

Université de Montréal

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes du sang de cordon et après greffe de sang de  
cordon

Par  
Emily Charrier

Programme de Sciences Biomédicales  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de  
doctorat en sciences biomédicales

Août 2010

© Emily Charrier, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes du sang de cordon et après greffe de sang de  
cordon

Présentée par :  
Emily Charrier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Carolina Alfieri  
(président-rapporteur)

Dr Michel Duval  
(directeur de recherche)

Dr Hélène Decaluwe  
(membre du jury)

Dr Jean-Pierre Routy  
(examineur externe)

Dr Denis-Claude Roy  
(représentant du doyen de la FES)

*A ma mamie Nicole.*

*Son intérêt pour mon travail et l'envoi de ses coupures de journaux sur le sang de cordon m'ont permis de continuer à voir l'utilité de mon travail. Merci.*

*On a beau chercher, on ne trouve jamais que soi-même.  
Anatole France*

*Vous savez ce que c'est que la recherche : on part sur une question et on trouve en cours de route des faits qui vous en posent une autre.  
Philippe Meyer*

*Certains moments ont un goût d'éternité.  
Marc Levy*

## RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

---

La greffe de sang de cordon est de plus en plus utilisée et a permis de traiter avec succès chez l'enfant des déficits immunitaires ainsi que des hémopathies malignes comme les leucémies. Malgré d'importants avantages tels que l'absence de risque pour le donneur ou la plus faible incidence de maladie du greffon contre l'hôte (GvHD), utiliser le sang de cordon comporte certains inconvénients. En effet, une reconstitution immunitaire retardée, des infections opportunistes en plus grand nombre et un risque de rechute sont des complications qui peuvent survenir et engendrer un risque pour le pronostic vital du patient. Par conséquent, de nouvelles stratégies d'immunothérapies doivent être envisagées.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés aux cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dont les fonctions sont importantes pour l'initiation des réponses immunitaires innée et adaptative et particulièrement pour leur capacité à activer les cellules NK. Afin d'élucider le rôle et l'impact de ces cellules dans les greffes de sang de cordon, le nombre et la fonction des pDC et des NK a été suivi longitudinalement chez des patients ayant subi une greffe de sang de cordon comparativement à des patients transplantés avec de la moelle osseuse. Nous avons ainsi démontré que les pDC et les NK apparaissent précocement suite à une greffe de sang de cordon et que ces cellules sont fonctionnelles. Ces résultats mettent donc en lumière que ces cellules pourraient être de bons outils pour l'établissement d'une immunothérapie après greffe de sang de cordon.

De plus, la caractérisation fonctionnelle des pDC du greffon de sang de cordon a permis de révéler une plus faible production d'IFN- $\alpha$  par les pDC, comparativement aux pDC de sang d'adulte. Cette différence pourrait jouer un rôle dans la plus faible incidence de GvHD après les greffes de sang de cordon. Dans le but de préciser les mécanismes moléculaires de régulation négative de la production

d'IFN- $\alpha$  par les pDC de sang de cordon, nous avons étudié les protéines de la voie de signalisation TLR9-IRF7. L'expression similaire de l'ARN du TLR9, MyD88, IRAK1 et IRF7 contraste avec la plus faible expression des protéines correspondantes. De plus, l'expression des MicroARNs miR-146a et miR-155 est plus élevée dans les pDC de sang de cordon comparativement aux pDC de sang d'adultes. Ensemble, ces données pointent une régulation négative post-transcriptionnelle de la voie TLR9-IRF7 qui pourrait expliquer la plus faible production d'IFN- $\alpha$  des pDC du sang de cordon.

L'ensemble de ces travaux suggère que les pDC pourraient représenter une cible de choix dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques dans les greffes de sang de cordon.

**MOTS CLÉS** : sang de cordon, immunothérapie, transplantation de cellules souches hématopoïétiques, cellules dendritiques plasmacytoïdes, leucémies.

## RÉSUMÉ EN ANGLAIS

---

Umbilical cord blood transplantation has increasingly been used as a source of hematopoietic stem cells to successfully treat immunodeficiencies and malignant diseases such as leukemia in pediatric patients. Despite important advantages, namely lack of risk for the donor and low incidence of GvHD, use of cord blood is associated with several drawbacks. Specifically, delayed immune reconstitution, more opportunistic infections and a relative risk of relapse are complications that may occur and lead to a poor prognosis. Consequently, new immunotherapeutic strategies should be considered.

In this study, we were interested in plasmacytoid dendritic cells (pDC), whose functions are important for initiation of innate and adaptive immune responses and, in particular, for their ability to activate natural killer cells (NK). In order to elucidate the role and the impact of these cells in cord blood transplantation, pDC and NK numbers and function have been longitudinally followed in cord blood and bone marrow recipients. We showed that pDC and NK cells appeared early after umbilical cord blood transplantation and that these cells retained functional activity. Thus, these cells may constitute a good tool for immunotherapy in umbilical cord blood transplantation.

Moreover, the functional characterization of pDC in cord blood revealed a lower production of IFN- $\alpha$  by cord blood pDC, which may play a role in the lower incidence of GvHD after umbilical cord blood transplantations. In order to determine the molecular mechanism for the negative regulation of IFN- $\alpha$  production by cord blood pDC, we studied the expression of TLR9-IRF7 pathway. The stable expression of TLR9, MyD88, IRAK1 and IRF7 mRNA contrasts with the lower expression of corresponding proteins. Interestingly, expression of microRNA miR-146a and miR-155 is higher in cord blood pDC. Together, these results point to a post-

transcriptional negative regulation of TLR9-IRF7 pathway which may explain the lower IFN- $\alpha$  production by cord blood pDC.

This work reinforces the idea that pDCs constitute a target of choice for developing new therapeutic approaches in cord blood transplantations.

**KEY WORDS :** cord blood, immunotherapy, hematopoietic stem cell transplantation, plasmacytoid dendritic cells, leukemia.

# TABLE DES MATIÈRES

---

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.....	iv
RÉSUMÉ EN ANGLAIS.....	vi
TABLE DES MATIÈRES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	1
INTRODUCTION.....	4
REVUE DE LITTÉRATURE.....	7
<b>I. La greffe de sang de cordon.....</b>	<b>8</b>
1- Les greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	8
2- Cas particulier : la greffe de sang de cordon.....	8
3- Les complications post-transplantation: particularités de la greffe de sang de cordon.....	9
A - L'échec et le rejet de greffe.....	10
A-1) Immunologie du rejet de greffe.....	10
A-2) Conditionnement.....	10
A-3) Évaluation de la prise de la greffe : sortie de neutropénie et chimérisme.....	11
A-4) Facteurs influençant la prise de la greffe.....	12
A-5) Nouvelles stratégies :.....	13
A-6) Reconstitution immunitaire.....	14
B - Les infections opportunistes.....	18
B-1) Les phases à risque des infections.....	18
B-2) Les types d'infections et les spécificités de la greffe de sang de cordon.....	19
C - La maladie du greffon contre l'hôte (GvHD).....	20
C-1) La pathophysiologie de la GvHD.....	21
C-2) Spécificités qui expliquent la moindre incidence de GvHD après greffe de sang de cordon.....	23
D - Les rechutes de leucémie.....	25
D-1) L'effet graft <i>versus</i> leukemia (GvL).....	26
D-2) Spécificités de la greffe de sang de cordon.....	27
4- Les avantages et désavantages de la greffe de sang de cordon.....	28
A - Les avantages pratiques.....	28
B - Les avantages cliniques.....	29
C - Les désavantages.....	29
<b>II. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC).....</b>	<b>31</b>
1- Immunologie des pDC.....	31
A - Morphologie et phénotype des pDC.....	31
A-1) Morphologie des pDC.....	31



A-2) Marqueurs de surface des pDC .....	32
A-3) TLR : senseurs des antigènes viraux.....	33
B - Développement des pDC.....	37
B-1) Les molécules régulatrices de la différenciation des pDC.....	37
B-2) Origine cellulaire des pDC : lignée myéloïde / lymphoïde.....	38
C - Localisation et migration des pDC.....	39
D - Fonctions des pDC.....	40
D-1) Cellules professionnelles de la production d'IFN de type I : pDC dans l'immunité innée .....	40
D-1-a) Production de cytokines par les pDC.....	40
D-1-b) Signalisation induite par les TLR7 et TLR9.....	42
❖ La voie d'activation conduisant à la production d'IFN de type I	42
❖ La voie de signalisation conduisant à la production de cytokines inflammatoires.....	43
❖ Rétro-contrôle négatif des voies de signalisation.....	44
D-1-c) Signalisation induite par les IFN- $\alpha/\beta$ .....	46
D-1-d) Rôle des IFN de type I dans l'immunité innée.....	49
D-2 Cellules présentatrices d'antigènes : pDC dans l'immunité adaptative .....	51
D-2-a) Maturation des pDC en DC .....	51
D-2-b) Capture et présentation d'antigènes.....	52
D-2-c) Cross-présentation d'antigènes et activation des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	52
D-2-d) Activation et polarisation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	54
❖ Les lymphocytes Th1 et Th2.....	55
❖ Les lymphocytes Th17 .....	56
❖ Les lymphocytes Treg.....	56
D - 3 Activité cytotoxique des pDC.....	58
2- Les pDC dans les greffes de cellules souches hématopoïétiques.....	59
A - Reconstitution des pDC.....	59
B - pDC dans les infections virales .....	61
B-1) Les infections par HSV .....	61
B-2) Les infections par le CMV .....	61
C - pDC et réponse anti-tumorale.....	62
C-1) Dans les tumeurs solides.....	63
C-2) Dans les leucémies.....	65
D - Tolérogénicité des pDC : impact sur la prise de la greffe et sur la GvHD .....	66
HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL .....	68
RÉSULTATS .....	71
<b>Article 1: Phenotypic and Functional Reconstitution of Plasmacytoid Dendritic and Natural Killer Cells: a Comparative Study of Bone Marrow and Umbilical Cord Blood Transplantation. ....</b>	<b>72</b>
ACKNOWLEDGMENTS:.....	75
ABSTRACT .....	76
INTRODUCTION.....	77

MATERIALS AND METHODS .....	80
Patients and controls.....	80
Determination of blood cell subsets and kinetics of reconstitution.....	81
Phenotyping and functional analysis of NK cells and pDC .....	82
In vitro pDC differentiation.....	83
Statistical analysis .....	83
RESULTS.....	84
Clinical outcomes.....	84
NK receptor expression following UCBT.....	88
Functional analysis of post-transplant NK cells.....	89
Functional analysis of post-transplant pDCs.....	90
<i>In vitro</i> differentiation of pDC from UCB or BM CD34 <sup>+</sup> cells .....	92
DISCUSSION .....	94
RÉFÉRENCES.....	97
<b>Article 2 : Post-Transcriptional Down-Regulation of Toll-Like Receptor Signaling Pathway in Umbilical Cord Blood Plasmacytoid Dendritic Cells is Associated with High Expression of miR-146a and miR-155 microRNAs.....</b>	<b>103</b>
ABSTRACT.....	106
INTRODUCTION.....	107
MATERIALS AND METHODS .....	109
Blood and bone marrow samples .....	109
Blood mononuclear cells isolation, PDC purification and stimulation .....	109
Flow cytometry analysis.....	110
FITC-dextran uptake assays.....	110
Real time RT-PCR.....	111
IRF-7 translocation by confocal immunofluorescence microscopy.....	111
ELISA.....	112
Statistical analysis .....	112
RESULTS.....	113
Differentiation phenotype of UCB PDC .....	113
Functional properties of UCB PDCs.....	115
Antigen uptake of UCB PDCs upon stimulation.....	118
Low expression of the TLR-9/IRF-7 pathway proteins in UCB PDC .....	118
High expression of miR-146a and miR-155 in UCB PDCs.....	120
DISCUSSION .....	122
ACKNOWLEDGMENTS.....	125
RÉFÉRENCES.....	126
DISCUSSION .....	131
<b>1 - Choix de l'étude des pDC.....</b>	<b>132</b>
<b>2 - Facteurs influençant la fonction des pDC : patients, greffon et immunosuppresseurs.....</b>	<b>134</b>
1- Age, sexe et maladie du patient .....	134
2- Source de cellules souches hématopoïétiques.....	134
3- Dose cellulaire du greffon.....	135
4- Immunosuppresseurs.....	135
<b>3 - Facteurs influençant la fonction des pDC : environnement.....</b>	<b>137</b>

<b>4 - Influence de la reconstitution de l'axe pDC/NK sur les complications de greffes de sang de cordon.....</b>	<b>139</b>
1- Infections virales.....	139
2- GvHD.....	141
3- Rechute.....	142
<b>5 - Différences fonctionnelles des pDC de sang de cordon : atout pour une immunothérapie ?.....</b>	<b>142</b>
1- Immaturité versus différences fonctionnelles ? .....	142
2- Tolérance ?.....	144
3- pDC tolérogènes du sang de cordon : atout pour les greffes de sang de cordon ? .....	147
<b>6 - Axe pDC/NK : cible pour une immunothérapie ?.....</b>	<b>148</b>
<b>7 - Perspectives.....</b>	<b>151</b>
Références .....	153
ANNEXES .....	187
<b>Revue 1: Immunologie néonatale et greffe de sang de cordon.....</b>	<b>188</b>
<b>Revue 2: Complementary and Contrasting Roles of NK cells and T cells in Pediatric Umbilical Cord Blood Transplantations.....</b>	<b>193</b>

# LISTE DES TABLEAUX

---

TABLEAU 1 : IMMUNOLOGIE DU SANG DE CORDON: CAUSES POSSIBLES DE LA PLUS FAIBLE INCIDENCE ET SÉVÉRITÉ APRÈS GREFFE DE SANG DE CORDON.....	24
TABLEAU 2 : AVANTAGES ET DÉSAVANTAGES DE LA GREFFE DE SANG DE CORDON PAR RAPPORT À UNE GREFFE DE MOELLE OSSEUSE.....	28
TABLEAU 3 : PHÉNOTYPE DES PDC HUMAINES. ....	33
TABLEAU 4 : EXPRESSION DES TLR PAR LES DIFFÉRENTES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES ET PAR LES MONOCYTES.....	34
TABLEAU 5 : IMMUNOTHÉRAPIES DES CANCERS BASÉES SUR LES PDC.....	65
TABLEAU 6 : PATIENT’S CHARACTERISTICS .....	81
TABLEAU 7 : TRANSPLANTATION OUTCOMES FOLLOWING BMT AND UCBT.....	85

## LISTE DES FIGURES

---

FIGURE 1 : TRANSPLANTATIONS DU PROGRAMME NATIONAL DES DONNEURS DE MOELLE OSSEUSE (NMDP) CHEZ LES PATIENTS PÉDIATRIQUES SELON LA SOURCE DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES.....	9
FIGURE 2 : RECONSTITUTION DES CELLULES DENDRITIQUES, DES CELLULES NK ET DES LYMPHOCYTES T APRÈS UNE GREFFE DE SANG DE CORDON. ....	15
FIGURE 3 : INFECTIONS OPPORTUNISTES APRÈS GREFFE DE SANG DE CORDON. ....	18
FIGURE 4 : LES ÉTAPES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA MALADIE DU GREFFON CONTRE L'HÔTE. ....	21
FIGURE 5 : MORPHOLOGIE DES PDC .....	31
FIGURE 6 : SIGNALISATION INDUITE PAR LES TLR7 ET TLR9 DANS LES PDC. ....	37
FIGURE 7 : MÉCANISMES DE CONTRÔLE DE LA PRODUCTION DES IFN DE TYPE I PAR LES PDC. ....	44
FIGURE 8 : VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR LES IFN DE TYPE I. ....	47
FIGURE 9 : STIMULATION DE L'IMMUNITÉ INNÉE PAR LES PDC. ....	50
FIGURE 10 : POLARISATION DE L'IMMUNITÉ ADAPTATIVE PAR LES PDC. ....	55
FIGURE 11 : RÔLE DES PDC DANS L'IMMUNITÉ ANTI-TUMORALE. ....	63
FIGURE 12 : IMMUNE RECONSTITUTION AFTER UCBT AND BMT.....	87
FIGURE 13 : PHENOTYPIC ANALYSIS OF NK CELLS AFTER UCBT AND BMT.....	88
FIGURE 14 : FUNCTIONAL ANALYSIS OF NK CELLS AFTER UCBT AND BMT. ....	90
FIGURE 15 : FUNCTIONAL ANALYSIS OF PDC AFTER UCBT AND BMT.....	91
FIGURE 16 : <i>IN VITRO</i> PDC GENERATION FROM UCB OR BM CD34 <sup>+</sup> CELLS .....	93
FIGURE 17 : DIFFERENTIATION OF UCB PDC.....	114
FIGURE 18 : FUNCTIONAL PROPERTIES OF UCB PDCs. ....	115
FIGURE 19 : MATURATION OF UCB PDC.....	116
FIGURE 20 : MATURATION OF UCB PDC AND ANTIGEN UPTAKE UPON STIMULATION. ....	117
FIGURE 21 : MRNA AND PROTEIN EXPRESSION OF THE TLR-9/IRF-7 SIGNALING PATHWAY. ....	119
FIGURE 22 : IRF-7 NUCLEAR TRANSLOCATION IN UCB PDCs.....	120
FIGURE 23 : INCREASED EXPRESSION OF miR-146A AND miR-155 MICRORNAs IN UCB PDCs. ....	121

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

---

### A

ADN : acide désoxyribonucléique  
 ADNc : ADN complémentaire  
 Ag : antigène  
 AP-1 : activator protein 1  
 APC : allophycocyanine  
 ARN : acide ribonucléique  
 ARNm : acide ribonucléique messenger  
 ATG : antithymocyte globuline  
 ATL : adult-T leukemia/lymphoma

### B

BCAP : B cell adaptor protein  
 BCR : B cell receptor  
 BDCA : blood dendritic cell antigen  
 BLNK: B cell linker  
 BSA: bovine serum albumin  
 BST2 : bone marrow stromal cell antigen 2  
 BTK: Bruton's tyrosine kinase

### C

CBMC : cord blood mononuclear cells  
 CBP : CREB-binding protein  
 CD : cluster de différenciation  
 CDP : progéniteur commun des cellules dendritiques  
 CLP : progéniteur lymphoïde commun  
 CLR : C-type lectin receptor  
 CMP : progéniteur myéloïde commun  
 CMV : cytomégalovirus  
 CpG : cytosine phospho guanine  
 CREB : cAMP-response element binding protein  
 CSH : cellules souches hématopoïétiques  
 CTL : lymphocyte T cytotoxique

### D

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DCIR : dendritic cell immunoreceptor  
 DC-SIGN : dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin  
 DLI : infusion de lymphocyte du donneur

### E

EBV : virus de l'Epstein-Barr  
 EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid  
 ERK : extracellular signal-regulated kinase

### F

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting  
 FBS: fetal bovin serum  
 FcR: récepteur au fragment Fc des immunoglobulines  
 FCS: fetal calf serum  
 FITC: fluoresceine isothiocyanate  
 FLT3-L : fms-related tyrosine kinase – 3 ligand  
 FoxP3: forkhead box P3  
 FSC: forward scatter

### G

G-CSF : facteur stimulant les colonies de granulocytes (Granulocyte colony-stimulating factor)  
 GITR : glucocorticoid-induced TNF receptor  
 GvHD : graft versus host disease  
 GvL : graft versus leukemia

### H

HDAC : histone deacetylase  
 HEV : veinule à endothelium épais

HHV-6 : virus humain de l'herpes 6  
 HLA : antigène leucocyte humain  
 (human leucocyte antigen)  
 HSV : virus de l'herpes simplex

**I**

IDO : indoleamine 2,3-dioxygenase  
 IFN : interféron  
 Ig : immunoglobuline  
 IKK : I $\kappa$ B kinase  
 IL : interleukine  
 ILT-7 : immunoglobulin-like  
 transcript 7 ligand  
 IRAK : IL-1R-associated kinase  
 IRF7 : facteur régulateur des  
 interférons 7 (Interferon regulatory  
 factor 7)  
 ISGF : IFN-stimulated gene factor  
 ISRE : IFN-stimulated response  
 element  
 ISS : séquence immunostimulatoire  
 ITAM : immunoreceptor-based  
 tyrosine activation motif  
 I $\kappa$ B : inhibitor of NF- $\kappa$ B

**J**

JAK: Janus kinase

**K**

KIR: killer-cell inhibitory receptor

**L**

Lin : lineage  
 LLA : leucémie lymphoïde aigue  
 LMA: leucémie myéloïde aigue  
 LMC: leucémie myéloïde chronique  
 LPS: lipopolysaccharide  
 LRR : leucine rich repeat  
 LSA: antigène spécifique de leucémie

**M**

MALT: tissu lymphoïde associé aux  
 muqueuses  
 MAPK : mitogen activated protein  
 kinase

mDC: cellule dendritique myéloïde  
 MDA5: melanoma differentiation  
 associated antigen 5

MFI: median fluorescence intensity  
 mHAg: antigène mineur  
 d'histocompatibilité

MO : moelle osseuse

MoDC : cellule dendritique générée à  
 partir de monocyte

mTOR : mammalian target of  
 rapamycin

MyD88 : myeloid differentiation gene  
 88

**N**

NDV: virus de la maladie de  
 Newcastle

NF- $\kappa$ B : Facteur nucléaire kappa B  
 (Nuclear factor-kappa B)

NK: Cellules tueuses naturelles  
 (Natural killer cell)

NMDP: national marrow donor  
 program

NOD: non obese diabetic

**O**

ODN: oligodéoxynucléotide

**P**

PBMC: peripheral blood mononuclear  
 cells

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

pDC: Cellules dendritique  
 plasmacytoïdes (plasmacytoid  
 dendritic cells)

PE : phycoerythrine

PI3K : phosphoinositide 3 kinase

**R**

RE: reticulum endoplasmique

RIC: conditionnement atténué  
 (reduced intensity conditioning)

RIG-1: retinoid-inducible gene 1

ROR: RAR-related orphan receptors

**S**

SCID: déficience immune combine  
sévère (Severe Combine Immune  
Deficiency)  
SSC: size scatter  
STAT: signal transducer and activator  
of transcription  
SV: Sendai virus

**T**

TAK: TGF- $\beta$  activated kinase  
TCR: T-cell receptor  
Th: T helper  
TIR: toll/IL-1R  
TLR: toll-like receptor  
TNF: tumor necrosis factor  
TRAF: TNF-receptor associated factor

TRAIL: TNF-related apoptosis  
inducing ligand  
Treg: cellules T régulatrices  
TREM: triggering receptor expressed  
by myeloid cells  
Tyk: tyrosine kinase

**V**

VEGF: vascular endothelium growth  
Factor  
VIH: virus d'immunodéficience  
humaine  
VSV: virus de la stomatite vésiculaire  
VZV: virus de la varicelle et du zona

**W**

WT-1: Wilm's tumor-1



# REMERCIEMENTS

---

Comme le veut la tradition, je vais tenter de satisfaire au difficile exercice de la page des remerciements. Non qu'exprimer ma gratitude envers les personnes en qui j'ai trouvé un soutien soit contre ma nature, bien au contraire. La difficulté tient plutôt dans le fait de n'oublier personne. Ce travail n'aurait pas pu être accompli sans l'aide consciente ou inconsciente d'un certain nombre de personnes. Je tiens ici à les remercier, en m'excusant par avance pour toutes celles que j'aurais pu oublier sans le vouloir. Merci à tous ceux qui m'ont "supportée" dans les deux sens (anglais et français) pendant ces 5 ans. Cette période représente environ 5% de la vie; c'est déjà 10 fois plus que le pourcentage de pDC dans le sang! Et quand on voit tout ce qu'elles sont capables de faire....ça donne de belles perspectives pour la suite....

Je voudrais tout de suite remercier le FRSQ et la Fondation Charles-Bruneau pour avoir subventionné ce travail, ainsi que les Fondation Cole, Fondation des Étoiles et la Fondation du CHU Sainte Justine pour m'avoir accordé des bourses de doctorat.

La première personne que je tiens à remercier est Michel Duval, mon directeur, pour avoir accepté « une petite montagnarde de France » dans ton laboratoire et ainsi de nous avoir donné l'opportunité de venir vivre au Québec. Tu as su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé. J'espère avoir pu réussir à « gravir les montagnes des voies de signalisation des pDC ».

Merci aussi à Dr José Menezes qui m'a trouvé un petit coin de paille dans son laboratoire en attendant qu'on ait le nôtre. Merci surtout pour vos conversations et votre intérêt pour ce travail, ainsi que pour tous vos précieux conseils.

Je voudrais aussi remercier Carolina Alfieri pour toute l'aide que vous m'avez apportée pour comprendre et résoudre les problèmes administratifs lors de mon admission à l'université. Je voudrais aussi vous remercier pour avoir accepté d'être présente sur mon jury de pré-doc et de thèse et pour m'avoir encouragée à publier mes résultats. Vous m'aurez ainsi suivi tout au long de mon parcours parfois semé d'embûches.

Merci à Hélène Decaluwe, Jean-Pierre Routy et Denis-Claude Roy d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'avoir apporté des commentaires à mon travail, ce qui a permis de grandement l'améliorer.

Je souhaiterais aussi remercier tous les membres du GRETISC : Carolina Alfieri, Christian Beauséjour, Elie Haddad, Nikolaus Heveker, Françoise LeDeist, Isabelle Louis, José Menezes, Philippe Ovetchkine, Hugo Soudeyns et Éric Wagner

pour leurs remarques et leurs commentaires qui ont permis de faire avancer ce travail dans la bonne direction.

Merci aussi à Eric Wagner, Isabelle Louis et Hugo Morin, nos porteurs de bonnes nouvelles : « y'a un sang de cordon. Quelqu'un est intéressé ? »...même si ça arrivait un vendredi. Sans vous, nous n'aurions pas eu la matière première pour ce travail. J'ai un remerciement spécial pour Hugo pour son soutien, sa bonne humeur même quand je revenais tous les jours lui demander de me trouver des informations sur les patients.

Merci aussi à l'équipe de recherche clinique, Nalwen, Yves-Lyne et Ingrid qui m'ont accueillie dans leur bureau. Et surtout merci à toi Samira pour toute ton aide avec les dossiers des patients. Sans toi, cela aurait été très très long et difficile de réunir toutes les informations cliniques dont j'avais besoin.

Merci aussi à Rose-Marie et Sylvie pour votre travail sur les pDC chez les patients. Vous m'en avez sauvé des heures de FACS ! Merci aussi d'avoir partagé avec moi votre expérience de maman.

«Faire une thèse» est une échappée solitaire au milieu de compagnons de fortune (ou d'infortune). Je souhaite donc vivement les remercier. Aux personnes avec qui j'ai travaillé, discuté et appris. Annie, on a commencé en même temps et on a tous appris sur la greffe de sang de cordon ensemble, on a aussi partagé des soupers et un week end de canot-camping, ainsi que des congrès. Merci aussi à Jamila et Souad pour toutes les discussions qu'on a eu ensemble. Jamila, ta bonne humeur a permis de mettre une bonne ambiance dans le laboratoire. Souad, merci d'avoir partagé avec moi ton point de vue sur le doctorat et la science en générale. Merci Michael. Tu es arrivé au bon moment dans le laboratoire, enfin je n'étais plus la seule étudiante du labo. Sabine, un gros merci pour toute ton aide et ton implication dans mon travail et notamment dans la correction de ma thèse. Sans toi, le travail sur les pDC du sang de cordon n'aurait jamais abouti. Merci de m'avoir encouragé dans la dernière ligne droite.

Je voudrais aussi dire un énorme merci à R'Kia. Tu as été ma grande sœur à notre arrivée à Montréal, tu m'as guidée dans toutes les étapes de notre installation ici, que se soit au niveau professionnel ou personnel. Tu as toujours été là quand tout allait bien mais surtout quand ça n'allait pas ou quand j'avais des doutes. Pour ta présence et ton soutien, merci.

Et pour finir, je souhaiterais remercier la personne qui m'a le plus aidé au laboratoire. Paulo, tu es vraiment quelqu'un d'incroyable. Tu m'as aidée aussi bien pour les manips et les problèmes techniques que pour les questions que je me posais concernant l'analyse des mes données : comment les présenter au mieux, quels test statistique utiliser. Tu as toujours de très bons conseils et tes remarques sont toujours pertinentes. Tu m'as aidé jusqu'à la dernière minute, quand mes références ont buggées. Tu es une personne qui mérite d'être connue est reconnue dans ton travail car je ne connais personne qui fait aussi bien les choses que toi et en plus tu apportes ton aide quand on te la demande. Donc, pour tout ca, un énorme merci. Cette thèse est

donc aussi un peu la tienne. D'ailleurs, si ça te tente de venir la soutenir oralement, y'a pas de problème ;-)

D'autres personnes n'ont pas forcément participé directement à mes travaux mais elles m'ont apporté des petits riens qui font un grand tout. Merci aux membres des laboratoires d'Elie Haddad et de Christian Beauséjour pour leur aide directe ou indirecte qui a facilité et contribué à la réalisation de mon travail de thèse : François, Joelle, Sonia, Massar, Arnaud, Sandra, Ludo, Clémence et Sylvia, ainsi que Cynthia, Basma, Ohan et Geneviève. Merci aussi aux membres du laboratoire d'Hugo Soudeyns : Mathieu, Natacha et Doris. Merci Doris, Natacha et Elodie pour les (quelques) séances de sport que j'ai fait avec vous et surtout pour les pauses café qui permettaient de se lâcher pour ne pas exploser.

Cela va de soi, je remercie évidemment ma famille pour son irremplaçable et inconditionnel soutien. Ils ont été présents pour écarter les doutes, soigner les blessures et partager les joies. Papa, maman, ca y'est je ne suis plus étudiante ! Merci aussi sister pour m'avoir aidé à imprimer ma thèse. J'aurai aimé être plus disponible pendant ton séjour à Montréal. J'aurai préféré te faire visiter le Mont-Royal ou le stade olympique de Montréal plutôt que le bureau et la photocopieuse de Sainte Justine ou le bureau de la secrétaire de l'université ;-)

Le plus fort de mes remerciements est pour Julien. Merci de m'avoir tenu la main jusqu'aux dernières lignes de ce mémoire. En plus de me supporter dans des conditions «normales», tu as du subir mon humeur en fin de thèse et souvent me pousser à me ressaisir. Tu as été une présence indispensable. Merci d'être là tous les jours. Et pour finir, merci à toi Noa. Ton arrivée m'a poussée à terminer ce travail rapidement. Et ta présence et tes sourires m'ont appris à relativiser les mauvaises journées au labo.

# **INTRODUCTION**

L

L

La greffe de sang de cordon est de plus en plus utilisée et a permis de traiter avec succès chez l'enfant des déficits immunitaires congénitaux, des aplasies médullaires congénitales ou acquises, d'autres anomalies innées du métabolisme, ainsi que des hémopathies malignes (leucémies aiguës et chroniques). Malgré d'importants avantages tels que l'absence de risque pour le donneur ou la plus faible incidence de maladie du greffon contre l'hôte (GvHD), utiliser le sang de cordon comporte certains inconvénients. En effet, une reconstitution immunitaire retardée, des infections opportunistes en plus grand nombre et un risque de rechute sont des complications qui peuvent survenir et engendrer un risque pour le pronostic vital du patient. Par conséquent, de nouvelles stratégies d'immunothérapies doivent être envisagées.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux cellules dendritiques plasmacytoides (pDC) tant au niveau du greffon que lors de la reconstitution immunitaire post-greffe. En effet, ces cellules jouent un rôle primordial dans l'initiation des réponses immunitaires aussi bien innée, qu'adaptative. De plus, dépendamment de l'environnement et de leur état d'activation, elles peuvent moduler les réponses immunitaires et ainsi influencer les complications immunologiques qui surviennent après une greffe. Au cours de cette thèse, il sera démontré que les pDC apparaissent précocement suite à une greffe de sang de cordon et que, contrairement aux greffes de moelle osseuse (MO), ces cellules sont capables de devenir des cellules dendritiques matures. Cependant, nous montrerons également que les pDC du greffon de sang de cordon sont caractérisées par une baisse de la production d'IFN- $\alpha$ . L'étude des voies de signalisation intracellulaires des pDC révélera une plus faible expression des protéines de la voie de signalisation menant à la production d'IFN- $\alpha$ .

La revue de la littérature sera orientée vers la greffe de sang de cordon avec un regard particulier sur les avantages et les désavantages de ce type de greffe par rapport aux greffes de MO. L'immunologie des pDC sera détaillée, en particulier, la voie de signalisation menant à la production des IFN de type I. De plus, l'emphase sera mise sur le potentiel des pDC dans le cadre des transplantations de cellules souches hématopoïétiques (CSH) et leur implication dans les réponses immunitaires innée et adaptative anti-virales et anti-tumorales. Fort de ces informations, notre hypothèse de travail, ainsi que nos objectifs seront présentés et démontrés sous la forme de 2 chapitres.

La section « résultats » sera divisée en 2 parties, chacune correspondant à un article scientifique. La première partie démontre que les pDC apparaissent rapidement et en nombre plus élevé après une greffe de sang de cordon. De plus, les pDC et les cellules tueuses naturelles (NK) sont plus importantes en nombre et sont matures et fonctionnelles. La deuxième partie révèle que les pDC du greffon de sang de cordon ne produisent pas d'IFN- $\alpha$  en raison d'une plus basse expression des protéines de la voie de signalisation TLR9-IRF7.

Une discussion générale établissant les liens entre les résultats présentés dans les différents articles terminera cette thèse.

## **REVUE DE LITTÉRATURE**

# I. La greffe de sang de cordon

## 1- Les greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

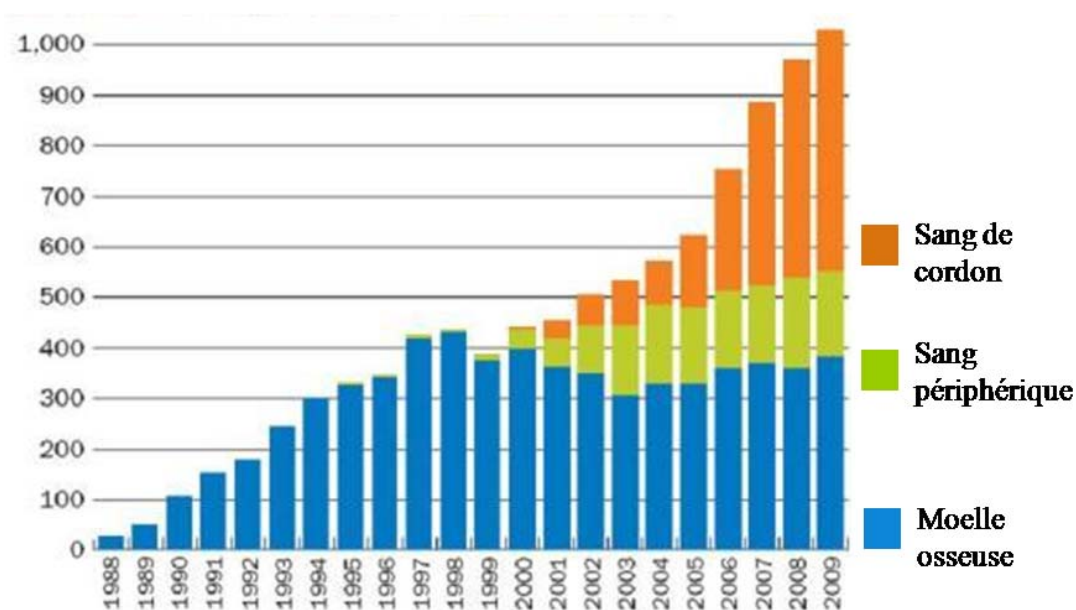
La transplantation de CSH est une procédure qui permet de remplacer le système immunitaire ou hématopoïétique déficient ou envahi par une prolifération leucémique. Pour ce faire, le patient subit un conditionnement qui induit une aplasie médullaire permettant d'éliminer les cellules résidant dans la moelle osseuse. Par la suite, des CSH sont infusées au patient afin de restituer un système immunitaire et hématopoïétique complet et sain. Cette stratégie thérapeutique est préconisée depuis plus de 30 ans pour soigner un grand nombre de déficits immunitaires congénitaux, des aplasies médullaires congénitales ou acquises, d'autres anomalies innées du métabolisme, ainsi que des hémopathies malignes (leucémies aiguës et chroniques) (Barker and Wagner, 2003b). Traditionnellement, les CSH provenaient de deux sources différentes : la MO et le sang périphérique enrichi en CSH par traitement du donneur avec du G-CSF (facteur de croissance qui fait migrer les CSH de la MO vers le sang périphérique). Malheureusement, seulement 30% des patients ont un donneur potentiel apparenté pour lequel la concordance HLA est de 6/6 ou 5/6 (HLA-A, B et DRB1). En l'absence d'un donneur apparenté, la recherche d'un greffon doit reposer sur le registre mondial de donneurs, ce processus pouvant prendre jusqu'à 4 mois. Cette procédure est encore plus compliquée et plus longue pour les patients non caucasiens puisque la grande majorité des donneurs sont caucasiens (Barker and Wagner, 2003b). Durant cette période, la progression de la maladie et la toxicité du traitement peuvent mener à une dégradation du pronostic. Pour cette raison, des traitements alternatifs ont été développés et notamment l'utilisation du sang de cordon comme source de CSH.

## 2- Cas particulier : la greffe de sang de cordon.

La découverte des CSH au sein du sang de cordon remonte à déjà plus de 35 ans. En effet, une étude de Knudtson *et al*, publié en 1974, a démontré que des cellules formant des colonies granulocytiques pouvaient se développer *in vitro* à partir du sang de cordon, mettant en lumière pour la première fois la présence de



CSH (Knudtson, 1974). Ce n'est que plusieurs années plus tard que Broxmeyer *et al.* ont établi *in vitro* qu'un sang de cordon contenait un nombre suffisamment important de CSH pour être transplantable (Broxmeyer *et al.*, 1989). En 1988, E. Gluckman accomplit avec succès la première greffe de sang de cordon chez un enfant atteint d'anémie de Fanconi (Gluckman *et al.*, 1989). Il s'agissait d'une greffe allogénique intra-familiale, le donneur étant la sœur dont le groupe HLA était identique à celui du receveur et qui était indemne de la maladie. Depuis 1988, des milliers d'enfants ont reçu des greffes de sang de cordon. En 2009, 1056 greffes de sang de cordon ont été recensées par le programme national des donneurs de moelle osseuse (NMDP), ce qui représente 22 % du nombre total de transplantations de CSH et une augmentation de plus de 18% par rapport à l'année 2008 (Voir figure 1).



**Figure 1 : Transplantations du Programme National des donneurs de moelle osseuse (NMDP) chez les patients pédiatriques selon la source de cellules souches hématopoïétiques.**

### **3- Les complications post-transplantation: particularités de la greffe de sang de cordon.**

Quelle que soit la provenance du greffon, un certain nombre de complications reliées à la transplantation peuvent survenir et peuvent même mener à la mort du

patient. L'incidence relative de chacune des complications est différente selon la source de CSH.

### **A - L'échec et le rejet de greffe**

L'échec de greffe (ou « non-prise ») se manifeste par une absence initiale de la prise du greffon alors que le rejet de greffe est caractérisé par une perte des cellules du donneur après une prise initiale de la greffe. Après une greffe de sang de cordon, l'incidence de l'échec de greffe est plus grande qu'après une greffe de moelle osseuse (Rocha et al., 2004; Rubinstein et al., 1998). Ceci est particulièrement dûe à un plus grand pourcentage de patient chez qui le greffon ne prend pas, le rejet de greffe étant très rare, aussi bien après une greffe de sang de cordon que de MO.

#### **A-1) Immunologie du rejet de greffe**

Il est maintenant très bien établi que le rejet du greffon est dû aux réponses immunitaires du receveur contre les cellules du donneur. En effet, la disparité HLA entre le donneur et le receveur est un facteur important dans le processus de rejet de greffe (Beatty et al., 1985). Plus précisément, des études ont montré que le rejet des greffons de CSH est médié par les cellules NK, les cellules NKT, et les lymphocytes T du receveur contre les cellules du donneur qui sont reconnues comme étrangères (Cudkowicz and Bennett, 1971a; Cudkowicz and Bennett, 1971b; Haraguchi et al., 2005; Blazar et al., 1996; Drobyski and Majewski, 1997; Vallera et al., 1994). Ceci signifie donc que le rejet de greffe entre donneur et receveur non apparenté est une des complications qui peut survenir fréquemment.

#### **A-2) Conditionnement**

Pour éviter cette complication reliée à la greffe, le système immunitaire du patient doit être détruit partiellement ou en totalité, par des traitements chimiothérapeutiques agressifs accompagnés parfois d'irradiation corporelle; on parle de conditionnement à la greffe. Généralement, un conditionnement classique est appelé myéloablatif lorsqu'il détruit les lignées myéloïdes et lymphoablatif, lorsqu'il détruit les lignées lymphoïdes. Le conditionnement induit donc une profonde immunosuppression ainsi

qu'une aplasie médullaire, permettant aux cellules du donneur de coloniser la moelle. Dans certains cas, le conditionnement peut être réduit (reduced conditioning intensity: RIC) et peut être non-myéloablatif. Le type de conditionnement et son intensité varient en fonction de la pathologie pour laquelle la greffe est utilisée. Généralement, le conditionnement donné aux patients avant une greffe de sang de cordon est myéloablatif et lymphoablatif. Au centre hospitalier universitaire Sainte Justine, les patients reçoivent, pour la plupart, de l'anti-thymoglobuline (ATG), du busulfan et du cyclophosphamide.

### A-3) Évaluation de la prise de la greffe : sortie de neutropénie et chimérisme

La prise des cellules du donneur est évaluée d'une part, par l'analyse de la reconstitution des neutrophiles et des plaquettes, et d'autre part, par une analyse du chimérisme donneur/receveur. Pour considérer qu'il y a prise complète de la greffe, le patient doit être sorti de neutropénie et son chimérisme doit être supérieur à 90% du donneur. Un chimérisme partiel du donneur indique donc une prise partielle du greffon chez le receveur.

Une étude comparative a montré que l'atteinte d'un chimérisme complet du donneur est plus lente après une greffe de sang de cordon qu'après une greffe de moelle osseuse (Sugita et al., 2008). Les auteurs ont déterminé le pourcentage de chimérisme du donneur aux jours 7, 14, 21 et 28 après greffe. Ils ont ainsi pu montrer qu'à 7 et 14 jours post-greffe, le chimérisme du donneur est à 14.3% et 55.8% après greffe de sang de cordon alors qu'il est de 43.3% et 84.5% après greffe de moelle osseuse. Néanmoins, à 21 et 28 jours post-greffe, aucune différence significative n'a été observée entre les deux sources de CSH, les deux groupes ayant atteint un chimérisme complet du donneur (Sugita et al., 2008). Ainsi, ce retard dans l'aboutissement du chimérisme complet du donneur après une greffe de sang de cordon peut être une des raisons expliquant le délai dans la prise de la greffe et la plus forte incidence d'échec de greffe.

Depuis maintenant plus de 10 ans, il apparaît clairement que la reconstitution des neutrophiles et des plaquettes est plus lente après greffe de sang de cordon,

comparativement aux autres sources de CSH. En effet, alors qu'après greffe de MO non apparentée le temps médian de la sortie de neutropénie se situe autour de 20 jours après greffe les neutrophiles apparaissent environ 27 jours après greffe de sang de cordon. La reconstitution des plaquettes est aussi retardée, le temps médian de sortie des plaquettes est de 27 après greffe de MO contre 59 après greffe de sang de cordon (Laughlin et al., 2004; Rocha et al., 2000; Sugita et al., 2008; Dalle et al., 2004; Locatelli et al., 1999; Gluckman et al., 1997; Rubinstein et al., 1998; Kurtzberg et al., 1996; Wagner et al., 1996). En résumé, il apparaît de façon évidente que la prise de la greffe est plus lente après une greffe de sang de cordon, comparativement à une greffe de MO. Ce retard dans la reconstitution des neutrophiles peut contribuer à rendre le patient susceptible à certaines complications comme les infections opportunistes (développées plus loin). Il est donc nécessaire de mieux comprendre les facteurs influençant la prise de la greffe afin d'envisager de nouvelles stratégies pour limiter cette complication.

#### A-4) Facteurs influençant la prise de la greffe

Plusieurs facteurs sont connus pour influencer la reconstitution des neutrophiles et des plaquettes. Une étude reportant les transplantations de sang de cordon de 45 centres révèle l'importance de la dose cellulaire comme un prédicteur de la prise de la greffe (Gluckman et al., 1997). En effet, les patients transplantés avec des cordons non apparentés contenant moins de 37 millions de cellules nucléées par kg de receveur nécessitent une médiane de 34 jours pour sortir de neutropénie et une médiane de 134 jours pour sortir de thrombopénie. Ces nombres diminuent à 25 et 47 jours pour des patients recevant des greffons de sang de cordon contenant plus de 37 millions de cellules nucléées par kg (Gluckman et al., 1997). Un an plus tard, Rubinstein et al. ont aussi démontré que le nombre de leucocytes par kg dans l'unité de sang de cordon corrèle avec le temps de prise de la greffe (Rubinstein et al., 1998). Cette étude et d'autres ont aussi révélé que la cinétique de la prise des neutrophiles et des plaquettes est reliée au degré de disparité HLA (Rubinstein et al., 1998; Laughlin et al., 2001; Eapen et al., 2007). Ces observations soulignent donc la relation qu'il existe entre la disparité HLA, la dose cellulaire du greffon et la prise de la greffe,

comme cela avait déjà été clairement établi pour les greffons de MO (Paulin, 1992; Mavroudis et al., 1996; Sierra et al., 1997). Au vue de l'importance du degré de disparité HLA et de la dose cellulaire dans la prise de la greffe, l'ensemble de ces études soulignent la nécessité d'apporter un intérêt particulier dans le choix de l'unité de sang de cordon.

#### A-5) Nouvelles stratégies :

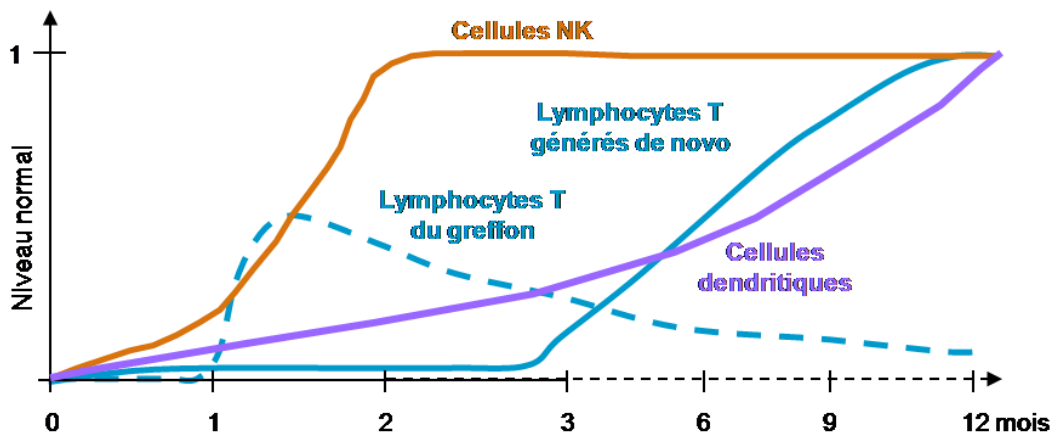
Puisque les unités de sang de cordon contiennent généralement 10 à 20 fois moins de cellules nucléées qu'une unité de moelle osseuse, de nouvelles stratégies se sont développées afin de contrer l'impact négatif de la dose cellulaire du greffon sur la prise de la greffe (Barker and Wagner, 2003a). Ceci inclut l'utilisation de plusieurs unités de sang de cordon, la co-infusion de cellules souches mésenchymateuses, l'injection du sang de cordon directement dans la moelle osseuse ou l'expansion des précurseurs et des cellules souches hématopoïétiques *ex vivo* (Barker et al., 2005b; Fernandez et al., 2003; Jarosca et al., 2003; Kros et al., 2003). L'expansion *ex vivo* a démontré un potentiel pour améliorer la prise des neutrophiles, même quand la dose de cellules injectée est sous-optimale (McNiece et al., 2000). Très récemment, l'expansion de cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon via Notch et l'infusion de ces cellules *in vivo* a considérablement réduit le temps de sortie de neutropénie. Néanmoins, cette expansion semble aboutir à une absence de persistance *in vivo* à long-terme (Delaney et al., 2010). Cette approche semble donc prometteuse et continue d'être activement investiguée afin d'être améliorée.

Une autre approche pour augmenter le nombre de cellules totales infusées est l'injection de plusieurs unités de sang de cordon à un seul patient, élargissant donc l'utilisation du sang de cordon aux adolescents de fort poids, ainsi qu'aux adultes. Non seulement cette approche a montré dans un modèle de souris NOD-SCID une amélioration de la prise de la greffe comparativement à l'injection d'une seule unité, mais en plus, cette stratégie thérapeutique est déjà à l'essai cliniquement. En 2005, une première étude a été exclusivement dédiée à évaluer la sûreté des transplantations de double cordon chez des patients adultes (Barker et al., 2005b). Les patients avec une maladie maligne de haut risque ont été transplantés avec deux unités de sang de

cordon présentant une disparité HLA partielle et tous ont présenté une prise des neutrophiles 23 jours après la greffe sans démontrer une augmentation de l'incidence de maladie du greffon contre l'hôte (Barker et al., 2005b). De manière intéressante, la majorité (76%) des patients affichaient une prise de greffe provenant de seulement l'une des deux unités. De plus, cette même étude a montré que le greffon prédominant était celui qui contenait une dose significativement plus importante de cellules CD3<sup>+</sup> (Barker et al., 2005b). Ces données n'ont toutefois pas été retrouvées dans les études ultérieures et les déterminants qui conduisent à la prise d'un greffon plutôt qu'un autre restent mystérieux. D'autres études cliniques ont montré la sûreté et l'efficacité des transplantations de double sang de cordons (Ballen et al., 2007; Brunstein et al., 2007), sans toutefois mettre en évidence des paramètres prédictifs pour déterminer quelle unité prédominerait chez le patient. Puisque toutes ces avenues de recherche ont pour but de raccourcir le temps de prise de la greffe, ces nouvelles stratégies permettraient ainsi d'améliorer l'efficacité de la greffe de sang de cordon en diminuant la mortalité liée à la greffe.

#### A-6) Reconstitution immunitaire

Une reconstitution immunitaire rapide est indispensable afin d'éviter un certain nombre de complications qui peuvent survenir après une transplantation de CSH. Je ne décrirai, ici, que la reconstitution des cellules impliquées dans les principales complications, soit les cellules dendritiques, les cellules NK et les lymphocytes T, avec une emphase particulière sur la reconstitution de ces cellules après une greffe de sang de cordon (voir figure 2).



**Figure 2 : Reconstitution des cellules dendritiques, des cellules NK et des lymphocytes T après une greffe de sang de cordon.**

- La reconstitution des cellules NK est rapide et elle est généralement complétée en termes de nombre et de fonction dès deux mois après une greffe de sang de cordon, comme cela a été observée chez les receveurs de MO (Thomson et al., 2000; Giebel et al., 2005; Beziat et al., 2009; Moretta et al., 2001). Cette reconstitution n'est pas influencée par la dose cellulaire du greffon. Les cellules NK sont présentes dans le sang périphérique 2 à 3 semaines après greffe et constituent jusqu'à 80 % des lymphocytes périphériques du receveur durant les 3 premiers mois. Quelques études ont révélé l'importance du phénotype des cellules NK émergentes pour le résultat de la greffe. Les cellules NK sont divisées en deux sous-populations selon l'intensité d'expression du marqueur CD56 : les CD56<sup>bright</sup> et les CD56<sup>dim</sup>. Alors que les cellules NK CD56<sup>bright</sup> ont une faible activité cytotoxique et expriment préférentiellement le récepteur inhibiteur NKG2A, les cellules NK CD56<sup>dim</sup> sont caractérisées par leur forte activité cytolytique et l'expression de récepteurs inhibiteurs KIR (killer-immunoglobulin-like receptor). Le phénotype des cellules NK post-greffe est caractérisé par une prédominance transitoire de la population CD56<sup>bright</sup>, qui exprime préférentiellement le récepteur NKG2A et a une faible activité cytotoxique (Nguyen et al., 2005; Vago et al., 2008). Certaines études ont suggéré que le phénotype et le répertoire des récepteurs inhibiteurs exprimés sur les cellules NK au cours de la reconstitution pourrait jouer un rôle sur l'issue de la transplantation (Shilling et al., 2003; Zhao et al., 2007). En effet, des patients exhibant des cellules NK exprimant le

récepteur NKG2A ou qui ont reçu un greffon avec une grande fréquence de cellules exprimant NKG2A connaissent une plus forte incidence de mortalité liée à la transplantation, ainsi qu'une diminution de la survie sans leucémie (Zhao et al., 2007). A l'inverse, de grandes fréquences de cellules NK exprimant les récepteurs inhibiteurs KIR chez le receveur semble avoir un impact positif sur le résultat de la greffe. Cependant, des grandes quantités de cellules T dans le greffon et le développement d'une GvHD aiguë altère la reconstitution des cellules KIR<sup>+</sup> et aggrave le pronostic (Cooley et al., 2005; Zhao et al., 2007). La population de cellules NK CD56<sup>dim</sup> cytotoxiques émerge aussi rapidement durant les deux premiers mois suivant la greffe de sang de cordon (Brahmi et al., 2001). Et il a été montré que ces cellules sont capables d'une activité cytotoxique via les voies granzyme/perforine et Fas/Fas-L (Brahmi et al., 2001).

- La vaste majorité des lymphocytes T présents durant les 3 premiers mois après une greffe de sang de cordon sont des lymphocytes T provenant du greffon et qui s'expandent chez le patient lymphopénique (Klein et al., 2001; Mackall et al., 1996). Cette expansion mène à un rétrécissement du répertoire du TCR (Klein et al., 2001) et à la différenciation des cellules T naïves en cellules 'mémoire-like' CD3<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> (Hamilton and Jameson, 2008; Cheung et al., 2009). Une deuxième vague de lymphocytes T apparaît après 3 mois et ces cellules sont caractérisées par leur phénotype naïf CD3<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>. Ces cellules proviennent de la thymopoïèse et en absence de GvHD, mène à la formation d'un répertoire diversifié et fonctionnel environ 1 an après la greffe (Moretta et al., 2001; Niehues et al., 2001; Klein et al., 2001). De façon intéressante, deux ans après la transplantation, une plus grande diversité de répertoire TCR est observée chez les receveurs de sang de cordon, comparativement aux receveurs de MO (Talvensaari et al., 2002). Néanmoins la reconstitution des cellules T n'atteint pas un nombre normal avant 9 mois (Klein et al., 2001).
- Peu d'informations sont disponibles sur la reconstitution des cellules dendritiques après transplantation de CSH. Puisqu'aucune étude ne s'est intéressée à ces cellules

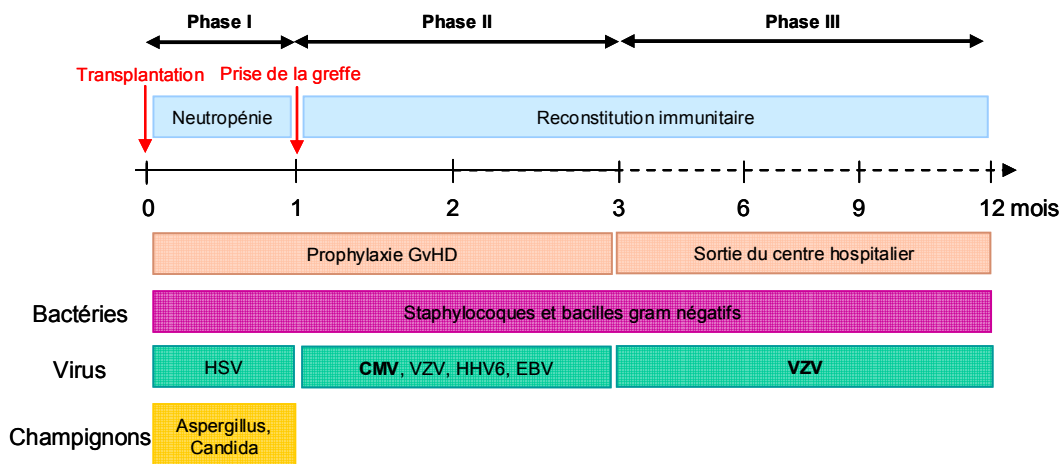


après greffe de sang de cordon, je présenterai ici ce qui est connu pour les greffes de CSH en général. Les cellules dendritiques du donneur peuvent être détectées dans le sang périphérique durant les premières semaines après la greffe, mais leur nombre n'atteint pas un niveau normal avant plus d'un an (Chklovskaja et al., 2004; Giraud et al., 2005; Porta et al., 2004). De plus, la GvHD aiguë, ainsi que l'utilisation de glucocorticoïdes et de G-CSF altèrent la reconstitution des cellules dendritiques circulantes (Fagnoni et al., 2004; Kitawaki et al., 2003; Arpinati et al., 2004; Horvath et al., 2009). Mais la dose des cellules CD34<sup>+</sup> du greffon n'influence pas la reconstitution des cellules dendritiques (Urbini et al., 2003). De plus, même si les cellules dendritiques du sang périphérique de patient proviennent du donneur, il semblerait que plus de 70% des cellules dendritiques présentes dans les tissus restent du receveur et pourraient persister jusqu'à un an post greffe (Bogunovic et al., 2006; Auffermann-Gretzinger et al., 2002; Auffermann-Gretzinger et al., 2006). Cette persistance des cellules dendritiques de l'hôte est associée au développement de la GvHD (Chan et al., 2003). De plus, il semblerait que les cellules dendritiques émergeant après greffe de MO ont un défaut dans la production d'IFN de type I (Giraud et al., 2005). Cliniquement, il a été observé que les patients greffés avec un greffon contenant un nombre élevé de cellules dendritiques et ayant une reconstitution immunitaire précoce ont une meilleure survie à long terme (Mohty et al., 2005; Talam et al., 2007). Dans le même ordre d'idée, il a été montré que de faibles nombres de cellules dendritiques après une transplantation allogénique semblent prédire la rechute et le développement d'une GvHD, ainsi que la susceptibilité aux infections (Reddy et al., 2004; Kitawaki et al., 2003; Horvath et al., 2009). Ensemble, ces données soulignent l'importance d'une reconstitution précoce des cellules dendritiques pour les résultats de transplantations de CSH. De plus, ces cellules pourraient être utilisées comme outils immunothérapeutiques dans le but d'améliorer les greffes de CSH (développé plus loin). Or, jusqu'à maintenant, aucune étude ne s'est intéressée à la reconstitution des cellules dendritiques après une greffe de sang de cordon.

## B - Les infections opportunistes

### B-1) Les phases à risque des infections

Traditionnellement, on reconnaît 3 phases à risque d'infection pour les patients transplantés (Figure 3).



**Figure 3 : Infections opportunistes après greffe de sang de cordon.**

La première phase correspond à la période de neutropénie. Durant cette période, les infections bactériennes et fongiques, notamment les infections à *Candida* sont fréquentes. Tous les patients reçoivent donc une prophylaxie à base d'antibiotiques à large spectre contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. De plus, des réactivations virales sont généralement rencontrées, comme par exemple la réactivation du virus de l'herpes simplex (HSV). Pour limiter le risque de réactivation, une prophylaxie avec de l'acyclovir est recommandée. La deuxième phase à risque commence à la sortie de neutropénie et se poursuit jusqu'à l'arrêt du traitement immunosuppresseur contre la GvHD aiguë vers 100-180 jours post-greffe. Cette phase se caractérise par des infections virales dues au cytomégalovirus (CMV) ou au virus de la varicelle (VZV), en raison de la lente reconstitution de l'immunité cellulaire adaptative. Une prophylaxie utilisant du ganciclovir prévient ainsi le risque de la maladie à CMV mais retarde la reconstitution immunitaire spécifique et ainsi favorise l'apparition tardive d'infection à CMV. Ainsi, cette prophylaxie reste réserver aux patients à haut-risque. Des infections par le virus de l'herpes de type 6 (HHV-6) et par le virus Epstein-Barr (EBV) peuvent parfois survenir. La troisième

phase à risque commence ensuite, le patient étant alors davantage exposé à divers pathogènes. De plus l'immunité cellulaire et humorale étant encore diminuées, des réactivations virales notamment VZV peuvent arriver au cours de cette période.

#### B-2) Les types d'infections et les spécificités de la greffe de sang de cordon

Un certain nombre d'études ont comparé la fréquence des infections opportunistes selon la source des CSH. Cependant, l'interprétation des données est compliquée par l'hétérogénéité des types d'infections et des populations de patients. Néanmoins, certaines études (Rocha et al., 2001; Rocha et al., 2000; Eapen et al., 2007; Atsuta et al., 2009), mais pas toutes (Rocha et al., 2004; Parody et al., 2006; Barker et al., 2005a) ont révélées que la mortalité attribuée aux infections est plus grande parmi les receveurs de sang de cordon, comparativement aux autres sources de CSH provenant de donneurs non apparentés, particulièrement avant le jour 100 post-greffe. Les infections opportunistes représentent entre 15 et 47% des causes de mortalité après greffe de sang de cordon (Rubinstein et al., 1998; Gluckman et al., 1997; Locatelli et al., 1999; Barker et al., 2001; Rocha et al., 2001; Rocha et al., 2004; Laughlin et al., 2004).

Parmi ces infections, les infections bactériennes sont les plus fréquentes et surviennent plus généralement avant le jour 100 post greffe (Barker et al., 2005a; Parody et al., 2006; Hamza et al., 2004). Parmi les enfants, un âge plus élevé est associé à un risque plus élevé de bactériémie (Yazaki et al., 2009).

Les infections fongiques et les infections à levure se produisent dans environ 30 à 40% des patients après greffe de sang de cordon (Parody et al., 2006; Hamza et al., 2004). Le développement d'une GvHD aiguë, un retard dans la sortie de neutropénie et l'utilisation d'anti-thymoglobuline (ATG) sont associés à un risque plus élevé d'infections fongiques.

La plupart des infections virales ou des réactivations ont été observées pendant la période entre la sortie de neutropénie et la fin de la prophylaxie pour la GvHD. Et leur incidence peut être influencée par le développement ou non de la GvHD. Un grand nombre d'études se sont intéressées aux infections par les virus

herpétiques. En effet, il a été montré que la séropositivité du receveur pour le CMV est associée à une augmentation de la mortalité reliée à la transplantation et à une plus faible survie après une greffe de sang de cordon (Gluckman et al., 1997; Locatelli et al., 1999; Wagner et al., 2002). De plus, l'incidence de réactivation du CMV chez les receveurs de sang de cordon est similaire à ce qui est retrouvé chez les receveurs de MO (30 à 100 %) (Parody et al., 2006). Globalement, l'immunité spécifique anti-CMV semble être retardée après greffe de sang de cordon (Tomonari et al., 2003). De la même manière, l'incidence d'infections par VZV est plus élevée après greffe de sang de cordon et semble apparaître plus tardivement (Parody et al., 2006; Vandenbosch et al., 2008), suggérant là encore un retard dans la reconstitution immunitaire anti-VZV. Bien qu'il ne semble pas y avoir de spécificités dans l'incidence et le type d'infections qui survient après une greffe de sang de cordon, mis à part pour VZV et CMV, la mortalité associée aux infections apparaît plus élevée durant les 100 premiers jours post-greffe de sang de cordon, comparativement aux autres sources de CSH (Barker et al., 2005a; Parody et al., 2006; van Burik and Brunstein, 2007; Eapen et al., 2007). Cette observation corrèle avec le retard dans la prise de la greffe. Les stratégies thérapeutiques développées dans le but de favoriser une prise de greffe plus précoce pourraient donc très probablement avoir un impact sur la mortalité associée aux infections. De plus, la large majorité de cellules T naïves présentes dans le greffon de sang de cordon ne permet pas de transférer une immunité contre les pathogènes communément rencontrés, comme cela est le cas pour les greffes de MO ou de sang périphérique.

### **C - La maladie du greffon contre l'hôte (GvHD)**

La GvHD est la complication la plus fréquente qui peut survenir suite à une transplantation de CSH. En effet, environ 35 à 50% des receveurs de transplantations de CSH développeront une GvHD aiguë et ceci malgré une prophylaxie immunosuppressive agressive. Cette complication est le résultat d'un processus immunologique où les cellules immunocompétentes du greffon reconnaissent les cellules du receveur comme étant étrangères et les détruisent. Ainsi, la disparité HLA entre le donneur et le receveur est un important facteur de risque. Il est aussi

intéressant de noter qu'une plus forte incidence de GvHD a été observée chez des patients transplantés avec des greffons non apparentés mais HLA identiques comparativement à des greffons histocompatibles provenant d'un frère ou d'une sœur (Martin, 1991), soulignant ainsi le rôle des antigènes mineurs d'histocompatibilité. Un grand nombre d'études comparatives ont révélé une incidence et une sévérité plus faible de GvHD aiguë après greffe de sang de cordon (Gluckman et al., 1997; Rubinstein et al., 1998; Wagner et al., 1996; Rocha et al., 2000) et ce, malgré une disparité HLA généralement plus grande entre les greffons de sang de cordon et le receveur qu'avec des greffons de MO.

### C-1) La pathophysiologie de la GvHD

La GvHD aiguë se développe en trois étapes (Figure 4)

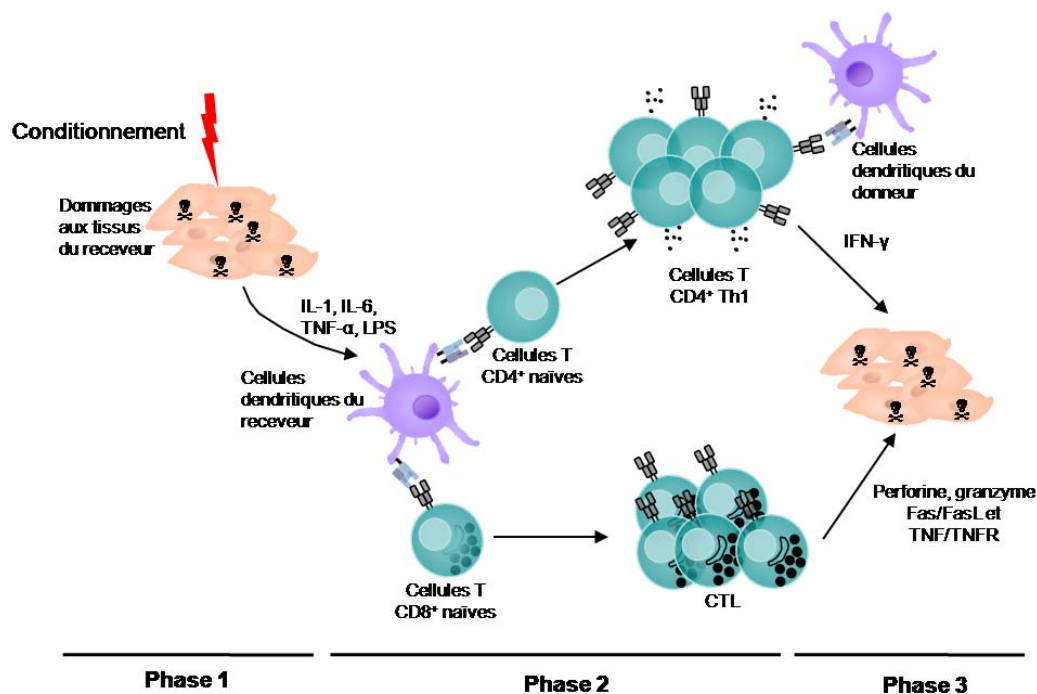


Figure 4 : Les étapes dans le développement de la maladie du greffon contre l'hôte.

#### La phase 1 : l'effet du conditionnement

Le conditionnement pré-greffe a pour conséquence d'engendrer d'une part, un important environnement inflammatoire par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6 et d'autre part de créer

d'importantes lésions tissulaires, notamment au tractus gastro-digestif. Ces lésions favorisent le passage de produits bactériens comme les lipopolysaccharides (LPS) à travers la muqueuse intestinale. Les cytokines pro-inflammatoires et ces produits bactériens induisent l'activation des cellules dendritiques de l'hôte et du donneur (Zhang et al., 2002; Ferrara, 2002). Cette activation crée un environnement propice au développement d'une GvHD car une fois activées, les cellules dendritiques présentent des antigènes de l'hôte provenant de la dégradation tissulaire induite par le conditionnement et l'inflammation. La sévérité de la GvHD est donc étroitement liée à l'intensité et à la toxicité du conditionnement. Des conditionnements atténués ont été développés et ont montré une réduction de l'incidence de la GvHD, sans toutefois améliorer la survie globale (Chakrabarti and Buyck, 2007).

### **La phase 2 : l'activation des cellules T**

Dans ce contexte pro-inflammatoire, les cellules T du donneur interagissent avec les cellules dendritiques activées de l'hôte. Plus spécifiquement, il a été démontré que se sont les cellules T naïves qui sont capables d'induire la GvHD aiguë (Anderson et al., 2003; Zhang et al., 2004). D'une part, les cellules T CD8<sup>+</sup> sont stimulées par les cellules résiduelles du receveur, induisant des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). D'autre part, il a été montré que les cellules T CD4<sup>+</sup> peuvent être activées aussi bien par les cellules dendritiques résiduelles du receveur que par les cellules dendritiques du donneur qui ont été aussi activées par la tempête de cytokine. Les cellules T CD4<sup>+</sup> vont ainsi biaiser la réponse immunitaire vers Th1, notamment par la production de cytokines comme l'IFN- $\gamma$ , l'IL-2 et le TNF- $\alpha$ , menant à l'expansion des cellules T.

### **La phase 3: phase effectrice inflammatoire**

La phase finale de la GvHD est caractérisée par l'apoptose des tissus cibles induite par les effecteurs cellulaires cytotoxiques et par les cytokines produites. Les cellules effectrices incluent les lymphocytes CTL et les cellules NK dont la cytotoxicité passe par la sécrétion de perforine et de granzyme, par la voie Fas-Fas-L ou par l'interaction de ligand induisant l'apoptose relié au TNF- $\alpha$  (Kagi et al., 1994a; Kagi et al., 1994b; Shresta et al., 1998; Kayagaki et al., 1999).

La pathophysiologie de la GvHD est ainsi relativement bien connue et les rôles respectifs des cellules dendritiques et des lymphocytes T dans ce processus immunologique ont été démontrés. A l'heure actuelle, un grand nombre d'études cherchent à comprendre de quelle manière il serait possible de prévenir et de mieux traiter la GvHD pour améliorer la survie des patients. Une des pistes dans cette direction serait de mieux comprendre pourquoi l'incidence et sévérité de cette complication est plus faible après une greffe de sang de cordon.

#### C-2) Spécificités qui expliquent la moindre incidence de GvHD après greffe de sang de cordon

De multiples facteurs intrinsèques au sang de cordon pourraient contribuer à la plus faible sévérité de la GvHD observée après greffe de sang de cordon (Tableau 1).

<b>Caractéristiques</b>	<b>Références</b>
<b>Cellules dendritiques</b>	
Diminution de production d'IL-12	Goriely et al., 2001; De Wit et al., 2003; Goriely et al., 2004.
Diminution de la production des IFN de type I	De Wit et al., 2005; Aksoy et al., 2007; Danis et al., 2008.
<b>Lymphocytes T</b>	
5 fois moins de lymphocytes T infusés	Barker and Wagner, 2003
Naïveté des lymphocytes T	D'Arena et al., 1998.
Faible niveau de marqueurs d'activation	Hassan et al., 1995; Nonoyama et al., 1995
Faible réponse cytotoxique allogénique	Berthou et al., 1995; Merindol et al., 2010; Risdon et al., 1999; Takahashi et al., 1995.
Faible production de cytokines de type Th1	Chalmers et al., 1998; Wilson et al., 1986.
Forte production de cytokines de type Th2	Ribeiro-do-Couto et al., 2001

**Tableau 1 : Immunologie du sang de cordon: causes possibles de la plus faible incidence et sévérité après greffe de sang de cordon.**

Une première explication pourrait être la fonction réduite des cellules dendritiques du sang de cordon. En effet, comme cela a été mentionné précédemment, les cellules T CD4<sup>+</sup> du donneur peuvent être activées par les cellules dendritiques résiduelles du receveur, mais aussi par les cellules dendritiques du donneur. Or, les cellules dendritiques du sang de cordon présentent des différences fonctionnelles comparativement aux cellules dendritiques adultes. En effet, la production par les cellules dendritiques de deux cytokines connues pour activer les cellules T et biaiser leur réponse vers Th1, l'IL-12 et les IFN de type I, est défectueuse dans le sang de cordon en réponse à des ligands des TLR et notamment, le LPS (Goriely et al., 2001;



De et al., 2003; Goriely et al., 2004; De et al., 2004; Aksoy et al., 2007; Danis et al., 2008). Ainsi, l'absence d'interaction fonctionnelle entre les cellules dendritiques et les cellules T du greffon mènerait à une activation sous-optimale des lymphocytes T. Une autre explication pourrait être la dose de lymphocytes infusés au patient puisque cinq fois moins de lymphocytes sont contenus dans une unité de sang de cordon comparativement à un greffon de moelle (Haspel and Miller, 2008). En plus, des différences phénotypiques et fonctionnelles des lymphocytes T de sang de cordon ont été clairement décrites dans la littérature. Ainsi, les lymphocytes T du sang de cordon expriment le marqueur CD45RA<sup>+</sup>, ainsi que de faibles niveaux de marqueurs d'activation, indiquant un phénotype naïf (D'Arena et al., 1998). De plus, même si les cellules T du sang de cordon démontrent une réponse proliférative en réponse à une stimulation allogénique, une faible réponse cytotoxique est générée, caractérisée par une faible expression de granzyme et perforine (Berthou et al., 1995; Risdon et al., 1994; Takahashi et al., 1995; Merindol et al., 2010). De façon intéressante, la production de cytokines de type Th1 est altérée (Wilson et al., 1986; Chalmers et al., 1998), alors que la production de cytokines Th2, comme l'IL-13 est au contraire augmentée (Ribeiro-do-Couto et al., 2001). Le biais Th2 des lymphocytes T du sang de cordon observé *in vitro* pourrait donc expliquer la faible incidence et la faible sévérité de la GvHD après greffe de sang de cordon.

#### **D - Les rechutes de leucémie**

Bien que la GvHD soit une complication grave observée après les transplantations de CSH, elle est toutefois corrélée avec un taux de rechute de la leucémie moins élevé, soulignant donc le lien étroit qu'il existe entre GvHD et rechute de leucémie. Généralement, après le conditionnement, les patients atteints de leucémies sont en rémission complète. C'est-à-dire que le nombre de cellules malignes est non détectable par les méthodes de détection conventionnelles. Néanmoins, un nombre minimal de cellules malignes pourrait encore être présent. On parle alors de maladie résiduelle. La détection et la cinétique de la maladie résiduelle sont importantes pour prédire les rechutes. Dans le cadre de traitement contre les leucémies, les transplantations de CSH allogéniques présentent un important avantage puisqu'elles

permettent de générer un important effet graft *versus* leukemia (GvL), permettant ainsi l'élimination des cellules leucémiques restantes.

#### D-1) L'effet graft *versus* leukemia (GvL)

L'effet GvL est un processus immunologique par lequel les lymphocytes du greffon détruisent les cellules leucémiques résiduelles du patient, évitant ainsi la rechute de la maladie. Les mécanismes et les effecteurs cellulaires de l'effet GvL sont maintenant relativement bien compris. Les cellules NK et les lymphocytes T sont connus pour exercer un puissant effet GvL. Une première évidence de l'implication des lymphocytes T dans l'effet GvL vient du fait qu'un chimérisme complet du donneur des cellules T est crucial pour prévenir la rechute (Barrett and Savani, 2006). En ce sens, en cas de rechute, les infusions de lymphocytes de donneur (DLI) ont été développées et sont efficaces dans certains cas de leucémie aiguë non lymphoïde (Dazzi and Fozza, 2007; Kolb et al., 1990). En revanche, le fait de dépléter les cellules T des greffons de MO est associé à une augmentation du risque de rechute (Rocha et al., 2001). Pour induire un effet GvL, les lymphocytes T reconnaissent deux classes d'antigènes: a) les antigènes spécifiques de leucémie (LSA: leukemia specific Ag) comme WT-1 (Wilm's tumor-1) ou des protéines de fusion comme BCR-ABL, b) les antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHAg) qui sont largement exprimés à travers l'organisme ou qui sont exprimés uniquement sur les cellules hématopoïétiques. L'effet GvL des lymphocytes T est dépendant de la présentation antigénique par les molécules HLA. Or, une méthode d'immuno-évasion des cellules tumorales est de diminuer l'expression des molécules HLA de classe I, diminuant ainsi la reconnaissance de ces cellules par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, mais les rendant sensibles à la lyse par les cellules NK. En effet, des cellules NK alloréactives sont capables de tuer différents types de cellules leucémiques incluant les leucémies myéloïdes aiguës (LMA) et les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) (Ruggeri et al., 2008). Dans le contexte des greffes de CSH, l'alloréactivité des cellules NK est générée par la disparité HLA entre le donneur et le receveur. En effet, les cellules NK du donneur présentant des récepteurs KIR inhibiteurs qui ne reconnaissent pas les molécules HLA pour lesquelles ils ont été éduqués (soi manquant) deviennent alors

alloréactives et lysent les cellules cibles (Ljunggren and Karre, 1990). Dans des transplantations haploidentiques, il a été montré que la disparité KIR-ligand entre le donneur et le receveur réduit le risque de rechute (Ruggeri et al., 2002). Cependant, des analyses rétrospectives ont fourni des résultats inconsistants: alors que certaines études ont révélé une augmentation marquée de l'effet GvL, d'autres n'ont pas reproduits ces résultats (Ruggeri et al., 2002; Giebel et al., 2003; Farag et al., 2006; Pende et al., 2009). L'effet GvL est donc médié par deux types de lymphocytes utilisant des mécanismes de reconnaissance des cellules leucémiques complémentaires, permettant donc d'envisager des stratégies d'immunothérapie complémentaires.

#### D-2) Spécificités de la greffe de sang de cordon

L'effet GvL et la GvHD ont en commun une réaction immunitaire des cellules du donneur contre les cellules de l'hôte. Par conséquent, une faible incidence de la GvHD après greffe de sang de cordon laisse supposer que l'effet GvL sera moins important qu'après greffe de MO. Or, l'incidence de rechute de la leucémie est similaire ou même plus faible chez les receveurs de sang de cordon (autour de 20 à 30%) comparativement aux receveurs de MO (Rocha et al., 2001; Michel et al., 2003; Eapen et al., 2007; Verneris et al., 2009). Certains facteurs de risque de rechute ont pu être mis en évidence après greffe de sang de cordon. Ceux-ci incluent l'absence de disparité HLA et le retard dans la reconstitution des réponses antivirales (Parkman et al., 2006; Rubinstein et al., 1998; Laughlin et al., 2004). Cohen et al. ont reporté que les patients présentant une réponse des cellules T spécifiques des virus herpétiques après greffe de sang de cordon ont une incidence réduite de rechute et un taux de survie globale plus élevé (Cohen et al., 2006). Deux groupes se sont aussi intéressés à l'impact de la disparité KIR-ligand après greffe de sang de cordon. L'étude d'Eurocord-Netcord a déterminé que l'alloréactivité des cellules NK est associée à une réduction du risque de rechutes, ainsi qu'une augmentation de la survie sans leucémie (Willemze et al., 2009). Au contraire, Brunstein et al. n'ont pas trouvé d'effet significatif sur la fréquence de rechutes et sur la survie globale (Brunstein et al., 2009). De part ces résultats contradictoires, des études supplémentaires semblent

encore nécessaires. Néanmoins, les caractéristiques communes de toutes les études où la disparité KIR-ligand est bénéfique sont l'absence de cellules T mémoires dans le greffon et l'utilisation d'ATG dans le conditionnement. Ces deux conditions sont rencontrées dans les greffes de sang de cordon et pourraient donc avoir un impact positif sur le risque de rechute après greffe de sang de cordon.

#### 4- Les avantages et désavantages de la greffe de sang de cordon

Comme cela a été rapporté ci-dessus pour chacune des complications post-transplantation, la greffe de sang de cordon présente certains avantages par rapport à la greffe de MO. Ces avantages sont aussi bien au niveau pratique et organisationnel qu'au niveau clinique. Ils sont résumés ci-après (Table 2).

<b>Avantages</b>	<b>Désavantages</b>
<b>Organisation pratique de la transplantation plus facile</b>	<b>Nombre limité de cellules souches hématopoïétiques</b>
<b>Absence de risque pour le donneur</b>	<b>Plus grande incidence d'échec de la greffe</b>
<b>Amélioration de la balance ethnique</b>	<b>Retard dans la prise de la greffe</b>
<b>Permet une plus grande disparité HLA entre le donneur et le receveur</b>	<b>Reconstitution myéloïde plus lente</b>
<b>Incidence et sévérité plus faible de la GvHD</b>	<b>Impossibilité d'obtenir des lymphocytes du même donneur</b>
<b>Diminution de la transmission virale (EBV et CMV)</b>	<b>Augmentation de la morbidité dues aux infections pendant les 100 premiers jours.</b>

**Tableau 2 : Avantages et désavantages de la greffe de sang de cordon par rapport à une greffe de moelle osseuse**

##### A - Les avantages pratiques

Les donneurs de MO intra-familiaux (apparentés) dont la compatibilité HLA est de 6 gènes sur 6 ou 5 gènes sur 6 sont disponibles pour seulement 30% des patients. 70% des patients doivent donc s'en remettre aux registres internationaux de

donneurs de MO pour trouver un greffon. Cependant, la recherche d'un donneur dans ces registres peut prendre jusqu'à 4 mois et parfois plus, notamment pour les patients non caucasiens qui sont sous-représentés dans les banques de donneurs de moelle. Un des avantages des banques de sang de cordon est leur représentation ethnique plus étendue, le sang de cordon profite donc à une plus large population.

Un autre avantage du sang de cordon est la simplicité dans l'organisation de la greffe. Le temps entre la prise de décision et la greffe est réduit puisque les unités de sang de cordon sont congelées et stockées dans les banques. Dans le cas de la greffe de MO, les greffons sont prélevés sur un donneur vivant, juste avant la transplantation. Il faut donc organiser le prélèvement de la MO et la transplantation au même moment. Un temps de décision et d'organisation de la greffe plus court évite une dégradation de l'état du patient due à la progression de la maladie et/ou à la toxicité du traitement.

Enfin, les risques pour le donneur sont inexistantes alors que le prélèvement de MO constitue une intervention chirurgicale pour le donneur. En effet, le sang de cordon est prélevé par ponction de la veine du cordon ombilical après la naissance de l'enfant; ce prélèvement ne comporte donc aucun risque ni pour l'enfant, ni pour la mère.

### **B - Les avantages cliniques**

Un important avantage clinique est la faible incidence et la faible sévérité de la GvHD. Cet avantage permet une plus grande disparité HLA entre le donneur et le receveur. Un autre avantage est le plus faible risque de transmission d'infections par les virus latents comme EBV et CMV.

### **C - Les désavantages**

Le principal désavantage du sang de cordon comparativement à la MO est le nombre limité de cellules que contient une unité de sang de cordon. En effet, plusieurs groupes ont montré une forte corrélation entre la dose cellulaire et la survie après une greffe de sang de cordon (Gluckman et al., 2004; Barker et al., 2010). Ceci a pour

conséquence de retarder la reconstitution myéloïde (granulocytes, monocytes, globules rouges et plaquettes) et la prise de la greffe. Le risque d'infections opportunistes est donc plus grand durant les 100 premiers jours post-transplantation. Un autre désavantage est l'impossibilité d'obtenir des lymphocytes additionnels du même donneur en cas de rechute de la maladie maligne (infusion de DLI) pour augmenter l'effet GvL de la greffe.

En résumé, l'ensemble des études sur la greffe de sang de cordon supporte fortement l'utilisation du sang de cordon comme une alternative très intéressante en cas d'absence de donneur de MO. La greffe de sang de cordon est donc de plus en plus considérée comme un choix équivalent à la transplantation de MO non apparentée. Cependant, pour contrer les limitations de la greffe de sang de cordon, il est important de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

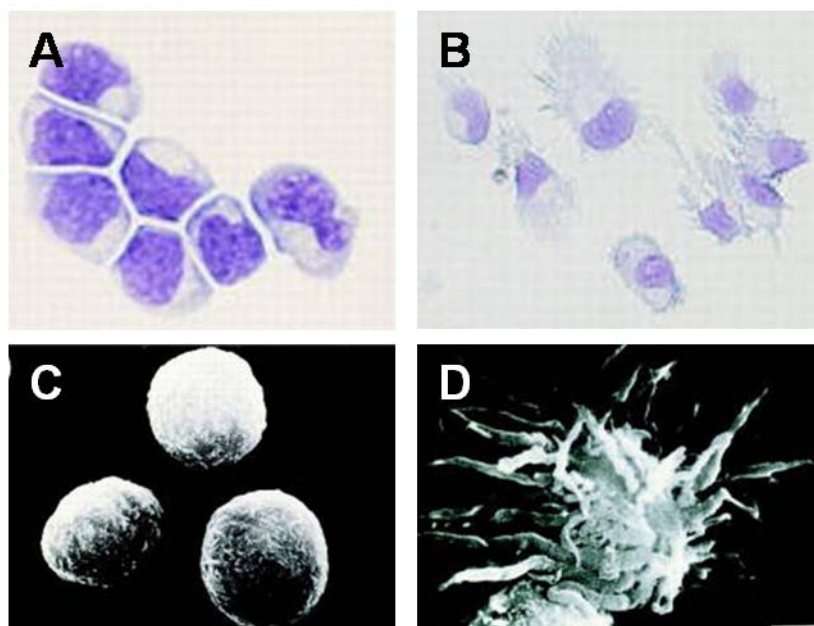
## II. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)

### 1- Immunologie des pDC

#### A - Morphologie et phénotype des pDC

##### A-1) Morphologie des pDC

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) représentent une rare population constituant seulement 0,2 à 0,8% des cellules mononucléées de sang périphérique d'un adulte. Elles ont une morphologie similaire à celle d'un plasmocyte. Elles sont légèrement plus petites que les monocytes, mais plus grosses que les lymphocytes. L'observation en microscopie électronique révèle que les pDC ont un diamètre de 8 à 10  $\mu\text{m}$ . De plus, les pDC ont un noyau excentré, en forme de rein, et un cytoplasme basophile qui contient un réticulum endoplasmique bien développé, un petit appareil de Golgi et quelques mitochondries (Figure 5).



**Figure 5 : Morphologie des pDC**

(A) pDC non activées colorées au Giemsa. (B) pDC matures colorées au Giemsa caractérisées par la formation de dendrites. (C) pDC non activées observées

en microscopie électronique à transmission. (D) pDC matures observées en microscopie électronique à transmission.

Adapté de (Grouard et al., 1997; Liu, 2005).

#### A-2) Marqueurs de surface des pDC

Les pDC humaines n'expriment pas les marqueurs spécifiques des lignées lymphoïdes et myéloïdes comme le CD19 (lymphocytes B), CD3 (lymphocytes T), CD14 (monocytes), CD56 (cellules NK) et CD11c (cellules dendritiques myéloïdes, mDC). De plus, les pDC n'expriment pas la plupart des antigènes exprimés par les mDC, comme le CD11b, CD13, CD14 et CD33. Les pDC ont été originalement identifiées comme étant  $\text{Lin}^-$ ,  $\text{HLA-DR}^+$ ,  $\text{CD123}^{\text{high}}$ ,  $\text{CD4}^{\text{bright}}$  et  $\text{CD11c}^-$ . Il y a quelques années, Dzionek et al. ont identifié deux nouveaux récepteurs spécifiques des pDC, BDCA-2 et BDCA-4 (neuropilin-1), ce qui permet une identification directe de ces cellules dans le sang périphérique, mais aussi dans les tissus (Dzionek et al., 2002; Dzionek et al., 2001; Dzionek et al., 2000). BDCA-2 est un membre de la famille des glycoprotéines transmembranaires de type lectine. Ce marqueur spécifique est rapidement perdu par les pDC matures en culture (Dzionek et al., 2001). BDCA-4/neuropiline-1 est un récepteur des membres de la famille des sémaphorines et aussi un co-récepteur pour le VEGF. En revanche, d'autres types cellulaires expriment BDCA-4 tels que les monocytes en culture, les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) générées à partir de monocytes (MoDC) et une fraction des mDC générées à partir de  $\text{CD34}^+$ ; BDCA-4 perd donc sa spécificité vis-à-vis des pDC en culture (Dzionek et al., 2000). Néanmoins, contrairement au marqueur BDCA-2, l'engagement d'un anticorps anti-BDCA-4 sur cette molécule ne modifie pas la fonction des pDC. Un autre récepteur spécifique des pDC est l'ILT-7 (immunoglobulin-like transcript 7) (Cao et al., 2006). La protéine ILT-7 fait partie d'une famille de récepteurs de surface comportant 4 domaines extracellulaires de type immunoglobulines (Ig), un domaine transmembranaire et une courte queue intracellulaire (Cao and Bover, 2010). ILT-7 est exprimé exclusivement par les pDC (Cao et al., 2006) et son ligand, BST2 (Bone marrow stromal cell antigen 2) a été très récemment découvert (Cao et al., 2009). L'interaction ILT-7-BST2 mène à une diminution de la réponse des TLR en réduisant la production des IFN de type I par



les pDC. Ainsi, il semble que le récepteur ILT-7 module la fonction des pDC (Tableau 3).

<b>Marqueurs non exprimés</b>
<b>CD19, CD3, CD14, CD56, CD11b, CD13, CD14, CD33, CD16, CD64</b>
<b>Marqueurs exprimés</b>
<b>HLA-DR, CD123, CD4, ILT-2, ILT-3, CD32<sup>faible</sup></b>
<b>Marqueurs spécifiques</b>
<b>BDCA2, BDCA4, ILT7</b>

**Tableau 3 : Phénotype des pDC humaines.**

#### A-3) TLR : senseurs des antigènes viraux

Les récepteurs TLR sont des protéines transmembranaires de type I de la famille du récepteur à l'IL-1 (IL-1R) qui possèdent un domaine N-terminal extracellulaire riche en répétitions leucines (LRR) pour la fixation du ligand, un seul domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire de signalisation. Le domaine C-terminal est homologue au domaine intracellulaire de l'IL-1R et est donc appelé Toll/IL-1R (TIR). Les TLR sont exprimés à la surface cellulaire ou dans les compartiments endosomaux. A l'heure actuelle, 10 TLR différents ont été identifiés chez l'homme (Beutler, 2004). De façon intéressante, les différents sous-types de cellules dendritiques (DC) expriment des combinaisons différentes de TLR (tableau 4). Ainsi, les pDC expriment préférentiellement le TLR7 et le TLR9. En accord avec ces profils d'expression, les pDC détectent l'ARN simple brin et l'ADN des génomes viraux (Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001).

	<b>monocytes</b>	<b>mDC</b>	<b>pDC</b>
<b>TLR1</b>	++	+	+
<b>TLR2</b>	++	+	-
<b>TLR3</b>	-	++	-
<b>TLR4</b>	++	+	-
<b>TLR5</b>	+	+	-
<b>TLR6</b>	+	+	+
<b>TLR7</b>	-	-	++
<b>TLR8</b>	++	++	-
<b>TLR9</b>	-	-	++
<b>TLR10</b>	-	+	+

**Tableau 4 : Expression des TLR par les différentes sous-populations de cellules dendritiques humaines et par les monocytes.**

+, ++ et - indiquent l'expression relative de l'ARNm de chaque TLR.

Adapté de (Liu, 2005).

Les TLR7 et TLR9 sont localisés au niveau des endosomes et des lysosomes. Le TLR7 reconnaît les ARN simples brins riches en uridine et/ou guanosine dérivés des virus à ARN comme l'influenza, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ou le virus de la maladie de Newcastle (NDV) (Heil et al., 2003; Diebold et al., 2004; Lund et al., 2004). Le TLR7 reconnaît également une classe de composants antiviraux synthétiques comme les imidazoquinolines, la loxoribine et l'azoquinoline R848 (Hemmi et al., 2002; Jurk et al., 2002). De façon intéressante, l'ARN de mammifère qui contient beaucoup de nucléosides modifiés (méthylation, isomérisation,

thiolation...) a une capacité stimulatrice du TLR7 significativement plus faible que l'ARN microbien (Kariko et al., 2005). La localisation du TLR7 dans les endosomes et la modification de nucléosides permettent de discriminer l'ARN endogène de celui de dérivés de pathogènes.

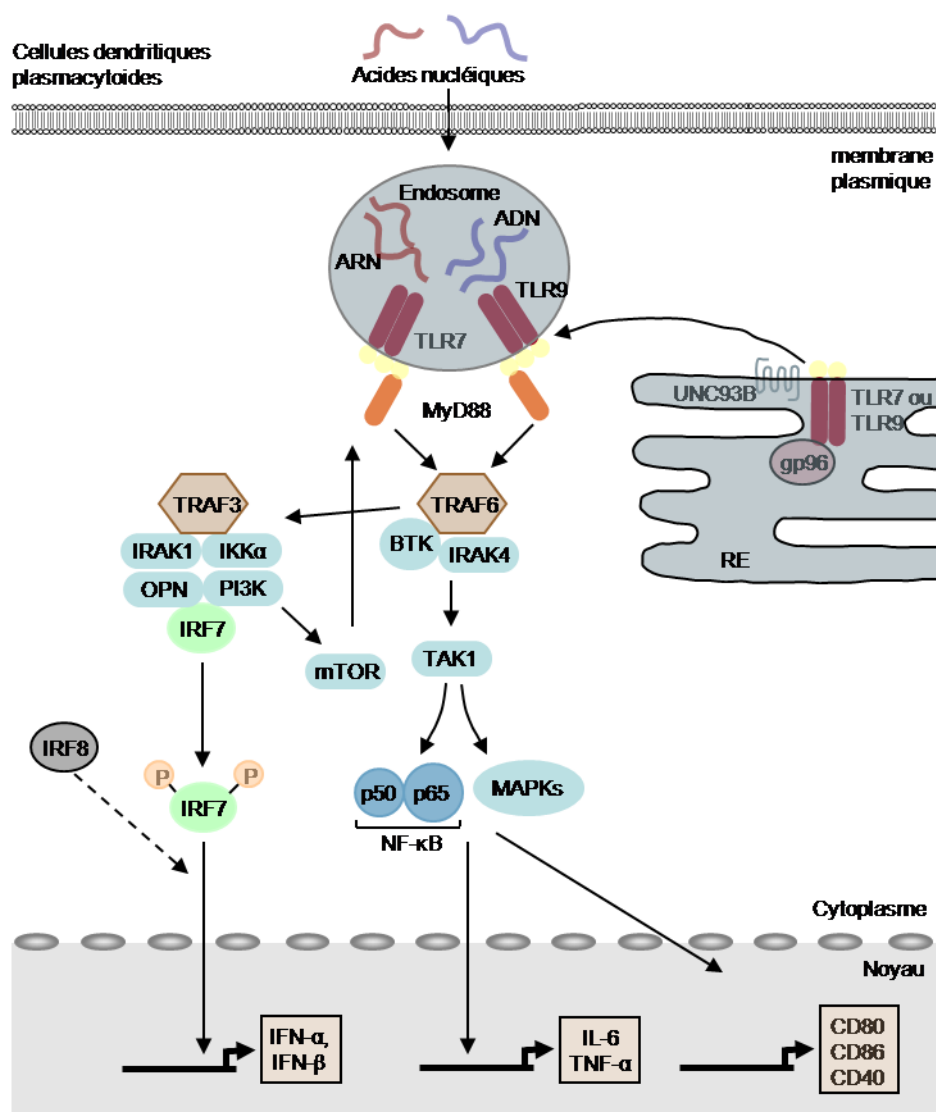
Le TLR9 reconnaît l'ADN bactérien contenant des dinucléotides CpG non méthylés appelés motifs CpG (Hemmi et al., 2000). Il a aussi été démontré que le TLR9 exprimé par les pDC reconnaît aussi les motifs CpG des ADN viraux comme les virus HSV-1 et HSV-2 (Takeshita et al., 2001; Lund et al., 2003; Krug et al., 2004a). Le TLR9 reconnaît également une classe de composants antiviraux synthétiques comme les oligodeoxynucleotides (ODN) à motifs CpG (Krieg, 2002). Ces ODN CpG sont des séquences immunostimulatrices (ISS), synthétisées avec un squelette phosphothioate pour leur conférer une résistance aux nucléases et augmenter leur demi-vie. Il existe trois différentes classes d'ODN, les CpG de type A, B et C. Ils diffèrent à la fois par leur séquence et par leur activité biologique. En effet, les ODN CpG multimériques de classe A sont d'excellents inducteurs d'IFN- $\alpha$  par les pDC mais ils stimulent peu leur différenciation en cellules dendritiques; les ODN CpG de type B simples brins induisent peu la production d'IFN- $\alpha$ , mais induisent la différenciation des pDC qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation (Krieg, 2002; Vollmer et al., 2004). Les ODN CpG doubles brins de classe C combinent les propriétés des CpG de classe A et B, étant donc des inducteurs de la production d'IFN- $\alpha$  et de la maturation des pDC (Vollmer et al., 2004; Hartmann et al., 2003b). L'activation différentielle des pDC par ces ODN est due à la structure tridimensionnelle et à la localisation subcellulaire des ODN. En effet, il a été montré que les ODN CpG de classe A forment des agrégats et sont localisés dans les endosomes précoces alors que les CpG de classe B sont transportés dans les endosomes tardifs et les lysosomes (Honda et al., 2005; Guiducci et al., 2006). Ainsi, ces trois classes d'ODN CpG semblent induire des facteurs signalétiques différents conduisant aux différentes fonctions biologiques observées.

La discrimination faite par les pDC entre les ADN naturels issus du soi et les ADN issus des pathogènes, repose sur le motif CpG (Wagner, 2008; Coch et al., 2009). En effet, de façon similaire au TLR7, la faible fréquence des motifs CpG et le fort taux

de méthylation de l'ADN de mammifère préviennent sa reconnaissance par le TLR9 dans des circonstances physiologiques. De plus, la localisation endosomale du TLR9 est critique dans la discrimination entre l'ADN du soi et du non-soi puisque, contrairement à l'ADN microbien, l'ADN de mammifère ne transite pas par les compartiments endosomaux en conditions normales (Barton et al., 2006).

En absence de ligand, le TLR9 réside dans le réticulum endoplasmique (RE) des pDC au repos et il n'est dirigé vers les endosomes qu'après exposition à un agoniste (Latz et al., 2004). Le transport des TLR7 et TLR9 vers les endosomes et leur activation subséquente requiert la protéine UNC93B1. Cette protéine transmembranaire est localisée au niveau du RE et interagit spécifiquement avec les TLR3, TLR7 et TLR9 (Tabeta et al., 2006; Brinkmann et al., 2007; Kim et al., 2008). Néanmoins, UNC93B1 a une plus forte affinité pour le TLR9 que pour le TLR7 (Fukui et al., 2009). De plus, des patients déficients pour cette protéine présentent une altération de la production d'IFN de type I lors d'une infection par le HSV-1 (Casrouge et al., 2006). La protéine chaperonne gp96 peut également interagir avec ces TLR et semble jouer un rôle dans leur fonction (Yang et al., 2007).

En parallèle, les différents ligands des TLR7 et TLR9 doivent être acheminés vers les endosomes. Cependant, ce processus reste encore mal compris. En effet, contrairement aux mDC, les pDC n'ont pas ou peu d'activité de phagocytose (Dalgaard et al., 2005; Lui et al., 2009). Plusieurs études ont montré que l'activation des pDC par des virus à ARN ou à ADN est altérée en présence de chloroquine, un inhibiteur de l'acidification endosomale (Lund et al., 2003; Lund et al., 2004; Barchet et al., 2005), suggérant que la dégradation de la capsid virale est primordiale pour l'accès des TLR à leur ligand. Néanmoins, s'il est probable que les virus induisent activement leur endocytose par la cellule, se retrouvant alors dans les compartiments endosomaux acides, le trafic cellulaire emprunté par les ligands synthétiques pour atteindre ces endosomes reste à définir.



**Figure 6 : Signalisation induite par les TLR7 et TLR9 dans les pDC.**  
Adapté de (Gilliet et al., 2008).

## B - Développement des pDC

### B-1) Les molécules régulatrices de la différenciation des pDC

Des expériences chez la souris ont permis d'identifier certaines molécules régulatrices du développement des pDCs. Ainsi, la cytokine fms-related tyrosine kinase - 3 ligand (FLT3-L) a été identifiée comme essentielle pour le développement des pDC (et des mDC) à partir des cellules souches hématopoïétiques humaines et murines. Dans des souris transgéniques pour FLT3-L, le nombre de pDC est

augmenté, tandis que dans des souris déficientes pour cette cytokine, le nombre de pDC est réduit (McKenna et al., 2000; Manfra et al., 2003). La capacité du FLT3-L à promouvoir le développement des pDC *in vivo* a été confirmé par des expériences montrant que l'administration de FLT3-L à des volontaires humains a induit une augmentation du nombre de pDC dans leur sang périphérique (Pulendran et al., 2000). De plus, la génération de pDC humaines est possible en cultivant des cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> en présence de FLT3-L (Blom et al., 2000). Plus récemment, il a été suggéré que l'IL-7 pourrait être nécessaire pour le développement des pDC et des mDC à partir d'un progéniteur commun (Vogt et al., 2009).

Au niveau moléculaire, plusieurs facteurs de transcription régulant la différenciation des pDCs ont été décrits chez la souris, parmi lesquels STAT-3 (Laouar et al., 2003), Ikaros (Allman et al., 2006), IRF4, IRF8 (Tsujiura et al., 2003) et E2-2. Seul le facteur de transcription E2-2 a été démontré comme essentiel à la différenciation des pDC humaines et murines (Schotte et al., 2004; Nagasawa et al., 2008). Il a été montré que ce facteur de transcription régule l'expression d'un grand nombre de gènes spécifiques des pDCs, tels que BDCA-2 et ILT-7, ainsi que des gènes contrôlant la fonction des pDCs tels que Spi-B et IRF7; il a été qualifié de « master regulator gene » car il initie l'expression du programme génique spécifique des pDC (Cisse et al., 2008). Cependant, les autres partenaires du réseau transcriptionnel conduisant à la différenciation de la lignée pDC restent encore très mal définis.

#### B-2) Origine cellulaire des pDC : lignée myéloïde / lymphoïde

Les pDC se différencient à partir des précurseurs hématopoïétiques de la MO mais leur voie de différenciation est encore mal comprise, notamment en ce qui concerne leur origine lymphoïde ou myéloïde. L'hypothèse selon laquelle les pDC dérivent de précurseurs lymphoïdes est supportée par plusieurs données. Tout d'abord, les transcrits des gènes spécifiques des cellules T ou B sont exprimés par les pDC, mais pas par les mDC, tels que les ARNm du récepteur pré-T $\alpha$  (pT $\alpha$ ), de  $\lambda$ 5, de Spi-B. On a également identifié des réarrangements D-J des gènes des immunoglobulines dans les pDC (Corcoran et al., 2003). De plus, la surexpression des facteurs de transcription *Id2* ou *Id3* bloque le développement des pDC et des lymphocytes T et

B, mais pas des mDC (Spits et al., 2000). A l'inverse, des défauts génétiques de Spi-B empêchent aussi le développement des pDC, mais pas certaines sous-populations de DC. Finalement, une récente étude sur le régulateur des CMH de classe II, CIITA, a montré que l'expression de ce facteur dans les pDC et les lymphocytes B est régulée par un promoteur distinct de celui qui est activé dans les mDC. L'ensemble de ces données est donc en faveur d'un précurseur commun entre les LT, les LB et les pDC, tel que le progéniteur commun lymphoïde (CLP) identifié dans la moelle de souris et la moelle humaine.

Cependant, les résultats d'autres études ne corroborent pas cette hypothèse. En effet, des CLP ou des progéniteurs myéloïdes commun (CMP) murins, traités avec du FLT3-L peuvent se différencier en culture et *in vivo*, en pDC et en mDC (Karsunky et al., 2003; D'Amico and Wu, 2003; Shigematsu et al., 2004; Karsunky et al., 2005). Mais il semble que leurs caractéristiques et leur fonction soient différentes selon leur origine (Yang et al., 2005a). De plus, l'étude de souris déficientes pour IRF8, un facteur de transcription critique pour la lignée myéloïde, démontrent que la génération de pDC et d'autres sous populations de cellules dendritiques est altérée (Aliberti et al., 2003). De plus, deux études d'Ishikawa et al. ont pu étudier la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques humains *in vivo* (Ishikawa et al., 2007; Ishikawa et al., 2008). Ils ont ainsi pu démontrer que l'injection de CMP et CLP humains purifiés dans des souris nouveau-né NOD-scid/IL2R $\gamma$  (null) induit dans les deux cas, la différenciation de mDC et de pDC. Ils proposent ainsi l'hypothèse de l'existence d'un précurseur commun aux différentes sous-populations de DC. Allant dans ce sens, des études élégantes ont identifié un progéniteur commun aux cellules dendritiques (CDP ou pro-DC) chez la souris grâce à des cultures de MO stimulée par FLT3-L (Naik et al., 2007; Onai et al., 2007). Cependant, ces progéniteurs pro-DC restent à identifier chez l'homme.

### **C - Localisation et migration des pDC**

Le développement des pDC à partir des cellules souches hématopoïétiques se déroule au niveau des organes lymphoïdes primaires comme le foie fœtal, le thymus et la MO

(Blom et al., 2000). Le transfert des progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> dans des souris SCID mène à la production de pDC humaines dans la MO de la souris et dans un thymus humain transplanté (Weijer et al., 2002; Palucka et al., 2003; Traggiai et al., 2004). Il semble que les pDC soient produites tout au long de la vie à partir de la MO et elles sont présentes dans la rate, le thymus, les ganglions lymphatiques, les organes lymphoïdes associés aux muqueuses, le poumon et le foie (Colonna et al., 2004; Demedts et al., 2005; Masten et al., 2006). La durée de vie des pDC murines est évaluée à 2 semaines, ainsi le remplacement continu dans le sang est indispensable pour maintenir la population de pDC à son niveau homéostatique (Merad and Manz, 2009). Une récente étude des pDC humaines de la MO ont mis en évidence trois stades de différenciation successifs (Martin-Martin et al., 2009). Le stade I, le plus immature, est caractérisé par le phénotype CD34<sup>++</sup>, HLA-DR<sup>+++</sup> et CD123<sup>++</sup>. Les pDC des stades II et III présentent le phénotype CD34<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>++</sup> et CD123<sup>+++</sup> et CD34<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>++</sup> et CD123<sup>+++</sup> respectivement. Cette étude a montré que seules les pDC du stade III produisent de l'IFN- $\alpha$  (Martin-Martin et al., 2009). Peu d'informations sont disponibles concernant le trafic des pDC en conditions physiologiques. Après avoir quitté la MO, les pDC migrent vers les zones riches en cellules T des organes lymphoïdes secondaires à travers les veinules post capillaires (HEV), vers les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT). La migration des pDC semble être associée à l'expression de CD62L et CCR7, qui interagissent avec L-sélectine ligands exprimés par les HEV. La migration des pDC humaines en contexte physiologique et pathologique nécessite donc de plus amples investigations.

## **D - Fonctions des pDC**

D-1) Cellules professionnelles de la production d'IFN de type I : pDC dans l'immunité innée

D-1-a) Production de cytokines par les pDC

Les pDC sont des cellules professionnelles pour la production d'IFN de type I. En réponse à une infection virale, les pDC produisent de grandes quantités d'IFN de type



I (1 à 2 UI par cellule ou 3 à 10 pg par cellule) dès les premières 24 heures, ce qui représente 100 à 1000 fois plus d'IFN de type I produit que n'importe quelle autre cellule. L'ARNm des IFN de type I peut être détecté aussi tôt que 4 heures après la stimulation virale et son niveau est maximal environ 12 heures post-stimulation. Cette rapidité de production des IFN de type I par les pDC n'est pas encore complètement comprise. Cependant, des données montrent que, contrairement aux autres cellules, l'initiation de la production d'IFN de type I par les pDC ne fait pas intervenir la boucle de régulation positive qui induit l'expression du facteur de transcription IRF7 (détaillé plus loin). En effet, les pDC expriment fortement et constitutivement IRF7. Une étude utilisant des souris déficientes pour le récepteur des IFN de type I a montré que les fibroblastes des souris déficientes pour le gène *Ifnr* produisaient beaucoup moins d'IFN- $\alpha$  que les fibroblastes des souris sauvages. Par contre, les pDC des souris *Ifnr*<sup>-/-</sup> produisaient des quantités similaires d'IFN- $\alpha$  suite à une infection virale, suggérant fortement que la capacité des pDC à produire de grandes quantités d'IFN- $\alpha$  est indépendante de la boucle de régulation positive faisant intervenir les récepteurs des IFN de type I (Barchet et al., 2002).

En plus des IFN de type I, les pDC humaines peuvent produire des quantités modérées de TNF- $\alpha$  et d'IL-6. En revanche, la capacité des pDC à produire de l'IL-12, comme les mDC reste controversée. Bien que certaines équipes ont pu détecter la production d'IL-12 par les pDC isolées en réponse au LPS, combiné au ligand du CD40 (CD40L) ou encore en réponse aux ODN CpG de type B et au CD40L, d'autres n'ont pas confirmé ce résultat (Cella et al., 1999; Kadowaki et al., 2001; Krug et al., 2001). Une des explications possibles de ces résultats contradictoires est la méthode de purification des pDC. Ainsi, la production d'IL-12 détectée pourrait provenir de la contamination de la population purifiée par des mDC. Une autre évidence qui supporte l'idée selon laquelle les pDC sont spécialisées dans la production d'IFN de type I et les mDC dans la production d'IL-12 vient d'une étude qui utilise la molécule R848. Cette molécule est un ligand du TLR7 présent sur les pDC et du TLR8 présent sur les mDC. Cette étude a montré qu'en réponse au R848, les mDC produisent préférentiellement de l'IL-12, alors que les pDC produisent de l'IFN- $\alpha$  (Ito et al., 2002). Chez la souris, la spécialisation de la production d'IFN de

type 1 par les pDC n'est pas aussi claire que chez l'humain. En effet, plusieurs études ont montré que les pDC murines peuvent produire les deux cytokines (Nakano et al., 2001; Asselin-Paturel et al., 2001; Bjorek, 2001). De plus, les pDC humaines et murines présentent d'autres différences, notamment, pour l'expression des TLR (Shortman and Liu, 2002; Boonstra et al., 2003).

#### D-1-b) Signalisation induite par les TLR7 et TLR9

La fixation d'un ligand sur le TLR9 induit un changement conformationnel du domaine signalétique intracytoplasmique menant au recrutement de molécules adaptatrices (Latz et al., 2007). Plusieurs voies de signalisation sont activées simultanément conduisant d'une part à la production d'IFN de type 1 et d'autre part à la maturation des pDC (Figure 6).

##### ❖ *La voie d'activation conduisant à la production d'IFN de type I*

Les TLR7 et TLR9 activés s'associent avec la protéine adaptatrice appelée myeloid differentiation gene 88 (MyD88) via l'interaction avec son domaine TIR (Akira and Takeda, 2004). MyD88 est une protéine clé dans la voie de signalisation car elle va permettre le recrutement d'un complexe multiprotéique transducteur de signal composé de plusieurs kinases dont l'IL-1R-associated kinase (IRAK-1) (Uematsu et al., 2005), IRAK-4 (Yang et al., 2005b) et le TNF-receptor associated factor (TRAF-6) (Hacker et al., 2006) qui finalement recrutent et activent le facteur de transcription IRF7 (Kawai et al., 2004). Des études suggèrent que la tyrosine kinase de Bruton (BTK) serait également un facteur constituant ce complexe (Jefferies et al., 2003; Sochorova et al., 2007). L'activation du facteur de transcription IRF7 est induite d'une part par ubiquitination grâce à l'activité ubiquitine E3 ligase de TRAF-6 et par phosphorylation par la kinase IRAK-4 (Kawai et al., 2004). Le facteur IRF7 activé interagit aussi avec TRAF-3 (Honda et al., 2003), IKK $\alpha$  (Hoshino et al., 2006) et l'ostéopontine (Shinohara et al., 2006). IRF7 se lie aussi très probablement à la PI3K puisqu'il a été montré que cette protéine participe à sa translocation (Guiducci et al., 2008). Par ailleurs, la voie PI3K-Akt initie et active également la voie mTOR qui facilite la formation du complexe TLR/MyD88 (Cao et al., 2008). L'IRF8, même s'il n'est pas impliqué dans la production initiale des IFN de type I, permet d'augmenter

cette production par un mécanisme de rétro-contrôle positif (Tsujimura et al., 2003; Tailor et al., 2007). Finalement, bien qu'il soit clairement établi que la transcription des gènes des IFN de type I dans les pDC est dépendante du facteur de transcription IRF7, l'absence de littérature n'a pas permis d'approfondir les mécanismes de transcription et notamment l'existence de co-activateurs, comme cela a pu être établi pour IRF3 et la transcription du gène de l'IFN- $\beta$  (Aksoy et al., 2007).

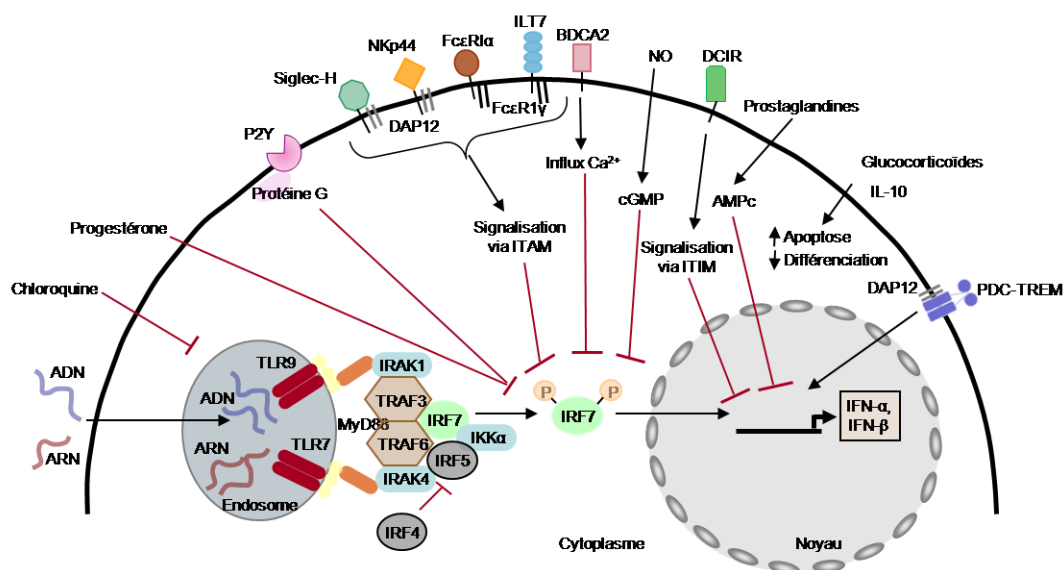
Dans la plupart des cellules, la production d'IFN- $\alpha$  est dépendante d'une boucle autocrine. En effet, l'IFN- $\beta$  produit, en s'engageant sur le récepteur aux IFN de type I va permettre l'induction de l'expression d'IRF7 (Taniguchi and Takaoka, 2002). Or, les pDC expriment constitutivement IRF7 (Ito et al., 2006). Leur niveau élevé d'IRF7 endogène leur permet alors de produire rapidement des IFN de type I en réponse à un stimulus et ce, de façon indépendante de la boucle autocrine (Barchet et al., 2002). L'observation faite chez la souris que les pDC expriment de faibles niveaux de répresseurs transcriptionnels 4E-BP, qui sont responsables de la régulation de la traduction d'IRF7, pourrait expliquer l'expression constitutive d'IRF7 dans ces cellules (Colina et al., 2008).

❖ *La voie de signalisation conduisant à la production de cytokines inflammatoires*

De façon simultanée, TAK-1 est ubiquitinylée par TRAF-6 (Deng et al., 2000) au niveau du complexe transducteur de signal. TAK-1 active alors la voie de signalisation NF- $\kappa$ B en phosphorylant le complexe IKK composé d'IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  et IKK- $\gamma$ . Ce complexe activé phosphoryle à son tour I $\kappa$ B qui est ensuite ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. L'hétérodimère p50-p65 de la voie canonique NF- $\kappa$ B est alors libéré et transloque dans le noyau (Akira and Takeda, 2004). TAK-1 active également la voie de signalisation des MAPK (Wang et al., 2001) dont la p38MAPK conduisant à la phosphorylation de facteurs de transcription comme AP1 (Akira and Takeda, 2004). Les voies de signalisation NF- $\kappa$ B et MAPK induisent toutes les deux la transcription des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires, les chimiokines et les molécules de co-stimulation (Osawa et al., 2006).

❖ *Rétro-contrôle négatif des voies de signalisation*

En raison de la capacité des IFN de type I à activer les réponses innée et adaptative du système immunitaire, la sécrétion des IFN doit être contrôlée pour éviter une réponse immune aberrante qui pourrait endommager les organes de l'hôte. Pour cela, les pDC expriment une panoplie de récepteurs de surface capables de moduler la production de cytokines (Figure 7).



**Figure 7 : Mécanismes de contrôle de la production des IFN de type I par les pDC.**

BDCA-2, un récepteur lectine de type C (CLR), a été le premier récepteur pouvant supprimer la capacité des pDC à produire des IFN de type I en réponse à des ligands de TLR (Dzionek et al., 2001). Il a été montré qu'un autre récepteur spécifique des pDC humaines, l'ILT-7, dont le ligand BST2 a été récemment identifié (Cao et al., 2009) est capable d'inhiber la production des IFN de type I et des cytokines pro-inflammatoires par les pDC activées par des agonistes des TLR7 et TLR9 (Cao et al., 2006). L'étude de leur mécanisme d'action a révélé que BDCA-2 et ILT-7 s'associent tous les deux avec le récepteur aux fragments Fc des immunoglobulines FcεRIγ et induisent une voie de signalisation via un motif ITAM

(Cao et al., 2007). L'engagement d'IgE sur son récepteur engendre également une diminution de la production des IFN de type I lorsque les cellules sont co-stimulées par des CpG (Novak et al., 2004; Schroeder et al., 2005).

D'autres récepteurs qui signalisent via des motifs ITAM ont été montrés comme ayant un effet inhibiteur similaire. La fixation d'IgG sur le récepteur Fc $\gamma$ RIIA (CD32) diminue la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC activées (Bave et al., 2003; Green et al., 2004). L'engagement du récepteur NKp44, un récepteur associé à la protéine adaptatrice à motif ITAM DAP12, par un anticorps inhibe la production d'IFN- $\alpha$  induit par les ODN CpG (Fuchs et al., 2005). Chez la souris, la liaison de Siglec H par un anticorps, un autre récepteur associé à DAP12 réduit la production des IFN de type I *in vitro* et *in vivo* (Blasius et al., 2006). Il a été démontré que ces récepteurs induisent l'activation d'une voie de signalisation similaire à celle utilisée par le BCR des lymphocytes B (Cao et al., 2007). En effet, l'engagement de ces récepteurs membranaires active les protéines tyrosine kinases de la famille SRC comme LYN et SYK et deux adaptateurs signalétiques des lymphocytes B : BLNK et BCAP (Cao and Liu, 2007; Rock et al., 2007). De plus, le recrutement de SYK induit l'activation d'un complexe composé de BLNK, BTK et de PLC $\gamma$ 2 conduisant à une mobilisation importante du calcium intracellulaire. Or, il a déjà été montré qu'un important flux calcique peut inhiber la signalisation des TLR par l'induction d'une activation continue de la serine phosphatase calcineurine qui interagirait avec MyD88, empêchant son association avec les TLR (Connolly and Kusner, 2007).

Par ailleurs, PDC-TREM, un récepteur membranaire spécifique des pDC se lie à la plexine A1 et est activé par fixation de son ligand, la sémaphorine 6D pour induire l'activation de la PI3K et des ERK1 et ERK2 médiée par DAP12 (Watarai et al., 2008). Ceci a pour conséquence une augmentation de la production d'IFN- $\alpha$ . Les différents effets des récepteurs associés à DAP12 sur la production des IFN de type I par les pDC requièrent donc des études complémentaires.

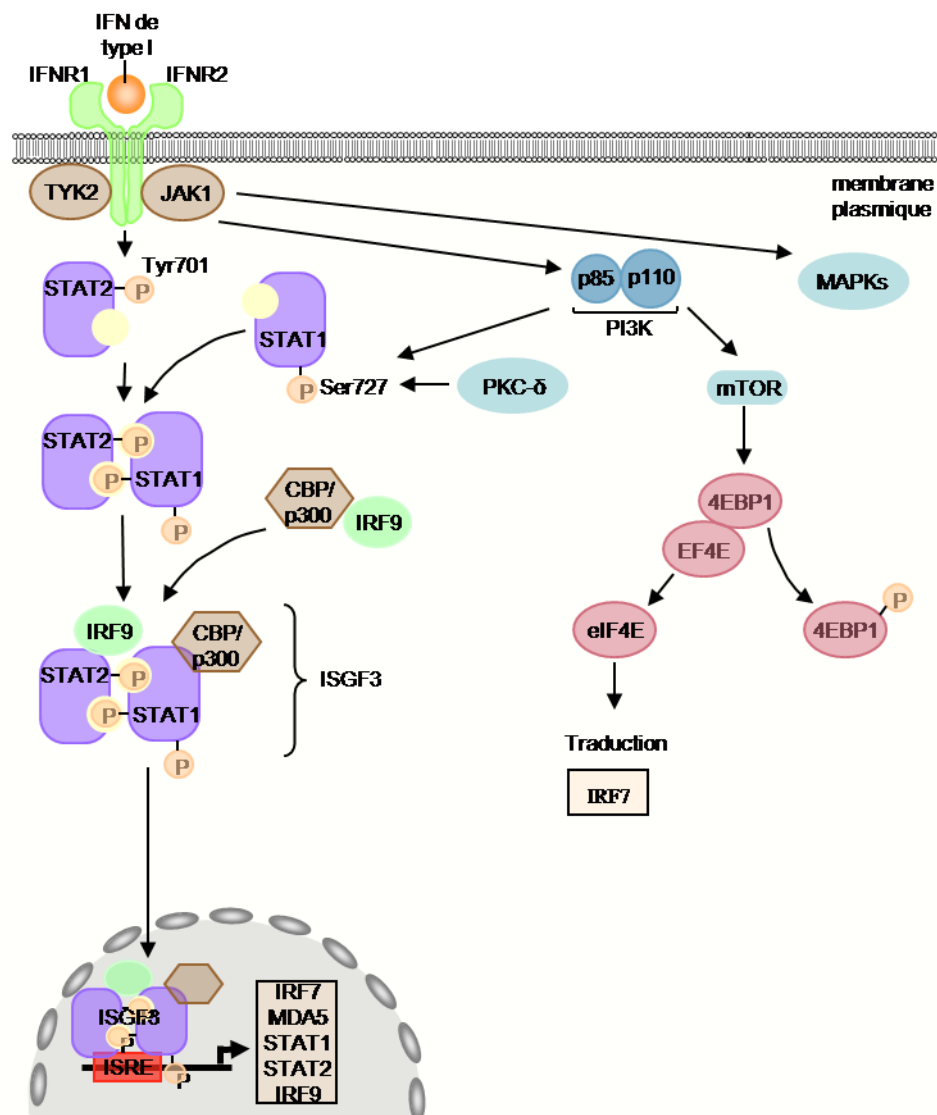
Dernièrement, il a été montré que les récepteurs P2Y, des récepteurs couplés à des protéines G stimulés par des nucléotides tels que l'ATP, l'ADP et le glucose-UDP diminuent la sécrétion d'IFN- $\alpha$  par les pDC humaines activées par l'Influenza et les ODN CpG de type A (Shin et al., 2008). L'utilisation d'anticorps dirigés contre

BDCA-4 semble également inhiber la production d'IFN- $\alpha$  induite par la stimulation virale des pDC mais de façon moins importante que ce qui a été rapporté avec des anticorps anti-BDCA-2 (Grage-Griebenow et al., 2007). Par ailleurs, les pDC expriment le CLR DCIR et il a été montré que son engagement par des anticorps induit la diminution de la production des IFN de type I sans altérer la production de cytokines pro-inflammatoires et l'expression de molécules de co-stimulation après activation par un ligand du TLR9 (Meyer-Wentrup et al., 2008). Au contraire, l'engagement par cross-linking des protéines CD300a et CD300c, exprimées par différentes populations hématopoïétiques dont les pDC, induit une diminution de la production de TNF- $\alpha$  et une augmentation de la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC humaines activées par des ODN CpG (Ju et al., 2008). Ces récentes études suggèrent donc que l'engagement de récepteurs membranaires entraîne l'activation de différentes voies régulant positivement ou négativement la signalisation induite par la stimulation TLR des pDC.

Il existe aussi une importante littérature sur l'impact de facteurs solubles sur le contrôle de la production d'IFN de type I. Dans le contexte d'un environnement tumoral, inflammatoire ou allergique, certains facteurs solubles comme l'IL-10 (Payvandi et al., 1998), l'oxide nitrique (Morita et al., 2005), les prostaglandines (Contractor et al., 2007; Fabricius et al., 2010; Hung et al., 2009; Son et al., 2006) ou la protéine HMGB1 (Popovic et al., 2006) inhibent la production d'IFN de type I par les pDC. Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans le contrôle de la production des IFN de type I ont été identifiés et font notamment intervenir l'AMP cyclique et une diminution d'expression d'IRF7 (Morita et al., 2005; Fabricius et al., 2010). De manière intéressante, certaines hormones comme la progestérone ont aussi une influence négative sur la production d'IFN de type I (Hughes et al., 2008). Ensemble, ces données montrent que les fonctions des pDC et notamment la production d'IFN de type I sont très sensibles à la régulation par les facteurs environnementaux.

#### D-1-c) Signalisation induite par les IFN- $\alpha/\beta$

La voie de signalisation des IFN de type I est connue depuis déjà de nombreuses années (Figure 8).



**Figure 8 : Voies de signalisation induites par les IFN de type I.**

Adapté de (Platanias, 2005).

Les IFN- $\alpha/\beta$  se fixent sur le même récepteur hétérodimérique exprimé de façon ubiquitaire et composé des sous-unités IFNR1 et IFNR2. La fixation des IFN- $\alpha/\beta$  sur le récepteur provoque sa dimérisation, ainsi que l'auto et la transphosphorylation des deux protéines tyrosines kinases de la famille Janus associées au récepteur : Tyk2 sur IFNR1 et JAK1 sur IFNR2 (Stark et al., 1998). La phosphorylation des kinases Janus

mène à la phosphorylation d'une tyrosine du domaine intracellulaire d'IFNR1 et permet de recruter STAT2 via son domaine SH2. STAT2 est alors phosphorylé et permet de recruter et de phosphoryler STAT1 sur la tyrosine à la position 701 (Darnell, Jr., 1997). L'acétyltransférase CBP/p300 est ensuite recrutée en se fixant sur deux résidus phospho-serines (aa364 et aa384) de l'IFNR2 et acétyle la chaîne du récepteur sur la tyrosine 399 (Tang et al., 2007). Cette acétylation crée un site d'amarrage pour IRF9 qui s'associe également au récepteur permettant la formation du complexe hétérodimérique ISGF3 (Stark et al., 1998; Tang et al., 2007). Ce complexe est ensuite acétylé et transloque au noyau où il se fixe sur des séquences consensus régulatrices appelées ISRE (interferon-stimulated response element) en amont des gènes induits par l'IFN. Une fois dans le noyau, les protéines STAT interagissent avec des protéines co-activatrices, comme BRG1 (Huang et al., 2002). De plus, il a été montré que l'activité histone-déacétylase (HDAC) est requise pour la transcription des gènes dépendants de l'IFN (Chang et al., 2004). La signalisation induite par les IFN de type I induit également une phosphorylation de STAT1 sur le résidu sérine en position 727 (Ser727) de son domaine C-terminal. Cette phosphorylation n'est pas nécessaire pour la translocation du complexe ou pour sa fixation sur les ISRE mais elle est essentielle pour son activité transcriptionnelle (Wen and Darnell, Jr., 1997). Cette phosphorylation peut être médiée par la PKC- $\delta$  (Uddin et al., 2002), CamKII (Nair et al., 2002) ou encore la PI3K (Nguyen et al., 2001).

En plus des protéines STAT, les IFN de type I induisent l'activation d'autres facteurs de transcription. En effet, après engagement du récepteur IFNR, les kinases PI3K (Uddin et al., 1997; Kaur et al., 2005), MEK/ERK2 (David et al., 1995) et p38MAPK (Uddin et al., 2000; Katsoulidis et al., 2005) sont activées de façon indépendante de la voie JAK-STAT et sont impliquées dans l'activation des facteurs NF- $\kappa$ B (Yang et al., 2001; Kaur et al., 2005), CREB/ATF-1 (Sousa et al., 2005), AP1 (Katsoulidis et al., 2005), IRF4 et IRF8. Une étude a démontré que l'activation de la voie PI3K par l'engagement du récepteur à l'IFN de type I conduit également à l'activation de la voie mTOR (Lekmine et al., 2003).

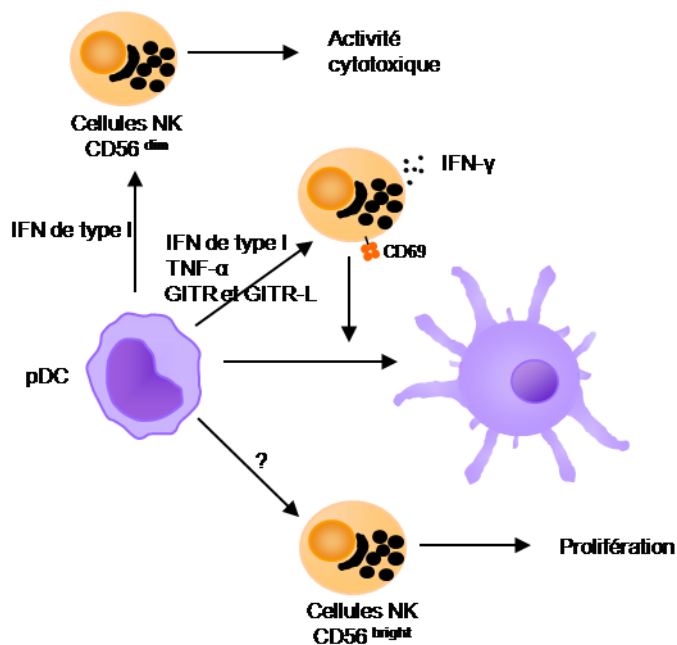


Les gènes exprimés suite à la signalisation induite par les IFN de type I sont nommés ISG (IFN-stimulated genes). Parmi ces ISG, on retrouve les gènes codant pour l'IRF7, MDA5 et RIG-I qui vont pouvoir amplifier la production d'IFN de type I, et les gènes codant pour STAT1, STAT2 et IRF9 qui vont augmenter la signalisation induite par les IFN de type I (van Boxel-Dezaire et al., 2006).

En résumé, les pDC, cellules professionnelles pour la production des IFN de type I, sont capables de générer une réponse rapide et intense, permettant donc aux IFN de type I d'intervenir durant les premières étapes des réponses immunitaires. Néanmoins, de part leur large spectre d'action et afin d'éviter une trop forte réaction immunitaire, la production des IFN de type I doit être extrêmement bien contrôlée. Ainsi, un grand nombre de voies inhibitrices existent.

#### D-1-d) Rôle des IFN de type I dans l'immunité innée

L'immunité innée est constituée des cellules NK. Ces cellules sont des lymphocytes qui sont caractérisée par l'expression du marqueur CD56. Les cellules NK possèdent une activité cytotoxique et sont d'importants effecteurs cellulaires dans la défense de l'organisme contre différents agents infectieux et contre des cellules tumorales. L'activité cytotoxique des cellules NK est contrôlée par une balance entre des signaux activateurs et inhibiteurs médiés par divers récepteurs et est régulée par diverses cytokines (Biron et al., 1999). Néanmoins, l'observation que les IFN de type I produit au cours d'une infection virale sont de puissants inducteurs de la cytotoxicité des cellules NK font de ces cytokines des acteurs majeurs dans l'activation de ces cellules. En effet, dès les années 1980s, des chercheurs ont montré qu'au cours d'une infection virale, l'activation des cellules NK est dépendante d'une population cellulaire HLA-DR<sup>+</sup>, maintenant connue pour être les pDC (Perussia et al., 1985; Bandyopadhyay et al., 1986; Oh et al., 1987) (Figure 9).



**Figure 9 : Stimulation de l'immunité innée par les pDC.**  
Adapté de (Moretta et al., 2005)

Différentes études se sont intéressées plus récemment à l'interaction *in vitro* entre les cellules NK et les pDC (Gerosa et al., 2005; Gerosa et al., 2002; Romagnani et al., 2005; Marshall et al., 2006; Hanabuchi et al., 2006). Ces études ont montré que non seulement, les pDC humaines activent les cellules NK, tel qu'indiqué par l'augmentation de l'expression de CD69, mais amplifie aussi leurs fonctions effectrices, particulièrement leur activité cytotoxique et la production d'IFN- $\gamma$ . Le mécanisme d'activation des cellules NK par les pDC est maintenant clairement connu. En effet, les IFN de type I sécrétés par les pDC sont nécessaires et suffisants pour induire l'activité cytotoxique des cellules NK alors que l'expression de CD69 et la production d'IFN- $\gamma$  est dépendante à la fois des IFN de type I et du TNF- $\alpha$ . Il a aussi été montré que l'interaction entre le récepteur glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (GITR) et son ligand exprimé sur les pDC activées participe à la co-activation des cellules NK par les pDC (Hanabuchi et al., 2006). De plus, les pDC induisent la prolifération sélective des cellules NK CD56<sup>bright</sup> (Gerosa et al., 2005) et produisent des chimiokines, notamment CCL4 et CXCL10 qui permettent le recrutement des cellules NK (Megjugorac et al., 2004; Piqueras et al., 2006).

Réciproquement, les cellules NK activées par l'IL-2 ne sont pas cytotoxiques envers les pDC. Au contraire, elles induisent leur maturation, ainsi que la production d'IFN- $\alpha$  et de TNF- $\alpha$  (Gerosa et al., 2005; Gerosa et al., 2002), générant ainsi une boucle autocrine d'activation de la réponse immunitaire innée.

L'importance de la fonctionnalité du dialogue entre les pDC et les cellules NK a aussi été étudiée dans le contexte de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). En effet, les pDC de patients infectés par le VIH ne sont pas capables d'activer les cellules NK en raison de leur incapacité à produire de l'IFN- $\alpha$  et du TNF (Conry et al., 2009; Reitano et al., 2009). De façon intéressante, des recherches antérieures indiquaient que les cellules T CD4<sup>+</sup> autologues infectées par le VIH étaient résistantes à la lyse par les cellules NK (Bonaparte and Barker, 2003). Cependant, une étude a démontré que l'aide de cellules accessoires comme les pDC est nécessaire à l'induction de la lyse des cellules T CD4<sup>+</sup> infectées par le VIH par les cellules NK (Tomescu et al., 2007).

Ensemble, ces données suggèrent fortement que des pDC fonctionnelles sont indispensables à l'établissement et à la régulation de l'immunité innée contre les infections, via leur interaction avec les cellules NK.

## D-2 Cellules présentatrices d'antigènes : pDC dans l'immunité adaptative

### D-2-a) Maturation des pDC en DC

En l'absence de stimulation, les pDC expriment de faibles niveaux de molécules de co-stimulation CD80 et CD86 et elles ont une faible capacité de présentation d'antigènes, et donc n'induisent pas la prolifération des cellules T spécifiques d'un antigène. Cependant, les pDC peuvent se différencier en DC matures et ainsi, acquérir la capacité d'interagir avec les cellules T. Durant leur maturation, les pDC subissent une transformation morphologique radicale. En effet, au microscope électronique, les pDC au repos sont rondes et lisses alors qu'après activation, elles acquièrent une morphologie dendritique typique (Figure 5). La morphologie dendritique a bien été étudiée *in vitro*. Cependant, il n'y a pas d'observations publiées *in situ*. Cela est dû au fait que l'expression des deux marqueurs spécifiques des pDC, BDCA-2 et BDCA-4 est modifiée. En effet, l'expression de BDCA-2 est diminuée

après activation des pDC et les mDC activées se mettent à exprimer BDCA-4, perdant ainsi toute spécificité pour les pDC (Dzionek et al., 2001).

Des études *in vitro* suggèrent qu'il existe deux voies de maturation. La première fait intervenir l'IL-3 ou l'IL-3 et CD40L, alors que la seconde met en jeu l'IFN- $\alpha$  et le TNF- $\alpha$  (Grouard et al., 1997; Olweus et al., 1997; Rissoan et al., 1999; Kadowaki et al., 2000). La pertinence biologique de la maturation des pDC par l'IL-3 n'est pas vraiment connue. Certains groupes ont proposé que l'IL-3 pourrait être produit par les basophiles, les éosinophiles et les mastocytes au cours d'une infection parasitaire. La maturation des pDC induite par les l'IFN- $\alpha$  et le TNF- $\alpha$  est quant à elle provoquée par les cytokines produites par les pDC elles-mêmes. Classiquement, cette voie de maturation est induite par la stimulation du TLR9 par les ODN CpG de type B. Cependant, l'induction des molécules de co-stimulation directement par l'activation de la voie TLR9-NF- $\kappa$ B, comme il est classiquement représenté dans les schémas des voies de signalisation, n'a pas été clairement démontrée. Il semble donc important de poursuivre les investigations afin de savoir quelles sont les voies de signalisation qui mènent à l'induction du phénotype de maturation dans les pDC.

#### D-2-b) Capture et présentation d'antigènes

Les pDC ont une faible capacité à prendre en charge des antigènes exogènes et à les apprêter. Ceci peut s'expliquer par l'absence d'expression des récepteurs scavengers classiques des DC : la dectine-1, le récepteur au mannose et DC-SIGN (Meyer-Wentrup et al., 2008; Lui et al., 2009). Certaines études suggèrent que les pDC sont capables de capturer des antigènes exogènes seulement lorsqu'ils sont opsonisés par des Ig grâce à l'expression de récepteurs au fragment Fc des Ig comme CD32 (Bave et al., 2003; Bjorck, 2001; Parcina et al., 2008). Par ailleurs, les pDC présentent les antigènes de façon moins efficace que les mDC en terme de phagocytose, d'apprêtement et de chargement des peptides sur les molécules CMH de classe II (Grouard et al., 1997; Lui et al., 2009).

#### D-2-c) Cross-présentation d'antigènes et activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

La présentation croisée est un mécanisme qui consiste en l'apprêtement et la présentation d'antigènes exogènes par les molécules CMH de classe I. Ce mécanisme permet ainsi l'activation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs spécifiques d'antigènes exogènes. Ce processus diffère de la voie classique où les molécules HLA de classe I présentent des antigènes issus de protéines synthétisées de façon endogène. Plusieurs études effectuées chez la souris ont montré que les pDC n'étaient pas ou peu capables de cross-présenter des antigènes exogènes (Schlecht et al., 2004). De plus, Shnurr et al. ont démontré que des complexes immuns comprenant des antigènes exogènes dérivés de mélanomes couplés à des immunoglobulines sont efficacement présentés à des CTL spécifiques par les mDC humaines mais pas par les pDC (Schnurr et al., 2005). Dans un modèle murin, une étude a démontré que bien que se soit les pDC qui orchestrent la mise en place de l'immunité anti-tumorale en activant les cellules NK et les mDC, la présentation croisée des antigènes tumoraux est médiée par les mDC (Liu et al., 2008). Cependant, la présentation croisée a été mise en évidence chez les pDC dans certaines conditions comme en ciblant les pDC avec l'antigène et en les mettant en présence d'une grande fréquence de lymphocytes T spécifiques ou en les activant préalablement avec des ODN CpG (Zhang et al., 2006). De façon contradictoire, une autre équipe a montré que la stimulation par les ODN CpG inhibe la cross-présentation (Lui et al., 2009). De plus, une étude a apporté la preuve que les pDC humaines sont capables de cross-présenter des peptides dérivés du VIH couplés à un lipopeptide ainsi que des dérivés de cellules infectées en apoptose (Hoeffel et al., 2007). Plus récemment, il a été montré que les pDC non stimulées cross-présentent des antigènes issus de la capture de cellules infectées par le virus de l'influenza (Lui et al., 2009). *In vivo*, il a aussi été établi que les pDC de la rate de souris capturent efficacement des Ags exogènes mais qu'elles ne sont pas capables de cross-présenter ces Ags dans leur état basal. Par contre, quand les pDC sont stimulées *in vitro* et *in vivo* par les TLR7 ou TLR9, elles cross-présentent des Ags et sont capables de générer des réponses effectrices T CD8<sup>+</sup> contre ces Ags *in vivo* (Mouries et al., 2008).

Le rôle des pDC humaines dans l'induction de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques par présentation directe d'antigènes endogènes a été peu étudié.

Néanmoins, il a été montré que les pDC infectées par le virus de l'influenza peuvent induire la prolifération de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires spécifiques d'antigènes viraux (Fonteneau et al., 2003). De plus, il a été montré que les pDC murines activées peuvent induire des CTL fonctionnels spécifiques d'antigènes endogènes dans des contextes viraux et tumoraux (Salio et al., 2004; Schlecht et al., 2004).

Du fait des résultats divergents concernant la capacité de présentation croisée des pDC et du manque de littérature concernant l'induction de lymphocytes T cytotoxiques, il apparaît primordial de poursuivre les recherches sur le rôle des pDC dans l'établissement de réponses cytotoxiques spécifiques d'Ag.

#### D-2-d) Activation et polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Les pDC au repos expriment un faible niveau de CD86 et n'expriment pas les autres molécules de co-stimulation CD80, CD83 et CD40. Ainsi, contrairement aux mDC, les pDC au repos ne sont pas capables d'induire la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves (Rissoan et al., 1999), ni d'induire la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes effecteurs T helper (Th) (Grouard et al., 1997; Krug et al., 2003). De plus, il a été montré que les pDC fraîchement isolées du sang induisent l'anergie de clones CD4 de façon antigène-spécifique et empêchent la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  (Kuwana, 2002) (Figure 10).

En revanche, lorsqu'elles sont activées, les pDC augmentent l'expression des molécules HLA de classe II et l'apprêtement d'antigènes, up-régulent leur expression des molécules de co-stimulation et produisent différentes cytokines pro-inflammatoires, leur permettant donc de moduler la polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Grouard et al., 1997; Liu et al., 2001). Les pDC activées peuvent non seulement induire efficacement la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> déjà activés (Krug et al., 2003), mais elles sont également capables de stimuler des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs *in vivo* (Fonteneau et al., 2003) (Figure 10).

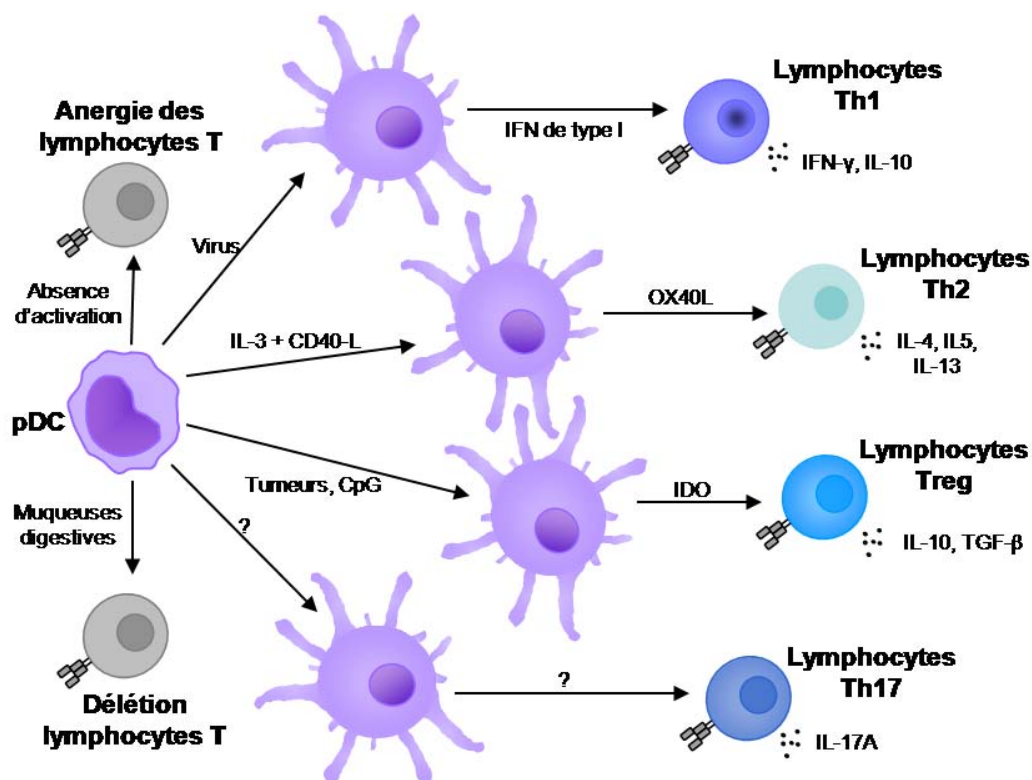


Figure 10 : Polarisation de l'immunité adaptative par les pDC.

#### ❖ Les lymphocytes Th1 et Th2

Comme mentionné plus haut, les pDC peuvent moduler différemment la réponse immunitaire selon le signal qu'elles ont reçu pour induire leur maturation. Les pDC activées par un virus, comme l'influenza induisent une forte prolifération des cellules T CD4 naïves allogéniques, ainsi que leur différenciation en cellules T productrices d'IFN- $\gamma$  et d'IL-10, conduisant ainsi la réponse immunitaire vers une polarisation Th1 (Cella et al., 2000; Kadowaki et al., 2000). Il a été suggéré que cette polarisation est dépendante des IFN de type 1 et indépendant de l'IL-12 (Kadowaki et al., 2000). A l'inverse, les pDC activées par CD40L et l'IL-3 induisent préférentiellement des réponses immunitaires de type Th2 et ce, de façon indépendante de l'IL-4 (Rissoan et al., 1999). Plus récemment, une étude a démontré que, suite à leur maturation via CD40L et l'IL-3, les pDC expriment à leur surface de hauts niveaux d'OX40L et produisent peu d'IFN de type I. Ceci a pour conséquence l'induction de la

polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïves en cellules productrices de cytokines de type Th2, comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Ito et al., 2004). Ces mêmes auteurs proposent cependant que les IFN de type I produits par les pDC après activation virale masqueraient l'effet induit par OX40L, ce qui permettrait de développer des lymphocytes Th1 (Ito et al., 2004). Curieusement, une étude a montré que les pDC activées par CD40L et pré-incubées avec de l'IL-3 sont capables d'induire des lymphocytes Th1 ((Cella et al., 2000).

#### ❖ *Les lymphocytes Th17*

Récemment, plusieurs études ont établi que les DC produisant de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6, de l'IL-23, du TNF- $\alpha$  et/ou TGF- $\beta$  induisent la différenciation d'une population de lymphocytes Th CD4<sup>+</sup> sécrétant de l'IL-17A nommés Th17 (Acosta-Rodriguez et al., 2007a; Acosta-Rodriguez et al., 2007b; Wilson et al., 2007; Korn et al., 2009). Ces lymphocytes Th17 sont caractérisés par leur production d'IL-17F, d'IL-22 et d'IL-26 et par l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t. Ils contribuent à la défense de l'organisme contre les pathogènes infectieux extracellulaires mais causent également des pathologies auto-immunes (Langrish et al., 2005; Annunziato et al., 2007; Korn et al., 2009). Bien que peu d'informations existent sur l'impact des pDC dans l'induction d'une telle sous population de lymphocytes, une équipe a montré que les pDC activées par un ligand synthétique du TLR7 induisent la différenciation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes Th sécrétant séquentiellement de l'IL-10, de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL17A (Lombardi et al., 2009). Encore plus récemment, il a été montré que la différenciation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en une sous population de lymphocytes Th cutanés mémoires produisant de l'IL-22 mais pas d'IL-17, ni d'IFN- $\gamma$  est médiée par les pDC de façon dépendante de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  (Duhon et al., 2009).

#### ❖ *Les lymphocytes Treg*

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont caractérisés par leur capacité à supprimer les réponses immunes Th1 et Th2. Les Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> expriment le répresseur



transcriptionnel Forkhead box P3 (FoxP3) et produisent des cytokines comme l'IL-10 et/ou le TGF- $\beta$ . Deux sous populations de Treg ont été identifiées : 1) les Treg naturels qui se développent dans le thymus et sont spécifiques d'antigènes du soi et 2) les Treg induits qui proviennent de la différenciation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en périphérie et sont spécifiques d'antigènes de l'environnement présentés par des DC (Workman et al., 2009). Plus précisément, parmi les lymphocytes Treg induits on peut distinguer les Th3 qui produisent du TGF- $\beta$  et des Tr1 qui produisent de l'IL-10 (Cottrez and Groux, 2004; Bacchetta et al., 2005). La place des pDC dans l'induction de la tolérance a été mise en évidence par un certain nombre d'études. En effet, il a été montré que les pDC activées par des ODN CpG peuvent induire des lymphocytes Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> produisant de l'IL-10, du TGF- $\beta$ , de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-6 (Moseman et al., 2004; Bilsborough et al., 2003; de Heer et al., 2004). De façon similaire, quand les cellules naïves T CD8 sont primées par les pDC, elles se différencient en cellules CD8<sup>+</sup> productrices d'IL-10 (Ito et al., 2007; Gilliet and Liu, 2002). Habituellement, les DC induisant la génération de lymphocytes Treg produisent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ . Or, dans l'étude de Moseman, aucune production d'IL-10 et de TGF- $\beta$  par les pDC activées par les ODN CpG n'a pu être détectée (Moseman et al., 2004), suggérant que les pDC ont un pouvoir tolérogène mais selon un mécanisme différent de celui connu jusque là. Et ce n'est que récemment qu'une équipe a démontré que les pDC humaines convertissent des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Treg grâce à l'expression intracellulaire de l'enzyme indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO), une enzyme qui catabolise la dégradation du tryptophane (Chen et al., 2008). La déprivation de l'environnement en cet acide aminé essentiel et la formation du métabolite kynurenine a un fort effet inhibiteur sur la prolifération et la survie des lymphocytes T et contribue au potentiel tolérogène de ces cellules (Mellor and Munn, 2004). De plus, il a été démontré que la stimulation des pDC murines avec les ligands inhibiteurs CTLA-4-Ig, OX2 (CD200)-Ig ou CD28-Ig induit la production d'indoleamine 2,3-dioxygénase (Fallarino et al., 2004; Fallarino et al., 2004) (Mellor et al., 2003). Plus récemment, l'activation des pDC par le VIH induit aussi l'expression d'IDO et engendre la suppression de l'immunité

anti-VIH (Boasso et al., 2007; Manches et al., 2008). Les mécanismes régissant l'expression d'IDO dans les pDC humaines restent néanmoins à être explorés.

Toutes ces études suggèrent donc l'existence d'une relation particulière entre les pDC et les lymphocytes Treg. Ainsi, ces observations pourraient avoir des implications importantes pour l'application de thérapies immunomodulatrices. Dans ce sens, Ochando et al. ont reporté qu'une thérapie combinée de transfusion spécifique du donneur et d'un anticorps anti-CD40L en transplantation d'organe solide induit des lymphocytes Treg spécifiques d'un allo-antigène. Cette génération des cellules Treg est directement dépendante de l'interaction entre les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les pDC portant l'allo-antigène (Ochando et al., 2006).

Par ailleurs, il semble que les pDC participent à la mise en place de la tolérance orale envers des antigènes exogènes puisque les pDC des muqueuses digestives sont capables de supprimer les réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de façon antigène spécifique (Goubier et al., 2008). Ce processus n'est cependant pas dû directement à l'induction des lymphocytes Treg mais à une délétion spécifique des effecteurs par les pDC (Dubois et al., 2009).

Malgré l'abondance de la littérature montrant le rôle des pDC dans la mise en place de la tolérance, il est à noter que quelques équipes ont montré que les pDC ne sont pas capable d'induire une réponse immunitaire tolérogène (Salio et al., 2003) (Schlecht et al., 2001).

Même si les pDC n'ont pas été initialement connues pour leur rôle dans la présentation antigénique, des études révèlent que les pDC sont capables de biaiser la réponse immunitaire adaptative, dépendamment des signaux de maturation qu'elles ont reçus. Les pDC font donc le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

### D - 3 Activité cytotoxique des pDC

Ce n'est que très récemment que l'activité cytotoxique des pDC a pu être mise en évidence. En effet, il a été tout d'abord montré dans une lignée de pDC que la stimulation de ces cellules par le virus de l'influenza ou par les ligands synthétiques

des TLR7 et TLR9 induit l'expression de la molécule TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Elles deviennent alors cytotoxiques envers des cellules infectées et tumorales qui expriment le récepteur de TRAIL (Chaperot et al., 2006). Très récemment, une étude a rapporté que les pDC humaines activées inhibent la réplication de cellules cancéreuses en les tuant par contact et expriment TRAIL (Matsui et al., 2009). Par ailleurs, il a aussi été montré que les pDC humaines expriment une molécule effectrice des lymphocytes CTL et des cellules NK, le granzyme B (Rissoan et al., 2002; Matsui et al., 2009). Dans le même sens, plusieurs études en contexte pathologique appuient ces résultats. En effet, une étude utilisant l'imiquimod, ligand synthétique du TLR7 pour le traitement de carcinomes basocellulaires, montre que les pDC des infiltrats inflammatoires expriment TRAIL et sont capables d'une activité antitumorale (Stary et al., 2007). D'autres montrent que les pDC induisent l'apoptose des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de patients séropositifs pour le VIH (Hardy et al., 2007; Stary et al., 2009), ce qu'une autre équipe n'a pourtant pas reproduit (Chehimi et al., 2010). Il est intéressant de noter que, tout comme pour la production d'IFN de type I, l'expression de TRAIL et l'activité cytotoxique des pDC est complètement abolie par la stimulation du récepteur BDCA2 (Riboldi et al., 2009).

L'ensemble de ces données suggère donc que les pDC ont un rôle majeur à jouer, non seulement dans l'initiation, mais aussi dans la phase effectrice des réponses immunitaires.

## **2- Les pDC dans les greffes de cellules souches hématopoïétiques**

### **A - Reconstitution des pDC**

Alors que la reconstitution des mDC a été relativement bien étudiée, peu d'information est disponible concernant la reconstitution des pDC et son impact sur les résultats de greffes de CSH. De plus, les quelques données proviennent d'études réalisées avec des patients ayant eu une greffe de moelle osseuse. Il a en effet été

décrit que les pDC sont détectables dans le sang de patients ayant subi une greffe de CSH aussi tôt que 6 semaines après greffe de moelle osseuse et leur nombre atteint des valeurs normales entre 12 et 24 mois. Les patients transplantés ont une capacité de production d'IFN de type I réduite suite à l'infection par le HSV-1, mais pas après infection par le virus Sendai (SV) (Giraud et al., 2005).

Chez les donneurs de cellules souches périphériques, l'administration de G-CSF augmente sélectivement le nombre de pDC dans le greffon, mais pas les mDC (Arpinati et al., 2000). Par contre, l'administration de G-CSF après greffe de CSH n'influence pas la reconstitution de pDC (Fagnoni et al., 2004). D'autres ont montré que la reconstitution des pDC après une allogreffe de CSH corrèle avec les niveaux plasmatiques de FLT3-L, mais pas de G-CSF (Chklovskaja et al., 2004).

D'autres groupes ont montré qu'une reconstitution altérée des pDC augmente le risque de rechute et de GvHD aiguë (Mohty et al., 2005; Reddy et al., 2004). Bien qu'une étude ait montré qu'un grand nombre de pDC est retrouvé chez des patients atteints de GvHD aiguë (Fagnoni et al., 2004), il semblerait qu'un faible nombre de pDC au moment de la greffe favoriserait une GvHD aiguë (Reddy et al., 2004). Inversement, la GvHD aiguë, ainsi que l'administration de corticostéroïdes altèrent la reconstitution des pDC (Kitawaki et al., 2003; Mohty et al., 2005; Vakkila et al., 2005; Arpinati et al., 2004). En revanche, Clark et al. ont reporté que la GvHD chronique pourrait être associée à un nombre élevé de pDC (Clark et al., 2003). Cependant, ces résultats sont controversés par d'autres études qui n'ont mis en évidence aucune corrélation entre la GvHD chronique et le nombre de pDC (Mohty et al., 2005; Vakkila et al., 2005; Arpinati et al., 2004).

Avec ces quelques études, il apparaît que le nombre de pDC qui apparaissent après une greffe de moelle osseuse atteint des niveaux normaux un an après la greffe et que ces cellules sont peu fonctionnelles. Néanmoins, d'autres études semblent nécessaires pour comprendre l'impact de ces cellules sur les résultats de greffe.

## **B - pDC dans les infections virales**

Par leur capacité à reconnaître des motifs génomiques d'acides nucléiques viraux, les pDC sont des cellules clés dans l'établissement de l'immunité antivirale. Leur rôle durant les infections virales a donc été très étudié. Je ciblerai mon attention sur la place des pDC dans les infections virales qui sont couramment rencontrées après greffe de CSH et particulièrement après greffe de sang de cordon.

### **B-1) Les infections par HSV**

Le rôle protecteur des IFN de type I contre les infections par HSV-1 et HSV-2 est connu depuis un grand nombre d'années. Mais ce n'est que récemment que les mécanismes de détection de ces virus par les pDC ont pu être mis en lumière. En effet, il a été montré que la détection des virus HSV-1 et HSV-2 se fait par endocytose au sein de la pDC et semble être strictement dépendant de l'activation du TLR9 exprimé par les pDC (Lund et al., 2003; Hochrein et al., 2004; Krug et al., 2004b). Il est aussi intéressant de noter que la production d'IFN- $\alpha/\beta$  est aussi médiée par d'autres cellules que les pDC et que ceci est indépendant du TLR9 (Hochrein et al., 2004; Krug et al., 2004b). De plus, la co-culture des lymphocytes T avec des cellules dendritiques exposées *in vivo* à des titres viraux croissants résulte en une incapacité à produire de l'IFN- $\alpha$  et en une diminution graduelle des réponses Th1 (Bjorck, 2004). Même si les pDC seules ne sont pas capables d'induire la génération de lymphocytes T cytotoxiques, la déplétion des pDC détériore l'éradication du virus par les CTL. Cette observation s'explique par le fait que les pDC sont nécessaires pour fournir aux cellules dendritiques des ganglions lymphatiques des signaux leur permettant d'induire des CTL anti-HSV (Yoneyama et al., 2005). Une étude sur deux patients avec des infections sévères de HSV-2 a révélé des niveaux indétectables de cellules NK et de pDC dans le sang (Dalloul et al., 2004). L'importance des pDC dans le contrôle de l'infection par les virus HSV est aussi révélée par la protection apportée par l'application locale de CpG sur les lésions cutanées (Ashkar et al., 2003; Gill et al., 2006).

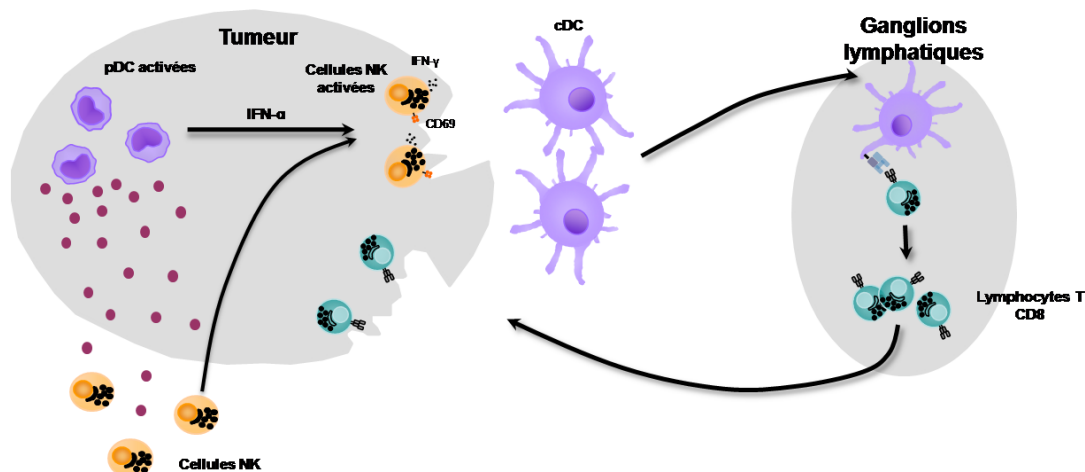
### **B-2) Les infections par le CMV**

Suite à une infection aiguë par le CMV murin, les pDC murines produisent de grandes quantités d'IFN- $\alpha/\beta$ , ce qui limite la réplication virale directement, mais aussi activent les cellules NK et coordonnent la fonction des autres cellules dendritiques pour initier la réponse immunitaire adaptative (Dalod et al., 2003; Krug et al., 2004a). En plus, ces cellules mûrissent et elles sont ainsi capables d'activer efficacement les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Dalod et al., 2003; Kvale et al., 2006; Varani et al., 2007). La détection du CMV par les pDC semble être dépendante du TLR9 et de MyD88 puisque des souris TLR9<sup>-/-</sup> et MyD88<sup>-/-</sup> sont plus susceptibles à l'infection et présentent des charges virales plus élevées que des souris sauvages (Tabeta et al., 2004; Delale et al., 2005; Krug et al., 2004a). Néanmoins, la résistance à l'infection et la production d'IFN- $\alpha$  est plus marquée chez les souris MyD88<sup>-/-</sup> que chez les souris TLR9<sup>-/-</sup>, suggérant ainsi que la détection du CMV par les pDC n'est pas exclusivement due au TLR9 (Delale et al., 2005). En effet, quelques études étayaient cette hypothèse et proposent un rôle du TLR7 dans la reconnaissance du CMV (Hokeness-Antonelli et al., 2007; Zucchini et al., 2008). Alors que toutes ces études soulignent l'importance des pDC dans le contrôle de l'infection par le CMV, d'autres études ont établi que l'infection par CMV pouvait affecter la fonction des pDC. Bien que l'infection des pDC par le CMV soit non permissive, celle-ci peut entraver la capacité allostimulatoire des pDC, menant à une diminution de la prolifération des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Varani et al., 2007). Très récemment, il a aussi été montré que les pDC infectées par CMV favorisent les cellules NK productrices de cytokines, plutôt que les cellules NK cytotoxiques (Cederarv et al., 2009).

### **C - pDC et réponse anti-tumorale**

L'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale nécessite la génération de lymphocytes cytotoxiques envers la tumeur. En plus d'avoir un effet sur l'établissement de réponses cytotoxiques, les IFN de type I jouent également un rôle direct sur la tumeur en augmentant son immunogénicité et en diminuant son taux de division cellulaire (Gutterman, 1994; Ferrantini and Belardelli, 2000; Vilcek, 2006). En raison de la capacité des pDC à faire le lien entre l'immunité innée et adaptative, à produire de grandes quantités d'IFN de type I et à induire des cellules T régulatrices,

leur rôle dans l'immunité tumorale a été investigué. Bien que quelques études se soient intéressées à l'implication des pDC dans l'immunité anti-leucémique, la majorité des informations proviennent de patients présentant des tumeurs solides (Figure 11).



**Figure 11 : Rôle des pDC dans l'immunité anti-tumorale.**

Adapté de (Liu et al., 2008).

### C-1) Dans les tumeurs solides

Tout comme les mDC, les pDC infiltrent les tumeurs solides. Dans le cancer du sein, un grand nombre de pDC infiltrées est corrélé avec une augmentation du risque de dissémination de la tumeur et de rechute (Treilleux et al., 2004). De plus, deux études ont montré que le nombre de pDC circulantes est diminué et que leur maturation est altérée (Della et al., 2003; Pinzon-Charry et al., 2007). Comme pour le cancer du sein, les patientes porteuses d'un cancer des ovaires présentent une altération fonctionnelle des cellules dendritiques dans la tumeur (Zou, 2005). Néanmoins, les pDC du microenvironnement tumoral ovarien sont fonctionnelles (Zou et al., 2001). Dans le carcinome épithélial des ovaires, un grand nombre de pDC a été trouvé dans les fluides ascitiques et ces pDC ne sont pas capables d'induire la production d'IL-2 par les cellules T (Zou et al., 2001). Au contraire, elles induisent des cellules T régulatrices productrices d'IL-10 (Wei et al., 2005; Zou, 2005). Une étude récente a montré que les pDC des ganglions lymphatiques drainant la tumeur expriment l'IDO et génèrent des lymphocytes T régulateurs conduisant à l'induction d'une tolérance

tumorale (Lee et al., 2003; Munn et al., 2004; Sharma et al., 2007). Ces données mettent en évidence que pour certains types de cancer, les pDC ne favorisent pas l'établissement de réponse antitumorale, notamment par l'induction de cellules T régulatrices. Les cellules tumorales participent activement à l'inhibition des pDC notamment en exprimant BTS2, un ligand du récepteur ILT7 (Cao and Bover, 2010). Dans un but d'immunothérapie, il serait intéressant de stimuler les pDC infiltrant les tumeurs par des ligands des TLR. Pour aller dans ce sens, des études dans un modèle murin ont montré que les pDC activées par des ligands des TLR sont capables d'activer des cellules NK et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes tumoraux conduisant à la régression tumorale (Salio et al., 2003; Salio et al., 2004; Liu et al., 2008; Vicari et al., 2002). De plus, il a été montré que l'injection intradermique ou sous-cutanée d'un ligand du TLR9 chez des patients porteurs de mélanome induit l'activation des pDC présentes dans les ganglions, la disparition des lymphocytes Treg et l'augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK (Pashenkov et al., 2006; Molenkamp et al., 2007). Cette immunothérapie a même permis, chez certains patients, la régression complète de la tumeur (Hofmann et al., 2008). L'utilisation d'agoniste pour les TLR7 et TLR9 semble être efficace pour traiter des patients avec des mélanomes (Pashenkov et al., 2006; Palamara et al., 2004; Salio et al., 2003). L'augmentation de la fonction des pDC a aussi été décrite dans des cancers du sein, de l'ovaire et dans des lymphomes (Vicari et al., 2002; Preynat-Seauve et al., 2006; Lou et al., 2007). Ainsi, l'activation des pDC infiltrant la tumeur, notamment par l'utilisation des ligands des TLR, semble représenter une stratégie prometteuse pour le développement de vaccins antitumoraux. De tels résultats mettent en avant qu'il est possible de ré-établir ou de maximiser des réponses immunitaires antitumorales en ciblant les pDC (Tableau 5).



Traitement	Système	TLR ciblé	Type de cancer	Phase de l'étude	Références
<b>Tumeurs solides</b>					
pDC pulsées avec OVA et activées par CpG	Murin	TLR9	Lymphome de cellules T EG7	Pré-clinique	Lou et al., 2007
DC activées par CpG + anti-IL-10	Murin	TLR9	Carcinome du colon C26	Pré-clinique	Vicari et al., 2002
pDC activées par CD40L	Humain	/	Lignées cellulaires de mélanomes	Pré-clinique	Salio et al., 2003
CpG7909	Humain	TLR9	Mélanome	Phase I/II	Pashenkov et al., 2006
Resiquimod	Humain	TLR7	Mélanome	Phase I	Adams et al., 2008
<b>Leucémies</b>					
CpG	Murin	TLR9	LMA et LLA	Pré-clinique	Blazar et al., 2001; Fujii et al., 2007
PF-3512676	Humain	TLR9	LLC	Phase I	www.clinicaltrials.gov

Tableau 5 : Immunothérapies des cancers basées sur les pDC.

### C-2) Dans les leucémies

Dans le cas des leucémies, des études ont cherché à savoir si les pDC pouvaient participer aux réponses anti-leucémiques. Plusieurs ont révélé que la diminution du nombre de pDC chez des enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) de lignée B pourrait contribuer aux faibles réponses anti-leucémiques observées contre les leucémies lymphoïdes aiguës (LLA) (Maecker et al., 2006; Mami et al., 2004; Laane et al., 2007). La même observation a été faite chez des patients atteints de LMC (Mohty et al., 2002), de LMA (Mohty et al., 2001) et chez des patients avec

une leucémie adulte des cellules T (adult T-cell leukaemia : ATL) (Hishizawa et al., 2004). Chez ces patients leucémiques on observe une réduction du nombre et de la fonctionnalité des pDC. La production d'IFN- $\alpha$  est diminuée, leur maturation et leur capacité allostimulatrice des cellules T est altérée (Mohty et al., 2001; Hishizawa et al., 2004). Il a été proposé que le défaut de fonction des pDC pourrait participer à l'échappement des cellules leucémiques à la surveillance par le système immunitaire. De façon intéressante, Mohty et al. ont montré que les patients avec une LMC répondant favorablement à un traitement avec l'imatinib, un puissant inhibiteur de l'activité tyrosine kinase BCR/ABL, restaurent le nombre et la fonction des pDC (Mohty et al., 2004). Comme cela a été décrit plus haut pour les tumeurs solides, l'activation des pDC par les ligands des TLR dans les leucémies semble être une stratégie thérapeutique intéressante. En effet, l'équipe de Kirk Schultz a établi que les ODN CpG induisent une augmentation des molécules de co-stimulation sur des cellules leucémiques lymphoblastiques aiguës de type B, ce qui engendre une réponse allogénique des lymphocytes T contre la leucémie (Reid et al., 2005). De façon intéressante, la même équipe a clairement démontré que l'administration *in vivo* d'ODN CpG réduit significativement la charge leucémique, permet de contrôler la maladie et augmente la survie des souris. La mort des cellules leucémiques *in vivo* est corrélée avec la production de cytokines comme l'IFN- $\alpha$ , l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  et est directement liée à la présence de cellules NK (Fujii et al., 2007). De plus, l'administration des ODN CpG confère une protection à long-terme contre la maladie (Seif et al., 2009). Ensemble, ces résultats mettent donc en lumière que l'activation des pDC pourrait être une avenue intéressante dans le développement d'immunothérapie contre les leucémies.

#### **D - Tolérogénicité des pDC : impact sur la prise de la greffe et sur la GvHD**

Plusieurs travaux ont tenté d'établir des liens directs entre les pDC et la tolérance nécessaire à la réussite des greffes. Une étude a révélé que l'injection de pDC chez une souris, a un impact significatif sur la prise de la greffe, notamment en amplifiant la prise des cellules souches hématopoïétiques (Fugier-Vivier et al., 2005). La

déplétion des pDC ou la prévention de leur migration à partir des ganglions lymphatiques inhibe le développement des cellules T régulatrices, alors que le transfert adoptif des pDC induit la génération des Treg et prolonge la survie après une allogreffe cardiaque (Ochando et al., 2006). Coates et al ont montré que les pDC du donneur, mobilisées par une injection de FLT3-L prolongent la survie d'un cœur greffé, même en absence d'immunosuppresseurs (Coates et al., 2003). Fugier-Vivier et al. ont aussi montré que les souris ne rejettent pas une allogreffe de peau, montrant ainsi que les pDC induisent une tolérance envers le donneur (Fugier-Vivier et al., 2005). Cette observation suggère donc que les pDC pourraient être de bonnes cibles thérapeutiques puisqu'elles ne semblent pas induire de GvHD. En effet, une sous-population de pDC exprimant CCR9 est capable d'inhiber le développement d'une GvHD aiguë (Hadeiba et al., 2008). Cependant, une autre étude plus récente montrant que les pDC sont capables d'activer des lymphocytes T allo-réactifs et de médier une GvHD (Koyama et al., 2009) met en lumière la nécessité de poursuivre les investigations.

## **HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL**

**L**a littérature scientifique sur la greffe de sang de cordon révèle un intérêt grandissant de la part des chercheurs et des cliniciens pour le sang de cordon. En effet, ce type de greffe permet de minimiser les effets délétères de la GvHD tout en gardant un effet GvL, et ce malgré une disparité HLA plus importante que ce qui est habituellement accepté pour les greffes de moelle osseuse. Cependant, la greffe de sang de cordon présente des inconvénients par rapport à des greffes de moelle osseuse. Le nombre restreint de cellules souches hématopoïétiques dans une unité de sang de cordon limite la prise de la greffe et ralentit la reconstitution de la lignée myéloïde, ce qui a pour conséquence des risques d'infections opportunistes et notamment virales plus importants durant les 6 premiers mois. De plus, en cas de rechute, le mode d'intervention utilisant les infusions de lymphocytes du donneur (DLI) n'est pas disponible. Ces observations suggèrent fortement qu'il est important de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour contourner ces limitations.

Comme nous l'avons vu dans la revue de littérature, les pDC sont des cellules capables de moduler les réponses immunitaires. En effet, de part leur activité antivirale directe médiée par les IFN de type I, leur activité stimulatrice de la réponse cytotoxique des cellules NK, et leur tolérogénicité, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle une reconstitution rapide et fonctionnelle des pDC permettrait d'améliorer les résultats de greffe de sang de cordon en limitant les infections opportunistes et la GvHD.

L'absence de littérature sur la reconstitution des pDC suite à une greffe de sang de cordon ne permettait pas d'évaluer le potentiel immunothérapeutique de ces cellules. En effet, les seules études qui se sont intéressées aux pDC dans le cadre des transplantations de cellules souches hématopoïétiques ont étudié la reconstitution de ces cellules suite à une greffe de moelle osseuse. Pour ces raisons, nous avons étudié,

dans une première partie, la reconstitution des pDC chez des patients ayant été transplantés avec du sang de cordon en comparaison avec des patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse. Cette étude nous a permis de mettre en évidence une reconstitution accrue en nombre et en fonction des pDC suite à une greffe de sang de cordon. De façon intéressante, la reconstitution rapide et fonctionnelle des pDC est spécifique à la greffe de sang de cordon puisque ceci n'a pas été observé après une greffe de moelle osseuse.

Dans une seconde partie, nous avons déterminé si cette reconstitution fonctionnelle des pDC après greffe de sang de cordon pouvait être en lien avec les pDC du greffon. Pour ce faire, nous avons caractérisé les pDC du sang de cordon. Ainsi, nous avons pu révéler l'absence de production d'IFN- $\alpha$  suite à la stimulation des pDC de sang de cordon par les CpG. Nous nous sommes également intéressés à l'identification du mécanisme responsable de l'absence de production d'IFN- $\alpha$  dans ces cellules.

## **RÉSULTATS**

## **Article 1: Phenotypic and Functional Reconstitution of Plasmacytoid Dendritic and Natural Killer Cells: a Comparative Study of Bone Marrow and Umbilical Cord Blood Transplantation.**

Emily Charrier, Paulo Cordeiro, Rose-Marie Brito, Michael Harnois, Sabine Herblot, Samira Mezziani, Françoise LeDeist, Michel Duval

Article en préparation pour soumission à *Leukemia*

La capacité des pDC à moduler les réponses immunitaires innées et adaptatives nous fait penser que les pDC seraient de bons outils d'immunothérapie. En effet, comme nous l'avons vu dans la revue de littérature, les pDC activent et recrutent les cellules NK, qui deviennent ainsi des cellules cytotoxiques effectrices de l'immunité innée. Or, dans les dernières années, il a été montré que les cellules NK ont un potentiel d'immunothérapie dans les cadres de greffe de CSH (Velardi, 2008). De façon intéressante, les pDC sont aussi capables d'initier la réponse immunitaire adaptative et ainsi de générer des réponses antitumorales. Pour ces raisons, nous nous sommes intéressés aux pDC.

Cependant, l'absence de littérature sur la reconstitution des pDC suite à une greffe de sang de cordon ne permettait pas d'évaluer le potentiel immunothérapeutique de ces cellules. En effet, les seules études qui se sont intéressées aux pDC dans le cadre des transplantations de cellules souches hématopoïétiques ont étudié la reconstitution de ces cellules suite à une greffe de moelle osseuse. Pour ces raisons, nous avons étudié, dans une première partie, la reconstitution des pDC chez des patients ayant été transplantés avec du sang de cordon en comparaison avec des patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse.



Mon rôle dans cet article a été d'effectuer une partie des expériences en collaboration avec Paulo Cordeiro et Rose-Marie Brito. J'ai aussi compilé les données cliniques des patients avec l'aide de Samira Mezziani. Et enfin, j'ai procédé à l'analyse de tous les résultats et à la rédaction de l'article, en collaboration avec Sabine Herblot et mon directeur de recherche.

**Phenotypic and Functional Reconstitution of Plasmacytoid Dendritic and Natural Killer Cells: a Comparative Study of Bone Marrow and Umbilical Cord Blood Transplantation.**

Emily Charrier <sup>\*,†</sup>, Paulo Cordeiro <sup>\*</sup>, Rose-Marie Brito, Michael Harnois <sup>\*,‡</sup>, Sabine Herblot <sup>\*</sup>, Samira Mezziani <sup>§</sup>, Françoise LeDeist, Michel Duval <sup>\*,†,‡,§</sup>

\* Groupe de Recherche En Transplantation et Immunologie du Sang de Cordon (GRETISC), Centre de cancérologie Charles Bruneau, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine. 3175 chemin de la Côte Sainte-Catherine, H3T 1C5 Montréal, Québec, CANADA ; † Université de Montréal, Département de Sciences Biomédicales ; ‡ Université de Montréal, Département de Microbiologie et d'immunologie ; § CHU Sainte-Justine, Service d'hémato-oncologie

**Keywords:** umbilical cord blood transplantation, leukemia, dendritic cells, natural killer cells

**ACKNOWLEDGMENTS:**

This publication was supported by grants from la Fondation du Centre de Cancérologie Charles-Bruneau and Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

E.C. is a fellow of Fondation des Étoiles, Fondation du CHU Sainte Justine and Fondation Cole. We thank all the members of the Groupe de Recherche sur l'Immunologie et la Transplantation de Sang de Cordon for their help, advice, and friendly support: C. Alfieri, C. Beauséjour, N. Heveker, F. Le Deist, I. Louis, P. Ovetchkine, H. Soudeyns, E. Wagner, and J. Menezes. We also thank Hugo Morin and Sonia Bizier from the Research Cord Blood Bank of CHU Sainte-Justine for helping with graft data collection.

## ABSTRACT

Natural killer (NK) and plasmacytoid dendritic cells (pDC) are innate immune cells that orchestrate immune defenses against virus and tumor cells. Following allogeneic stem cells transplantation, both pDC and NK cells have been shown to independently influence transplant outcomes. However, no study has directly evaluated the functionality of the pDC/NK cell axis in terms of stem cell sources. We thus aimed to compare pDC and NK cell functional reconstitution following umbilical cord blood (UCBT) and bone marrow transplantation (BMT), in children treated for malignant or non-malignant diseases. We show that the kinetics of NK cell reconstitution is similar after UCBT and BMT and is characterized by a rapid increase of blood NK cell counts associated with a predominance of the CD56<sup>bright</sup> subset. As assessed by interferon-gamma production and CD107 expression following *in vitro* stimulation, NK cell activation was similar in patients treated with UCBT or with BMT. In contrast, we observed that pDC reconstitution is faster following UCBT as compared to BMT: CB-derived pDC counts reached higher levels as early as 2 months post transplantation and these counts remained elevated, while BM-derived pDC counts stayed below normal levels during the first year post-transplantation. However, CB-derived pDC exhibited impaired IFN- $\alpha$  production upon *in vitro* stimulation with unmethylated CpG oligonucleotides, despite a higher level of IFN- $\alpha$  production by unstimulated blood cells. This defect was not observed in patients treated with BMT. However, both CB- and BM-derived pDC are able to mature into antigen presenting cells. Finally, no significant association between pDC or NK cell recovery and patient outcome could be identified in our cohort. These data reveal an important difference in the pDC/NK axis functionality between UCB- and BM-transplanted patients that may impact future developments of post-transplant immunotherapy based on innate immunity activation.

## INTRODUCTION

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the only therapy to cure children with leukemia relapse, metabolic disorders and severe immune deficiencies. However, almost all lethal complications of HSCT, including leukemia relapse and opportunistic infections result from the post-transplant immune deficiency that lasts for months after transplantation. Therefore, the therapeutic challenge in improving the transplanted-children outcome relies on the enhancement of immune reconstitution, without increasing the harmful graft-versus-host disease (GvHD).

Umbilical cord blood (UCB) is increasingly used due to its immediate availability, greater tolerance of HLA disparity and lower incidence of GvHD<sup>1-5</sup>. Although higher rates of life-threatening infections have been reported in patients who received UCBT, similar event-free survival and leukemia relapse rates have been observed in UCB and bone marrow (BM) transplanted patients<sup>3;6-9</sup>. These observations indicate that UCB-derived immune cells have unique immune properties that allow for allogeneic tolerance while preserving anti-tumor activity, also called graft-versus-leukemia (GvL) effect. This immunological therapeutic effect is mediated by lymphocytes of both innate and adaptive arms of the engrafted immune system, i.e. natural killer (NK) and T cells respectively. While T cell reconstitution following UCBT is delayed as compared to BMT<sup>6</sup>, NK cell reconstitution has been shown to follow similar kinetics in UCB and BM-transplanted patients<sup>10-13</sup>. Indeed, NK cells are the first lymphocytes emerging in blood and represent up to 80% of peripheral blood lymphocytes during the first 100 days post-transplant. The role of NK cells in GvL effect and post-transplant outcome has been increasingly investigated during the last decades. In particular, it has been proposed that donor NK cells expressing inhibitory KIRs, which do not recognise ligand(s) on recipient targets (KIR-ligand mismatch), are released from HLA inhibition and mediate allo-responses leading to clinically significant effects. Indeed, KIR-ligand incompatibility was associated with a decreased incidence of graft failure, acute GvHD and relapse and an improved survival of patients with acute leukemia<sup>14</sup>.

NK cells are the innate immune effectors and their functions are highly regulated by interactions with other cellular subsets, such as dendritic cells (DCs)<sup>15-17</sup>. Cross talk between NK cells and DCs improves NK cell activation and potentializes their responses against pathogens and tumor cells, while, activated NK cells induce DC maturation<sup>17</sup>. In particular, type I interferons (IFN), produced in large amounts by plasmacytoid dendritic cells (pDC), are strong inducers of NK cell cytolytic activity and cytokine production<sup>18-20</sup>. Therefore, the immune reconstitution of DCs following transplantation greatly influences the functionality of NK cells and, as a consequence, the occurrence of life-threatening complications such as opportunistic infections, leukemia relapse and GvHD. Indeed, clinical studies have revealed that acute GvHD is associated with impaired pDC recovery after transplant<sup>21-24</sup>. Nonetheless, the role of pDCs in GvHD physiopathology is still unclear as conflicting results have been reported using mouse models of transplantation<sup>25-27</sup>. In addition, it has been shown that pDCs can enhance GvL activity mediated by donor T cells without increasing GvHD in a mouse model of hematopoietic transplantation<sup>28</sup>. However, the role of NK cells was not investigated in this study. These data indicate that post-transplant pDCs play pleiotropic roles, inducing tolerance or promoting a GvL effect, due to their unique ability to induce NK cell-mediated anti-tumor activity, Th1 or Th2-dependent T cell cytotoxic responses and tolerance through regulatory T cell (Treg) differentiation<sup>29</sup>.

Given the importance of innate immunity, early after HSCT, a better characterization of post-transplant innate effectors (NK cells) and regulators (pDC) may open new avenues of investigation to improve the outcome of transplanted patients. We therefore decided to longitudinally monitor the reconstitution and function of the pDC/NK axis in children treated with BMT or UCBT for malignant and non malignant diseases. We reveal an important difference in the kinetics of reconstitution of CB-derived versus BM-derived pDCs. CB-pDCs recovery is more rapid, although these cells exhibit impaired IFN- $\alpha$  production upon *in vitro* stimulation. In contrast, CB-derived NK cells are not functionally different from their BM-derived counterparts. Furthermore, a correlation between pDC/NK axis recovery and outcome of transplanted children was not found in our cohort. Collectively, these

results shed new light on the innate immune recovery following CBT and might set the basis for future pre-clinical trials aimed at increasing the NK cell-mediated GvL effect, to reduce the leukemia relapse rate in CB-transplanted children.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients and controls**

Patients (or their parents) provided informed written consent approved by the local Research Ethics Committee before peripheral blood samples were collected for the study. Blood samples were collected in heparinized tubes 1, 2, 3, 6, 9 and 12 months post-UCBT or BMT. Patient and transplant characteristics are summarized in Table 6. Fifty-six patients were included in our study (18 underwent BMT and 38 underwent UCBT at CHU Sainte Justine between 2005 and 2010). The criteria for exclusion were leukemia relapse (since the date of assessment), graft-failure and donor chimerism inferior to 90%. The conditioning regimen included total-body irradiation (TBI) or busulfan. Grafts were not T cell depleted. GvHD-prophylaxis included cyclosporin A and a short course of methotrexate after BMT. Patients treated with UCBT or unrelated BMT were given anti-thymocyte (rabbit) globulin (ATG, Thymoglobulin, Genzyme). Supportive care has been previously described and was identical for all patients, except for the granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), which was administered only after UCBT <sup>2</sup>. Most of the UCB-recipient pairs were 5/6 HLA matches.



Number of patients	Bone marrow		Cord blood		<i>p value</i>
	Number	%	Number	%	
	18		38		
<b>Recipient age at transplantation (year)</b>					
Median	12		8,9		<b>0,0016</b>
range	6 - 20		0,5 - 19,9		
<b>Sex</b>					
Female	9	50	12	32	
Male	9	50	26	68	
<b>Diseases</b>					
Leukemia	9	50	21	55	
LAL	3		13		
LANL	5		7		
CML	1		1		
Others	9	50	17	45	
<b>HLA match</b>					
6/6 or 10/10	17	94,4	6	15,8	
5/6 or 9/10	1	5,6	24	63,2	
4/6			10	26,3	
3/6			2	5,2	
<b>Double cord blood</b>			4	10,5	
<b>Total nucleated cells infused (x108 /kg)</b>					
Median	3,95		0,5		<b>&lt; 0,0001</b>
range	2,4 - 5,3		0,15 - 2,53		
<b>CD34+ cells infused ( x106 / kg)</b>					
Median	4,47		0,18		<b>&lt; 0,0001</b>
range	0,08 - 12,47		0,04 - 1,83		

**Table 6 : Patient and transplant characteristics**

### **Determination of blood cell subsets and kinetics of reconstitution**

Lymphocyte and monocyte absolute counts were determined using hemocytometer while pDC, NK and T cell absolute numbers per millilitre of blood were calculated from flow cytometry data and mononuclear cell counts as previously described<sup>30</sup>. Briefly, pDCs were identified as Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD123<sup>high</sup>, T and NK cells were identified as CD3<sup>+</sup>, CD56<sup>-</sup> and CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup> cells, respectively, within the gate of

mononuclear cells; the number of events in the pDC, T and NK gates were multiplied by the absolute counts of monocytes and lymphocytes per mL, obtained from the hemocytometer, and divided by the total number of events in the mononuclear cell window.

### **Phenotyping and functional analysis of NK cells and pDC**

NK cell and pDC phenotypes were determined using 4-color flow cytometry analysis. Whole blood cells were stained, after erythrocyte lysis with BD Pharm Lyse solution (BD Biosciences, Mississauga, ON), using anti-CD3, CD56, CD158a, CD158b and CD159 antibodies for NK cell identification and anti-Lineage (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56), CD11c, HLA-DR and CD123 antibodies for pDC identification.

NK cell activation was examined, following an overnight stimulation of whole blood samples with IL-15 at 50 ng/mL, (Amgen, Mississauga, ON, Canada) or IFN- $\alpha$  (Intron A) at 1000UI/mL (Schering, Kenilworth, NJ, USA) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Golgi Stop (BD Biosciences, Mississauga, ON) was added for the last 4 hours of incubation, per manufacturer's instructions. Extracellular staining of whole blood cells was performed, after erythrocyte lysis, using anti-CD56 (APC), anti-CD3 (PE/Cy7) and anti-CD107a/b (FITC) antibodies before fixation and permeabilisation with the cytofix/cytoperm kit (BD Biosciences, Mississauga, ON). Intracellular staining with anti-IFN- $\gamma$  (PE) antibody was then performed, to detect IFN- $\gamma$  production by activated NK cells.

pDC functional analyses were performed, after an overnight stimulation of whole blood with a CpG 2216 oligonucleotide (50 $\mu$ g/mL; Midland, TX, USA) or a control oligonucleotide (50 $\mu$ g/mL; Midland, TX, USA). Plasma samples were collected, after centrifugation and stored at -80°C. Subsequently, IFN- $\alpha$  levels in plasma, were measured using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Biosource/Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). After red blood cell lysis, pDC maturation was examined, by staining with anti-CD40 (FITC) and anti-CD54 (PE) or anti-CD80 (FITC) and anti-CD86 (PE) antibodies, in combination with anti-HLA-DR (PE/Cy7) and CD123 (APC) for pDC identification. All fluorescent data acquisitions

of stained samples were performed on a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) with subsequent analysis of the data using Cellquest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

### **In vitro pDC differentiation**

*In vitro* pDC differentiation was performed using a method adapted from that published by Chen et al.<sup>31</sup>. UCB and BM CD34<sup>+</sup> cells were purified with a positive selection kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were then cultured at a concentration of 10<sup>6</sup> cellules/mL in Yssel medium (Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA, USA) supplemented with 5% AB human serum (Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA, USA), FLT3-Ligand (100 ng/mL; R&D Systems), thrombopoietin (TPO) (50 ng/mL; R&D Systems) and Stem Cell Factor (SCF) (10 ng/mL; R&D Systems). Culture medium was changed every 2 to 3 days and progenitor expansion culture was maintained during one week. After 7 days, SCF was replaced by IL-7 at 10 ng/mL (Cytheris S.A., Issy-les-Moulineaux, France) in order to facilitate pDC differentiation. The culture was maintained for 10 to 14 more days. pDC differentiation was evaluated by flow cytometry with anti-Lineage (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) FITC, anti-BDCA-2 PE, anti-HLA-DR PE/Cy7 and anti-CD123-APC antibodies.

### **Statistical analysis**

Results shown are means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). Inter-group comparisons were assessed with the Mann–Whitney U test, and significance was defined by a p value less than 0.05 with a two- tailed test. Statistical differences were shown as \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## RESULTS

### **Clinical outcomes.**

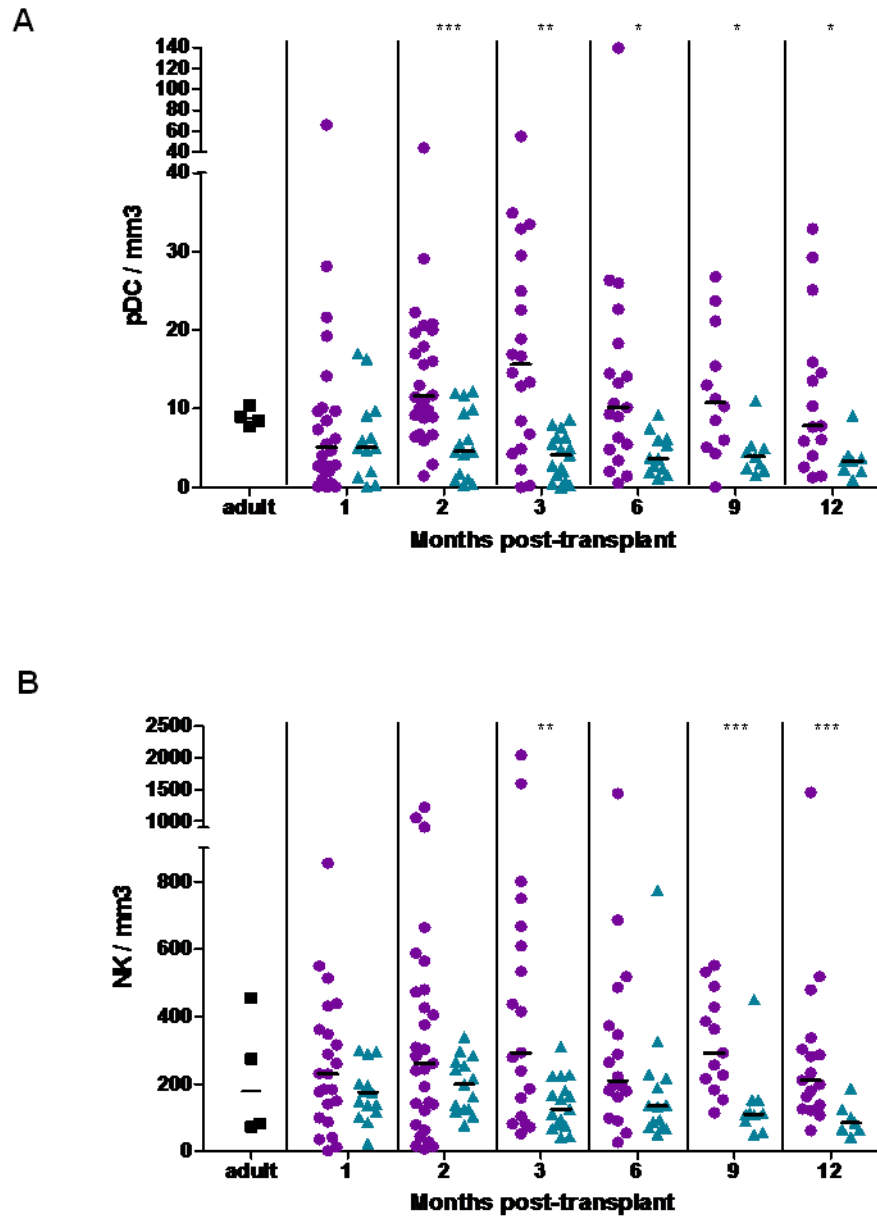
We included 38 UCB- and 18 BM-transplanted patients in our study (Table 6). Neutrophil engraftment occurred at a median of 22 days for the two groups (Table 7). Platelet recovery was statistically different between the two groups as it occurred at a median of 25 and 47 days following BMT and UCBT, respectively (Table 7). Two of 18 recipients of BMT and in six of 38 recipients of UCBT developed acute GvHD; thus, the rate of acute GvHD was similar between the two groups (11.1% for BMT and 15.8% for UCBT). Leukemia recurred after transplantation in 3 of 18 (16.7%) recipients of BMT and in 14 of 38 (36.8%) recipients of UCBT. The incidence of CMV and EBV infection and/or reactivation was similar between the two groups. Finally, global mortality is higher after UCBT compared to BMT (31.6% vs 5.5%).

	Bone marrow		Cord blood		<i>p value</i>
	Number	%	Number	%	
Number of patients	18		38		
<b>Neutropenia duration (days)</b>					
Median	22		22		<i>ns</i>
range	10 - 31		8 - 34		
<b>Thrombopenia duration (days)</b>					
Median	25		47		<b>&lt; 0,0001</b>
range	13 - 82		2 - 113		
<b>Graft failure</b>					
Engraftment failure	0	5,5	4	10,5	
rejection	1				
<b>acute GvHD</b>					
0	2	11,1	6	15,8	
I	16		32		
II	2		2		
III			1		
Ukn			1		
			2		
<b>chronic GvHD</b>					
	0	0	1	2,6	
<b>Relapse</b>					
Median days occurred	3	16,7	14	36,8	
range	264		180		
	210 - 447		55 - 571		
<b>EBV infection</b>					
negative - negative	4	22,2	11	28,9	
negative - positive	2	11,1	1	2,6	
positive - negative	5	27,8	14	36,8	
positive - positive	4	22,2	12	31,6	
status Ukn	3		0		
<b>CMV infection</b>					
negative - negative	15	83,3	27	71,1	
negative - positive	1	5,5	2	5,3	
positive - negative	0	0	2	5,3	
positive - positive	0	0	7	18,4	
status Ukn	2		0		
<b>Mortality</b>					
	1	5,5	12	31,6	
relapse	1		9		
other causes	0		1		

**Table 6 : Transplantation outcomes following BMT and UCBT.**

### **Immune reconstitution following UCBT**

We aimed to evaluate innate immune reconstitution following UCBT and BMT, in particular the pDC/NK axis. We therefore enumerated pDC and NK absolute counts in blood samples from UCB-transplanted patients throughout the follow-up (from 1 to 12 months post-transplantation). NK cells were present as early as 1 month post-UCBT and BMT at similar levels than in the control group (Figure 12A). Moreover, NK cell counts were significantly higher in UCB-transplanted patients 9 and 12 months post transplant than in BM-transplanted patients. Interestingly, normal pDC counts were obtained 2 months post-UCBT and remained elevated throughout the follow-up, while after BMT, pDC numbers never attained normal levels even after 12 months (Figure 12B). Therefore, our cohort had a similar pattern of T and NK cell reconstitutions as others previously reported <sup>6,13</sup>. Importantly, we reveal a unique feature of immune reconstitution following UCBT which is a fast and robust pDC recovery.



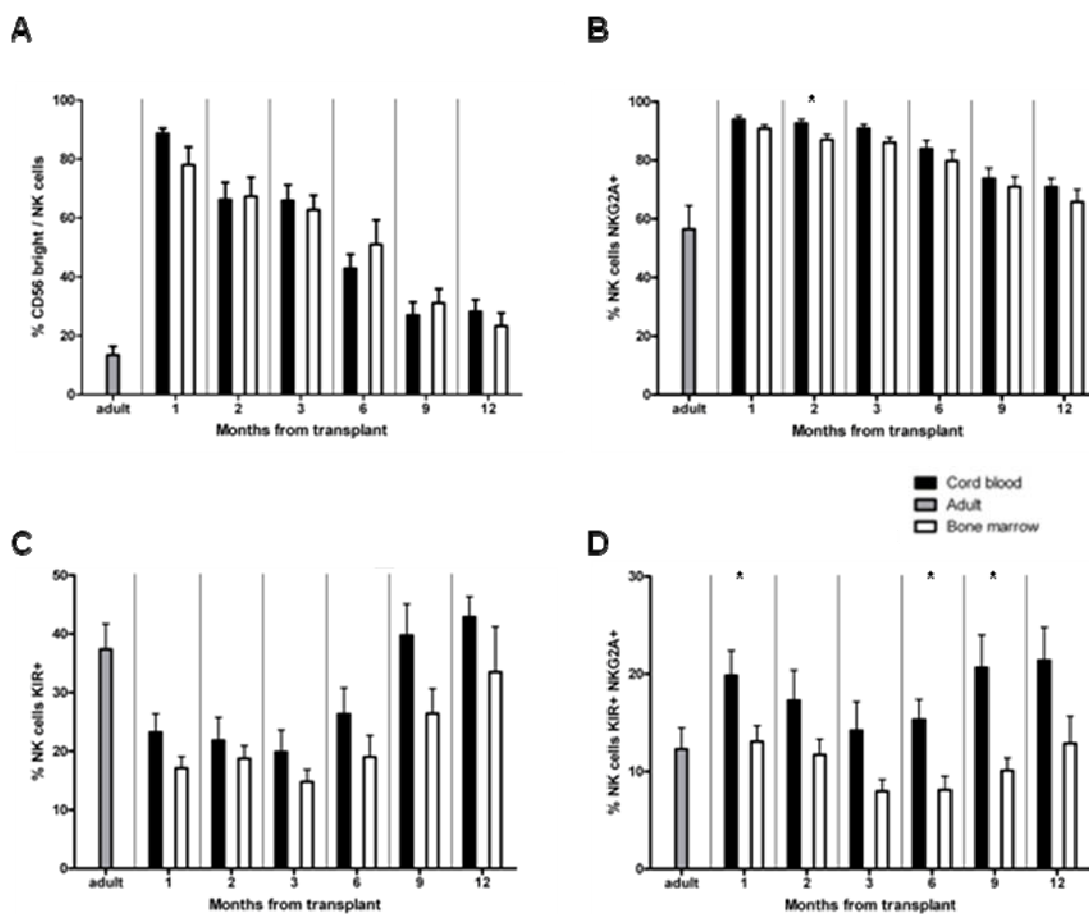
**Figure 12 : Immune reconstitution after UCBT and BMT.**

Absolute cell counts of  $CD3^+ CD56^+$  NK cells and  $Lin^- CD123^{high} HLA-DR^+$  pDC from healthy adult donors (squares) and from patients at 1, 2, 3, 6, 9, and 12 months post-UCBT (circles) and post-BMT (triangles). Each circle or triangle represents a patient. Horizontal bars represent the median. Cell counts were compared using a

0.01 significance level. Significant P-values are reported as: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### NK receptor expression following UCBT

Several studies have suggested that the cell surface phenotype and the inhibitory receptor repertoire expressed by post-transplant NK cells influence the outcome of transplanted patients <sup>32;33</sup>. We therefore longitudinally analysed the phenotype of blood NK cells in UCB- and BM-transplanted patients, 1 to 12 months after transplantation, as compared with blood NK cells from healthy volunteers.



**Figure 13 : Phenotypic analysis of NK cells after UCBT and BMT.**

(A) Percentage of CD56<sup>bright</sup> subset among CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells. (B) Percentage of NK-expressing NKG2A receptor among CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells. (C) Percentage of NK-expressing KIR (CD158a/b) receptor among CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells. (D) Percentage of NK co-expressing NKG2A and KIR receptors among CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK

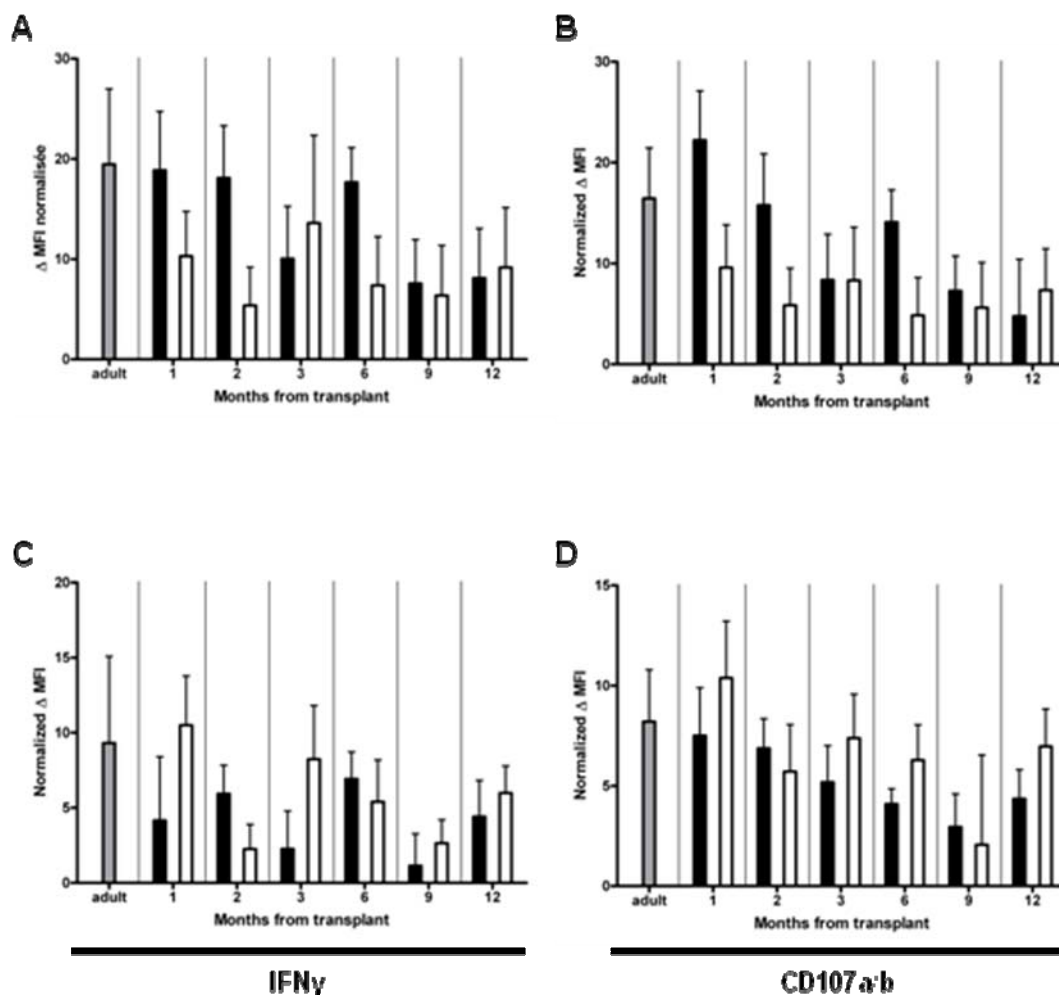


cells. Cells were collected from healthy adult donors (gray histogram), and from recipients of UCBT (black histogram) or BMT (white histogram). Results are shown as median  $\pm$  S.E.M. Significant p-values are reported as: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

During the first months following UCBT and BMT, we noticed that high proportions of NK cells were CD56<sup>bright</sup> and NKG2A<sup>+</sup> and these proportions tended to normalise by one year post-transplantation (Figure 13A and B). On the opposite, the percentages of NK cells expressing KIR were lower than controls during the first months post-transplantation (Figure 13C). Interestingly, the recovery of normal proportion of KIR<sup>+</sup> NK cells was faster in UCB-transplanted patients than in BM-transplanted patients since normal levels were reached 9 months post-UCBT as compared with 12 months post-BMT (Figure 13C). We also noticed that the percentages of NK cells expressing both KIR and NKG2A were higher in UCB-transplanted patients than in controls 1, 6 and 9 months post-transplantation, whereas this particular population was not increased in BM-transplanted patients (Figure 13D). Therefore, these results reveal slight phenotypic differences between NK cell recovery after UCBT and BMT.

### **Functional analysis of post-transplant NK cells**

We then assessed the functional abilities of NK cells following UCBT and BMT. IFN- $\gamma$  production and degranulation response, determined by CD107a/b expression, were tested by flow cytometry after whole blood stimulation with IFN- $\alpha$  or IL-15. We observed that post-UCBT and post-BM NK cells are equally activated by these cytokines as we did not notice any statistical differences between the UCBT and BMT groups and healthy controls. Overall, these results demonstrate that post-transplant NK cells are functional following UCBT and BMT.

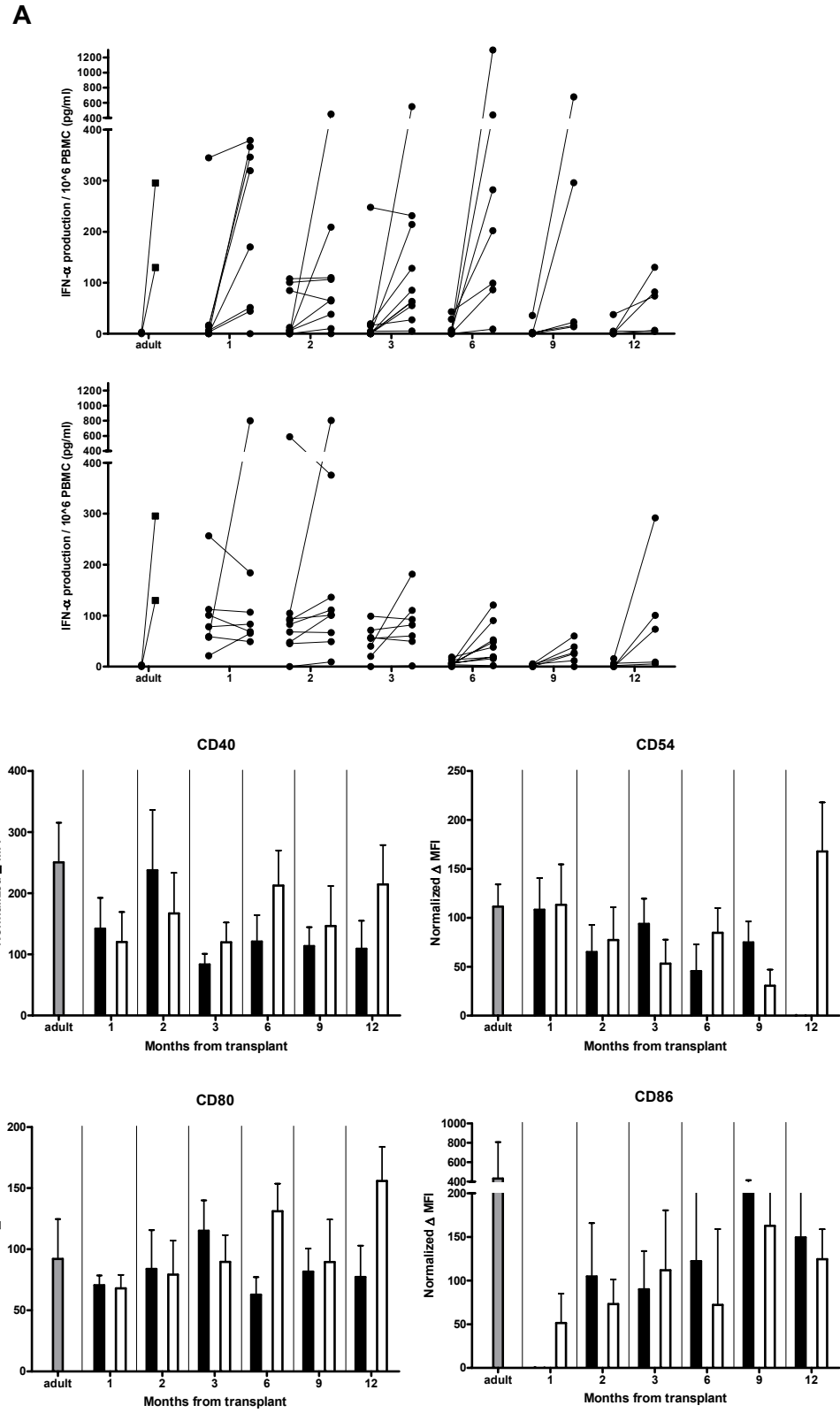


**Figure 14 : Functional analysis of NK cells after UCBT and BMT.**

IFN- $\gamma$  production and degranulation abilities of NK cells after UCBT and BMT. Intracellular expression of IFN- $\gamma$  on CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> after incubation with IL-15 (A) or IFN- $\alpha$  (C) and degranulation response determined by CD107a/b surface expression after incubation with IL-15 (B) or IFN- $\alpha$  (D). Cells were collected from healthy adult donors (gray histogram), and from recipient of UCBT (black histogram) or BMT (white histogram). Results are shown as median  $\pm$  S.E.M.

#### Functional analysis of post-transplant pDCs

We then assessed functional responses of post-transplant pDCs in terms of IFN- $\alpha$  production and maturation into antigen-presenting cells upon stimulation with TLR9 ligands (CpG ODN).



**Figure 15 : Functional analysis of pDC after UCBT and BMT.**

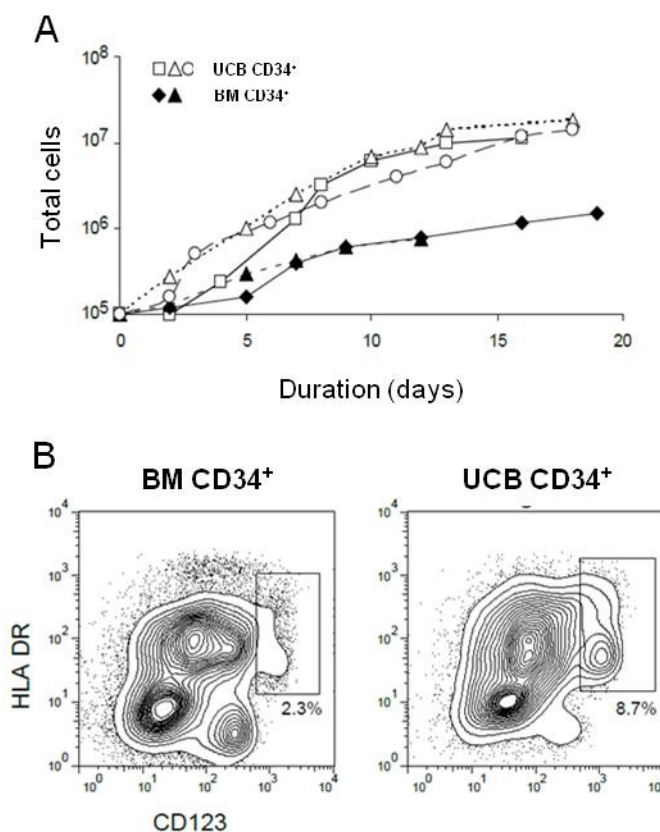
IFN- $\alpha$  production and maturation of pDCs after UCBT and BMT. (A) IFN- $\alpha$  production was measured by ELISA in plasma samples collected after overnight stimulation of peripheral blood of BM (upper panel) or UCB (lower panel) recipients with CpG 2216 ODN. (B) The expression of co-stimulatory molecules, CD40, CD54, CD80 and CD86 was assessed by flow cytometry after overnight stimulation with CpG 2216 ODN. Cells were collected from healthy adult donors (gray histogram), and from recipient of UCBT (black histogram) or BMT (white histogram). Results are shown as median  $\pm$  S.E.M.

We observed that IFN- $\alpha$  production of CpG ODN stimulated blood cells from BM-transplant recipients was similar to that of healthy controls, as early as one month post-transplantation (Figure 14A upper panel). Whereas, during the first 3 months post-UCBT, IFN- $\alpha$  levels were elevated in unstimulated blood cell samples and could not be increased by stimulation with CpG ODN (Figure 14A lower panel). In addition, at 6, 9 and 12 months post-UCBT, IFN- $\alpha$  production is lower than controls. pDC maturation into antigen presenting cells was measured by the up-regulation of T-cell co-stimulation molecule expression, i.e. CD40, CD54, CD80 and CD86, in response to overnight stimulation with CpG ODN. We observed that post-transplant pDCs up-regulated these co-receptors at similar levels as healthy controls, throughout the follow-up (Figure 14B).

Collectively, these results indicate that post-transplant pDCs exhibit functional differences dependent on the stem cell source; we identified a specific defect of IFN- $\alpha$  production by post-UCBT pDCs, while maturation in antigen presenting cells was similar for the two groups of transplanted patients and identical to controls.

### ***In vitro* differentiation of pDC from UCB or BM CD34<sup>+</sup> cells**

To understand the higher and faster pDC reconstitution after UCBT as compared with BMT, we investigated the differentiation potential of CD34<sup>+</sup> cells isolated from BM and UCB, using an *in vitro* model of pDC differentiation.



**Figure 16 : *In vitro* pDC generation from UCB or BM CD34<sup>+</sup> cells**

(A) Number of total cells obtained from  $10^5$  UCB (white symbols) or BM (black symbols) CD34<sup>+</sup> cells after 21 days of *in vitro* culture. (B) Contour plots of CD123 and HLA-DR expression after 21 days culture of UCB (right panel) and BM (left panel) CD34<sup>+</sup> cells. pDCs are gated as CD123<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> and percentages within the gates are indicated. Results are representative of 3 experiments.

We observed that the total number of cells obtained from  $10^5$  CD34<sup>+</sup> cells is 1 log<sub>10</sub> higher (Figure 16.A) and the percentage of pDCs is 2 to 3-fold higher (Figure 16.B) with UCB CD34<sup>+</sup> cells than with BM CD34<sup>+</sup> cells after 3 weeks of differentiation. This result suggests that the higher pDC counts obtained after UCBT may be due to an intrinsic potential for pDC generation from UCB CD34<sup>+</sup> cells.

## DISCUSSION

This study documents the recovery of the pDC/NK axis following UCBT and BMT in children treated for leukemia and non-malignant diseases. Importantly, we reveal that pDC reconstitution is faster following UCBT as compared with BMT; whereas, UCB-derived pDCs are unable to produce IFN- $\alpha$  for the first 3 months post-transplantation in response to TLR9 ligands. These observations are the first report of different pDC reconstitution depending on the stem cell source after HSCT. In addition, our study confirms that the innate immune effectors, i.e. NK cells, reconstitute early and can be *in vitro* activated by cytokines; only slight differences in phenotype, but not in function, have been observed in our cohort between BM and UCB-transplanted patients.

Several studies reported the impact of the quality of NK cell reconstitution on the clinical outcome of HSC-transplanted patients<sup>32-34</sup>. Shilling *et al.* reported that patients with a delayed NK reconstitution after HLA-matched HSCT presented more severe clinical complications than those with a faster NK-recovery<sup>34</sup>. Together with the observation that blood NK cells represent the majority of circulating lymphocytes following HSCT, these results indicate that early innate immune reconstitution play a major role in the outcome of transplanted patients. By 1 month post-transplantation, we observed an increase in the CD56<sup>bright</sup> to CD56<sup>dim</sup> NK cell ratio associated with a higher proportion of NKG2A expressing NK cells and a lower KIR<sup>+</sup> NK cells, in both UCB and BM-transplanted patients. These observations agree with previous studies that have reported specific phenotypic features including a very low proportion of KIR-positive NK cells inversely correlated with their high expression of NKG2A following HSCT<sup>32,33,35,36</sup>. This phenotype has been associated with lower cytotoxic activity and higher cytokine production upon activation<sup>32,33</sup>. However, we show here that, upon stimulation, post-transplant NK cells produced IFN- $\gamma$  and possessed a degranulation propensity comparable with control NK cells from healthy volunteers. Our results therefore suggest that post-transplant NK cells are functionally competent and furthermore, we did not find functional differences between UCB versus BM-derived NK cells. We although noticed higher percentages

of KIR-positive NK cells and NKG2A and KIR-double positive NK cells following UCBT as compared with BMT. Since NK-receptor acquisition is an orderly process, whereby NKG2A is first expressed, followed by acquisition of KIR<sup>37-39</sup>, it has been proposed that this double-positive population is differentiation intermediate<sup>40;41</sup>. Further investigations are although required to determine if these phenotypic differences between UCB-derived and BM-derived NK cells are associated with specific functions.

Crosstalk between NK cells and DCs regulate both innate and adaptive immune responses<sup>42-44</sup>. Indeed, DC promote NK cell activation by increasing NK cell cytotoxicity and IFN- $\gamma$  production<sup>42-44</sup>. In particular, chemokines and type I interferons (IFN) produced by pDCs upon activation are main activators of the NK cytolytic function<sup>18-20</sup>. We therefore evaluated pDC reconstitution following UCBT and BMT. Surprisingly, despite the routine use of ATG, corticosteroids and G-CSF in UCB recipients, all of which are known to adversely affect pDC viability<sup>45-48</sup>, blood pDC counts were elevated in UCB-transplanted patients. In our cohort, pDC reconstitution following UCBT was faster and pDC counts reached higher levels than after BMT. We therefore reveal for the first time an association between pDC recovery rate and the stem cell source. This rapid and early pDC recovery following UCBT may be due to the higher proliferative ability of UCB CD34<sup>+</sup> cells<sup>49</sup> and their higher potential to differentiate into pDCs, as shown by our *in vitro* model of pDC differentiation. However, our functional analysis of pDCs revealed that circulating pDCs in UCB-transplanted patients did not produce IFN- $\alpha$  in response to TLR9 ligands, while they are able to mature in antigen presenting cells. This phenotype is therefore reminiscent of that of UCB pDCs<sup>50;51</sup> and therefore suggests that post-UCBT pDCs participate to the higher tolerance of graft-derived immune cells. We although did not find any correlation between acute GvHD occurrence and pDC recovery, probably due to the low number of patients in our cohort. In the future, it will be of great interest to identify the molecular and cellular mechanisms responsible for this impaired IFN- $\alpha$  production. Since pDC-derived IFN- $\alpha$  is a strong inducer of

NK-mediated anti-tumor and anti-viral activities, restoring the pDC responsiveness to TLR9 ligands may reduce the leukemia relapse and the opportunistic infection rates.

In conclusion, our study sheds new light on the innate immunity recovery following UCBT and BMT. Future development of post-transplant immunotherapy strategies designed to enhance the NK cell-mediated GvL effect should take into account the insensitivity of UCB-derived pDCs to TLR9 ligands.



## RÉFÉRENCES

1. Rocha V, Locatelli F. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:207-214.
2. Dalle JH, Duval M, Moghrabi A et al. Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33:605-611.
3. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* 2007;369:1947-1954.
4. Rocha V, Cornish J, Sievers EL et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001;97:2962-2971.
5. Rocha V, Wagner JE, Jr., Sobocinski KA et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N.Engl.J.Med.* 2000;342:1846-1854.
6. Thomson BG, Robertson KA, Gowan D et al. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* 2000;96:2703-2711.
7. Barker JN, Hough RE, van Burik JA et al. Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2005;11:362-370.
8. Parody R, Martino R, Rovira M et al. Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: comparison of cord blood transplantation with peripheral blood and bone marrow transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2006;12:734-748.
9. van Burik JA, Brunstein CG. Infectious complications following unrelated cord blood transplantation. *Vox Sang.* 2007;92:289-296.
10. Hamza NS, Lisgaris M, Yadavalli G et al. Kinetics of myeloid and lymphocyte recovery and infectious complications after unrelated umbilical cord blood versus HLA-matched unrelated donor allogeneic transplantation in adults. *Br.J.Haematol.* 2004;124:488-498.
11. Moretta A, Maccario R, Fagioli F et al. Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp.Hematol.* 2001;29:371-379.

12. Beziat V, Nguyen S, Lapusan S et al. Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia* 2009;23:721-728.
13. Renard C, Barlogis V, Mialou V et al. Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children. *Br.J.Haematol.* 2011;152:322-330.
14. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-2100.
15. Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat.Rev.Immunol.* 2002;2:957-964.
16. Moretta L, Ferlazzo G, Mingari MC, Melioli G, Moretta A. Update on natural killer cells: cross-talk with dendritic cells and role in the cure of acute myeloid leukemias. *Cancer J.* 2003;9:232-237.
17. Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C et al. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol.Rev.* 2006;214:219-228.
18. Perussia B, Fanning V, Trinchieri G. A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. *Nat.Immun.Cell Growth Regul.* 1985;4:120-137.
19. Bandyopadhyay S, Perussia B, Trinchieri G, Miller DS, Starr SE. Requirement for HLA-DR+ accessory cells in natural killing of cytomegalovirus-infected fibroblasts. *J.Exp.Med.* 1986;164:180-195.
20. Oh SH, Bandyopadhyay S, Miller DS, Starr SE. Cooperation between CD16(Leu-11b)+ NK cells and HLA-DR+ cells in natural killing of herpesvirus-infected fibroblasts. *J.Immunol.* 1987;139:2799-2802.
21. Arpinati M, Chirumbolo G, Urbini B et al. Acute graft-versus-host disease and steroid treatment impair CD11c+ and CD123+ dendritic cell reconstitution after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2004;10:106-115.
22. Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DN. Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* 1999;93:728-736.
23. Horvath R, Budinsky V, Kayserova J et al. Kinetics of dendritic cells reconstitution and costimulatory molecules expression after myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: implications for the development of acute graft-versus host disease. *Clin.Immunol.* 2009;131:60-69.

24. Rajasekar R, Mathews V, Lakshmi KM et al. Plasmacytoid dendritic cell count on day 28 in HLA-matched related allogeneic peripheral blood stem cell transplant predicts the incidence of acute and chronic GVHD. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2008;14:344-350.
25. Koyama M, Hashimoto D, Aoyama K et al. Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. *Blood* 2009;113:2088-2095.
26. Markey KA, MacDonald KP, Hill GR. Recipient plasmacytoid DCs are not required to prime allogeneic T-cell responses after BMT. *Blood* 2009;113:6038-6039.
27. Hadeiba H, Sato T, Habtezion A et al. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat.Immunol.* 2008
28. Li JM, Southerland LT, Lu Y et al. Activation, immune polarization, and graft-versus-leukemia activity of donor T cells are regulated by specific subsets of donor bone marrow antigen-presenting cells in allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *J.Immunol.* 2009;183:7799-7809.
29. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity.* 2008;29:352-361.
30. Pacanowski J, Kahi S, Baillet M et al. Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* 2001;98:3016-3021.
31. Chen W, Antonenko S, Sederstrom JM et al. Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* 2004;103:2547-2553.
32. Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP et al. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood* 2005;105:4135-4142.
33. Zhao XY, Huang XJ, Liu KY, Xu LP, Liu DH. Reconstitution of natural killer cell receptor repertoires after unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and marrow transplantation: analyses of CD94:NKG2A and killer immunoglobulin-like receptor expression and their associations with clinical outcome. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2007;13:734-744.
34. Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW et al. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2003;101:3730-3740.

35. Davies SM, Ruggieri L, DeFor T et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood* 2002;100:3825-3827.
36. Cooley S, McCullar V, Wangen R et al. KIR reconstitution is altered by T cells in the graft and correlates with clinical outcomes after unrelated donor transplantation. *Blood* 2005;106:4370-4376.
37. Yu J, Heller G, Chewning J et al. Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands. *J.Immunol.* 2007;179:5977-5989.
38. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol.Rev.* 2006;214:56-72.
39. Vitale C, Chiossone L, Morreale G et al. Analysis of the activating receptors and cytolytic function of human natural killer cells undergoing in vivo differentiation after allogeneic bone marrow transplantation. *Eur.J.Immunol.* 2004;34:455-460.
40. Beziat V, Descours B, Parizot C, Debre P, Vieillard V. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS.One.* 2010;5:e11966.
41. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 2010;116:3853-3864.
42. Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol.* 2004;25:47-52.
43. Long EO. Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells. *Immunity.* 2007;26:385-387.
44. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 2005;106:2252-2258.
45. Shodell M, Shah K, Siegal FP. Circulating human plasmacytoid dendritic cells are highly sensitive to corticosteroid administration. *Lupus* 2003;12:222-230.
46. Shodell M, Siegal FP. Corticosteroids depress IFN-alpha-producing plasmacytoid dendritic cells in human blood. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2001;108:446-448.
47. Fang L, Fehse B, Engel M, Zander A, Kroger N. Antithymocyte globulin induces ex vivo and in vivo depletion of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Transplantation* 2005;79:369-371.

48. Fagnoni FF, Oliviero B, Giorgiani G et al. Reconstitution dynamics of plasmacytoid and myeloid dendritic cell precursors after allogeneic myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2004;104:281-289.
49. Ng YY, van KB, Lokhorst HM et al. Gene-expression profiling of CD34+ cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. *J.Leukoc.Biol.* 2004;75:314-323.
50. De WD, Orlislagers V, Goriely S et al. Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns. *Blood* 2004;103:1030-1032.
51. Danis B, George TC, Goriely S et al. Interferon regulatory factor 7-mediated responses are defective in cord blood plasmacytoid dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 2008;38:507-517.

**FOOTNOTES**Support:

This work was supported by the Fonds de Recherche en Santé du Québec and the Fondation Charles-Bruneau. Emily Charrier is a fellow of The Cole Foundation and the Fondation du CHU Sainte-Justine/Fondation des Étoiles.

Abbreviations:

UCB: umbilical cord blood, NK: natural killer, pDC: plasmacytoid dendritic cells, GvHD: graft-versus-host disease, IFN, interferon, HSC: hematopoietic stem cells, GvL: graft-versus-leukemia, Treg: regulatory T cells,

Corresponding author's address:

Sabine Herblot

Phone: 514-345-4931 ex3910

CHU Sainte-Justine – 3175, Côte Sainte-Catherine, Montreal, Quebec, Canada

## **Article 2 : Post-Transcriptional Down-Regulation of Toll-Like Receptor Signaling Pathway in Umbilical Cord Blood Plasmacytoid Dendritic Cells is Associated with High Expression of miR-146a and miR-155 microRNAs.**

Emily Charrier, Sabine Herblot, Paulo Cordeiro, Martine Cordeau, R’Kia Dardari, Annie Michaud, Michaël Harnois, Natacha Merindol, Michel Duval

Article soumis à la revue *Clinical Immunology*

Puisque nous avons mis en lumière une reconstitution fonctionnelle des pDC après greffe de sang de cordon, nous avons cherché à savoir si les pDC du sang de cordon étaient fonctionnellement différentes des pDC de sang périphérique d’adulte. Pour ce faire, nous avons caractérisé les pDC du sang de cordon et nous nous sommes intéressé à identifier le mécanisme moléculaire responsable de l’absence de production d’IFN- $\alpha$  dans ces cellules. Ce travail fait l’objet d’un article scientifique qui a été soumis à la revue *Clinical Immunology*.

Mon rôle dans cet article a été d’effectuer toutes les expériences présentées dans cet article, de procéder à l’analyse de tous les résultats et de participer à la rédaction de l’article, en collaboration avec Sabine Herblot et mon directeur de recherche.

Voila Mail - Windows Internet Explorer

http://mail2.voila.fr/webmail/fr\_FR/read.html?FOLDER=SF\_INBOX&IDMSG=12874&ORIGIN=SYSTEM\_FOLDER

Fichier Edition Affichage Favoris Outils ?

Windows Live voila mail Quoi de neuf? Profil Messagerie électronique Photos Calendrier MSN Partager Se connecter

Favoris Halte-garderie « Le Baluc... Ethica Clinical eBay Galerie de composants ... ADERLY – Essais cliniques ... Débuter avec Firefox

Voila Mail

Sabine

---

De: ees.yclim.0.ed800.bc57c160@eesmail.elsevier.com de la part de CLIN  
Date: sam. 2011-01-29 22:05  
À: Herblot Sabine  
Objet : Clinical Immunology: Submission Confirmation

Title: Post-Transcriptional Down-Regulation of Toll-Like Receptor Signaling Pathway in Umbilical Cord Blood Plasmacytoid Dendritic Cells is Associated with High Expression of miR-146a and miR-155  
Corresponding Author: Dr. Sabine Herblot  
Authors: Emily Charrier; Paulo Cordeiro; Martine Cordeau; RKia Dardari; Annie Michaud; Michael Harnois; Natacha Merindol; Michel Duval

Dear Dr. Herblot,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Clinical Immunology.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Clinical Immunology as an AUTHOR:

<http://ees.elsevier.com/yclim/>  
Your username is: herblots  
If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/yclim/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/yclim/automail_query.asp)

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Clinical Immunology. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Editorial Office  
Clinical Immunology

Terminé Intranet local | Mode protégé : désactivé 125%



**Post-Transcriptional Down-Regulation of Toll-Like Receptor Signaling Pathway  
in Umbilical Cord Blood Plasmacytoid Dendritic Cells is Associated with High  
Expression of miR-146a and miR-155 microRNAs.**

Emily Charrier<sup>\*†</sup>, Sabine Herblot<sup>\*§</sup>, Paulo Cordeiro<sup>\*</sup>, Martine Cordeau<sup>\*‡</sup>, R’Kia  
Dardari<sup>\*</sup>, Annie Michaud<sup>\*‡</sup>, Michaël Harnois<sup>\*‡</sup>, Natacha Merindol<sup>\*‡</sup>, Michel Duval<sup>\*</sup>  
†‡§

\* Groupe de Recherche En Transplantation et Immunologie du Sang de Cordon  
(GRETISC), Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Centre de Recherche du CHU  
Sainte-Justine, 3175 chemin de la Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec, Canada  
H3T 1C5; † Université de Montréal, Département de Sciences Biomédicales; ‡  
Université de Montréal, Département de Microbiologie et d’Immunologie; §  
Université de Montréal, Département de Pédiatrie.

**Keywords:** human, dendritic cells, cytokines

**ABSTRACT**

Human umbilical cord blood (UCB) plasmacytoid dendritic cells (PDC) produce lower amounts of IFN- $\alpha$  compared with adult counterparts upon TLR stimulation. This difference may play a role in the low graft-versus-host-disease (GvHD) rate after UCB transplantation and in the impaired immune response of the neonate to pathogens. To further elucidate the mechanisms underlying this difference, we studied the differentiation phenotype of UCB PDC by flow cytometry, their expression of co-stimulatory molecules and antigen uptake upon stimulation. We found that UCB PDC do not exhibit an immature phenotype but nonetheless secrete 60-fold less IFN- $\alpha$  compared with adult PDC upon stimulation. Intriguingly, we found that the proteins, but not the RNA levels of TLR-9, MyD88, IRAK1 and IRF-7, involved in the pathway linking TLR-9 stimulation to IRF-7 nuclear translocation and IFN- $\alpha$  production, were reduced 2-3 fold in UCB versus adult PDC. This reduction did not interfere with the proportion of UCB PDC showing nuclear expression of IRF-7 upon TLR-9 stimulation. Interestingly, the expression level of miR-146a and miR-155, two microRNAs involved in the regulation of TLR pathways, was 5 and 30 times higher, respectively, in UCB PDC. Taken together these data point out a post-transcriptional down-regulation of the TLR-9/IRF-7 signaling pathway that may explain the lower IFN- $\alpha$  response of UCB PDCs.

## INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell (HSC) transplantation (HSCT) is widely used for treating hereditary and/or hematological conditions of both malignant and non-malignant origin. Umbilical cord blood (UCB) has been used as an alternative source of HSC in transplantation for patients without an HLA-matched related donor, with similar therapeutic success as compared with unrelated bone marrow transplantation (1-5). Unlike transplantation with other sources of HSC, UCB transplantation is characterized by a low incidence and severity of graft-versus-host-disease (GvHD), caused by donor T-cells recognizing and reacting to host major and minor histocompatibility antigens (6). Nonetheless, this low rate of acute GvHD is not associated with a higher rate of leukemia relapse, indicating that graft-versus-leukemia (GvL) mechanisms are effective despite the lower alloreactivity (1, 7). This contrasts with HSCT using other stem cell sources where increasing a GvL effect is associated with increased GvHD and it indicates that UCB cells have unique immune properties that allow for allogeneic tolerance while preserving anti-tumoral activity.

Dendritic cells (DCs) capture, process and present antigens to T lymphocytes to induce immunity or tolerance (8). Both host and donor DCs participate in the initiation and maintenance of GvHD following HSCT: host DCs by presenting host-derived antigens to donor-T cells (6, 11), and graft-derived DCs by maintaining and expanding alloreactive CD8<sup>+</sup> T cells (9-11). Several subtypes of DCs, namely myeloid DCs (mDCs), plasmacytoid DCs (PDCs) and CD14<sup>-low</sup>CD16<sup>+</sup> dendritic cells are present in UCB (12, 13). Functional differences have been described between adult and neonatal DCs subsets that may account for some of the unique immune properties of UCB cells (12, 14-16). PDCs are of particular interest because of their ability to induce either Th1 or Th2-dependent T cell cytotoxic responses and induce tolerance through regulatory T cell (Treg) differentiation, depending on their environment (17). It was even shown in a mouse model of hematopoietic transplantation that PDCs can enhance the GvL activity of donor T cells without increasing GvHD, reminiscent of what is observed following UCB transplantation (19). Further characterization of the immune properties of UCB PDCs may,

therefore, shed light on the unique immune properties of UCB and open new avenues for improving UCB transplantation outcome.

PDCs selectively express Toll-like receptors 7 and 9 (TLR-7 and TLR-9), which are localized in the endosomal-lysosomal compartment and recognize unmethylated CpG motifs on viral RNA and DNA (18). Upon activation by TLR-ligands, adult PDCs rapidly secrete massive amounts of type I interferons (IFN) as well as chemokines that allow for the recruitment and activation of immune cells. This rapid and massive IFN response is due to the constitutively high level of expression of the IRF-7 transcription factor, which is phosphorylated and translocated to the nucleus upon activation of the TLR-7 or TLR-9 signaling pathways. PDCs then undergo maturation to fully differentiated antigen-presenting cells and up-regulate the expression of T cell co-stimulatory molecules (19). The type I IFN production is highly regulated by a set of positive and negative feedback loops as well as by cell surface receptors coupled with immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM) (20). In addition, the post-transcriptional regulation of several TLR pathways by microRNA miR-146a (21-24) and miR-155 (25) has been described, including, the control of type I IFN production (21, 26, 27). MicroRNAs are small non-coding RNAs that suppress gene expression by binding to partially complementary sequences of mRNAs and inhibiting their translation into protein or accelerating their degradation (28). Since the downstream signaling molecules of TLR are shared among all TLRs (i.e., MyD88, IRAK1, TRAF6), we hypothesize that type I IFN production following TLR-9 stimulation might also be regulated by miR-146a and miR-155 in UCB PDCs.

CB PDCs produce much less type I IFN upon activation by viral antigens or TLR-ligands (29-31), resembling tolerogenic PDC that have been described in some tumor environments (32-34). In this paper we examined the immune properties of UCB PDCs at the cellular and molecular levels and compared them with adult PDCs. Our results reveal that the lower IFN $\alpha$  production by UCB PDCs is not due to immaturity but may rather be the result of a down-regulation of the TLR pathway at the post-transcriptional level. Accordingly, this down-regulation is associated with increased expression of miR-146a and miR-155.

## MATERIALS AND METHODS

### Blood and bone marrow samples

Cord blood samples were provided by the Research Cord Blood Bank of the CHU Sainte-Justine in partnership with the public Cord Blood Bank administered by Héma-Québec. Cord blood units were harvested in sodium citrate collection packs by umbilical vein puncture after normal delivery of full-term healthy neonates. Adult peripheral blood samples were collected in heparinized tubes from healthy volunteers. Femoral heads from patients who had undergone total hip replacement surgery were used as a source of human bone marrow cells. All patients, mothers and volunteers provided informed written consent approved by the local Research Ethics Committee.

### Blood mononuclear cells isolation, PDC purification and stimulation

Mononuclear cells from peripheral blood (PBMC), cord blood (CBMC) and bone marrow were isolated by density gradient centrifugation (Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences Corporation, Piscataway, NJ) and were resuspended in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum, Penicillin G (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), Amphotericin B (0.25 µg/ml) and L-Glutamine (2 mM). PDCs were enriched by magnetic bead-mediated depletion using a plasmacytoid isolation kit (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA) according to the manufacturer's instructions. PDC were then sorted by cytometry using BDCA4-APC antibody (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA). The purity of the sorted PDCs was > 98% as assessed by flow cytometry (data not shown). Sorted PDCs ( $2 \times 10^4$  cells/250 µl) were treated with CpG 2216 (50 µg/ml) or CpG 2006 (50 µg/ml) for 6 to 48 h. The following oligodeoxynucleotides were provided by the Midland Certified Reagent Company, Inc. (Midland, TX): CpG 2216, 5'-ggGGGACGATCGTCgggggG-3', CpG 2006, 5'-TCgTCgTTTTgTCgTTTTgTCgTT-3'. As a control, we used the following non-stimulatory CpG control ODN: 5'-ggGGGAGCATGCTCgggggG. Following stimulation, PDCs were washed and used for flow cytometry analysis or confocal microscopy as explained in detail below.

### **Flow cytometry analysis**

PBMC, CBMC or bone marrow cells were stained with the following antibodies: BDCA2-PE, BDCA-4-APC (Miltenyi Biotech Inc., Auburn, CA), HLA-DR-PE/Cy7, CD123-APC, CD40-FITC, CD54-PE, CD80-FITC, CD86-PE, CD45-PE (from BD Biosciences, Mississauga, ON), and CD34-FITC (BioLegend, San Diego, CA). For intracellular staining, PBMC or CBMC were first stained using BDCA-4-APC, HLA-DR-PE/Cy7 and CD3-PE, then fixed and permeabilized using the Cytotfix/Cytoperm kit from BD Biosciences. Non-specific sites were blocked with rabbit immunoglobulin before cells were incubated with rabbit polyclonal anti-IRF-7 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), FITC-conjugated anti-TLR-9 (Imgenex, San Diego, CA), rabbit anti-human IRAK1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or rabbit anti-human MyD88 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The cells were washed twice and incubated with goat anti-rabbit IgG FITC (BD Biosciences, Mississauga, ON) for IRF-7, IRAK1 and MyD88. Four-color immunofluorescence analyses were performed on a FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA). Data were then analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR). The relative protein level was determined by the normalized delta Median of Fluorescence Intensity (Delta MFI), calculated by the difference between MFI of PDC and MFI of CD3<sup>+</sup> cells (internal negative control) and normalized to the MFI of CD3<sup>+</sup> cells.

### **FITC-dextran uptake assays**

PBMC and CBMC were incubated for 30 min at 37°C in RPMI 1640 containing 10% FCS and FITC-dextran (1 mg/mL) (35). As a control, cells were incubated with FITC-dextran at 4°C. Cells were then washed twice with cold PBS and stained for cell surface markers with the following antibodies: anti-CD11c PE, anti-HLA-DR PE/Cy7 and anti-CD123 APC. Cells were then fixed with 1% paraformaldehyde and analyzed by flow cytometry. The dextran uptake was measured by the difference between the median FITC fluorescence intensity of the cells incubated at 37°C minus the median FITC fluorescence intensity of the control incubated at 4°C.

### **Real time RT-PCR**

Total RNA from 20,000 resting AB and CB PDCs was prepared using phenol-chloroform extraction followed by ethanol precipitation using tRNA as carrier (36). First-strand DNA synthesis was performed as described (48) followed by Quantitative-PCR using the Brilliant II SYBR Green kit (Stratagene, La Jolla, CA) on Mx3000P thermal cycler (Stratagene, La Jolla, CA). Relative mRNA expression was determined using the  $\Delta$  Ct method (value obtained by subtracting the Ct value of  $\beta$ -2-Microglobulin mRNA from the Ct value of interest gene mRNA). Dissociation curve analyses were included in all experiments to verify the absence of non-specific products such as primer dimers. The passive reference dye ROX was used in all reactions to correct for possible volume differences and other well-to-well differences.

The levels of miRNA expression were measured by Q-RT-PCR using Exiqon first strand cDNA synthesis and amplification kits (Exiqon, Woburn, MA) according to the manufacturer's instructions. Twenty ng of total RNA prepared using miRNEasy kit (Qiagen, Mississauga, ON) were used for first strand cDNA synthesis and real time amplifications were performed on a Mx3000P thermocycler (Stratagene, La Jolla, CA). Samples were processed in duplicate and the small nuclear RNA U48 was used as internal control for cDNA loading.

### **IRF-7 translocation by confocal immunofluorescence microscopy**

PDC from UCB and adult blood were sorted by cytometry as described above or enriched from PBMC and CBMC using the negative selection kit from StemCell Technology (Vancouver, BC, Canada). The purity of enriched PDC was superior to 95%. After stimulation, PDC were collected, washed with PBS, fixed and permeabilized with Perm/Fix kit (BD Biosciences, Mississauga, ON) and stained for IRF-7 with rabbit polyclonal anti-IRF-7 antibody. FITC-conjugated goat anti-rabbit was used to reveal IRF-7 and after two washes, nuclei were stained with DAPI (4',6'-diamino-2-phenylindole, 0.5 ng/mL, Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Stained cells were then adhered to slides coated with 0,1% poly-L-lysine. Slides were mounted with Vectashield and analyzed on a LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss

Canada Ltd., Toronto, ON) with a 63 x oil-immersion objective. Multiple color images were acquired by scanning in sequential mode to avoid cross-excitation. Nuclear staining frequencies were quantified by counting cells (n = 100-150).

### **ELISA**

PDC at a concentration of  $8 \times 10^4$ /ml were stimulated by CpG 2216 or CpG control at 50 $\mu$ g/ml for 24 h. Supernatants were collected and stored at -80°C. The level of IFN- $\alpha$  was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (PBL InterferonSource, Piscataway, NJ). Each sample was tested in duplicate.

### **Statistical analysis**

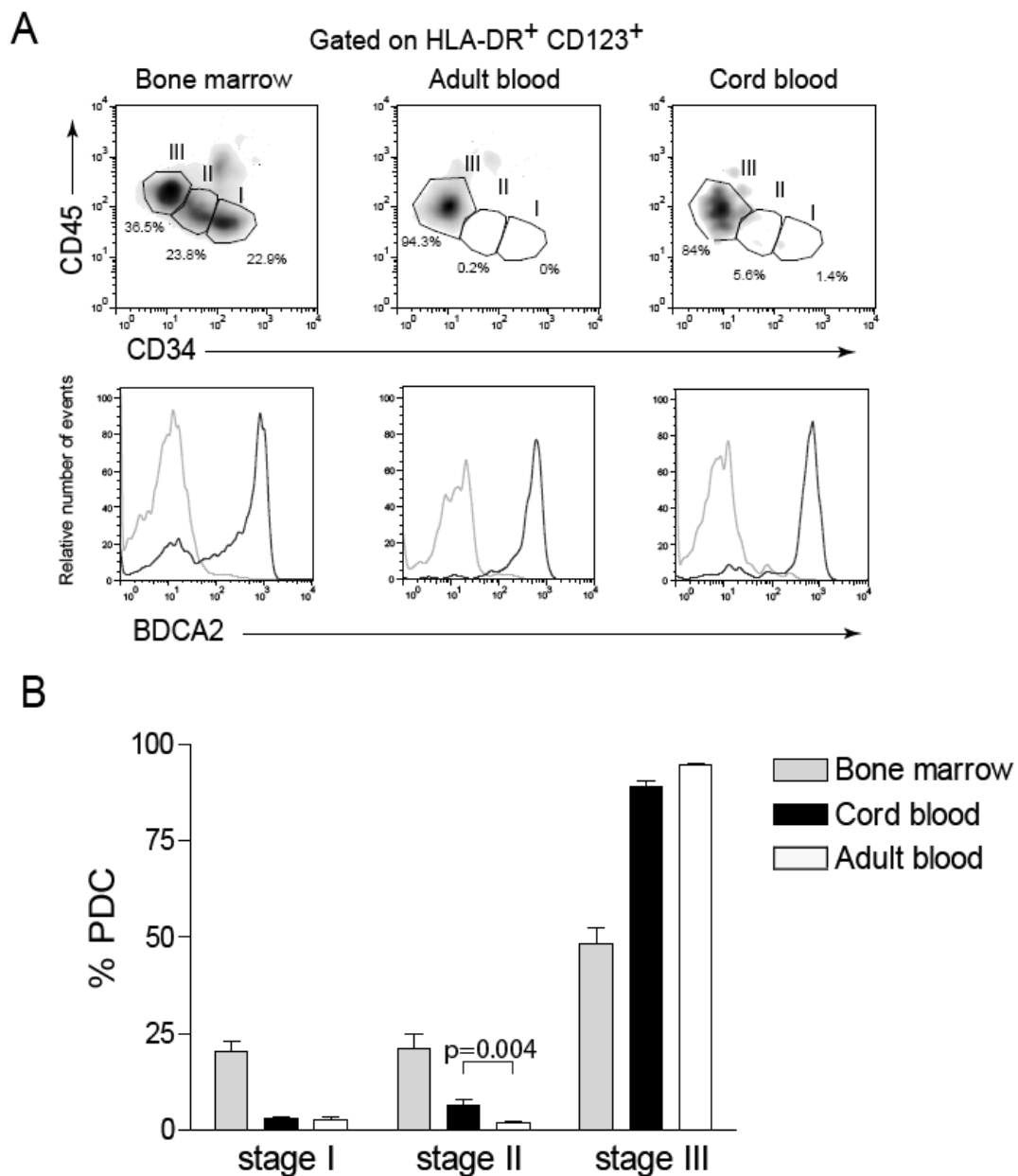
Results shown are means +/- SEM and statistical analysis were performed using Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Data were compared using nonparametric unpaired Mann-Whitney test.



## RESULTS

### Differentiation phenotype of UCB PDC

Three stages of differentiation can be distinguished by cell surface marker expression within the HLA-DR<sup>+</sup> CD123<sup>hi</sup> PDC population in human bone marrow. The most immature stage of differentiation (stage I) is characterized by CD34 expression and low CD45 expression. Stage II cells express lower CD34 levels and higher CD45, and stage III cells are CD34 negative CD45<sup>hi</sup> (37). We compared these differentiation stages in adult blood and UCB in order to determine the differentiation stage of UCB PDC. Human adult bone marrow samples were used as controls. Whereas bone marrow PDC were evenly distributed between stages I, II and III, as expected (37), UCB and adult PDC were mainly stage III PDC ( $87\% \pm 2$  in UCB and  $93\% \pm 1$  in adult blood, Figure 17A and B). Similarly to adult PDC, UCB PDCs expressed high homogenous levels of BDCA2, characteristic of stage III PDC (37) (Figure 17A). We nonetheless observed a slightly higher percentage of stage II PDC in UCB ( $6.3\% \pm 0.9$  versus  $1.3\% \pm 0.9$  in adult blood, Figure 17B). Together, these results indicate that UCB PDCs are as mature as their adult counterparts according to their surface phenotype.

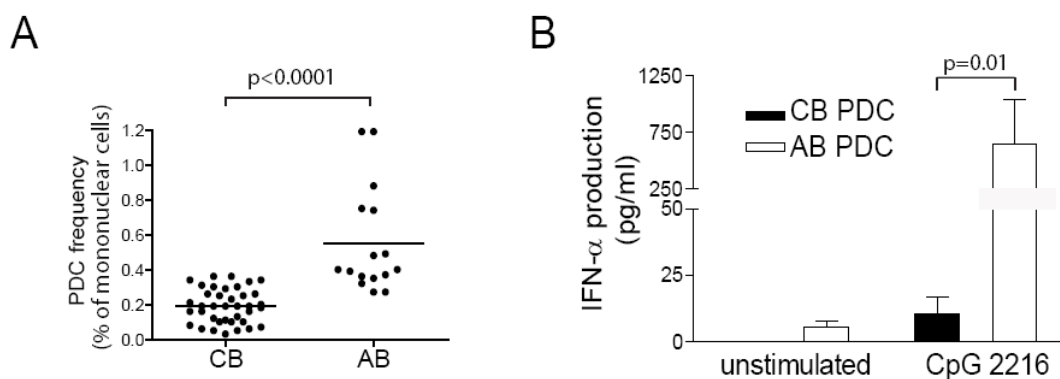


**Figure 17 : Differentiation of UCB PDC.**

PDC stages of differentiation were analyzed by flow cytometry (stage I: CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup>; stage II: CD34<sup>-</sup>/lowCD45<sup>low</sup>/+; stage III: CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>); A, density blots represent the expression of CD45 and CD34 markers within the PDC population identified as HLA-DR<sup>+</sup> CD123<sup>high</sup> (higher panels); histograms represent the expression of BDCA2 (black line) and isotype control (gray line) (lower panels). B, Frequencies of PDC differentiation stages are represented for bone marrow (n = 4), cord blood (n = 4) and adult blood (n = 4) samples.

### Functional properties of UCB PDCs.

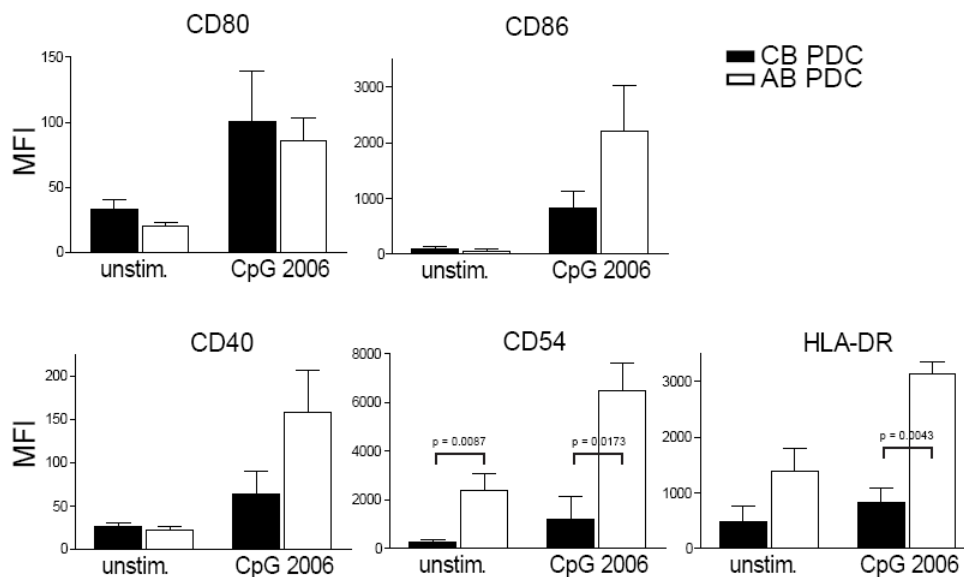
The functionality of UCB PDCs was then examined and compared with adult blood PDCs. We first enumerated blood PDCs by FACS analysis in 27 UCB and 16 adult blood samples. And we observed that the median percentage of PDCs among mononuclear cells was lower in UCB than in adult blood (0.2% vs. 0.5%, Figure 18A). To take into account the difference in PDC percentage and exclude any down-regulation by other cell types, PDCs were sorted using flow cytometry before *in vitro* stimulation with type A CpG oligonucleotide (CpG ODN 2216), a synthetic ligand of TLR-9. IFN- $\alpha$  production by isolated UCB PDCs upon stimulation was 60 times lower when compared with adult PDC (Figure 18B) (29, 30).



**Figure 18 : Functional properties of UCB PDCs.**

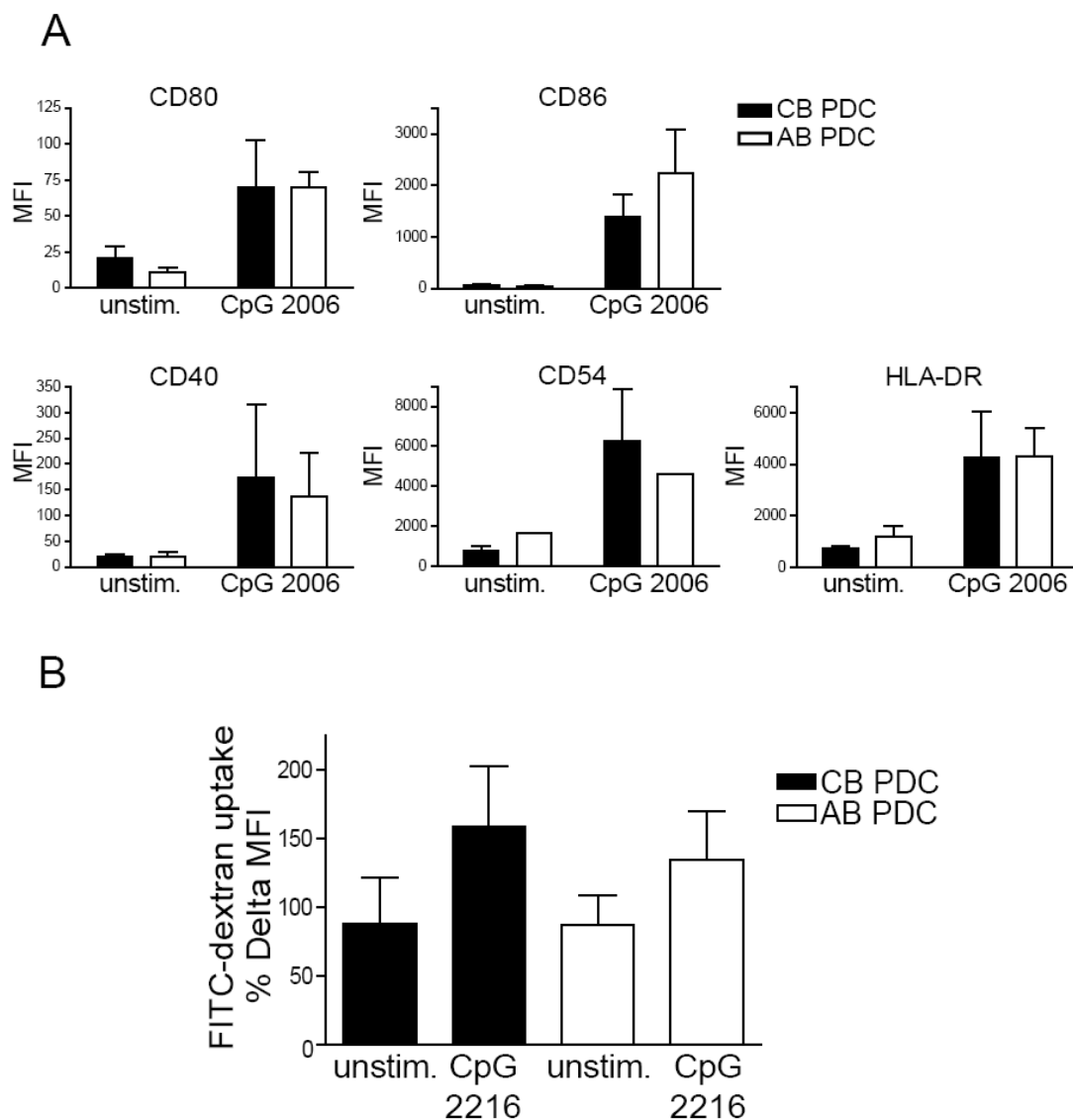
A, Percentage of PDCs among UCB and adult mononuclear cells was determined by flow cytometry. Mononuclear cells were first gated on forward and side scatters and PDCs were identified as Lin- HLA-DR+ CD123high cells. B, IFN- $\alpha$  production was assessed on purified PDCs from adult blood and UCB by ELISA following stimulation;  $2 \times 10^4$  cells were stimulated with  $50 \mu\text{g/ml}$  CpG 2216 ODN or control ODN for 24 h. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 4).

Next, the up-regulation of co-stimulatory molecules (CD40, CD54, CD80 and CD86) was measured at 24 and 48 h after stimulation with type B CpG ODN (CpG 2006). Although this up-regulation was lower in UCB PDCs at 24 h (Figure 19) (30), it reached adult levels at 48 h post-stimulation (Figure 20A).



**Figure 19 : Maturation of UCB PDC.**

Co-stimulatory molecules expression was investigated by flow cytometry after 24 of stimulation with CpG ODN 2006. Histograms represents means  $\pm$  SEM of 5 to 6 UCB and adult blood samples.



**Figure 20 : Maturation of UCB PDC and antigen uptake upon stimulation.**

A, Co-stimulatory receptor expression was investigated by flow cytometry after 48 h of stimulation with CpG ODN 2006. Histograms represent means  $\pm$  SEM of 4 to 5 UCB and adult blood samples. B, Dextran-FITC uptake assays were performed on freshly isolated UCB and adult blood mononuclear cells or following 18 h of stimulation with CpG ODN 2216. PDC were identified as CD11c- HLA DR+ CD123+ cells. Histograms represent means  $\pm$  SEM of 10 UCB and adult blood samples.

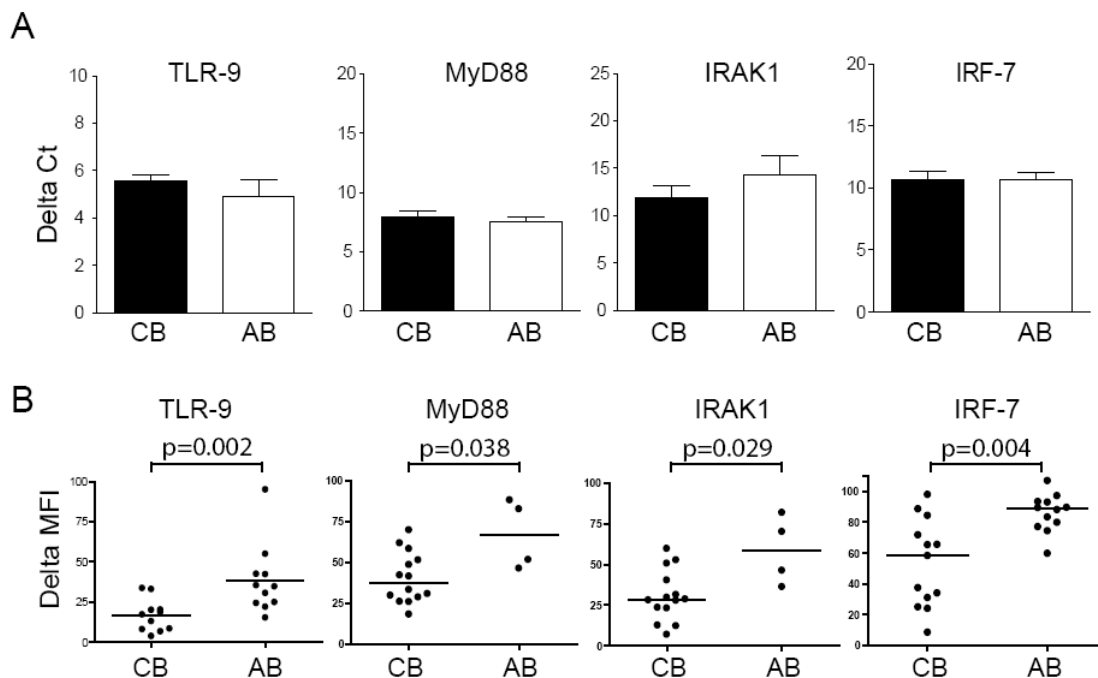
These results indicate that the maturation of UCB PDCs is efficient, although delayed, and demonstrate that UCB PDCs should be able to interact with T cells. These data point out that the most important difference between UCB and adult PDCs is the lower production of IFN- $\alpha$  upon stimulation.

#### **Antigen uptake of UCB PDCs upon stimulation**

We then explored the mechanisms involved in this low IFN- $\alpha$  response despite a fully differentiated phenotype. Since TLR-9 is expressed in the endosomal compartment, the ability of UCB PDCs to internalize antigens was tested using FITC-dextran endocytosis assay at steady state and after stimulation with type A CpG ODN. The uptake efficiency of PDCs increased following stimulation with CpG ODN (Figure 20B), but no significant difference was observed between adult and UCB PDCs. This result suggests that differences downstream of TLR-9 should be involved in the lower IFN- $\alpha$  production observed in UCB PDCs.

#### **Low expression of the TLR-9/IRF-7 pathway proteins in UCB PDC**

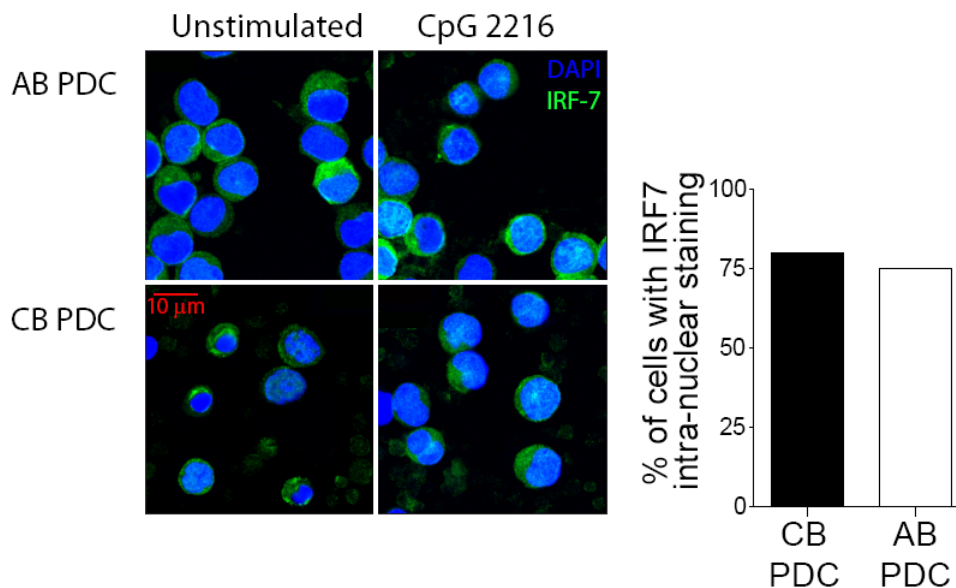
The signaling pathway downstream of TLR-9 leading to the activation and the nuclear translocation of the IRF-7 transcription factor, the principal activator of type I IFN genes in PDCs (38) was then examined. First, the mRNA expression levels of molecules involved in this pathway were measured by quantitative real-time RT-PCR on sorted PDCs.



**Figure 21: mRNA and protein expression of the TLR-9/IRF-7 signaling pathway.**

A, UCB and adult blood PDC were sorted and quantitative RT-PCR was performed for indicated genes. Results represent the means of Delta Ct values  $\pm$  SEM of at least 5 independent samples. B, Protein levels of indicated molecules were assessed by intracellular staining on freshly isolated PDC from UCB and adult blood samples. Each dot represents a blood sample and the median MFI values are represented by the horizontal bar.

No differences were observed between isolated UCB and adult PDCs with respect to TLR-9, MyD88, IRAK1 and IRF-7 mRNA levels (Figure 21A). Since the TLR-signaling pathways are subjected to post-transcriptional regulation (24, 28), protein levels of TLR-9, MyD88, IRAK1 and IRF-7 were quantified using intracellular staining and flow cytometry analysis. Median fluorescence intensity was 2 to 3 times lower in UCB PDCs for TLR-9, MyD88, IRAK1 and IRF-7 compared with adult PDCs (Figure 21B). IRF-7 nuclear translocation was also examined in sorted UCB and adult PDCs by confocal microscopy after *in vitro* stimulation with type A CpG ODN.



**Figure 22 : IRF-7 nuclear translocation in UCB PDCs.**

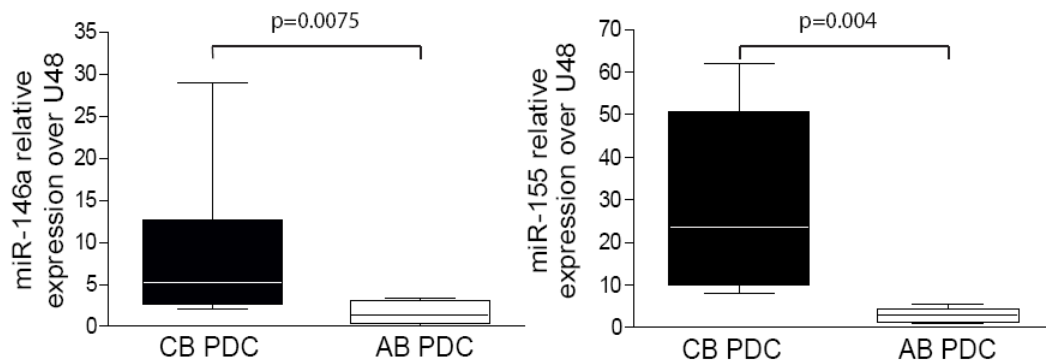
Adult and UCB PDC were sorted, fixed and permeabilized before IRF-7 staining. Nuclei were counterstained with DAPI and cells were cytopinned on coated slides before immunofluorescence analysis by confocal microscopy. The percentages of cells with intra-nuclear staining were estimated on 100-150 individual cells for each sample.

The percentage of cells with IRF-7 nuclear staining after stimulation was identical in UCB and adult cells (Figure 22). Together, these results indicate that essential proteins within the TLR-9 signaling pathway are down-regulated by a post-transcriptional mechanism in UCB PDCs.

### **High expression of miR-146a and miR-155 in UCB PDCs**

Since microRNAs have been known to negatively regulate TLR pathways in macrophages and DCs (21-25), and have recently been described as a mechanism of regulation of type I IFN production (21, 26, 27), the expression levels of miR-146a and miR-155 were investigated by quantitative RT-PCR on sorted PDCs.





**Figure 23 : Increased expression of miR-146a and miR-155 microRNAs in UCB PDCs.**

PDCs were isolated from UCB and adult blood by negative selection and cell sorting before RNA extraction and cDNA synthesis. miR-146a and miR-155 expressions were investigated by quantitative RT-PCR. Box plots are showing the median of each distribution (horizontal bar), the 25th and 75th percentile (box) and the range (vertical bars) for UCB and adult blood PDCs samples (6 adult and 12 UCB samples were analyzed).

Interestingly, the expression of miR-146a was 5 times higher in UCB PDCs, whereas the expression of miR-155 was 30 times higher (Figure 23). Importantly, this result reveals for the first time that the lower capacity of UCB PDCs to secrete type I IFN is associated with microRNA expression.

## DISCUSSION

The present report explored UCB PDC phenotype and function to get new insights into the mechanisms of higher tolerance to alloantigens of UCB cells despite a preserved anti-tumoral activity following UCBT. UCB PDCs exhibit a fully differentiated phenotype and up-regulate co-stimulatory molecules upon activation, although with delayed kinetics. Their lower IFN- $\alpha$  response is associated with a post-transcriptional down-regulation of TLR-9 signaling pathway proteins. This down-regulation is in line with an increased expression of miR-146a and miR-155, known to be involved in the post transcriptional down-regulation of immune responses.

Historically, the higher susceptibility of neonates to infections has been attributed to the immaturity of UCB immune cells. It was later shown that neonates are in fact immuno-competent, as they are able to mount adult-level T cell responses and their T cell repertoire is as diverse as that of adults (39-41). In addition, we previously showed that UCB NK cells exhibit a mature phenotype and as well as cytotoxic responses upon activation (42). The fully differentiated phenotype of UCB PDC is in line with these previous data and questions the so-called “immaturity” UCB immune cells. Taken together these data raise the hypothesis that the susceptibility of the human neonate to infections may be due to an active immune mechanism aimed at regulating immune responses during gestation. The phenotype of UCB PDCs described here is reminiscent of that observed in tolerant PDCs induced by some tumors, where PDCs are able to present antigens to CD4 and CD8<sup>+</sup> T cells, while their capability to secrete IFN- $\alpha$  is diminished (33, 34). Since type I IFN prime innate and adaptive immune cells, they are central players in the immune defenses against pathogens and tumor cells. Therefore, it has been proposed that tumors may take advantage of an effective suppression of type I IFN secretion as well as the induction of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg by DCs (33, 43, 44). Hence, it has been demonstrated that environmental factors greatly influence the immune properties of DCs. The fetus and placenta represent an environment where innate and adaptive immune responses need to be controlled to avoid pro-inflammatory cytokine secretion and allogenic reactions against non-inherited maternal antigens that can be

deleterious for the maintenance of gestation (45). In a recent study, Zarnani et al. reported that soluble factors secreted by decidual cells are important mediators of immunoregulation at the feto-maternal interface (46). We, therefore, propose that reduced IFN- $\alpha$  production by UCB PDC results from active immune suppression aimed at maintaining gestation rather than from the immaturity of these cells (45).

The molecular mechanism of this active immune silencing remains to be characterized. Our present report reveals for the first time that post-transcriptional regulation of the TLR-9 signaling pathway may play an important role in this process. We uncovered a global down-regulation of several proteins involved in the TLR-9 signaling pathway associated with a higher expression of miR-146a and miR-155. Although direct experimental evidence of a causality relationship is not possible in this setting of rare human cells, several data support this hypothesis. It has been shown that microRNAs control both cellular differentiation and activation of immune cells, i.e., T cells, B cells and DC (23, 24). The expression of miR-146a and miR-155 was examined because of the recently described implications of miR-146a and miR-155 in the negative regulation of TLR-dependent inflammatory responses (21, 22, 25, 47-49). It was shown that both miR-146a and miR-155 expression increased after DC maturation and activation, and this increase was required for the negative control of the immune response (21, 22, 50). In addition, at the clinical level, in systemic lupus erythematosus patients decreased miR-146a expression was correlated with increased IFN- $\alpha$  secretion, suggesting that these microRNAs are negative regulators of the IFN- $\alpha$  pathway (51, 52). At the molecular level, miR-146a directly targets IRAK1 and TRAF6 mRNAs, which are molecules shared among all TLR pathways, and decreases the expression of the corresponding proteins, while miR-155 targets TAB2, an important signaling molecule (25, 26, 53) and SOCS, a negative regulator of type I IFN signaling (27). Although direct interactions with TLR-9, MyD88 and IRF-7 mRNAs have not been observed, decreasing the amount of IRAK1, TRAF6 and other signaling molecules may affect the stability of the entire signaling pathway directly or indirectly. We further showed that IRF-7 nuclear translocation was not affected in UCB PDC, suggesting that this low amount of IRF-7 may not reach the threshold required for activating the type I IFN genes. Though our data on IRF-7 nuclear

translocation do not reproduce those of Danis et al. (29), we suspect that differences in the sensitivity between ImageStream technology and confocal microscopy may be responsible for this discrepancy. To further explore the molecular mechanism of IFN- $\alpha$  induced transcription, new information on IRF-7 nuclear pathways will be needed, particularly the identification of IRF-7 molecular partners of IFN-gene promoters.

In conclusion, human UCB PDC harbor a fully differentiated phenotype and their lower IFN- $\alpha$  response is associated with the post-transcriptional down-regulation of the pathway leading from TLR-9 ligation to the nuclear translocation of IRF-7 together with a higher expression of regulating miR-146a and miR-155. This suggests an active mechanism of immune down-regulation that may explain the lower alloreactivity of UCB cells. Further understanding of these mechanisms could lead to new ways of immune modulation after UCBT to further enhance the GvL effect without compromising the low incidence of GvHD. It may also lead to new ways to enhance the immune response to pathogens in neonates.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Hugo Morin and Dr. Isabelle Louis from the Research Cord Blood Bank at the CHU Sainte-Justine for providing cord blood units; Danièle Gagné (Institut de Recherche en Immunologie et Cancer, Université de Montréal) for cell sorting; Laurent Knafo for technical assistance in confocal microscopy. We gratefully acknowledge Drs. Elie Haddad, Nikolaus Heveker, Christian Beauséjour and Hugo Soudeyns (GRETISC members, CHU Sainte-Justine) for their helpful discussions.

## RÉFÉRENCES

1. Rocha, V., N. Kabbara, I. Ionescu, A. Ruggeri, D. Purtill, and E. Gluckman. 2009. Pediatric related and unrelated cord blood transplantation for malignant diseases. *Bone Marrow Transplant* 44:653-659.
2. Rocha, V., and F. Locatelli. 2008. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. *Bone Marrow Transplant* 41:207-214.
3. Dalle, J. H., M. Duval, A. Moghrabi, E. Wagner, M. F. Vachon, S. Barrette, M. Bernstein, J. Champagne, M. David, J. Demers, P. Rousseau, R. Winikoff, and M. A. Champagne. 2004. Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 33:605-611.
4. Eapen, M., P. Rubinstein, M. J. Zhang, C. Stevens, J. Kurtzberg, A. Scaradavou, F. R. Loberiza, R. E. Champlin, J. P. Klein, M. M. Horowitz, and J. E. Wagner. 2007. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* 369:1947-1954.
5. Rocha, V., J. Cornish, E. L. Sievers, A. Filipovich, F. Locatelli, C. Peters, M. Remberger, G. Michel, W. Arcese, S. Dallorso, K. Tiedemann, A. Busca, K. W. Chan, S. Kato, J. Ortega, M. Vowels, A. Zander, G. Souillet, A. Oakill, A. Woolfrey, A. L. Pay, A. Green, F. Garnier, I. Ionescu, P. Wernet, G. Sirchia, P. Rubinstein, S. Chevret, and E. Gluckman. 2001. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 97:2962-2971.
6. Ferrara, J. L., J. E. Levine, P. Reddy, and E. Holler. 2009. Graft-versus-host disease. *Lancet* 373:1550-1561.
7. Rocha, V., J. E. Wagner, Jr., K. A. Sobocinski, J. P. Klein, M. J. Zhang, M. M. Horowitz, and E. Gluckman. 2000. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med* 342:1846-1854.
8. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
9. Shlomchik, W. D., M. S. Couzens, C. B. Tang, J. McNiff, M. E. Robert, J. Liu, M. J. Shlomchik, and S. G. Emerson. 1999. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285:412-415.
10. Matte, C. C., J. Liu, J. Cormier, B. E. Anderson, I. Athanasiadis, D. Jain, J. McNiff, and W. D. Shlomchik. 2004. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med* 10:987-992.
11. Chakraverty, R., and M. Sykes. 2007. The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. *Blood* 110:9-17.
12. Morgado, J. M., R. Pratas, P. Laranjeira, A. Henriques, I. Crespo, F. Regateiro, and A. Paiva. 2008. The phenotypical and functional

- characteristics of cord blood monocytes and CD14(-/low)/CD16(+) dendritic cells can be relevant to the development of cellular immune responses after transplantation. *Transpl Immunol* 19:55-63.
13. Wu, L., and Y. J. Liu. 2007. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 26:741-750.
  14. Encabo, A., P. Solves, F. Carbonell-Uberos, and M. D. Minana. 2007. The functional immaturity of dendritic cells can be relevant to increased tolerance associated with cord blood transplantation. *Transfusion* 47:272-279.
  15. Arpinati, M., G. Chirumbolo, B. Urbini, G. Perrone, D. Rondelli, and C. Anasetti. 2003. Role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol* 11:345-356.
  16. Willems, F., S. Vollstedt, and M. Suter. 2009. Phenotype and function of neonatal DC. *Eur J Immunol* 39:26-35.
  17. Villadangos, J. A., and L. Young. 2008. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 29:352-361.
  18. Cao, W. 2009. Molecular characterization of human plasmacytoid dendritic cells. *J Clin Immunol* 29:257-264.
  19. Fitzgerald-Bocarsly, P., J. Dai, and S. Singh. 2008. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:3-19.
  20. Wang, J., Y. Hu, W. W. Deng, and B. Sun. 2009. Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway. *Microbes Infect* 11:321-327.
  21. Hou, J., P. Wang, L. Lin, X. Liu, F. Ma, H. An, Z. Wang, and X. Cao. 2009. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol* 183:2150-2158.
  22. Nahid, M. A., K. M. Pauley, M. Satoh, and E. K. Chan. 2009. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem* 284:34590-34599.
  23. Baltimore, D., M. P. Boldin, R. M. O'Connell, D. S. Rao, and K. D. Taganov. 2008. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* 9:839-845.
  24. Lindsay, M. A. 2008. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol* 29:343-351.
  25. Ceppi, M., P. M. Pereira, I. Dunand-Sauthier, E. Barras, W. Reith, M. A. Santos, and P. Pierre. 2009. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2735-2740.
  26. Zhou, H., X. Huang, H. Cui, X. Luo, Y. Tang, S. Chen, L. Wu, and N. Shen. 2010. miR-155 and its star-form partner miR-155\* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*.
  27. Wang, P., J. Hou, L. Lin, C. Wang, X. Liu, D. Li, F. Ma, Z. Wang, and X. Cao. 2010. Inducible microRNA-155 Feedback Promotes Type I IFN Signaling in Antiviral Innate Immunity by Targeting Suppressor of Cytokine Signaling 1. *J Immunol*.

28. Bartel, D. P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215-233.
29. Danis, B., T. C. George, S. Goriely, B. Dutta, J. Renneson, L. Gatto, P. Fitzgerald-Bocarsly, A. Marchant, M. Goldman, F. Willems, and D. De Wit. 2008. Interferon regulatory factor 7-mediated responses are defective in cord blood plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 38:507-517.
30. De Wit, D., V. Orlslagers, S. Goriely, F. Vermeulen, H. Wagner, M. Goldman, and F. Willems. 2004. Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns. *Blood* 103:1030-1032.
31. Nguyen, M., E. Leuridan, T. Zhang, D. De Wit, F. Willems, P. Van Damme, M. Goldman, and S. Goriely. 2010. Acquisition of adult-like TLR4 and TLR9 responses during the first year of life. *PLoS One* 5:e10407.
32. Flavell, R. A., S. Sanjabi, S. H. Wrzesinski, and P. Licona-Limon. 2010. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol* doi:10.1038/nri2808.
33. Bekeredjian-Ding, I., M. Schafer, E. Hartmann, R. Pries, M. Parcina, P. Schneider, T. Giese, S. Endres, B. Wollenberg, and G. Hartmann. 2009. Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology* 128:439-450.
34. Hartmann, E., B. Wollenberg, S. Rothenfusser, M. Wagner, D. Wellisch, B. Mack, T. Giese, O. Gires, S. Endres, and G. Hartmann. 2003. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 63:6478-6487.
35. Fanning, S. L., T. C. George, D. Feng, S. B. Feldman, N. J. Megjugorac, A. G. Izaguirre, and P. Fitzgerald-Bocarsly. 2006. Receptor cross-linking on human plasmacytoid dendritic cells leads to the regulation of IFN-alpha production. *J Immunol* 177:5829-5839.
36. Herblot, S., A. M. Steff, P. Hugo, P. D. Aplan, and T. Hoang. 2000. SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol* 1:138-144.
37. Martin-Martin, L., J. Almeida, P. M. Hernandez-Campo, M. L. Sanchez, Q. Lecrevisse, and A. Orfao. 2009. Immunophenotypical, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow. *Transfusion*.
38. Honda, K., H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida, and T. Taniguchi. 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434:772-777.
39. Forsthuber, T., H. C. Yip, and P. V. Lehmann. 1996. Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice. *Science* 271:1728-1730.
40. Sarzotti, M., D. S. Robbins, and P. M. Hoffman. 1996. Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science* 271:1726-1728.



41. Hermann, E., C. Truyens, C. Alonso-Vega, J. Even, P. Rodriguez, A. Berthe, E. Gonzalez-Merino, F. Torrico, and Y. Carlier. 2002. Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood* 100:2153-2158.
42. Dalle, J. H., J. Menezes, E. Wagner, M. Blagdon, J. Champagne, M. A. Champagne, and M. Duval. 2005. Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr Res* 57:649-655.
43. Dumitriu, I. E., D. R. Dunbar, S. E. Howie, T. Sethi, and C. D. Gregory. 2009. Human dendritic cells produce TGF-beta 1 under the influence of lung carcinoma cells and prime the differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 182:2795-2807.
44. Ghiringhelli, F., P. E. Puig, S. Roux, A. Parcellier, E. Schmitt, E. Solary, G. Kroemer, F. Martin, B. Chauffert, and L. Zitvogel. 2005. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202:919-929.
45. Levy, O. 2007. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 7:379-390.
46. Zarnani, A. H., S. M. Moazzeni, F. Shokri, M. Salehnia, P. Dokouhaki, R. Ghods, A. R. Mahmoodi, and M. Jeddi-Tehrani. 2008. Microenvironment of the fetomaternal interface protects the semiallogenic fetus through its immunomodulatory activity on dendritic cells. *Fertil Steril* 90:781-788.
47. Lederhuber, H., K. Baer, I. Altiok, K. Sadeghi, K. R. Herkner, and D. C. Kasper. 2010. MicroRNA-146: Tiny Player in Neonatal Innate Immunity? *Neonatology* 99:51-56.
48. Jurkin, J., Y. M. Schichl, R. Koeffel, T. Bauer, S. Richter, S. Konradi, B. Gesslbauer, and H. Strobl. 2010. miR-146a is differentially expressed by myeloid dendritic cell subsets and desensitizes cells to TLR2-dependent activation. *J Immunol* 184:4955-4965.
49. Taganov, K. D., M. P. Boldin, and D. Baltimore. 2007. MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity* 26:133-137.
50. Jin, P., T. H. Han, J. Ren, S. Saunders, E. Wang, F. M. Marincola, and D. F. Stronck. 2010. Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies. *J Transl Med* 8:4.
51. Tang, Y., X. Luo, H. Cui, X. Ni, M. Yuan, Y. Guo, X. Huang, H. Zhou, N. de Vries, P. P. Tak, S. Chen, and N. Shen. 2009. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum* 60:1065-1075.
52. Wang, G., L. S. Tam, E. K. Li, B. C. Kwan, K. M. Chow, C. C. Luk, P. K. Li, and C. C. Szeto. 2010. Serum and Urinary Cell-free MiR-146a and MiR-155 in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol*.
53. Taganov, K. D., M. P. Boldin, K. J. Chang, and D. Baltimore. 2006. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12481-12486.

**FOOTNOTES**Support:

This work was supported by the Fonds de Recherche en Santé du Québec and the Fondation Charles-Bruneau. Emily Charrier is a fellow of The Cole Foundation and the Fondation du CHU Sainte-Justine/Fondation des Étoiles.

Abbreviations:

UCB: umbilical cord blood, PDC: plasmacytoid dendritic cells, GvHD: graft-versus-host disease, IFN, interferon, HSC: hematopoietic stem cells, GvL: graft-versus-leukemia, Treg: regulatory T cells, TLR: Toll-like receptor, ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, PBMC: peripheral blood mononuclear cells, CBMC: cord blood mononuclear cells, MFI: median of intensity fluorescence.

Correspondence address:

Sabine Herblot

Phone: 514-345-4931 ex3910

CHU Sainte-Justine – 3175, Côte Sainte-Catherine, Montreal, Quebec, Canada

## **DISCUSSION**

Puisqu'un certain nombre d'études ont montré l'impact des cellules dendritiques dans la réussite des greffes de CSH, le but général de mes études doctorales était de caractériser les pDC du sang de cordon et après greffe de sang de cordon afin d'évaluer leur potentiel immunothérapeutique. La première partie de mon travail a montré une reconstitution précoce en nombre et en fonction des pDC après une greffe de sang de cordon, suggérant la possibilité de les utiliser comme outil thérapeutique. Notre hypothèse de travail étant qu'une reconstitution précoce et fonctionnelle des pDC serait associée à moins de complications post-greffe n'a pas été appuyée par nos données. Néanmoins, il semble intéressant de poursuivre l'étude de la reconstitution des pDC chez un plus grand nombre de receveurs de sang de cordon afin de formellement appuyer ou non cette hypothèse.

La seconde partie de mon travail avait pour but d'étudier la fonctionnalité des pDC du sang de cordon afin de comprendre leur impact dans le cadre des greffes de sang de cordon. Les résultats obtenus ont permis de mettre en lumière une différence dans la production d'IFN- $\alpha$  entre les pDC de sang de cordon et de sang d'adulte. De plus, nous avons reporté une régulation post-transcriptionnelle de la voie de signalisation TLR9-IRF7 dans les pDC de sang de cordon. Et cette diminution de l'expression des protéines clés de la voie de signalisation menant à la production des IFN de type I est associée à une expression plus élevée des microARNs miR-146a et miR-155.

La discussion sera centrée sur le domaine de la greffe de cellules souches hématopoïétiques et en particulier la greffe de sang de cordon. L'analyse et l'interprétation de l'ensemble de mes données permettra d'approfondir leur impact clinique potentiel chez les patients greffés.

## **1 - Choix de l'étude des pDC.**

Les pDC sont, avec les mDC, les deux populations de cellules dendritiques présentes dans le sang. Nous avons choisi de nous intéresser aux pDC pour plusieurs raisons. Tout d'abord, comme cela a été décrit dans la revue de la littérature, les pDC ont un rôle prépondérant dans la coordination des réponses immunitaires. En effet, en fonction de leur environnement et de leur mode d'activation en présence de différent

facteurs (cytokines, hormones, signaux de dangers...etc), ces cellules peuvent aussi bien initier des réponses immunitaires anti-inflammatoires que tolérogènes, permettant ainsi de moduler les réactions du système immunitaire. De plus, par leur extraordinaire capacité de production des IFN de type I, les pDC ont un fort pouvoir d'action sur les lymphocytes NK, notamment en les activant et en induisant leur activité cytotoxique. Dans le cadre des greffes de CSH, puisqu'il a été montré que l'activité cytolytique des cellules NK du donneur contre les cellules du receveur permettait d'éviter des complications comme la GvHD, les rechutes et le rejet, il semble intéressant de cibler des cellules comme les pDC pour potentialiser l'effet immunothérapeutique des cellules NK. A l'inverse, les mDC ne représentent pas un choix adéquat puisque ces cellules sont d'une part, sensibles à la lyse des cellules NK quand elles sont immatures (Moretta et al., 2006) et d'autre part, parce qu'elles ont un rôle majeur dans l'initiation de la GvHD. A la vue de ces données, il apparaît évident que les pDC représentent un choix judicieux dans l'élaboration d'une stratégie immunothérapeutique pour contrôler et limiter les complications qui pourraient survenir après une greffe de CSH et notamment après une greffe de sang de cordon.

Néanmoins, certaines limites à notre étude sont à noter. La reconstitution des pDC après une transplantation de CSH est réalisée dans le sang périphérique de patients ayant reçu une greffe de MO ou de sang de cordon. Nous décrivons donc ce qui se passe en périphérie et non dans les organes lymphoïdes ou dans les tissus. Ainsi, les résultats obtenus et leur interprétation est limitée. Néanmoins, étant donné la non-accessibilité à des échantillons tissulaires et médullaire, notre étude de la reconstitution des pDC dans le sang est une première étape dans la compréhension des mécanismes immunologiques qui surviennent au cours d'une greffe de sang de cordon.

## 2 - Facteurs influençant la fonction des pDC : patients, greffon et immunosuppresseurs.

### 1- Age, sexe et maladie du patient

D'après la littérature, aucune étude ne s'est intéressée à l'influence de facteurs comme l'âge, le sexe, la dose cellulaire du greffon ou les immunosuppresseurs sur la reconstitution des pDC. Notre étude est la première à avoir décrit longitudinalement la reconstitution des pDC dans le sang périphérique d'autant de patients. Malheureusement, le nombre relativement restreint et l'hétérogénéité de l'âge des patients, des maladies au diagnostique et la large diversité d'immunosuppresseurs utilisés aussi bien dans le conditionnement à la greffe que la prophylaxie contre la GvHD n'a pas permis d'observer une influence de ces différents facteurs sur la reconstitution des pDC. Un plus grand nombre de patients inclus dans l'étude serait nécessaire pour conclure sur l'impact de ces facteurs sur la reconstitution pDC.

### 2- Source de cellules souches hématopoïétiques

La seule différence significative réside dans la source de cellules souches hématopoïétiques. En effet, la reconstitution des pDC est significativement différente entre les patients ayant reçu un greffon de MO ou de sang de cordon. En effet, la figure 12 montre que la reconstitution des pDC est plus rapide après une greffe de sang de cordon qu'après une greffe de MO et est caractérisé par un nombre absolu de pDC plus élevé que chez le groupe d'adultes sains. De plus, leur capacité de produire de l'IFN- $\alpha$  suite à une stimulation par les ODN CpG semble être altérée (Figure 15A). Ceci peut être expliqué par la production constitutive d'IFN- $\alpha$  observé chez les receveurs de greffe de sang de cordon. En effet, il est probable que les pDC de patients ayant reçus une transplantation de sang de cordon aient été activées chez le patient et sont donc déjà devenues mature *in vivo*, les rendant donc incapables de produire d'avantage d'IFN- $\alpha$  *in vitro*. Dans le but de comprendre cette différence dans la reconstitution des pDC, nous avons déterminé quelles sont les caractéristiques des patients, du greffon et des drogues utilisées de chacun des deux groupes de

patients. Selon le tableau 6, les receveurs de sang de cordon sont significativement plus jeunes que ceux qui ont reçus une greffe de MO (8.9 ans vs 12 ans). La différence est relativement faible et une corrélation entre l'âge du patient à la greffe et le nombre de pDC n'a rien révélée (données non montrées).

### 3- Dose cellulaire du greffon

Une autre différence notable entre les deux groupes de patients est la dose de cellule infusée au patient. Comme cela a déjà été noté dans des études ultérieures, la dose de cellules nucléées totales et de cellules CD34<sup>+</sup> est toujours largement inférieure chez les receveurs de sang de cordon comparativement à ceux recevant une transplantation de MO (tableau 6). Ainsi, cette observation nous avait fait penser que la reconstitution des pDC pouvait être plus retardée après une greffe de sang de cordon. Or, nous avons trouvé que la greffe de sang de cordon est caractérisée par une reconstitution rapide des pDC, ce qui a été confirmé par notre expérience de génération *in vitro* de pDC à partir de cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon (Figure 16). Ainsi, la plus faible dose cellulaire du greffon ne peut pas expliquer la meilleure reconstitution des pDC. Il pourrait plutôt s'agir d'un meilleur potentiel de génération de pDC à partir des cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon, comparativement aux cellules CD34<sup>+</sup> de MO.

### 4- Immunosuppresseurs

Quant aux immunosuppresseurs utilisés, ils sont différents selon la source de CSH et pourraient donc participer à l'explication de la différence de reconstitution fonctionnelle des pDC entre les deux groupes de patients. La majorité des patients transplantés avec du sang de cordon reçoivent de l'ATG, du busulfan et du cyclophosphamide pour le conditionnement et de l'ATG, de la cyclosporine A et des corticoïdes en prophylaxie de la GvHD. Le conditionnement des patients ayant reçus une transplantation de MO est identique à celui pour les receveurs de sang de cordon, mais pour une majorité d'entre eux, ils ne reçoivent pas d'ATG. Le traitement prophylactique de la GvHD après une greffe de MO est principalement constitué de

cyclosporine A et de methotrexate. Quelques patients reçoivent aussi en plus de l'ATG. Globalement, les principales différences entre les deux groupes de patients est la quasi-systématique utilisation de l'ATG pour les greffes de sang de cordon et l'utilisation de corticoïdes au lieu du methotrexate pour la prophylaxie de la GvHD. Nous pouvons donc penser que l'utilisation d'agents comme l'ATG et les corticoïdes n'affecteraient pas la reconstitution des pDC. Or, curieusement les quelques études réalisées sur l'effet des immunosuppresseurs sur les pDC ont révélé que les corticoïdes, comme la prednisolone et le dexaméthasone ont un effet délétère sur la fonction des pDC (Boor et al., 2006; Rozkova et al., 2006; Shodell et al., 2003; Abe and Thomson, 2006; Shodell and Siegal, 2001). De plus, la cyclosporine A affecte la production d'IFN- $\alpha$  et leur maturation en cellule présentatrice d'antigène (Tajima et al., 2003). De façon intéressante, alors qu'il a été démontré que l'ATG induit la déplétion *in vivo* et *ex vivo* des pDC (Fang et al., 2005), ce sont les patients recevant un greffon de sang de cordon qui ont principalement de l'ATG dans le conditionnement et le traitement prophylactique contre la GvHD dans notre cohorte. De plus, un traitement de G-CSF est administré seulement aux receveurs de sang de cordon. Or, tout comme l'ATG induit une déplétion des pDC, l'utilisation du G-CSF est associée à un nombre plus faible de pDC dans le sang périphérique (Fagnoni et al., 2004). Nos résultats vont donc à l'encontre de ce à quoi nous nous attendions. Néanmoins, les données des études précédemment citées sont à prendre avec précaution puisque les doses utilisées dans les expériences *in vitro* sont très largement supérieur à celles administrées chez les patients. Des études supplémentaires pertinentes de la situation clinique semblent être nécessaires pour comprendre quel est l'impact des immunosuppresseurs sur le nombre et la fonction des pDC.

En conclusion, nous démontrons pour la première fois que la reconstitution des pDC est plus rapide après une greffe de sang de cordon alors que les traitements immunosuppresseurs particulièrement utilisés pour ce type de greffon vont à l'encontre du rétablissement en nombre et en fonction des pDC. A la lumière de notre modèle de génération *in vitro* des pDC, il apparaît que des caractéristiques



intrinsèques aux cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon pourraient expliquer cette reconstitution accélérée des pDC.

### **3 - Facteurs influençant la fonction des pDC : environnement.**

Comme cela a été très largement décrit dans la revue de littérature, la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC est un processus extrêmement bien contrôlé par différents mécanismes moléculaires. L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse a permis de constater que la fonction des pDC et notamment leur capacité à produire de l'IFN- $\alpha$  semble être dépendant de l'environnement dans lequel se trouve la pDC. Ainsi, dans le but de comprendre si l'environnement du sang de cordon comporte des facteurs pouvant contrôler la production d'IFN- $\alpha$ , nous avons trié les pDC du sang de cordon avant de les stimuler avec des ODN CpG. L'isolation des pDC permet ainsi de les sortir de leur environnement et d'éliminer l'impact des facteurs solubles potentiellement inhibiteurs de la production d'IFN- $\alpha$ . Comme nous l'avons vu dans la revue de littérature, la production des IFN de type I est extrêmement contrôlée. Et il a été montré que l'environnement, qu'il soit physiologique ou pathologique, peut avoir un impact sur la production des IFN de type I. En effet, l'environnement tumoral, par l'expression de molécules comme BST2 (Cao and Bover, 2010) par exemple, peut inhiber la production d'IFN de type I par les pDC (Bekeredjian-Ding et al., 2009). De la même manière, HMGB1, une protéine associée aux dommages dans le contexte d'inflammation chronique, empêche la fonction des pDC (Popovic et al., 2006). Ces données montrent donc qu'un environnement pathologique peut diminuer la fonction des pDC.

Les pDC ont un rôle majeur dans la régulation de la réponse immunitaire, soit en favorisant et en activant une réponse inflammatoire par la production d'IFN de type I, soit en générant une réponse tolérogène. Ainsi, dans certains contextes, les pDC sont de véritables inducteurs de la tolérance. En effet, le foie où une tolérance orale est indispensable pour prévenir une sensibilité aux antigènes alimentaires est un

organe où les pDC présentent des caractéristiques tolérogènes (Goubier et al., 2008; Dubois et al., 2009). De façon très intéressante, l'environnement placentaire se distingue par la présence d'un certain nombre de facteurs solubles connus pour interférer avec la sécrétion des IFN de type I par les pDC. Nous pensons donc que l'environnement placentaire est responsable de la quasi-absence de production d'IFN- $\alpha$ . En effet, l'IL-10 est produite en forte quantité dans le sang de cordon, notamment par les cellules T, les cellules B CD5<sup>+</sup> abondamment présentes dans le sang de cordon et par les cellules trophoblastiques du placenta (Roth et al., 1996; O'Garra and Howard, 1992). Or, l'IL-10 est connue pour induire l'apoptose des pDC et pour réduire leur production d'IFN- $\alpha$  en réponse à une stimulation virale (Payvandi et al., 1998; Duramad et al., 2003; Knodler et al., 2009). Par ailleurs, le placenta produit des hormones comme la progestérone afin de maintenir la grossesse (Tuckey, 2005). Il a aussi été montré que la progestérone régule négativement la production d'IFN- $\alpha$  (Hughes et al., 2008). D'autres molécules, produites par le placenta et libérées au moment du travail, comme les prostaglandines sont aussi connues pour être des régulateurs négatifs de la fonction des pDC (Son et al., 2006; Hung et al., 2009; Fabricius et al., 2010). Toutes ces molécules pourraient, selon nous, être responsables de la différence de production d'IFN- $\alpha$  par les pDC de sang de cordon.

Néanmoins, la quasi-absence de production d'IFN- $\alpha$  observée après stimulation des pDC purifiées du sang de cordon indique que, même en absence de ces molécules la production d'IFN- $\alpha$  n'est pas au même niveau que celle retrouvée par les pDC de sang d'adulte (Figure 18). Il nous semble légitime de penser que la présence de ces molécules tout au long de la grossesse a eu un impact sur le développement des pDC du sang de cordon. Nous émettons donc l'hypothèse que la différence de fonction des pDC du sang de cordon est le résultat de la différenciation de ces cellules dans l'environnement placentaire. Nous avons des données *in vitro* qui appuient cette hypothèse. En effet, nous avons mis au point un modèle de différenciation de pDC *in vitro* à partir de cellules CD34<sup>+</sup> humaines. Les pDC générées *in vitro* produisent de l'IFN- $\alpha$  et sont capables de devenir des cellules dendritiques matures en augmentant l'expression des molécules de co-stimulation

(données non montrées). Par contre, les pDC différenciées à partir de CD34<sup>+</sup> en présence de quantités physiologiques de progestérone, d'IL-10 et de TGF- $\beta$  ne produisent pas d'IFN- $\alpha$  en réponse aux ODN CpG (données non montrées).

En conclusion, il semble que la quasi-absence de production d'IFN- $\alpha$  par les pDC de sang de cordon soit liée à des différences intrinsèques aux pDC, pouvant être la conséquence de facteurs environnementaux du sang de cordon. Ainsi, ces données laissent présager que, générées en dehors de l'environnement du sang de cordon, les pDC devraient produire de l'IFN- $\alpha$ .

## **4 - Influence de la reconstitution de l'axe pDC/NK sur les complications de greffes de sang de cordon.**

### **1- Infections virales**

Puisque les IFN de type I amorcent les réponses immunitaires innée et adaptative, les pDC sont considérées comme des acteurs majeurs dans la défense contre les infections virales. Chez les receveurs de sang de cordon, la mortalité attribuée aux infections est plus grande, comparativement aux autres sources de CSH provenant de donneurs non apparentés, particulièrement avant le jour 100 post-greffe (Atsuta et al., 2009; Eapen et al., 2007). Les cellules mononucléées injectées avec le greffon pourraient conférer une protection immunitaire contre les infections pendant la période de neutropénie et de lymphopénie. Or, la deuxième partie de mon travail de doctorat montre que les pDC du sang de cordon ne produisent pas d'IFN- $\alpha$  durant les six premiers mois (Figure 18), limitant donc leur pouvoir antiviral direct. De plus, même si nous avons montré que les pDC sont capables de devenir des cellules présentatrices d'antigènes (Figures 19 et 20) et ainsi d'initier la réponse immunitaire adaptative, la plus faible production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules du sang de cordon semble être un obstacle important pour le contrôle des infections virales durant les premières semaines après la greffe de sang de cordon. Il faudra alors attendre la génération *de novo* des cellules du système immunitaire à partir des

CSH pour pouvoir induire des réponses immunitaires efficaces. Les résultats obtenus dans la première partie de mon travail montrent que les pDC sont présentes rapidement et en nombre élevé après une greffe de sang de cordon, comparativement à une greffe de MO. Mais, l'analyse fonctionnelle de ces cellules montre qu'elles ne répondent pas à une stimulation par les ODN CpG, mimant des motifs d'ADN viraux (Figure 15). Cependant, un niveau constitutif d'IFN- $\alpha$  est présent chez les patients greffés avec un sang de cordon et devrait donc pouvoir induire une réponse antivirale directe, ainsi qu'initier l'activation des cellules NK. En ce sens, nous avons effectivement démontré que les cellules NK après une greffe de sang de cordon produisent de l'IFN- $\gamma$  et dégranulent en réponse à une stimulation avec de l'IFN- $\alpha$  (Figure 14.A et C). Ainsi, à la lumière de ces résultats et aux données de la littérature, il apparaît que la plus forte incidence d'infections retrouvée durant les 100 premiers jours après une greffe de sang de cordon n'est pas due à un défaut de fonction de l'immunité innée mais semble être plutôt en lien avec le retard d'apparition de l'immunité adaptative.

L'absence de production d'IFN de type I par les pDC du sang de cordon participe vraisemblablement à la sensibilité du nouveau-né aux infections virales. Bien que la mise en place des programmes de prévention et de vaccination ait permis de réduire considérablement la taux de mortalité néonatale, l'Organisation Mondiale de la Santé estime que 1.3 millions de nouveau-nés meurent encore chaque année de maladies d'origine infectieuses. Le modèle actuellement retenu pour expliquer la vulnérabilité du nouveau-né aux infections est celui de l'immaturation de son système immunitaire. Or, selon nous, une autre hypothèse possible est la tolérogénicité du système immunitaire. Ainsi, la tolérance fœto-maternelle prédisposerait le nouveau-né aux infections. La susceptibilité néonatale aux infections serait le prix à payer pour le bon déroulement de la grossesse, processus indispensable à la survie de l'espèce.

## 2- GvHD

L'incidence de GvHD dans notre cohorte de patients est similaire entre les receveurs de sang de cordon et ceux recevant une transplantation de moelle osseuse. En effet, 2 des 18 patients (11.1%) ayant reçus une transplantation de MO ont développé une GvHD aiguë alors qu'elle a été diagnostiquée chez 6 des 38 (15.8%) des receveurs de sang de cordon. Ceci est surprenant puisque la plupart des études ont rapportées une incidence plus faible de GvHD dans les cohortes de patients ayant été greffés avec du sang de cordon. Les pourcentages de patients ayant eu une GvHD après une transplantation de moelle osseuse sont de 35 à 50%, ce qui est bien plus élevé que ce que nous rapportons ici. La GvHD semble donc être une complication bien contrôlée au CHU Sainte-Justine.

Les données de la littérature sur l'impact des pDC sur le développement ou non d'une GvHD aiguë ou chronique restent confuses. Certaines études ont relevé qu'une reconstitution altérée des pDC augmente le risque de GvHD aiguë (Mohty et al., 2005; Reddy et al., 2004). Ceci est en accord avec d'autres études qui ont montré que les immunosuppresseurs utilisés en prophylaxie de la GvHD et la GvHD elle-même altère la reconstitution des pDC (Kitawaki et al., 2003; Mohty et al., 2005; Vakkila et al., 2005; Arpinati et al., 2004). Plus récemment, deux études ont révélé que le nombre de pDC, et plus précisément une diminution du nombre de pDC 28 jours après la greffe peut être un indicateur du développement de la GvHD (Rajasekar et al., 2008). Cependant, une étude a révélé qu'un grand nombre de pDC est retrouvé chez des patients atteints de GvHD aiguë (Fagnoni et al., 2004). Il apparaît donc que l'influence des pDC dans le développement de la GvHD reste à préciser. Notre travail n'a malheureusement pas pu démontrer une possible association entre la reconstitution des pDC et la GvHD, probablement dûe au nombre restreint de patients ayant développés une GvHD. L'inclusion de patients supplémentaires serait nécessaire pour pouvoir conclure précisément sur l'impact des pDC dans la GvHD. De plus, des modèles murins de GvHD pourraient apporter des réponses quant au rôle des pDC dans la GvHD.

### 3- Rechute

L'incidence de rechute dans notre cohorte de patient est différente entre les receveurs de sang de cordon et ceux recevant une transplantation de MO. En effet, 3 des 18 patients (16.7%) ayant reçus une transplantation de MO ont rechuté à une médiane de 264 jours post-transplantation, alors que 14 des 38 (36.8%) des receveurs de sang de cordon ont rechuté de leur maladie plus rapidement (médiane de 180 jours). Cette différence d'incidence de rechute est encore plus marquée quand l'analyse est restreinte aux patients diagnostiqués pour une maladie maligne. Puisque seulement 9 et 23 (21 leucémies et 2 neuroblastomes) patients ayant reçu une transplantation de MO et de sang de cordon respectivement ont été diagnostiqués pour une maladie maligne, l'incidence de rechute est encore plus élevée dans les deux groupes de patients (33% et 61% pour les receveurs de MO et de sang de cordon respectivement). Alors que deux études ont relevé qu'une reconstitution altérée des pDC augmente le risque de rechute (Mohty et al., 2005; Reddy et al., 2004), nous n'avons pas trouvé d'association entre la reconstitution des pDC et le risque de rechute. Au sein du groupe de receveurs de sang de cordon, les patients ayant rechutés n'ont pas une reconstitution différente de ceux qui ne rechutent pas (données non montrées). De plus, l'incidence de rechute chez es receveurs de sang de corodn est largement plus élevé que dans le groupe de receveurs de MO, alors que la reconstitution des pDC est plus rapide. Ensemble, ces données soulignent l'absence d'impact de la reconstitution des pDC sur les rechutes après une greffe de sang de cordon.

## 5 - Différences fonctionnelles des pDC de sang de cordon : atout pour une immunothérapie ?

### 1- Immaturité versus différences fonctionnelles ?

Un grand nombre d'études qui se sont intéressées à l'immunologie néonatale ont révélé des différences de fonction des cellules de sang de cordon. La plupart de ces études ont attribué ces différences de fonction au fait que les cellules de sang de cordon ne se trouvent pas dans un état de différenciation terminale, parlant ainsi

d'immaturation des cellules de sang de cordon. Ainsi, dans le sang de cordon, la production d'un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires, de type Th1 et l'activité cytotoxique des cellules T est plus basse (Wilson et al., 1986; Harris et al., 1992; Chang et al., 1994; Lee et al., 1996; Qian et al., 1997; Chalmers et al., 1998; Nitsche et al., 2007). Cependant, depuis cette notion d'immaturation, plusieurs études ont montré que les cellules du sang de cordon sont capables de monter des réponses immunitaires contre un pathogène comparables à celles de l'adulte lorsqu'elles reçoivent la stimulation adéquate (Hermann et al., 2002; Merindol et al., 2010). De plus, des tentatives cliniques de transplantation de foie fœtal ont montré que les cellules T transplantées induisent de manière systématique une réponse allogénique efficace contre les cellules du receveur (Renda et al., 2000). De même, dans un modèle de transplantation hématopoïétique *in utero*, le rejet du donneur par les cellules T du fœtus receveur révèle la capacité des cellules T fœtales à déclencher des réactions allogéniques efficaces (Flake and Zanjani, 1997). Aussi, les différences de fonctions peuvent être gommées en présence de signaux appropriés. Des travaux dans le laboratoire ont également révélé que les cellules NK du sang de cordon sont phénotypiquement identiques aux cellules NK de sang d'adulte, à l'exception d'une plus faible expression des molécules CD8, CD57, ICAM-1, CD161 et la L-sélectine (Dalle et al., 2005). De plus, l'expression de la perforine et des granzymes, deux molécules effectrices de l'activité cytotoxique est normale et la production d'IFN- $\gamma$  peut être restaurée en incubant les cellules mononucléées du sang de cordon en présence d'IL-12 ou d'IL-15 (Lee et al., 1996; Qian et al., 1997; Dalle et al., 2005).

Concernant les pDC, notre travail a démontré que les pDC du sang de cordon sont phénotypiquement matures, puisqu'elles sont similaires aux pDC de sang d'adulte et correspondent au stade III décrit récemment dans la moelle osseuse humaine (Martin-Martin et al., 2009). Le stade de différenciation terminale des pDC est caractérisé par le phénotype suivant : CD34<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>++</sup>/CD123<sup>+++</sup>/CD45<sup>+++</sup> (stade III). Les résultats obtenus ont révélé que plus de 85% des pDC du sang de cordon sont des pDC présentant ce phénotype. De plus, l'expression des marqueurs BDCA-2 sur les pDC de sang de cordon confirme l'état de différenciation terminale

puisque'il a été montré que l'acquisition et l'intensité de ce marqueur augmente graduellement au cours de l'ontogénie des pDC dans la moelle osseuse. Nous avons cependant confirmé la plus faible production d'IFN- $\alpha$  en réponse aux ODN CpG (Figure 18), démontrant une différence de fonction des pDC de sang de cordon, non reliée à l'immaturation de ces cellules. Le faible pourcentage de pDC de stade II présent dans le sang de cordon (environ 6%) ne peut pas expliquer la quasi-absence de production d'IFN- $\alpha$ .

En conclusion, nous apportons la preuve que les pDC de sang de cordon sont au même stade de différenciation que les pDC présentes dans le sang périphérique d'adulte. Seule la quasi-absence de production d'IFN- $\alpha$  différencie les pDC de sang de cordon et de sang d'adulte. Ainsi, nous sommes les premiers à démontrer clairement que l'hypothèse de l'immaturation des pDC de sang de cordon n'est pas valable pour expliquer la quasi-absence de production des IFN de type I.

## 2- Tolérance ?

Comme nous venons de le discuter plus haut, nous pensons que la faible production d'IFN- $\alpha$  par les pDC du sang de cordon est probablement due à l'impact de l'environnement placentaire. Cependant, les pDC du sang de cordon sont capables de devenir des cellules dendritiques matures (Figures 19 et 20). La voie NF- $\kappa$ B semble donc ne pas être affectée par le mécanisme de contrôle traductionnel. Le fait que seule la production des IFN de type I soit affectée dans les pDC de sang de cordon rappelle les pDC tolérogènes présentes au sein de certaines tumeurs (Bekeredjian-Ding et al., 2009; Hartmann et al., 2003a). Dans le cadre de certains cancers, les pDC sont en effet capables de devenir des cellules présentatrices d'antigènes alors que leur capacité de production d'IFN- $\alpha$  est altérée (Bekeredjian-Ding et al., 2009; Hartmann et al., 2003a). De plus, comme cela a été noté dans la revue de littérature, les pDC infiltrant certaines tumeurs induisent préférentiellement des cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> et suppriment ainsi les réponses anti-tumorales (Ghiringhelli et al., 2005; Dumitriu et al., 2009). De la même manière, le



foie, où une tolérance orale est indispensable pour prévenir une sensibilité aux antigènes alimentaires, est un organe où les pDC présentent des caractéristiques tolérogènes (Goubier et al., 2008; Dubois et al., 2009). Ainsi, comme nous l'avons discuté plus haut, le microenvironnement favorise le développement de pDC incapables de produire des IFN de type I lorsqu'une tolérance immunitaire est observée.

Or, il est bien connu que la grossesse est un état physiologique qui est caractérisé par une tolérance fœto-maternelle. Puisque durant la gestation, le système immunitaire maternel est exposé aux antigènes paternels présents chez le fœtus, Medawar et al. ont proposé le modèle de fœtus comme allogreffe auquel le système immunitaire de la mère doit être tolérant (Medawar, 1961). Dans la compréhension de ces mécanismes de tolérance, plusieurs études ont attiré l'attention sur un certain nombre de facteurs immunomodulateurs présents à l'interface fœto-maternelle qui permettent de protéger le fœtus allogénique en établissant une tolérance immunologique et la prédominance d'une immunité Th2. Zarnani et al. ont pu établir que les cellules dendritiques jouent un rôle prédominant dans ces mécanismes (Zarnani et al., 2008). La relation immunologique entre la mère et le fœtus est une communication bi-directionnelle, ainsi nous proposons un modèle symétrique à celui de Medawar, soit que le système immunitaire du fœtus doit être tolérant aux cellules maternelles.

Nous pensons donc que les différences fonctionnelles observées par les cellules immunitaires du sang de cordon ne sont pas dues à une immaturité mais plutôt à une tolérance (annexe, revue 1). En effet, comme cela a déjà été discuté plus haut, les cellules du sang de cordon sont capables de monter des réponses immunitaires efficaces (Hermann et al., 2002; Tonon et al., 2006). De plus, il est surprenant de penser que les facteurs solubles présents à l'interface fœto-maternelle aient un impact seulement sur le système immunitaire de la mère. Pour appuyer ce modèle, la revue de littérature de l'immunologie néonatale nous révèle que les différences fonctionnelles des cellules du sang de cordon sont spécifiques aux cytokines qui

promeuvent une immunité de type Th1 (Wilson et al., 1986; Chang et al., 1994; Lee et al., 1996; Yan et al., 2004; De et al., 2003). En effet, en plus de la plus faible production d'IFN de type I, le sang de cordon est caractérisé par une plus faible production d'IL-12, toutes ces cytokines favorisant une réponse des cellules T CD4<sup>+</sup> en Th1 (Lee et al., 1996; Goriely et al., 2004; Goriely et al., 2001; De et al., 2003; De et al., 2004; Aksoy et al., 2007). Et il a aussi été montré une production plus basse d'IFN- $\gamma$  par les cellules néonatales (Wilson et al., 1986). Par contre, dans ces études, la production d'IL-10 n'est pas affectée, au contraire, elle est même augmentée (De et al., 2003). Et la cytokine IL-13 est produite en plus grandes quantités par les cellules T du nouveau-né (Ribeiro-do-Couto et al., 2001). Ces observations suggèrent donc fortement que le sang de cordon est aussi caractérisé par un biais vers une immunité Th2, comme ce qui a été constaté dans le sang maternel au cours de la grossesse. Un autre argument en faveur du modèle de la tolérance du sang de cordon est la présence de cellules T régulatrices présentant une activité suppressive plus puissante et plus constante que celle des Tregs issus du sang d'adulte (Godfrey et al., 2005). De plus, les Tregs ont été trouvés dans le thymus, la rate et les ganglions du fœtus humain dès la 14e semaine de gestation (Cupedo et al., 2005). De façon intéressante, les cellules T du sang de cordon sont tolérantes aux antigènes HLA maternels *in utero* et que cette tolérance se poursuit jusqu'à 6 mois après la naissance (Harris et al., 1994).

En conclusion, tout comme le fœtus est une allogreffe pour la mère, les réactions allogéniques des cellules immunitaires du fœtus contre les antigènes maternels non hérités doivent être réprimées. Ainsi, l'ensemble des données de la littérature sur l'immunologie du sang de cordon et les résultats obtenus dans ce travail laisse suggérer que la barrière materno-fœtale crée un environnement tolérant, responsable des différences de fonction observées. Il serait donc intéressant d'approfondir la caractérisation fonctionnelle des pDC du sang de cordon dans le but de savoir si ces cellules ont une empreinte de tolérogénicité de la réponse immunitaire en général.

### 3- pDC tolérogènes du sang de cordon : atout pour les greffes de sang de cordon ?

A la lumière de nos résultats concernant l'étude des pDC de sang de cordon, il apparaît que ces cellules présentent des différences fonctionnelles par rapport à leur équivalent dans le sang périphérique d'adulte, probablement dues à leur environnement (comme discuté plus haut). Dans le cadre des greffes de cellules souches hématopoïétiques, il est important de faire la distinction entre les pDC du sang de cordon infusées en même temps que le greffon et les pDC générées à partir des cellules souches hématopoïétiques du sang de cordon. En effet, comme nous l'avons vu au travers de nos résultats, ces cellules ne vont pas avoir les mêmes fonctions : les pDC du sang de cordon ne produisent pas d'IFN- $\alpha$  alors que les pDC qui apparaissent chez le patient greffé sont capables d'en produire, notamment à partir de 6 mois post-greffe. De plus, les pDC du greffon sont présentes durant les premières semaines suivant la greffe alors que les pDC générées à partir des cellules souches hématopoïétiques n'apparaîtront que plus tard. N'ayant pas les mêmes fonctions et n'étant pas présentes au même moment, on peut donc se demander si les pDC du greffon sang de cordon ne pourraient pas avoir un impact sur les résultats de greffes de sang de cordon et notamment sur les événements qui surviennent précocement. Puisque les pDC de sang de cordon sont caractérisées par une absence de production d'IFN- $\alpha$ , elles ne vont donc pas induire une polarisation de la réponse adaptative vers Th1, limitant donc ainsi l'initiation de la GvHD. Il se pourrait donc que l'absence de production d'IFN- $\alpha$  participe à la plus faible incidence de GvHD observée après greffe de sang de cordon. De plus, leur potentiel tolérogénique pourrait aussi favoriser la prise de la greffe comme cela a été décrit dans un modèle de souris (Fugier-Vivier 2005). Cependant, l'analyse de nos résultats à la lumière de ces données ne permet pas d'appuyer ces affirmations. En effet, pour cela, il aurait fallu connaître la dose de pDC infusée avec le greffon pour pouvoir associer la dose de pDC et l'incidence de GvHD ou de prise de la greffe. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour faire la distinction entre les pDC du greffon et celles différenciées à partir des cellules souches hématopoïétiques, notamment au cours du

premier mois post-greffe afin d'évaluer leur rôle dans l'établissement de réponse immunitaire tolérogène.

## 6 - Axe pDC/NK : cible pour une immunothérapie ?

Un des désavantages de la greffe de sang de cordon est l'impossibilité d'obtenir des lymphocytes additionnels du même donneur en cas de rechute de la maladie maligne pour augmenter l'effet GvL de la greffe. Même si certaines études tentent d'utiliser un autre sang de cordon comme source de lymphocytes pour utiliser en DLI, il est nécessaire de développer d'autres alternatives thérapeutiques pour contrer notamment les rechutes. Depuis quelques années, il est apparu que les cellules NK sont une cible intéressante pour une immunothérapie post-greffe (annexe, revue 2). En effet, plusieurs études cliniques ont montré que l'activation des cellules NK a un effet favorable sur les résultats de greffes de CSH (Ruggeri et al., 2002; Ruggeri et al., 2008). De plus, ces cellules apparaissent très précocement après une greffe de sang de cordon, comme nous et d'autres équipes l'ont montré et il n'y a pas de retard comparativement à une greffe de MO (Figure 2 et figure 12) (Beziat et al., 2009; Moretta et al., 2001; Thomson et al., 2000). Or, une équipe a montré que des patients ayant un retard dans la reconstitution NK présentent des complications cliniques plus sévères que ceux ayant une reconstitution précoce (Shilling et al., 2003). Ainsi, les résultats de notre étude laissent penser que la reconstitution des cellules NK n'aura pas d'impact négatif sur l'incidence de complications qui peuvent survenir après une greffe de sang de cordon.

De plus, comme cela a été préalablement décrit, la reconstitution phénotypique des cellules NK après une greffe de sang de cordon est caractérisée par une prédominance des cellules NK CD56<sup>bright</sup> (Figure 13.A) qui expriment préférentiellement le récepteur inhibiteur NKG2A (Figure 13.B) (Beziat et al., 2009). Quelques études ont suggéré que le phénotype et le répertoire des récepteurs inhibiteurs des cellules NK influenceraient les résultats de transplantations de CSH (Nguyen et al., 2005; Zhao et al., 2007; Shilling et al., 2003; Vago et al., 2008). En

effet, les patients qui présentent de forte proportion des cellules NK exprimant le récepteur NKG2A précocement après la greffe ont une plus forte incidence de mortalité associée à la transplantation et une réduction de la survie sans leucémie (Zhao et al., 2007). Or, d'après nos résultats, il n'y a pas de différence marquée entre le pourcentage de cellules NK NKG2A<sup>+</sup> qui apparaissent après une greffe de sang de cordon ou une greffe de MO (Figure 13.B). Ainsi, l'apparition des cellules NK n'influencerait pas particulièrement négativement la greffe de sang de cordon comparativement à une greffe de MO. De plus, il est intéressant de noter que la proportion de cellules NK exprimant les récepteurs KIR atteint des niveaux similaires au sang périphérique d'adulte dès 6 mois post-greffe de sang de cordon. En comparaison, la reconstitution des cellules NK KIR<sup>+</sup> après une greffe de moelle osseuse est semblable au pourcentage du sang périphérique d'adulte sain autour de 1 an post-greffe. Ces résultats montrent que la greffe de sang de cordon semble favoriser l'apparition des cellules NK KIR<sup>+</sup> (Figure 13.C). Il a été montré que la reconstitution des cellules NK KIR<sup>+</sup> peut être altérée par une forte dose de cellules T dans le greffon et par le développement d'une GvHD aiguë (Vago et al., 2008; Zhao et al., 2007; Cooley et al., 2005). Or, de façon intéressante, la greffe de sang de cordon est caractérisée par une plus faible quantité de lymphocytes T dans le greffon et par une incidence plus faible de GvHD. Ces conditions pourraient expliquer cette observation. De plus, une grande fréquence de cellules NK KIR<sup>+</sup> a un impact positif sur les résultats de transplantation de CSH (Cooley et al., 2005). Ainsi, la reconstitution précoce des cellules NK et l'apparition plus rapide d'une plus grande proportion des cellules NK KIR<sup>+</sup> après une greffe de sang de cordon laissent présager que la réussite de la greffe ne sera pas plus compromise qu'après une greffe de MO.

L'intérêt des cellules NK dans le cadre des transplantations de CSH a démarré avec l'étude de Ruggeri et al. (Ruggeri et al., 2002). En effet, cette équipe a montré que l'alloréactivité des cellules NK médiée par une disparité entre les récepteurs KIR des cellules NK du donneur et les molécules HLA de class I des cellules du receveur permettait d'éviter trois des quatre complications qui surviennent après greffe. Ainsi, en tuant les cellules leucémiques, les cellules dendritiques de l'hôte et les

lymphocytes T du receveur, l'alloréactivité des cellules NK empêchent les rechutes, la GvHD et le rejet respectivement (Ruggeri et al., 2002). Des résultats d'études cliniques impliquant une disparité KIR-ligand dans les greffes de sang de cordon ont été récemment publiées. L'étude d'Eurocord-Netcord, basée sur 218 patients ayant une leucémie aiguë, révèle que l'alloréactivité NK dans les greffes de sang de cordon est associée à une réduction significative de l'incidence de rechute et à une plus grande survie sans leucémie (Willemze et al., 2009). A l'inverse, Brunstein et al. ont montré que la disparité KIR-ligand n'a pas d'impact significatif sur les taux de rechutes et sur la survie globale (Brunstein et al., 2009). Cette discordance dans ces résultats souligne la nécessité d'approfondir le potentiel de l'alloréactivité des cellules NK pour les réussites de greffe de sang de cordon.

De manière intéressante, l'alloréactivité des cellules NK a aussi été rapportée dans le cas de greffes HLA identiques sans disparité KIR-ligand (Cook et al., 2004; Hsu et al., 2005; Verheyden et al., 2005). Dans ces situations, l'alloréactivité NK pourrait être expliquée par la prédominance d'interaction entre les récepteurs activateurs des cellules NK et leurs ligands. Ainsi, ces données mettent en lumière la possibilité d'investiguer d'autres stratégies d'activation des cellules NK. Une stratégie envisageable est l'utilisation d'IFN- $\alpha$ . En effet, l'IFN- $\alpha$  est connu pour avoir une activité immunomodulatoire de la réponse immunitaire innée et notamment sur les cellules NK. En effet, les IFN de type I sont nécessaires et suffisants pour induire l'activité cytotoxique des cellules NK et pour induire l'expression du marqueur d'activation CD69 (Gerosa et al., 2005; Romagnani et al., 2005; Marshall et al., 2006; Hanabuchi et al., 2006). En plus de son activité immunomodulatoire, l'IFN- $\alpha$  a un effet antinéoplasique direct et plusieurs études cliniques ont montré sa remarquable efficacité, notamment dans les syndromes myéloprolifératifs en induisant une réponse dans 80% de ces patients (Kiladjian et al., 2008). Cependant, son utilisation reste limitée dans la pratique clinique, due à sa toxicité et à ses effets secondaires. Même si l'IFN- $\alpha$  présente un intérêt pour le traitement des maladies hématologiques malignes, il reste important d'envisager d'autres alternatives thérapeutiques.

Une alternative possible serait l'utilisation de pDC activées comme outil immunothérapeutique. L'approche utilisant les pDC repose non seulement sur leur capacité de production d'IFN- $\alpha$ , mais aussi sur leur rôle central de modulation des réponses immunitaires innées et adaptatives. En effet, la sécrétion de chimiokines qui servent au recrutement des cellules NK, l'augmentation de l'activité présentatrice d'Ag des mDC, la présentation croisées des Ag tumoraux, l'augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK et l'induction d'une réponse antitumorale spécifique médiée par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> font des pDC un outil très intéressant dans le développement d'une immunothérapie (Liu et al., 2008). De plus, l'activité cytotoxique des pDC récemment décrite dans la littérature permettrait en plus que les pDC deviennent des cellules effectrices des réponses anti-tumorales (Chaperot et al., 2006; Stary et al., 2007; Stary et al., 2009; Rissoan et al., 2002; Matsui et al., 2009; Riboldi et al., 2009). Comme nous l'avons rapporté dans notre travail, les pDC sont présentes très précocément après une greffe de sang de cordon (Figure 12.A) et pourraient donc être stimulées *in vivo* ou *ex vivo* par des ligands des TLR afin d'induire une réponse antitumorale alors que la maladie résiduelle est encore minimale suite au conditionnement. En plus d'activer les cellules NK présentes en grand nombre dans les semaines suivant la greffe (Figure 12.B), les pDC activées pourraient aussi initier la réponse immunitaire adaptative en présentant les Ags tumoraux aux lymphocytes T injectés avec le sang de cordon puisqu'il a été montré que ces cellules sont capables d'une activité cytotoxique (Merindol et al., 2010). L'activation des pDC pourrait se faire en utilisant les ODN CpG puisque ces molécules sont déjà en développement pour un certain nombre de maladies (tableau 5).

## 7 - Perspectives

Notre travail sur la caractérisation fonctionnelle des pDC du sang de cordon a permis de mettre en lumière une régulation post-transcriptionnelle de la voie de signalisation TLR9-IRF7 pouvant expliquer la plus faible production d'IFN- $\alpha$  par les pDC de sang de cordon. Et, la plus basse expression des protéines de la voie TLR9-

IRF7 s'accompagne de niveau plus élevé des microARNs miR-146a et miR-155. A l'avenir, il serait donc intéressant d'approfondir la relation qu'il existe entre les microARNs et la diminution d'expression des molécules de la voie TLR9-IRF7. De plus, ce travail pose des questions concernant la tolérance du système immunitaire du fœtus : la production des pDC du sang de cordon est-elle régulée négativement par des facteurs environnementaux de l'interface foeto-maternel ? Et par quels mécanismes ? Les pDC du sang de cordon ont-elles une capacité accrue à biaiser la réponse immunitaire adaptative vers une polarisation Th2 ou Treg ? Et ceci peut-il avoir des conséquences sur les résultats de greffe de sang de cordon durant le premier mois post-greffe ?

L'étude de la reconstitution des pDC après une greffe de sang de cordon a révélé pour la première fois la présence précoce en nombre et en fonction des pDC comparativement à une greffe de MO, permettant ainsi d'envisager d'activer ces cellules. Afin de tester l'hypothèse de leur pouvoir immunothérapeutique dans les greffes de CSH, il serait intéressant d'utiliser le modèle de souris humanisées. L'injection de pDC activées ou non *ex vivo* en plus de CD34<sup>+</sup> de sang de cordon dans des souris ayant été préalablement injectées avec des cellules leucémiques permettrait de démontrer l'effet immunothérapeutique des pDC. En parallèle, il serait important de vérifier que les pDC n'induisent pas de GvHD.

Finalement, les résultats obtenus durant mes études doctorales ont ouvert la voie à de nouvelles avenues de recherche très originales et un fort potentiel de développement puisqu'il est possible d'envisager de pouvoir contrôler ou moduler les complications des greffes de sang de cordon. Ainsi, un essai clinique utilisant l'IFN- $\alpha$  pour l'immunothérapie des leucémies aiguës après greffe de sang de cordon est en cours de rédaction au CHU Sainte-Justine et ouvrira au début de 2011. Son principe est de s'appuyer sur la robuste reconstitution des pDC et des NK après greffe de sang de cordon mise en évidence dans ce travail, et sur la réponse de ces cellules à l'IFN- $\alpha$ .



## **RÉFÉRENCES**

Abe,M. and Thomson,A.W. (2006). Dexamethasone preferentially suppresses plasmacytoid dendritic cell differentiation and enhances their apoptotic death. *Clin. Immunol.* *118*, 300-306.

Acosta-Rodriguez,E.V., Napolitani,G., Lanzavecchia,A., and Sallusto,F. (2007a). Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* *8*, 942-949.

Acosta-Rodriguez,E.V., Rivino,L., Geginat,J., Jarrossay,D., Gattorno,M., Lanzavecchia,A., Sallusto,F., and Napolitani,G. (2007b). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* *8*, 639-646.

Akira,S. and Takeda,K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 499-511.

Aksoy,E., Albarani,V., Nguyen,M., Laes,J.F., Ruelle,J.L., De,W.D., Willems,F., Goldman,M., and Goriely,S. (2007). Interferon regulatory factor 3-dependent responses to lipopolysaccharide are selectively blunted in cord blood cells. *Blood* *109*, 2887-2893.

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

Allman,D., Dalod,M., Asselin-Paturel,C., Delale,T., Robbins,S.H., Trinchieri,G., Biron,C.A., Kastner,P., and Chan,S. (2006). Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood* *108*, 4025-4034.

Alter,G., Malenfant,J.M., and Altfeld,M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods* *294*, 15-22.

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

Annunziato,F., Cosmi,L., Santarlasci,V., Maggi,L., Liotta,F., Mazzinghi,B., Parente,E., Fili,L., Ferri,S., Frosali,F., Giudici,F., Romagnani,P., Parronchi,P., Tonelli,F., Maggi,E., and Romagnani,S. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* *204*, 1849-1861.

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

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

Ashkar,A.A., Bauer,S., Mitchell,W.J., Vieira,J., and Rosenthal,K.L. (2003). Local delivery of CpG oligodeoxynucleotides induces rapid changes in the genital mucosa and inhibits replication, but not entry, of herpes simplex virus type 2. *J. Virol.* *77*, 8948-8956.

Asselin-Paturel,C., Boonstra,A., Dalod,M., Durand,I., Yessaad,N., Dezutter-Dambuyant,C., Vicari,A., O'Garra,A., Biron,C., Briere,F., and Trinchieri,G. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* *2*, 1144-1150.

Atsuta,Y., Suzuki,R., Nagamura-Inoue,T., Taniguchi,S., Takahashi,S., Kai,S., Sakamaki,H., Kouzai,Y., Kasai,M., Fukuda,T., Azuma,H., Takanashi,M., Okamoto,S., Tsuchida,M., Kawa,K., Morishima,Y., Kodaera,Y., and Kato,S. (2009). Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplantation compared with unrelated bone marrow transplantation in adult patients with acute leukemia. *Blood* *113*, 1631-1638.

Auffermann-Gretzinger,S., Eger,L., Bornhauser,M., Schakel,K., Oelschlaegel,U., Schaich,M., Illmer,T., Thiede,C., and Ehninger,G. (2006). Fast appearance of donor dendritic cells in human skin: dynamics of skin and blood dendritic cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* *81*, 866-873.

Auffermann-Gretzinger,S., Lossos,I.S., Vayntrub,T.A., Leong,W., Grumet,F.C., Blume,K.G., Stockerl-Goldstein,K.E., Levy,R., and Shizuru,J.A. (2002). Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* *99*, 1442-1448.

Bacchetta,R., Gregori,S., and Roncarolo,M.G. (2005). CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun. Rev.* *4*, 491-496.

Ballen,K.K., Spitzer,T.R., Yeap,B.Y., McAfee,S., Dey,B.R., Attar,E., Haspel,R., Kao,G., Liney,D., Alyea,E., Lee,S., Cutler,C., Ho,V., Soiffer,R., and Antin,J.H. (2007). Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *13*, 82-89.

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

Barchet,W., Cella,M., Odermatt,B., Asselin-Paturel,C., Colonna,M., and Kalinke,U. (2002). Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J. Exp. Med.* *195*, 507-516.

Barchet,W., Krug,A., Cella,M., Newby,C., Fischer,J.A., Dzionek,A., Pekosz,A., and Colonna,M. (2005). Dendritic cells respond to influenza virus through. *Eur. J. Immunol.* *35*, 236-242.

Barker,J.N., Davies,S.M., DeFor,T., Ramsay,N.K., Weisdorf,D.J., and Wagner,J.E. (2001). Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood* *97*, 2957-2961.

Barker,J.N., Hough,R.E., van Burik,J.A., DeFor,T.E., MacMillan,M.L., O'Brien,M.R., and Wagner,J.E. (2005a). Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *11*, 362-370.

Barker,J.N., Scaradavou,A., and Stevens,C.E. (2010). Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies. *Blood* *115*, 1843-1849.

Barker,J.N. and Wagner,J.E. (2003a). Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* *48*, 35-43.

Barker,J.N. and Wagner,J.E. (2003b). Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 526-532.

Barker,J.N., Weisdorf,D.J., DeFor,T.E., Blazar,B.R., McGlave,P.B., Miller,J.S., Verfaillie,C.M., and Wagner,J.E. (2005b). Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* *105*, 1343-1347.

Barrett,A.J. and Savani,B.N. (2006). Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens: a review of ten years experience with new transplant concepts and new therapeutic agents. *Leukemia* 20, 1661-1672.

Barton,G.M., Kagan,J.C., and Medzhitov,R. (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* 7, 49-56.

Bave,U., Magnusson,M., Eloranta,M.L., Perers,A., Alm,G.V., and Ronnblom,L. (2003). Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG. *J. Immunol.* 171, 3296-3302.

Beatty,P.G., Clift,R.A., Mickelson,E.M., Nisperos,B.B., Flournoy,N., Martin,P.J., Sanders,J.E., Stewart,P., Buckner,C.D., Storb,R., and . (1985). Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *N. Engl. J. Med.* 313, 765-771.

Bekeredjian-Ding,I., Schafer,M., Hartmann,E., Pries,R., Parcina,M., Schneider,P., Giese,T., Endres,S., Wollenberg,B., and Hartmann,G. (2009). Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology* 128, 439-450.

Berthou,C., Legros-Maida,S., Soulie,A., Wargnier,A., Guillet,J., Rabian,C., Gluckman,E., and Sasportes,M. (1995). Cord blood T lymphocytes lack constitutive perforin expression in contrast to adult peripheral blood T lymphocytes. *Blood* 85, 1540-1546.

Beutler,B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257-263.

Beziat,V., Nguyen,S., Lapusan,S., Hervier,B., Dhedin,N., Bories,D., Uzunov,M., Boudifa,A., Trebeden-Negre,H., Norol,F., Marjanovic,Z., Marie,J.P., Vernant,J.P., Debre,P., Rio,B., and Vieillard,V. (2009). Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia* 23, 721-728.

Bilsborough,J., George,T.C., Norment,A., and Viney,J.L. (2003). Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* 108, 481-492.

Biron,C.A., Nguyen,K.B., Pien,G.C., Cousens,L.P., and Salazar-Mather,T.P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 189-220.

Bjorck,P. (2001). Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* 98, 3520-3526.

Bjorck,P. (2004). Dendritic cells exposed to herpes simplex virus in vivo do not produce IFN-alpha after rechallenge with virus in vitro and exhibit decreased T cell alloreactivity. *J. Immunol.* 172, 5396-5404.

Blasius,A.L., Cella,M., Maldonado,J., Takai,T., and Colonna,M. (2006). Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood* 107, 2474-2476.

Blazar,B.R., Taylor,P.A., Bluestone,J.A., and Vallera,D.A. (1996). Murine gamma/delta-expressing T cells affect allograftment via the recognition of nonclassical major histocompatibility complex class Ib antigens. *Blood* 87, 4463-4472.

- Blom,B., Ho,S., Antonenko,S., and Liu,Y.J. (2000). Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* *192*, 1785-1796.
- Boasso,A., Herbeuval,J.P., Hardy,A.W., Anderson,S.A., Dolan,M.J., Fuchs,D., and Shearer,G.M. (2007). HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *109*, 3351-3359.
- Bogunovic,M., Ginhoux,F., Wagers,A., Loubeau,M., Isola,L.M., Lubrano,L., Najfeld,V., Phelps,R.G., Grosskreutz,C., Scigliano,E., Frenette,P.S., and Merad,M. (2006). Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. *J. Exp. Med.* *203*, 2627-2638.
- Bonaparte,M.I. and Barker,E. (2003). Inability of natural killer cells to destroy autologous HIV-infected T lymphocytes. *AIDS* *17*, 487-494.
- Boonstra,A., Asselin-Paturel,C., Gilliet,M., Crain,C., Trinchieri,G., Liu,Y.J., and O'Garra,A. (2003). Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J. Exp. Med.* *197*, 101-109.
- Boor,P.P., Metselaar,H.J., Mancham,S., Tilanus,H.W., Kusters,J.G., and Kwekkeboom,J. (2006). Prednisolone suppresses the function and promotes apoptosis of plasmacytoid dendritic cells. *Am. J. Transplant.* *6*, 2332-2341.
- Brahmi,Z., Hommel-Berrey,G., Smith,F., and Thomson,B. (2001). NK cells recover early and mediate cytotoxicity via perforin/granzyme and Fas/FasL pathways in umbilical cord blood recipients. *Hum. Immunol.* *62*, 782-790.
- Brinkmann,M.M., Spooner,E., Hoebe,K., Beutler,B., Ploegh,H.L., and Kim,Y.M. (2007). The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* *177*, 265-275.
- Broxmeyer,H.E., Douglas,G.W., Hangoc,G., Cooper,S., Bard,J., English,D., Arny,M., Thomas,L., and Boyse,E.A. (1989). Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *86*, 3828-3832.
- Brunstein,C.G., Barker,J.N., Weisdorf,D.J., DeFor,T.E., Miller,J.S., Blazar,B.R., McGlave,P.B., and Wagner,J.E. (2007). Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood* *110*, 3064-3070.
- Brunstein,C.G., Wagner,J.E., Weisdorf,D.J., Cooley,S., Noreen,H., Barker,J.N., DeFor,T., Verneris,M.R., Blazar,B.R., and Miller,J.S. (2009). Negative effect of KIR alloreactivity in recipients of umbilical cord blood transplantation depends on transplantation conditioning intensity. *Blood*.
- Cao,W. and Bover,L. (2010). Signaling and ligand interaction of ILT7: receptor-mediated regulatory mechanisms for plasmacytoid dendritic cells. *Immunol. Rev.* *234*, 163-176.
- Cao,W., Bover,L., Cho,M., Wen,X., Hanabuchi,S., Bao,M., Rosen,D.B., Wang,Y.H., Shaw,J.L., Du,Q., Li,C., Arai,N., Yao,Z., Lanier,L.L., and Liu,Y.J. (2009). Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J. Exp. Med.* *206*, 1603-1614.
- Cao,W. and Liu,Y.J. (2007). Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 24-30.

- Cao,W., Manicassamy,S., Tang,H., Kasturi,S.P., Pirani,A., Murthy,N., and Pulendran,B. (2008). Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nat. Immunol.* *9*, 1157-1164.
- Cao,W., Rosen,D.B., Ito,T., Bover,L., Bao,M., Watanabe,G., Yao,Z., Zhang,L., Lanier,L.L., and Liu,Y.J. (2006). Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J. Exp. Med.* *203*, 1399-1405.
- Cao,W., Zhang,L., Rosen,D.B., Bover,L., Watanabe,G., Bao,M., Lanier,L.L., and Liu,Y.J. (2007). BDCA2/Fc epsilon RI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Biol.* *5*, e248.
- Casrouge,A., Zhang,S.Y., Eidenschenk,C., Jouanguy,E., Puel,A., Yang,K., Alcais,A., Picard,C., Mahfoufi,N., Nicolas,N., Lorenzo,L., Plancoulaine,S., Senechal,B., Geissmann,F., Tabeta,K., Hoebe,K., Du,X., Miller,R.L., Heron,B., Mignot,C., de Villemeur,T.B., Lebon,P., Dulac,O., Rozenberg,F., Beutler,B., Tardieu,M., Abel,L., and Casanova,J.L. (2006). Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* *314*, 308-312.
- Cederarv,M., Soderberg-Naucler,C., and Odeberg,J. (2009). HCMV infection of PDCs deviates the NK cell response into cytokine-producing cells unable to perform cytotoxicity. *Immunobiology* *214*, 331-341.
- Cella,M., Facchetti,F., Lanzavecchia,A., and Colonna,M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat. Immunol.* *1*, 305-310.
- Cella,M., Jarrossay,D., Facchetti,F., Aleardi,O., Nakajima,H., Lanzavecchia,A., and Colonna,M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* *5*, 919-923.
- Chakrabarti,S. and Buyck,H.C. (2007). Reduced-intensity transplantation in the treatment of haematological malignancies: current status and future-prospects. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* *2*, 163-188.
- Chalmers,I.M., Janossy,G., Contreras,M., and Navarrete,C. (1998). Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes. *Blood* *92*, 11-18.
- Chan,G.W., Gorgun,G., Miller,K.B., and Foss,F.M. (2003). Persistence of host dendritic cells after transplantation is associated with graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *9*, 170-176.
- Chang,H.M., Paulson,M., Holko,M., Rice,C.M., Williams,B.R., Marie,I., and Levy,D.E. (2004). Induction of interferon-stimulated gene expression and antiviral responses require protein deacetylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 9578-9583.
- Chang,M., Suen,Y., Lee,S.M., Baly,D., Buzby,J.S., Knoppel,E., Wolpe,S., and Cairo,M.S. (1994). Transforming growth factor-beta 1, macrophage inflammatory protein-1 alpha, and interleukin-8 gene expression is lower in stimulated human neonatal compared with adult mononuclear cells. *Blood* *84*, 118-124.
- Chaperot,L., Blum,A., Manches,O., Lui,G., Angel,J., Molens,J.P., and Plumas,J. (2006). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* *176*, 248-255.
- Chehimi,J., Papasavvas,E., Tomescu,C., Gekonge,B., Abdulhaqq,S., Raymond,A., Hancock,A., Vinekar,K., Carty,C., Reynolds,G., Pistilli,M., Mounzer,K., Kostman,J., and Montaner,L.J. (2010).

Inability of plasmacytoid dendritic cells to directly lyse HIV-infected autologous CD4<sup>+</sup> T cells despite induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J. Virol.* *84*, 2762-2773.

Chen,W., Antonenko,S., Sederstrom,J.M., Liang,X., Chan,A.S., Kanzler,H., Blom,B., Blazar,B.R., and Liu,Y.J. (2004). Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* *103*, 2547-2553.

Chen,W., Liang,X., Peterson,A.J., Munn,D.H., and Blazar,B.R. (2008). The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J. Immunol.* *181*, 5396-5404.

Cheung,K.P., Yang,E., and Goldrath,A.W. (2009). Memory-like CD8<sup>+</sup> T cells generated during homeostatic proliferation defer to antigen-experienced memory cells. *J. Immunol.* *183*, 3364-3372.

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

Cisse,B., Caton,M.L., Lehner,M., Maeda,T., Scheu,S., Locksley,R., Holmberg,D., Zweier,C., den Hollander,N.S., Kant,S.G., Holter,W., Rauch,A., Zhuang,Y., and Reizis,B. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* *135*, 37-48.

Clark,F.J., Freeman,L., Dzionek,A., Schmitz,J., McMullan,D., Simpson,P., Mason,J., Mahendra,P., Craddock,C., Griffiths,M., Moss,P.A., and Chakraverty,R. (2003). Origin and subset distribution of peripheral blood dendritic cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* *75*, 221-225.

Coates,P.T., Barratt-Boyes,S.M., Zhang,L., Donnenberg,V.S., O'Connell,P.J., Logar,A.J., Duncan,F.J., Murphey-Corb,M., Donnenberg,A.D., Morelli,A.E., Maliszewski,C.R., and Thomson,A.W. (2003). Dendritic cell subsets in blood and lymphoid tissue of rhesus monkeys and their mobilization with Flt3 ligand. *Blood* *102*, 2513-2521.

Coch,C., Busch,N., Wimmenauer,V., Hartmann,E., Janke,M., Abdel-Mottaleb,M.M., Lamprecht,A., Ludwig,J., Barchet,W., Schlee,M., and Hartmann,G. (2009). Higher activation of TLR9 in plasmacytoid dendritic cells by microbial DNA compared with self-DNA based on CpG-specific recognition of phosphodiester DNA. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 663-670.

Cohen,G., Carter,S.L., Weinberg,K.I., Masinsin,B., Guinan,E., Kurtzberg,J., Wagner,J.E., Kernan,N.A., and Parkman,R. (2006). Antigen-specific T-lymphocyte function after cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *12*, 1335-1342.

Colina,R., Costa-Mattioli,M., Dowling,R.J., Jaramillo,M., Tai,L.H., Breitbach,C.J., Martineau,Y., Larsson,O., Rong,L., Svitkin,Y.V., Makriganis,A.P., Bell,J.C., and Sonenberg,N. (2008). Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature* *452*, 323-328.

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

Connolly,S.F. and Kusner,D.J. (2007). The regulation of dendritic cell function by calcium-signaling and its inhibition by microbial pathogens. *Immunol. Res.* *39*, 115-127.

Conry,S.J., Milkovich,K.A., Yonkers,N.L., Rodriguez,B., Bernstein,H.B., Asaad,R., Heinzel,F.P., Tary-Lehmann,M., Lederman,M.M., and Anthony,D.D. (2009). Impaired plasmacytoid dendritic cell

(PDC)-NK cell activity in viremic human immunodeficiency virus infection attributable to impairments in both PDC and NK cell function. *J. Virol.* 83, 11175-11187.

Contractor,N., Louten,J., Kim,L., Biron,C.A., and Kelsall,B.L. (2007). Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J. Immunol.* 179, 2690-2694.

Cook,M.A., Milligan,D.W., Fegan,C.D., Darbyshire,P.J., Mahendra,P., Craddock,C.F., Moss,P.A., and Briggs,D.C. (2004). The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood* 103, 1521-1526.

Cooley,S., McCullar,V., Wangen,R., Bergemann,T.L., Spellman,S., Weisdorf,D.J., and Miller,J.S. (2005). KIR reconstitution is altered by T cells in the graft and correlates with clinical outcomes after unrelated donor transplantation. *Blood* 106, 4370-4376.

Cooper,M.A., Fehniger,T.A., and Caligiuri,M.A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22, 633-640.

Corcoran,L., Ferrero,I., Vremec,D., Lucas,K., Waithman,J., O'Keeffe,M., Wu,L., Wilson,A., and Shortman,K. (2003). The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. *J. Immunol.* 170, 4926-4932.

Cottrez,F. and Groux,H. (2004). Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation* 77, S12-S15.

Cudkowicz,G. and Bennett,M. (1971a). Peculiar immunobiology of bone marrow allografts. I. Graft rejection by irradiated responder mice. *J. Exp. Med.* 134, 83-102.

Cudkowicz,G. and Bennett,M. (1971b). Peculiar immunobiology of bone marrow allografts. II. Rejection of parental grafts by resistant F 1 hybrid mice. *J. Exp. Med.* 134, 1513-1528.

Cupedo,T., Nagasawa,M., Weijer,K., Blom,B., and Spits,H. (2005). Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. *Eur. J. Immunol.* 35, 383-390.

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

D'Arena,G., Musto,P., Cascavilla,N., Di,G.G., Fusilli,S., Zendoli,F., and Carotenuto,M. (1998). Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. *Haematologica* 83, 197-203.

Dalgaard,J., Beckstrom,K.J., Jahnsen,F.L., and Brinchmann,J.E. (2005). Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets. *J. Leukoc. Biol.* 77, 689-698.

Dalle,J.H., Duval,M., Moghrabi,A., Wagner,E., Vachon,M.F., Barrette,S., Bernstein,M., Champagne,J., David,M., Demers,J., Rousseau,P., Winikoff,R., and Champagne,M.A. (2004). Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplant.* 33, 605-611.



Dalle,J.H., Menezes,J., Wagner,E., Blagdon,M., Champagne,J., Champagne,M.A., and Duval,M. (2005). Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr. Res.* 57, 649-655.

Dalloul,A., Oksenhendler,E., Chosidow,O., Ribaud,P., Carcelain,G., Louvet,S., Massip,P., Lebon,P., and Autran,B. (2004). Severe herpes virus (HSV-2) infection in two patients with myelodysplasia and undetectable NK cells and plasmacytoid dendritic cells in the blood. *J. Clin. Virol.* 30, 329-336.

Dalod,M., Hamilton,T., Salomon,R., Salazar-Mather,T.P., Henry,S.C., Hamilton,J.D., and Biron,C.A. (2003). Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J. Exp. Med.* 197, 885-898.

Danis,B., George,T.C., Goriely,S., Dutta,B., Renneson,J., Gatto,L., Fitzgerald-Bocarsly,P., Marchant,A., Goldman,M., Willems,F., and De,W.D. (2008). Interferon regulatory factor 7-mediated responses are defective in cord blood plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 38, 507-517.

Darnell,J.E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635.

David,M., Petricoin,E., III, Benjamin,C., Pine,R., Weber,M.J., and Larner,A.C. (1995). Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science* 269, 1721-1723.

Dazzi,F. and Foza,C. (2007). Disease relapse after haematopoietic stem cell transplantation: risk factors and treatment. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 20, 311-327.

de Heer,H.J., Hammad,H., Soullie,T., Hijdra,D., Vos,N., Willart,M.A., Hoogsteden,H.C., and Lambrecht,B.N. (2004). Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J. Exp. Med.* 200, 89-98.

De,W.D., Orlslagers,V., Goriely,S., Vermeulen,F., Wagner,H., Goldman,M., and Willems,F. (2004). Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns. *Blood* 103, 1030-1032.

De,W.D., Tonon,S., Orlslagers,V., Goriely,S., Boutriaux,M., Goldman,M., and Willems,F. (2003). Impaired responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 3 ligands in human cord blood. *J. Autoimmun.* 21, 277-281.

Delale,T., Paquin,A., Asselin-Paturel,C., Dalod,M., Brizard,G., Bates,E.E., Kastner,P., Chan,S., Akira,S., Vicari,A., Biron,C.A., Trinchieri,G., and Briere,F. (2005). MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN-alpha release and initiation of immune responses in vivo. *J. Immunol.* 175, 6723-6732.

Delaney,C., Heimfeld,S., Brashem-Stein,C., Voorhies,H., Manger,R.L., and Bernstein,I.D. (2010). Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat. Med.* 16, 232-236.

Della,B.S., Gennaro,M., Vaccari,M., Ferraris,C., Nicola,S., Riva,A., Clerici,M., Greco,M., and Villa,M.L. (2003). Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer* 89, 1463-1472.

Demedts,I.K., Brusselle,G.G., Vermaelen,K.Y., and Pauwels,R.A. (2005). Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32, 177-184.

- Deng,L., Wang,C., Spencer,E., Yang,L., Braun,A., You,J., Slaughter,C., Pickart,C., and Chen,Z.J. (2000). Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* *103*, 351-361.
- Diebold,S.S., Kaisho,T., Hemmi,H., Akira,S., and Reis e Sousa (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* *303*, 1529-1531.
- Drobyski,W.R. and Majewski,D. (1997). Donor gamma delta T lymphocytes promote allogeneic engraftment across the major histocompatibility barrier in mice. *Blood* *89*, 1100-1109.
- Dubois,B., Joubert,G., Gomez de,A.M., Gouanvic,M., Goubier,A., and Kaiserlian,D. (2009). Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in oral tolerance. *Gastroenterology* *137*, 1019-1028.
- Duhen,T., Geiger,R., Jarrossay,D., Lanzavecchia,A., and Sallusto,F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* *10*, 857-863.
- Dumitriu,I.E., Dunbar,D.R., Howie,S.E., Sethi,T., and Gregory,C.D. (2009). Human dendritic cells produce TGF-beta 1 under the influence of lung carcinoma cells and prime the differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* *182*, 2795-2807.
- Duramad,O., Fearon,K.L., Chan,J.H., Kanzler,H., Marshall,J.D., Coffman,R.L., and Barrat,F.J. (2003). IL-10 regulates plasmacytoid dendritic cell response to CpG-containing immunostimulatory sequences. *Blood* *102*, 4487-4492.
- Dzionek,A., Fuchs,A., Schmidt,P., Cremer,S., Zysk,M., Miltenyi,S., Buck,D.W., and Schmitz,J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* *165*, 6037-6046.
- Dzionek,A., Inagaki,Y., Okawa,K., Nagafune,J., Rock,J., Sohma,Y., Winkels,G., Zysk,M., Yamaguchi,Y., and Schmitz,J. (2002). Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum. Immunol.* *63*, 1133-1148.
- Dzionek,A., Sohma,Y., Nagafune,J., Cella,M., Colonna,M., Facchetti,F., Gunther,G., Johnston,I., Lanzavecchia,A., Nagasaka,T., Okada,T., Vermi,W., Winkels,G., Yamamoto,T., Zysk,M., Yamaguchi,Y., and Schmitz,J. (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J. Exp. Med.* *194*, 1823-1834.
- Eapen,M., Rubinstein,P., Zhang,M.J., Stevens,C., Kurtzberg,J., Scaradavou,A., Loberiza,F.R., Champlin,R.E., Klein,J.P., Horowitz,M.M., and Wagner,J.E. (2007). Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* *369*, 1947-1954.
- Fabricius,D., Neubauer,M., Mandel,B., Schutz,C., Viardot,A., Vollmer,A., Jahrsdorfer,B., and Debatin,K.M. (2010). Prostaglandin E2 inhibits IFN-alpha secretion and Th1 costimulation by human plasmacytoid dendritic cells via E-prostanoid 2 and E-prostanoid 4 receptor engagement. *J. Immunol.* *184*, 677-684.
- Fagnoni,F.F., Oliviero,B., Giorgiani,G., De,S.P., Deho,A., Zibera,C., Gibelli,N., Maccario,R., Da,P.G., Zecca,M., and Locatelli,F. (2004). Reconstitution dynamics of plasmacytoid and myeloid dendritic cell precursors after allogeneic myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *104*, 281-289.

Fallarino,F., Asselin-Paturel,C., Vacca,C., Bianchi,R., Gizzi,S., Fioretti,M.C., Trinchieri,G., Grohmann,U., and Puccetti,P. (2004). Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J. Immunol.* *173*, 3748-3754.

Fang,L., Fehse,B., Engel,M., Zander,A., and Kroger,N. (2005). Antithymocyte globulin induces ex vivo and in vivo depletion of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Transplantation* *79*, 369-371.

Farag,S.S., Bacigalupo,A., Eapen,M., Hurley,C., Dupont,B., Caligiuri,M.A., Boudreau,C., Nelson,G., Oudshoorn,M., van,R.J., Velardi,A., Maiers,M., Setterholm,M., Confer,D., Posch,P.E., Anasetti,C., Kamani,N., Miller,J.S., Weisdorf,D., and Davies,S.M. (2006). The effect of KIR ligand incompatibility on the outcome of unrelated donor transplantation: a report from the center for international blood and marrow transplant research, the European blood and marrow transplant registry, and the Dutch registry. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *12*, 876-884.

Fearnley,D.B., Whyte,L.F., Carnoutsos,S.A., Cook,A.H., and Hart,D.N. (1999). Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* *93*, 728-736.

Fernandez,M.N., Regidor,C., Cabrera,R., Garcia-Marco,J.A., Fores,R., Sanjuan,I., Gayoso,J., Gil,S., Ruiz,E., Little,A.M., McWhinnie,A., and Madrigal,A. (2003). Unrelated umbilical cord blood transplants in adults: Early recovery of neutrophils by supportive co-transplantation of a low number of highly purified peripheral blood CD34+ cells from an HLA-haploidentical donor. *Exp. Hematol.* *31*, 535-544.

Ferrantini,M. and Belardelli,F. (2000). Gene therapy of cancer with interferon: lessons from tumor models and perspectives for clinical applications. *Semin. Cancer Biol.* *10*, 145-157.

Ferrara,J.L. (2002). Cellular and cytokine effectors of acute graft versus host disease. *Int. J. Hematol.* *76 Suppl 1*, 195-198.

Fitzgerald-Bocarsly,P., Dai,J., and Singh,S. (2008). Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev.* *19*, 3-19.

Flake,A.W. and Zanjani,E.D. (1997). In utero hematopoietic stem cell transplantation. A status report. *JAMA* *278*, 932-937.

Fonteneau,J.F., Gilliet,M., Larsson,M., Dasilva,I., Munz,C., Liu,Y.J., and Bhardwaj,N. (2003). Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* *101*, 3520-3526.

Fuchs,A., Cella,M., Kondo,T., and Colonna,M. (2005). Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood* *106*, 2076-2082.

Fugier-Vivier,I.J., Rezzoug,F., Huang,Y., Graul-Layman,A.J., Schanie,C.L., Xu,H., Chilton,P.M., and Ildstad,S.T. (2005). Plasmacytoid precursor dendritic cells facilitate allogeneic hematopoietic stem cell engraftment. *J. Exp. Med.* *201*, 373-383.

Fujii,H., Trudeau,J.D., Teachey,D.T., Fish,J.D., Grupp,S.A., Schultz,K.R., and Reid,G.S. (2007). In vivo control of acute lymphoblastic leukemia by immunostimulatory CpG oligonucleotides. *Blood* *109*, 2008-2013.

Fukui,R., Saitoh,S., Matsumoto,F., Kozuka-Hata,H., Oyama,M., Tabeta,K., Beutler,B., and Miyake,K. (2009). Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *J. Exp. Med.* *206*, 1339-1350.

Gerosa,F., Baldani-Guerra,B., Nisii,C., Marchesini,V., Carra,G., and Trinchieri,G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* *195*, 327-333.

Gerosa,F., Gobbi,A., Zorzi,P., Burg,S., Briere,F., Carra,G., and Trinchieri,G. (2005). The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J. Immunol.* *174*, 727-734.

Ghiringhelli,F., Puig,P.E., Roux,S., Parcellier,A., Schmitt,E., Solary,E., Kroemer,G., Martin,F., Chauffert,B., and Zitvogel,L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.* *202*, 919-929.

Giebel,S., Dziaczkowska,J., Wojnar,J., Krawczyk-Kulis,M., Markiewicz,M., Kruzel,T., Wylezol,I., Nowak,K., Jagoda,K., and Holowiecki,J. (2005). The impact of immunosuppressive therapy on an early quantitative NK cell reconstitution after allogeneic haematopoietic cell transplantation. *Ann. Transplant.* *10*, 29-33.

Giebel,S., Locatelli,F., Lamparelli,T., Velardi,A., Davies,S., Frumento,G., Maccario,R., Bonetti,F., Wojnar,J., Martinetti,M., Frassoni,F., Giorgiani,G., Bacigalupo,A., and Holowiecki,J. (2003). Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* *102*, 814-819.

Gill,N., Deacon,P.M., Lichty,B., Mossman,K.L., and Ashkar,A.A. (2006). Induction of innate immunity against herpes simplex virus type 2 infection via local delivery of Toll-like receptor ligands correlates with beta interferon production. *J. Virol.* *80*, 9943-9950.

Gilliet,M., Cao,W., and Liu,Y.J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 594-606.

Gilliet,M. and Liu,Y.J. (2002). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *195*, 695-704.

Giraud,S., Dhedin,N., Gary-Gouy,H., Lebon,P., Vernant,J.P., and Dalloul,A. (2005). Plasmacytoid dendritic cell reconstitution following bone marrow transplantation: subnormal recovery and functional deficit of IFN-alpha/beta production in response to herpes simplex virus. *J. Interferon Cytokine Res.* *25*, 135-143.

Gluckman,E., Broxmeyer,H.A., Auerbach,A.D., Friedman,H.S., Douglas,G.W., Devergie,A., Esperou,H., Thierry,D., Socie,G., Lehn,P., and . (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.* *321*, 1174-1178.

Gluckman,E., Rocha,V., Arcese,W., Michel,G., Sanz,G., Chan,K.W., Takahashi,T.A., Ortega,J., Filipovich,A., Locatelli,F., Asano,S., Fagioli,F., Vowels,M., Sirvent,A., Laporte,J.P., Tiedemann,K., Amadori,S., Abecassis,M., Bordigoni,P., Diez,B., Shaw,P.J., Vora,A., Caniglia,M., Garnier,F., Ionescu,I., Garcia,J., Koegler,G., Rebull,P., and Chevret,S. (2004). Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp. Hematol.* *32*, 397-407.

Gluckman,E., Rocha,V., Boyer-Chammard,A., Locatelli,F., Arcese,W., Pasquini,R., Ortega,J., Souillet,G., Ferreira,E., Laporte,J.P., Fernandez,M., and Chastang,C. (1997). Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N. Engl. J. Med.* *337*, 373-381.

Godfrey,W.R., Spoden,D.J., Ge,Y.G., Baker,S.R., Liu,B., Levine,B.L., June,C.H., Blazar,B.R., and Porter,S.B. (2005). Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* *105*, 750-758.

Goriely,S., Van,L.C., Dadkhah,R., Libin,M., De,W.D., Demonte,D., Willems,F., and Goldman,M. (2004). A defect in nucleosome remodeling prevents IL-12(p35) gene transcription in neonatal dendritic cells. *J. Exp. Med.* *199*, 1011-1016.

Goriely,S., Vincart,B., Stordeur,P., Vekemans,J., Willems,F., Goldman,M., and De,W.D. (2001). Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. *J. Immunol.* *166*, 2141-2146.

Goubier,A., Dubois,B., Gheit,H., Joubert,G., Villard-Truc,F., Asselin-Paturel,C., Trinchieri,G., and Kaiserlian,D. (2008). Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity.* *29*, 464-475.

Grage-Griebenow,E., Loseke,S., Kauth,M., Gehlhar,K., Zawatzky,R., and Bufe,A. (2007). Anti-BDCA-4 (neuropilin-1) antibody can suppress virus-induced IFN-alpha production of plasmacytoid dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* *85*, 383-390.

Green,D.S., Lum,T., and Green,J.A. (2004). IgG-derived Fc down-regulates virus-induced plasmacytoid dendritic cell (pDC) IFNalpha production. *Cytokine* *26*, 209-216.

Grouard,G., Risoan,M.C., Filgueira,L., Durand,I., Banchereau,J., and Liu,Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* *185*, 1101-1111.

Guiducci,C., Ghirelli,C., Marloie-Provost,M.A., Matray,T., Coffman,R.L., Liu,Y.J., Barrat,F.J., and Soumelis,V. (2008). PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid predendritic cells in response to TLR activation. *J. Exp. Med.* *205*, 315-322.

Guiducci,C., Ott,G., Chan,J.H., Damon,E., Calacsan,C., Matray,T., Lee,K.D., Coffman,R.L., and Barrat,F.J. (2006). Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J. Exp. Med.* *203*, 1999-2008.

Gutterman,J.U. (1994). Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 1198-1205.

Hacker,H., Redecke,V., Blagoev,B., Kratchmarova,I., Hsu,L.C., Wang,G.G., Kamps,M.P., Raz,E., Wagner,H., Hacker,G., Mann,M., and Karin,M. (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* *439*, 204-207.

Hadeiba,H., Sato,T., Habtezion,A., Oderup,C., Pan,J., and Butcher,E.C. (2008). CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.*

Hamilton,S.E. and Jameson,S.C. (2008). The nature of the lymphopenic environment dictates protective function of homeostatic-memory CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 18484-18489.

Hamza,N.S., Lisgaris,M., Yadavalli,G., Nadeau,L., Fox,R., Fu,P., Lazarus,H.M., Koc,O.N., Salata,R.A., and Laughlin,M.J. (2004). Kinetics of myeloid and lymphocyte recovery and infectious complications after unrelated umbilical cord blood versus HLA-matched unrelated donor allogeneic transplantation in adults. *Br. J. Haematol.* *124*, 488-498.

Hanabuchi,S., Watanabe,N., Wang,Y.H., Wang,Y.H., Ito,T., Shaw,J., Cao,W., Qin,F.X., and Liu,Y.J. (2006). Human plasmacytoid predendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). *Blood* *107*, 3617-3623.

Haraguchi,K., Takahashi,T., Matsumoto,A., Asai,T., Kanda,Y., Kurokawa,M., Ogawa,S., Oda,H., Taniguchi,M., Hirai,H., and Chiba,S. (2005). Host-residual invariant NK T cells attenuate graft-versus-host immunity. *J. Immunol.* *175*, 1320-1328.

Hardy,A.W., Graham,D.R., Shearer,G.M., and Herbeuval,J.P. (2007). HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 17453-17458.

Harris,D.T., Schumacher,M.J., LoCascio,J., Besencon,F.J., Olson,G.B., DeLuca,D., Shenker,L., Bard,J., and Boyse,E.A. (1992). Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 10006-10010.

Harris,D.T., Schumacher,M.J., LoCascio,J., Booth,A., Bard,J., and Boyse,E.A. (1994). Immunoreactivity of umbilical cord blood and post-partum maternal peripheral blood with regard to HLA-haploidentical transplantation. *Bone Marrow Transplant.* *14*, 63-68.

Hartmann,E., Wollenberg,B., Rothenfusser,S., Wagner,M., Wellisch,D., Mack,B., Giese,T., Gires,O., Endres,S., and Hartmann,G. (2003a). Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res.* *63*, 6478-6487.

Hartmann,G., Battiany,J., Poeck,H., Wagner,M., Kerkmann,M., Lubenow,N., Rothenfusser,S., and Endres,S. (2003b). Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *33*, 1633-1641.

Haspel,R.L. and Miller,K.B. (2008). Hematopoietic stem cells: source matters. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* *3*, 229-236.

Heil,F., Ahmad-Nejad,P., Hemmi,H., Hochrein,H., Ampenberger,F., Gellert,T., Dietrich,H., Lipford,G., Takeda,K., Akira,S., Wagner,H., and Bauer,S. (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol.* *33*, 2987-2997.

Hemmi,H., Kaisho,T., Takeuchi,O., Sato,S., Sanjo,H., Hoshino,K., Horiuchi,T., Tomizawa,H., Takeda,K., and Akira,S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* *3*, 196-200.

Hemmi,H., Takeuchi,O., Kawai,T., Kaisho,T., Sato,S., Sanjo,H., Matsumoto,M., Hoshino,K., Wagner,H., Takeda,K., and Akira,S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.

Hermann,E., Truyens,C., Alonso-Vega,C., Even,J., Rodriguez,P., Berthe,A., Gonzalez-Merino,E., Torrico,F., and Carlier,Y. (2002). Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood* *100*, 2153-2158.

Hishizawa,M., Imada,K., Kitawaki,T., Ueda,M., Kadowaki,N., and Uchiyama,T. (2004). Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals. *Br. J. Haematol.* *125*, 568-575.

Hochrein,H., Schlatter,B., O'Keeffe,M., Wagner,C., Schmitz,F., Schiemann,M., Bauer,S., Suter,M., and Wagner,H. (2004). Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 11416-11421.

Hoeffel,G., Ripoché,A.C., Matheoud,D., Nascimbeni,M., Escriou,N., Lebon,P., Heshmati,F., Guillet,J.G., Gannage,M., Caillat-Zucman,S., Casartelli,N., Schwartz,O., De la Salle,H., Hanau,D.,

Hosmalin,A., and Maranon,C. (2007). Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. *27*, 481-492.

Hofmann,M.A., Kors,C., Audring,H., Walden,P., Sterry,W., and Trefzer,U. (2008). Phase 1 evaluation of intralesionally injected TLR9-agonist PF-3512676 in patients with basal cell carcinoma or metastatic melanoma. *J. Immunother*. *31*, 520-527.

Hokeness-Antonelli,K.L., Crane,M.J., Dragoi,A.M., Chu,W.M., and Salazar-Mather,T.P. (2007). IFN- $\alpha$ -mediated inflammatory responses and antiviral defense in liver is TLR9-independent but MyD88-dependent during murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol*. *179*, 6176-6183.

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

Honda,K., Sakaguchi,S., Nakajima,C., Watanabe,A., Yanai,H., Matsumoto,M., Ohteki,T., Kaisho,T., Takaoka,A., Akira,S., Seya,T., and Taniguchi,T. (2003). Selective contribution of IFN- $\alpha$ /beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 10872-10877.

Horvath,R., Budinsky,V., Kayserova,J., Kalina,T., Formankova,R., Stary,J., Bartunkova,J., Sedlacek,P., and Spisek,R. (2009). Kinetics of dendritic cells reconstitution and costimulatory molecules expression after myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: implications for the development of acute graft-versus host disease. *Clin. Immunol*. *131*, 60-69.

Hoshino,K., Sugiyama,T., Matsumoto,M., Tanaka,T., Saito,M., Hemmi,H., Ohara,O., Akira,S., and Kaisho,T. (2006). IkappaB kinase- $\alpha$  is critical for interferon- $\alpha$  production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature* *440*, 949-953.

Hsu,K.C., Keever-Taylor,C.A., Wilton,A., Pinto,C., Heller,G., Arkun,K., O'Reilly,R.J., Horowitz,M.M., and Dupont,B. (2005). Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood* *105*, 4878-4884.

Huang,M., Qian,F., Hu,Y., Ang,C., Li,Z., and Wen,Z. (2002). Chromatin-remodelling factor BRG1 selectively activates a subset of interferon- $\alpha$ -inducible genes. *Nat. Cell Biol*. *4*, 774-781.

Hughes,G.C., Thomas,S., Li,C., Kaja,M.K., and Clark,E.A. (2008). Cutting edge: progesterone regulates IFN- $\alpha$  production by plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol*. *180*, 2029-2033.

Hung,C.H., Chu,Y.T., Suen,J.L., Lee,M.S., Chang,H.W., Lo,Y.C., and Jong,Y.J. (2009). Regulation of cytokine expression in human plasmacytoid dendritic cells by prostaglandin I<sub>2</sub> analogues. *Eur. Respir. J*. *33*, 405-410.

Ishaqi,M.K., Afzal,S., Dupuis,A., Doyle,J., and Gassas,A. (2008). Early lymphocyte recovery post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with significant graft-versus-leukemia effect without increase in graft-versus-host disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*. *41*, 245-252.

Ishikawa,F., Niino,H., Iino,T., Yoshida,S., Saito,N., Onohara,S., Miyamoto,T., Minagawa,H., Fujii,S., Shultz,L.D., Harada,M., and Akashi,K. (2007). The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood* *110*, 3591-3660.

Ishikawa,F., Saito,Y., Yoshida,S., Harada,M., and Shultz,L.D. (2008). The differentiative and regenerative properties of human hematopoietic stem/progenitor cells in NOD-SCID/IL2rgamma(null) mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *324*, 87-94.

Ito,T., Amakawa,R., Inaba,M., Hori,T., Ota,M., Nakamura,K., Takebayashi,M., Miyaji,M., Yoshimura,T., Inaba,K., and Fukuhara,S. (2004). Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J. Immunol.* *172*, 4253-4259.

Ito,T., Amakawa,R., Kaisho,T., Hemmi,H., Tajima,K., Uehira,K., Ozaki,Y., Tomizawa,H., Akira,S., and Fukuhara,S. (2002). Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J. Exp. Med.* *195*, 1507-1512.

Ito,T., Kanzler,H., Duramad,O., Cao,W., and Liu,Y.J. (2006). Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *107*, 2423-2431.

Ito,T., Yang,M., Wang,Y.H., Lande,R., Gregorio,J., Perng,O.A., Qin,X.F., Liu,Y.J., and Gilliet,M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.* *204*, 105-115.

Jaroscak,J., Goltry,K., Smith,A., Waters-Pick,B., Martin,P.L., Driscoll,T.A., Howrey,R., Chao,N., Douville,J., Burhop,S., Fu,P., and Kurtzberg,J. (2003). Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System. *Blood* *101*, 5061-5067.

Jarrossay,D., Napolitani,G., Colonna,M., Sallusto,F., and Lanzavecchia,A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3388-3393.

Jefferies,C.A., Doyle,S., Brunner,C., Dunne,A., Brint,E., Wietek,C., Walch,E., Wirth,T., and O'Neill,L.A. (2003). Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* *278*, 26258-26264.

Ju,X., Zenke,M., Hart,D.N., and Clark,G.J. (2008). CD300a/c regulate type I interferon and TNF-alpha secretion by human plasmacytoid dendritic cells stimulated with TLR7 and TLR9 ligands. *Blood* *112*, 1184-1194.

Jurk,M., Heil,F., Vollmer,J., Schetter,C., Krieg,A.M., Wagner,H., Lipford,G., and Bauer,S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol.* *3*, 499.

Kadowaki,N., Antonenko,S., Lau,J.Y., and Liu,Y.J. (2000). Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.* *192*, 219-226.

Kadowaki,N., Ho,S., Antonenko,S., Malefyt,R.W., Kastelein,R.A., Bazan,F., and Liu,Y.J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* *194*, 863-869.

Kagi,D., Ledermann,B., Burki,K., Seiler,P., Odermatt,B., Olsen,K.J., Podack,E.R., Zinkernagel,R.M., and Hengartner,H. (1994a). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* *369*, 31-37.

Kagi,D., Vignaux,F., Ledermann,B., Burki,K., Depraetere,V., Nagata,S., Hengartner,H., and Golstein,P. (1994b). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* *265*, 528-530.



- Kariko,K., Buckstein,M., Ni,H., and Weissman,D. (2005). Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*. *23*, 165-175.
- Karsunky,H., Merad,M., Cozzio,A., Weissman,I.L., and Manz,M.G. (2003). Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* *198*, 305-313.
- Karsunky,H., Merad,M., Mende,I., Manz,M.G., Engleman,E.G., and Weissman,I.L. (2005). Developmental origin of interferon-alpha-producing dendritic cells from hematopoietic precursors. *Exp. Hematol.* *33*, 173-181.
- Katsoulidis,E., Li,Y., Mears,H., and Platanias,L.C. (2005). The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in interferon signal transduction. *J. Interferon Cytokine Res.* *25*, 749-756.
- Kaur,S., Uddin,S., and Platanias,L.C. (2005). The PI3' kinase pathway in interferon signaling. *J. Interferon Cytokine Res.* *25*, 780-787.
- Kawai,T., Sato,S., Ishii,K.J., Coban,C., Hemmi,H., Yamamoto,M., Terai,K., Matsuda,M., Inoue,J., Uematsu,S., Takeuchi,O., and Akira,S. (2004). Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat. Immunol.* *5*, 1061-1068.
- Kayagaki,N., Yamaguchi,N., Nakayama,M., Kawasaki,A., Akiba,H., Okumura,K., and Yagita,H. (1999). Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* *162*, 2639-2647.
- Kiladjian,J.J., Chomienne,C., and Fenau,P. (2008). Interferon-alpha therapy in bcr-abl-negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* *22*, 1990-1998.
- Kim,D.H., Kim,J.G., Sohn,S.K., Sung,W.J., Suh,J.S., Lee,K.S., and Lee,K.B. (2004). Clinical impact of early absolute lymphocyte count after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* *125*, 217-224.
- Kim,Y.M., Brinkmann,M.M., Paquet,M.E., and Ploegh,H.L. (2008). UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* *452*, 234-238.
- Kitawaki,T., Kadowaki,N., Ishikawa,T., Ichinohe,T., and Uchiyama,T. (2003). Compromised recovery of natural interferon-alpha/beta-producing cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation complicated by acute graft-versus-host disease and glucocorticoid administration. *Bone Marrow Transplant.* *32*, 187-194.
- Klein,A.K., Patel,D.D., Gooding,M.E., Sempowski,G.D., Chen,B.J., Liu,C., Kurtzberg,J., Haynes,B.F., and Chao,N.J. (2001). T-Cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *7*, 454-466.
- Knodler,A., Schmidt,S.M., Bringmann,A., Weck,M.M., Brauer,K.M., Holderried,T.A., Heine,A.K., Grunebach,F., and Brossart,P. (2009). Post-transcriptional regulation of adapter molecules by IL-10 inhibits TLR-mediated activation of antigen-presenting cells. *Leukemia* *23*, 535-544.
- Knudtzon,S. (1974). In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* *43*, 357-361.
- Kolb,H.J., Mittermuller,J., Clemm,C., Holler,E., Ledderose,G., Brehm,G., Heim,M., and Wilmanns,W. (1990). Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* *76*, 2462-2465.

Korn,T., Bettelli,E., Oukka,M., and Kuchroo,V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 485-517.

Koyama,M., Hashimoto,D., Aoyama,K., Matsuoka,K., Karube,K., Niuro,H., Harada,M., Tanimoto,M., Akashi,K., and Teshima,T. (2009). Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. *Blood* *113*, 2088-2095.

Krieg,A.M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 709-760.

Krosl,J., Austin,P., Beslu,N., Kroon,E., Humphries,R.K., and Sauvageau,G. (2003). In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat. Med.* *9*, 1428-1432.

Krug,A., French,A.R., Barchet,W., Fischer,J.A., Dzionek,A., Pingel,J.T., Orihuela,M.M., Akira,S., Yokoyama,W.M., and Colonna,M. (2004a). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity.* *21*, 107-119.

Krug,A., Luker,G.D., Barchet,W., Leib,D.A., Akira,S., and Colonna,M. (2004b). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* *103*, 1433-1437.

Krug,A., Towarowski,A., Britsch,S., Rothenfusser,S., Hornung,V., Bals,R., Giese,T., Engelmann,H., Endres,S., Krieg,A.M., and Hartmann,G. (2001). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3026-3037.

Krug,A., Veeraswamy,R., Pekosz,A., Kanagawa,O., Unanue,E.R., Colonna,M., and Cella,M. (2003). Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *J. Exp. Med.* *197*, 899-906.

Kumar,S., Chen,M.G., Gastineau,D.A., Gertz,M.A., Inwards,D.J., Lacy,M.Q., Tefferi,A., and Litzow,M.R. (2003). Lymphocyte recovery after allogeneic bone marrow transplantation predicts risk of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* *17*, 1865-1870.

Kurtzberg,J., Laughlin,M., Graham,M.L., Smith,C., Olson,J.F., Halperin,E.C., Ciocchi,G., Carrier,C., Stevens,C.E., and Rubinstein,P. (1996). Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N. Engl. J. Med.* *335*, 157-166.

Kuwana,M. (2002). Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum. Immunol.* *63*, 1156-1163.

Kvale,E.O., Dalgaard,J., Lund-Johansen,F., Rollag,H., Farkas,L., Midtvedt,K., Jahnsen,F.L., Brinchmann,J.E., and Olweus,J. (2006). CD11c<sup>+</sup> dendritic cells and plasmacytoid DCs are activated by human cytomegalovirus and retain efficient T cell-stimulatory capability upon infection. *Blood* *107*, 2022-2029.

Laane,E., Bjorklund,E., Mazur,J., Lonnerholm,G., Soderhall,S., and Porwit,A. (2007). Dendritic cell regeneration in the bone marrow of children treated for acute lymphoblastic leukaemia. *Scand. J. Immunol.* *66*, 572-583.

Langrish,C.L., Chen,Y., Blumenschein,W.M., Mattson,J., Basham,B., Sedgwick,J.D., McClanahan,T., Kastelein,R.A., and Cua,D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* *201*, 233-240.

Laouar,Y., Welte,T., Fu,X.Y., and Flavell,R.A. (2003). STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity*. *19*, 903-912.

Latz,E., Schoenemeyer,A., Visintin,A., Fitzgerald,K.A., Monks,B.G., Knetter,C.F., Lien,E., Nilsen,N.J., Espevik,T., and Golenbock,D.T. (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* *5*, 190-198.

Latz,E., Verma,A., Visintin,A., Gong,M., Sirois,C.M., Klein,D.C., Monks,B.G., McKnight,C.J., Lamphier,M.S., Duprex,W.P., Espevik,T., and Golenbock,D.T. (2007). Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* *8*, 772-779.

Laughlin,M.J., Barker,J., Bambach,B., Koc,O.N., Rizzieri,D.A., Wagner,J.E., Gerson,S.L., Lazarus,H.M., Cairo,M., Stevens,C.E., Rubinstein,P., and Kurtzberg,J. (2001). Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N. Engl. J. Med.* *344*, 1815-1822.

Laughlin,M.J., Eapen,M., Rubinstein,P., Wagner,J.E., Zhang,M.J., Champlin,R.E., Stevens,C., Barker,J.N., Gale,R.P., Lazarus,H.M., Marks,D.I., van Rood,J.J., Scaradavou,A., and Horowitz,M.M. (2004). Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N. Engl. J. Med.* *351*, 2265-2275.

Le,B.K., Barrett,A.J., Schaffer,M., Hagglund,H., Ljungman,P., Ringden,O., and Remberger,M. (2009). Lymphocyte recovery is a major determinant of outcome after matched unrelated myeloablative transplantation for myelogenous malignancies. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *15*, 1108-1115.

Lee,J.R., Dalton,R.R., Messina,J.L., Sharma,M.D., Smith,D.M., Burgess,R.E., Mazzella,F., Antonia,S.J., Mellor,A.L., and Munn,D.H. (2003). Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma. *Lab Invest* *83*, 1457-1466.

Lee,S.M., Suen,Y., Chang,L., Bruner,V., Qian,J., Indes,J., Knoppel,E., van,d., V, and Cairo,M.S. (1996). Decreased interleukin-12 (IL-12) from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and upregulation of interferon-gamma, natural killer, and lymphokine-activated killer activity by IL-12 in cord blood mononuclear cells. *Blood* *88*, 945-954.

Lekmine,F., Uddin,S., Sassano,A., Parmar,S., Brachmann,S.M., Majchrzak,B., Sonenberg,N., Hay,N., Fish,E.N., and Platanius,L.C. (2003). Activation of the p70 S6 kinase and phosphorylation of the 4E-BP1 repressor of mRNA translation by type I interferons. *J. Biol. Chem.* *278*, 27772-27780.

Liu,C., Lou,Y., Lizee,G., Qin,H., Liu,S., Rabinovich,B., Kim,G.J., Wang,Y.H., Ye,Y., Sikora,A.G., Overwijk,W.W., Liu,Y.J., Wang,G., and Hwu,P. (2008). Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J. Clin. Invest* *118*, 1165-1175.

Liu,Y.J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 275-306.

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

Ljunggren,H.G. and Karre,K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* *11*, 237-244.

Locatelli,F., Rocha,V., Chastang,C., Arcese,W., Michel,G., Abecasis,M., Messina,C., Ortega,J., Badell-Serra,I., Plouvier,E., Souillet,G., Jouet,J.P., Pasquini,R., Ferreira,E., Garnier,F., and

- Gluckman,E. (1999). Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. *Blood* 93, 3662-3671.
- Lombardi,V., Van,O.L., Horiot,S., and Moingeon,P. (2009). Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of Il-10, IFN-gamma, and IL-17A by naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* 182, 3372-3379.
- Lou,Y., Liu,C., Kim,G.J., Liu,Y.J., Hwu,P., and Wang,G. (2007). Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune responses. *J. Immunol.* 178, 1534-1541.
- Lui,G., Manches,O., Angel,J., Molens,J.P., Chaperot,L., and Plumas,J. (2009). Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PLoS. One.* 4, e7111.
- Lund,J., Sato,A., Akira,S., Medzhitov,R., and Iwasaki,A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198, 513-520.
- Lund,J.M., Alexopoulou,L., Sato,A., Karow,M., Adams,N.C., Gale,N.W., Iwasaki,A., and Flavell,R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 5598-5603.
- Mackall,C.L., Bare,C.V., Granger,L.A., Sharrow,S.O., Titus,J.A., and Gress,R.E. (1996). Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J. Immunol.* 156, 4609-4616.
- Maecker,B., Mougiakakos,D., Zimmermann,M., Behrens,M., Hollander,S., Schrauder,A., Schrappe,M., Welte,K., and Klein,C. (2006). Dendritic cell deficiencies in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia* 20, 645-649.
- Mami,N.B., Mohty,M., Chambost,H., Gaugler,B., and Olive,D. (2004). Blood dendritic cells in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 126, 77-80.
- Manches,O., Munn,D., Fallahi,A., Lifson,J., Chaperot,L., Plumas,J., and Bhardwaj,N. (2008). HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J. Clin. Invest* 118, 3431-3439.
- Manfra,D.J., Chen,S.C., Jensen,K.K., Fine,J.S., Wiekowski,M.T., and Lira,S.A. (2003). Conditional expression of murine Flt3 ligand leads to expansion of multiple dendritic cell subsets in peripheral blood and tissues of transgenic mice. *J. Immunol.* 170, 2843-2852.
- Markey,K.A., Macdonald,K.P., and Hill,G.R. (2009). Recipient plasmacytoid DCs are not required to prime allogeneic T-cell responses after BMT. *Blood* 113, 6038-6039.
- Marshall,J.D., Heeke,D.S., Abbate,C., Yee,P., and Van,N.G. (2006). Induction of interferon-gamma from natural killer cells by immunostimulatory CpG DNA is mediated through plasmacytoid-dendritic-cell-produced interferon-alpha and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 117, 38-46.
- Martin,P.J. (1991). Increased disparity for minor histocompatibility antigens as a potential cause of increased GVHD risk in marrow transplantation from unrelated donors compared with related donors. *Bone Marrow Transplant.* 8, 217-223.
- Martin-Martin,L., Almeida,J., Hernandez-Campo,P.M., Sanchez,M.L., Lecrevisse,Q., and Orfao,A. (2009). Immunophenotypical, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow. *Transfusion.*

Masten,B.J., Olson,G.K., Tarleton,C.A., Rund,C., Schuyler,M., Mehran,R., Archibeque,T., and Lipscomb,M.F. (2006). Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *J. Immunol.* *177*, 7784-7793.

Matsui,T., Connolly,J.E., Michnevitz,M., Chaussabel,D., Yu,C.I., Glaser,C., Tindle,S., Pypaert,M., Freitas,H., Piqueras,B., Banchereau,J., and Palucka,A.K. (2009). CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J. Immunol.* *182*, 6815-6823.

Mavroudis,D., Read,E., Cottler-Fox,M., Couriel,D., Molldrem,J., Carter,C., Yu,M., Dunbar,C., and Barrett,J. (1996). CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood* *88*, 3223-3229.

McKenna,H.J., Stocking,K.L., Miller,R.E., Brasel,K., De,S.T., Maraskovsky,E., Maliszewski,C.R., Lynch,D.H., Smith,J., Pulendran,B., Roux,E.R., Teepe,M., Lyman,S.D., and Peschon,J.J. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* *95*, 3489-3497.

McNiece,I., Kubegov,D., Kerzic,P., Shpall,E.J., and Gross,S. (2000). Increased expansion and differentiation of cord blood products using a two-step expansion culture. *Exp. Hematol.* *28*, 1181-1186.

Medawar,P.B. (1961). Immunological tolerance. *Science* *133*, 303-306.

Megjugorac,N.J., Young,H.A., Amrute,S.B., Olshalsky,S.L., and Fitzgerald-Bocarsly,P. (2004). Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 504-514.

Mellor,A.L., Baban,B., Chandler,P., Marshall,B., Jhaver,K., Hansen,A., Koni,P.A., Iwashima,M., and Munn,D.H. (2003). Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J. Immunol.* *171*, 1652-1655.

Mellor,A.L. and Munn,D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 762-774.

Merad,M. and Manz,M.G. (2009). Dendritic cell homeostasis. *Blood* *113*, 3418-3427.

Merindol,N., Grenier,A.J., Caty,M., Charrier,E., Duval,A., Duval,M., Champagne,M.A., and Soudeyns,H. (2010). Umbilical cord blood T cells respond against the Melan-A/MART-1 tumor antigen and exhibit reduced alloreactivity as compared with adult blood-derived T cells. *J. Immunol.* *185*, 856-866.

Meyer-Wentrup,F., Benitez-Ribas,D., Tacke,P.J., Punt,C.J., Figdor,C.G., de Vries,I.J., and Adema,G.J. (2008). Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN- $\alpha$  production. *Blood* *111*, 4245-4253.

Michel,G., Rocha,V., Chevret,S., Arcese,W., Chan,K.W., Filipovich,A., Takahashi,T.A., Vowels,M., Ortega,J., Bordigoni,P., Shaw,P.J., Yaniv,I., Machado,A., Pimentel,P., Fagioli,F., Verdeguer,A., Jouet,J.P., Diez,B., Ferreira,E., Pasquini,R., Rosenthal,J., Sievers,E., Messina,C., Iori,A.P., Garnier,F., Ionescu,I., Locatelli,F., and Gluckman,E. (2003). Unrelated cord blood transplantation for childhood acute myeloid leukemia: a Eurocord Group analysis. *Blood* *102*, 4290-4297.

Mohty,M., Blaise,D., Faucher,C., Bardou,V.J., Gastaut,J.A., Viens,P., Olive,D., and Gaugler,B. (2005). Impact of plasmacytoid dendritic cells on outcome after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* *19*, 1-6.

- Mohty,M., Isnardon,D., Vey,N., Briere,F., Blaise,D., Olive,D., and Gaugler,B. (2002). Low blood dendritic cells in chronic myeloid leukaemia patients correlates with loss of CD34<sup>+</sup>. *Br. J. Haematol.* *119*, 115-118.
- Mohty,M., Jarrossay,D., Lafage-Pochitaloff,M., Zandotti,C., Briere,F., de Lamballeri,X.N., Isnardon,D., Sainty,D., Olive,D., and Gaugler,B. (2001). Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. *Blood* *98*, 3750-3756.
- Mohty,M., Jourdan,E., Mami,N.B., Vey,N., Damaj,G., Blaise,D., Isnardon,D., Olive,D., and Gaugler,B. (2004). Imatinib and plasmacytoid dendritic cell function in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* *103*, 4666-4668.
- Molenkamp,B.G., van Leeuwen,P.A., Meijer,S., Sluijter,B.J., Wijnands,P.G., Baars,A., van den Eertwegh,A.J., Scheper,R.J., and de Gruijl,T.D. (2007). Intradermal CpG-B activates both plasmacytoid and myeloid dendritic cells in the sentinel lymph node of melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* *13*, 2961-2969.
- Moretta,A. (2002). Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 957-964.
- Moretta,A., Maccario,R., Fagioli,F., Giraldi,E., Busca,A., Montagna,D., Miniero,R., Comoli,P., Giorgiani,G., Zecca,M., Pagani,S., and Locatelli,F. (2001). Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp. Hematol.* *29*, 371-379.
- Moretta,A., Marcenaro,E., Sivori,S., Della,C.M., Vitale,M., and Moretta,L. (2005). Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends Immunol.* *26*, 668-675.
- Moretta,L., Ferlazzo,G., Bottino,C., Vitale,M., Pende,D., Mingari,M.C., and Moretta,A. (2006). Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol. Rev.* *214*, 219-228.
- Moretta,L., Ferlazzo,G., Mingari,M.C., Melioli,G., and Moretta,A. (2003). Update on natural killer cells: cross-talk with dendritic cells and role in the cure of acute myeloid leukemias. *Cancer J.* *9*, 232-237.
- Morita,R., Uchiyama,T., and Hori,T. (2005). Nitric oxide inhibits IFN-alpha production of human plasmacytoid dendritic cells partly via a guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *J. Immunol.* *175*, 806-812.
- Moseman,E.A., Liang,X., Dawson,A.J., Panoskaltis-Mortari,A., Krieg,A.M., Liu,Y.J., Blazar,B.R., and Chen,W. (2004). Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol.* *173*, 4433-4442.
- Mouries,J., Moron,G., Schlecht,G., Escriou,N., Dadaglio,G., and Leclerc,C. (2008). Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* *112*, 3713-3722.
- Munn,D.H., Sharma,M.D., Hou,D., Baban,B., Lee,J.R., Antonia,S.J., Messina,J.L., Chandler,P., Koni,P.A., and Mellor,A.L. (2004). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J. Clin. Invest* *114*, 280-290.

- Nagasawa,M., Schmidlin,H., Hazekamp,M.G., Schotte,R., and Blom,B. (2008). Development of human plasmacytoid dendritic cells depends on the combined action of the basic helix-loop-helix factor E2-2 and the Ets factor Spi-B. *Eur. J. Immunol.* *38*, 2389-2400.
- Naik,S.H., Sathe,P., Park,H.Y., Metcalf,D., Proietto,A.I., Dakic,A., Carotta,S., O'Keeffe,M., Bahlo,M., Papenfuss,A., Kwak,J.Y., Wu,L., and Shortman,K. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.* *8*, 1217-1226.
- Nair,J.S., DaFonseca,C.J., Tjernberg,A., Sun,W., Darnell,J.E., Jr., Chait,B.T., and Zhang,J.J. (2002). Requirement of Ca<sup>2+</sup> and CaMKII for Stat1 Ser-727 phosphorylation in response to IFN-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 5971-5976.
- Nakano,H., Yanagita,M., and Gunn,M.D. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *194*, 1171-1178.
- Ng,Y.Y., van,K.B., Lokhorst,H.M., Baert,M.R., van den Burg,C.M., Bloem,A.C., and Staal,F.J. (2004). Gene-expression profiling of CD34+ cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 314-323.
- Nguyen,H., Ramana,C.V., Bayes,J., and Stark,G.R. (2001). Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J. Biol. Chem.* *276*, 33361-33368.
- Nguyen,S., Dhedin,N., Vernant,J.P., Kuentz,M., Al,J.A., Rouas-Freiss,N., Carosella,E.D., Boudifa,A., Debre,P., and Vieillard,V. (2005). NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood* *105*, 4135-4142.
- Niehues,T., Rocha,V., Filipovich,A.H., Chan,K.W., Porcher,R., Michel,G., Ortega,J.J., Wernet,P., Gobel,U., Gluckman,E., and Locatelli,F. (2001). Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children -- a Eurocord analysis. *Br. J. Haematol.* *114*, 42-48.
- Nitsche,A., Zhang,M., Clauss,T., Siegert,W., Brune,K., and Pahl,A. (2007). Cytokine profiles of cord and adult blood leukocytes: differences in expression are due to differences in expression and activation of transcription factors. *BMC. Immunol.* *8*, 18.
- Novak,N., Allam,J.P., Hagemann,T., Jenneck,C., Laffer,S., Valenta,R., Kochan,J., and Bieber,T. (2004). Characterization of FcepsilonRI-bearing CD123 blood dendritic cell antigen-2 plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *114*, 364-370.
- O'Garra,A. and Howard,M. (1992). IL-10 production by CD5 B cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *651*, 182-199.
- Ochando,J.C., Homma,C., Yang,Y., Hidalgo,A., Garin,A., Tacke,F., Angeli,V., Li,Y., Boros,P., Ding,Y., Jessberger,R., Trinchieri,G., Lira,S.A., Randolph,G.J., and Bromberg,J.S. (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat. Immunol.* *7*, 652-662.
- Oh,S.H., Bandyopadhyay,S., Miller,D.S., and Starr,S.E. (1987). Cooperation between CD16(Leu-11b)+ NK cells and HLA-DR+ cells in natural killing of herpesvirus-infected fibroblasts. *J. Immunol.* *139*, 2799-2802.

Olweus,J., BitMansour,A., Warnke,R., Thompson,P.A., Carballido,J., Picker,L.J., and Lund-Johansen,F. (1997). Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 12551-12556.

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

Osawa,Y., Iho,S., Takauji,R., Takatsuka,H., Yamamoto,S., Takahashi,T., Horiguchi,S., Urasaki,Y., Matsuki,T., and Fujieda,S. (2006). Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* *177*, 4841-4852.

Pacanowski,J., Kahi,S., Baillet,M., Lebon,P., Deveau,C., Goujard,C., Meyer,L., Oksenhendler,E., Sinet,M., and Hosmalin,A. (2001). Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* *98*, 3016-3021.

Palamara,F., Meindl,S., Holcman,M., Luhrs,P., Stingl,G., and Sibilina,M. (2004). Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J. Immunol.* *173*, 3051-3061.

Palucka,A.K., Gatlin,J., Blanck,J.P., Melkus,M.W., Clayton,S., Ueno,H., Kraus,E.T., Cravens,P., Bennett,L., Padgett-Thomas,A., Marches,F., Islas-Ohlmayer,M., Garcia,J.V., and Banchereau,J. (2003). Human dendritic cell subsets in NOD/SCID mice engrafted with CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood* *102*, 3302-3310.

Parcina,M., Wendt,C., Goetz,F., Zawatzky,R., Zahringer,U., Heeg,K., and Bekeredjian-Ding,I. (2008). Staphylococcus aureus-induced plasmacytoid dendritic cell activation is based on an IgG-mediated memory response. *J. Immunol.* *181*, 3823-3833.

Parkman,R., Cohen,G., Carter,S.L., Weinberg,K.I., Masinsin,B., Guinan,E., Kurtzberg,J., Wagner,J.E., and Kernan,N.A. (2006). Successful immune reconstitution decreases leukemic relapse and improves survival in recipients of unrelated cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *12*, 919-927.

Parody,R., Martino,R., Rovira,M., Vazquez,L., Vazquez,M.J., de la,C.R., Blazquez,C., Fernandez-Aviles,F., Carreras,E., Salavert,M., Jarque,I., Martin,C., Martinez,F., Lopez,J., Torres,A., Sierra,J., and Sanz,G.F. (2006). Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: comparison of cord blood transplantation with peripheral blood and bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *12*, 734-748.

Pashenkov,M., Goess,G., Wagner,C., Hormann,M., Jandl,T., Moser,A., Britten,C.M., Smolle,J., Koller,S., Mauch,C., Tantcheva-Poor,I., Grabbe,S., Loquai,C., Esser,S., Franckson,T., Schneeberger,A., Haarmann,C., Krieg,A.M., Stingl,G., and Wagner,S.N. (2006). Phase II trial of a toll-like receptor 9-activating oligonucleotide in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* *24*, 5716-5724.

Paulin,T. (1992). Importance of bone marrow cell dose in bone marrow transplantation. *Clin. Transplant.* *6*, 48-54.

Payvandi,F., Amrute,S., and Fitzgerald-Bocarsly,P. (1998). Exogenous and endogenous IL-10 regulate IFN-alpha production by peripheral blood mononuclear cells in response to viral stimulation. *J. Immunol.* *160*, 5861-5868.



Pende,D., Marcenaro,S., Falco,M., Martini,S., Bernardo,M.E., Montagna,D., Romeo,E., Cognet,C., Martinetti,M., Maccario,R., Mingari,M.C., Vivier,E., Moretta,L., Locatelli,F., and Moretta,A. (2009). Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* *113*, 3119-3129.

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

Pinzon-Charry,A., Ho,C.S., Maxwell,T., McGuckin,M.A., Schmidt,C., Furnival,C., Pyke,C.M., and Lopez,J.A. (2007). Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *Br. J. Cancer* *97*, 1251-1259.

Piqueras,B., Connolly,J., Freitas,H., Palucka,A.K., and Banchereau,J. (2006). Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood* *107*, 2613-2618.

Platanias,L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 375-386.

Popovic,P.J., DeMarco,R., Lotze,M.T., Winikoff,S.E., Bartlett,D.L., Krieg,A.M., Guo,Z.S., Brown,C.K., Tracey,K.J., and Zeh,H.J., III (2006). High mobility group B1 protein suppresses the human plasmacytoid dendritic cell response to TLR9 agonists. *J. Immunol.* *177*, 8701-8707.

Porta,M.D., Rigolin,G.M., Alessandrino,E.P., Maiocchi,M., Malcovati,L., Vanelli,L., Barate,C., Rumi,E., Ciccone,M., Cuneo,A., Lazzarino,M., and Castoldi,G. (2004). Dendritic cell recovery after allogeneic stem-cell transplantation in acute leukemia: correlations with clinical and transplant characteristics. *Eur. J. Haematol.* *72*, 18-25.

Preynat-Seauve,O., Schuler,P., Contassot,E., Beermann,F., Huard,B., and French,L.E. (2006). Tumor-infiltrating dendritic cells are potent antigen-presenting cells able to activate T cells and mediate tumor rejection. *J. Immunol.* *176*, 61-67.

Pulendran,B., Banchereau,J., Burkeholder,S., Kraus,E., Guinet,E., Chalouni,C., Caron,D., Maliszewski,C., Davoust,J., Fay,J., and Palucka,K. (2000). Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J. Immunol.* *165*, 566-572.

Qian,J.X., Lee,S.M., Suen,Y., Knoppel,E., van,d., V, and Cairo,M.S. (1997). Decreased interleukin-15 from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and the effect of interleukin-15 in upregulating antitumor immune activity and cytokine production in cord blood. *Blood* *90*, 3106-3117.

Rajasekar,R., Mathews,V., Lakshmi,K.M., Sellathamby,S., George,B., Viswabandya,A., Daniel,D., Chandy,M., and Srivastava,A. (2008). Plasmacytoid dendritic cell count on day 28 in HLA-matched related allogeneic peripheral blood stem cell transplant predicts the incidence of acute and chronic GVHD. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *14*, 344-350.

Reddy,V., Iturraspe,J.A., Tzolas,A.C., Meier-Kriesche,H.U., Schold,J., and Wingard,J.R. (2004). Low dendritic cell count after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts relapse, death, and acute graft-versus-host disease. *Blood* *103*, 4330-4335.

Reid,G.S., She,K., Terrett,L., Food,M.R., Trudeau,J.D., and Schultz,K.R. (2005). CpG stimulation of precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia induces a distinct change in costimulatory molecule expression and shifts allogeneic T cells toward a Th1 response. *Blood* *105*, 3641-3647.

Reitano,K.N., Kottlil,S., Gille,C.M., Zhang,X., Yan,M., O'Shea,M.A., Roby,G., Hallahan,C.W., Yang,J., Lempicki,R.A., Arthos,J., and Fauci,A.S. (2009). Defective plasmacytoid dendritic cell-NK cell cross-talk in HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 25, 1029-1037.

Renard,C., Barlogis,V., Mialou,V., Galambrun,C., Bernoux,D., Goutagny,M.P., Glasman,L., Loundou,A.D., Poitevin-Later,F., Dignat-George,F., Dubois,V., Picard,C., Chabannon,C., Bertrand,Y., and Michel,G. (2010). Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children. *Br. J. Haematol.*

Renda,M.C., Fecarotta,E., Dieli,F., Markling,L., Westgren,M., Damiani,G., Jakil,C., Picciotto,F., and Maggio,A. (2000). Evidence of alloreactive T lymphocytes in fetal liver: implications for fetal hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 25, 135-141.

Ribeiro-do-Couto,L.M., Boeije,L.C., Kroon,J.S., Hooibrink,B., Breur-Vriesendorp,B.S., Aarden,L.A., and Boog,C.J. (2001). High IL-13 production by human neonatal T cells: neonate immune system regulator? *Eur. J. Immunol.* 31, 3394-3402.

Riboldi,E., Daniele,R., Cassatella,M.A., Sozzani,S., and Bosisio,D. (2009). Engagement of BDCA-2 blocks TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* 214, 868-876.

Risdon,G., Gaddy,J., Stehman,F.B., and Broxmeyer,H.E. (1994). Proliferative and cytotoxic responses of human cord blood T lymphocytes following allogeneic stimulation. *Cell Immunol.* 154, 14-24.

Rissoan,M.C., Duhon,T., Bridon,J.M., Bendriss-Vermare,N., Peronne,C., de,S., V, Briere,F., and Bates,E.E. (2002). Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 100, 3295-3303.

Rissoan,M.C., Soumelis,V., Kadowaki,N., Grouard,G., Briere,F., de Waal,M.R., and Liu,Y.J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283, 1183-1186.

Rocha,V., Cornish,J., Sievers,E.L., Filipovich,A., Locatelli,F., Peters,C., Remberger,M., Michel,G., Arcese,W., Dallorso,S., Tiedemann,K., Busca,A., Chan,K.W., Kato,S., Ortega,J., Vowels,M., Zander,A., Souillet,G., Oakill,A., Woolfrey,A., Pay,A.L., Green,A., Garnier,F., Ionescu,I., Wernet,P., Sirchia,G., Rubinstein,P., Chevret,S., and Gluckman,E. (2001). Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 97, 2962-2971.

Rocha,V., Labopin,M., Sanz,G., Arcese,W., Schwerdtfeger,R., Bosi,A., Jacobsen,N., Ruutu,T., de,L.M., Finke,J., Frassoni,F., and Gluckman,E. (2004). Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N. Engl. J. Med.* 351, 2276-2285.

Rocha,V. and Locatelli,F. (2008). Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. *Bone Marrow Transplant.* 41, 207-214.

Rocha,V., Wagner,J.E., Jr., Sobocinski,K.A., Klein,J.P., Zhang,M.J., Horowitz,M.M., and Gluckman,E. (2000). Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N. Engl. J. Med.* 342, 1846-1854.

Rock,J., Schneider,E., Grun,J.R., Grutzkau,A., Kuppers,R., Schmitz,J., and Winkels,G. (2007). CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLCgamma2. *Eur. J. Immunol.* 37, 3564-3575.

- Romagnani,C., Della,C.M., Kohler,S., Moewes,B., Radbruch,A., Moretta,L., Moretta,A., and Thiel,A. (2005). Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. *Eur. J. Immunol.* *35*, 2452-2458.
- Roth,I., Corry,D.B., Locksley,R.M., Abrams,J.S., Litton,M.J., and Fisher,S.J. (1996). Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J. Exp. Med.* *184*, 539-548.
- Rozkova,D., Horvath,R., Bartunkova,J., and Spisek,R. (2006). Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clin. Immunol.* *120*, 260-271.
- Rubinstein,P., Carrier,C., Scaradavou,A., Kurtzberg,J., Adamson,J., Migliaccio,A.R., Berkowitz,R.L., Cabbad,M., Dobrila,N.L., Taylor,P.E., Rosenfield,R.E., and Stevens,C.E. (1998). Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N. Engl. J. Med.* *339*, 1565-1577.
- Ruggeri,L., Capanni,M., Urbani,E., Perruccio,K., Shlomchik,W.D., Tosti,A., Posati,S., Rogaia,D., Frassoni,F., Aversa,F., Martelli,M.F., and Velardi,A. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* *295*, 2097-2100.
- Ruggeri,L., Mancusi,A., Burchielli,E., Capanni,M., Carotti,A., Aloisi,T., Aversa,F., Martelli,M.F., and Velardi,A. (2008). NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol. Dis.* *40*, 84-90.
- Salio,M., Cella,M., Vermi,W., Facchetti,F., Palmowski,M.J., Smith,C.L., Shepherd,D., Colonna,M., and Cerundolo,V. (2003). Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur. J. Immunol.* *33*, 1052-1062.
- Salio,M., Palmowski,M.J., Atzberger,A., Hermans,I.F., and Cerundolo,V. (2004). CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *J. Exp. Med.* *199*, 567-579.
- Schlecht,G., Garcia,S., Escriou,N., Freitas,A.A., Leclerc,C., and Dadaglio,G. (2004). Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8+ T-cell responses in vivo after viral stimulation. *Blood* *104*, 1808-1815.
- Schlecht,G., Leclerc,C., and Dadaglio,G. (2001). Induction of CTL and nonpolarized Th cell responses by CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells. *J. Immunol.* *167*, 4215-4221.
- Schnurr,M., Chen,Q., Shin,A., Chen,W., Toy,T., Jenderek,C., Green,S., Miloradovic,L., Drane,D., Davis,I.D., Villadangos,J., Shortman,K., Maraskovsky,E., and Cebon,J. (2005). Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* *105*, 2465-2472.
- Schotte,R., Nagasawa,M., Weijer,K., Spits,H., and Blom,B. (2004). The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *J. Exp. Med.* *200*, 1503-1509.
- Schroeder,J.T., Bieneman,A.P., Xiao,H., Chichester,K.L., Vasagar,K., Saini,S., and Liu,M.C. (2005). *J. Immunol.* *175*, 5724-5731.
- Seif,A.E., Barrett,D.M., Milone,M., Brown,V.I., Grupp,S.A., and Reid,G.S. (2009). Long-term protection from syngeneic acute lymphoblastic leukemia by CpG ODN-mediated stimulation of innate and adaptive immune responses. *Blood* *114*, 2459-2466.

Sharma,M.D., Baban,B., Chandler,P., Hou,D.Y., Singh,N., Yagita,H., Azuma,M., Blazar,B.R., Mellor,A.L., and Munn,D.H. (2007). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest* *117*, 2570-2582.

Shigematsu,H., Reizis,B., Iwasaki,H., Mizuno,S., Hu,D., Traver,D., Leder,P., Sakaguchi,N., and Akashi,K. (2004). Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* *21*, 43-53.

Shilling,H.G., McQueen,K.L., Cheng,N.W., Shizuru,J.A., Negrin,R.S., and Parham,P. (2003). Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* *101*, 3730-3740.

Shin,A., Toy,T., Rothenfusser,S., Robson,N., Vorac,J., Dauer,M., Stuplich,M., Endres,S., Cebon,J., Maraskovsky,E., and Schnurr,M. (2008). P2Y receptor signaling regulates phenotype and IFN-alpha secretion of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *111*, 3062-3069.

Shinohara,M.L., Lu,L., Bu,J., Werneck,M.B., Kobayashi,K.S., Glimcher,L.H., and Cantor,H. (2006). Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol.* *7*, 498-506.

Shodell,M., Shah,K., and Siegal,F.P. (2003). Circulating human plasmacytoid dendritic cells are highly sensitive to corticosteroid administration. *Lupus* *12*, 222-230.

Shodell,M. and Siegal,F.P. (2001). Corticosteroids depress IFN-alpha-producing plasmacytoid dendritic cells in human blood. *J. Allergy Clin. Immunol.* *108*, 446-448.

Shortman,K. and Liu,Y.J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 151-161.

Shresta,S., Pham,C.T., Thomas,D.A., Graubert,T.A., and Ley,T.J. (1998). How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr. Opin. Immunol.* *10*, 581-587.

Siegal,F.P., Kadowaki,N., Shodell,M., Fitzgerald-Bocarsly,P.A., Shah,K., Ho,S., Antonenko,S., and Liu,Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* *284*, 1835-1837.

Sierra,J., Storer,B., Hansen,J.A., Bjerke,J.W., Martin,P.J., Petersdorf,E.W., Appelbaum,F.R., Bryant,E., Chauncey,T.R., Sale,G., Sanders,J.E., Storb,R., Sullivan,K.M., and Anasetti,C. (1997). Transplantation of marrow cells from unrelated donors for treatment of high-risk acute leukemia: the effect of leukemic burden, donor HLA-matching, and marrow cell dose. *Blood* *89*, 4226-4235.

Sochorova,K., Horvath,R., Rozkova,D., Litzman,J., Bartunkova,J., Sediva,A., and Spisek,R. (2007). Impaired Toll-like receptor 8-mediated IL-6 and TNF-alpha production in antigen-presenting cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Blood* *109*, 2553-2556.

Son,Y., Ito,T., Ozaki,Y., Tanijiri,T., Yokoi,T., Nakamura,K., Takebayashi,M., Amakawa,R., and Fukuhara,S. (2006). Prostaglandin E2 is a negative regulator on human plasmacytoid dendritic cells. *Immunology* *119*, 36-42.

Sousa,L.P., Brasil,B.S., Silva,B.M., Nogueira,S.V., Andrade,A.A., Ferreira,P.C., Teixeira,S.M., Gollob,K.J., Kroon,E.G., Kato,K., and Bonjardim,C.A. (2005). Characterization of alpha-enolase as an interferon-alpha 2 alpha 1 regulated gene. *Front Biosci.* *10*, 2534-2547.

- Spits,H., Couwenberg,F., Bakker,A.Q., Weijer,K., and Uittenbogaart,C.H. (2000). Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J. Exp. Med.* *192*, 1775-1784.
- Stark,G.R., Kerr,I.M., Williams,B.R., Silverman,R.H., and Schreiber,R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 227-264.
- Stary,G., Bangert,C., Tauber,M., Strohal,R., Kopp,T., and Stingl,G. (2007). Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* *204*, 1441-1451.
- Stary,G., Klein,I., Kohlhofer,S., Koszik,F., Scherzer,T., Mullauer,L., Quendler,H., Kohrgruber,N., and Stingl,G. (2009). Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* *114*, 3854-3863.
- Sugita,J., Tanaka,J., Hashimoto,A., Shiratori,S., Yasumoto,A., Wakasa,K., Kikuchi,M., Shigematsu,A., Miura,Y., Tsutsumi,Y., Kondo,T., Asaka,M., and Imamura,M. (2008). Influence of conditioning regimens and stem cell sources on donor-type chimerism early after stem cell transplantation. *Ann. Hematol.* *87*, 1003-1008.
- Tabeta,K., Georgel,P., Janssen,E., Du,X., Hoebe,K., Crozat,K., Mudd,S., Shamel,L., Sovath,S., Goode,J., Alexopoulou,L., Flavell,R.A., and Beutler,B. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 3516-3521.
- Tabeta,K., Hoebe,K., Janssen,E.M., Du,X., Georgel,P., Crozat,K., Mudd,S., Mann,N., Sovath,S., Goode,J., Shamel,L., Herskovits,A.A., Portnoy,D.A., Cooke,M., Tarantino,L.M., Wiltshire,T., Steinberg,B.E., Grinstein,S., and Beutler,B. (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat. Immunol.* *7*, 156-164.
- Taylor,P., Tamura,T., Kong,H.J., Kubota,T., Kubota,M., Borghi,P., Gabriele,L., and Ozato,K. (2007). The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8. *Immunity.* *27*, 228-239.
- Tajima,K., Amakawa,R., Ito,T., Miyaji,M., Takebayashi,M., and Fukuhara,S. (2003). Immunomodulatory effects of cyclosporin A on human peripheral blood dendritic cell subsets. *Immunology* *108*, 321-328.
- Takahashi,N., Imanishi,K., Nishida,H., and Uchiyama,T. (1995). Evidence for immunologic immaturity of cord blood T cells. Cord blood T cells are susceptible to tolerance induction to in vitro stimulation with a superantigen. *J. Immunol.* *155*, 5213-5219.
- Takeshita,F., Leifer,C.A., Gursel,I., Ishii,K.J., Takeshita,S., Gursel,M., and Klinman,D.M. (2001). Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J. Immunol.* *167*, 3555-3558.
- Talarn,C., Urbano-Ispizua,A., Martino,R., Perez-Simon,J.A., Battle,M., Herrera,C., Granell,M., Gaya,A., Torrealadell,M., Fernandez-Aviles,F., Aymerich,M., Marin,P., Sierra,J., and Montserrat,E. (2007). Kinetics of recovery of dendritic cell subsets after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation and clinical outcome. *Haematologica* *92*, 1655-1663.
- Talvensaari,K., Clave,E., Douay,C., Rabian,C., Garderet,L., Busson,M., Garnier,F., Douek,D., Gluckman,E., Charron,D., and Toubert,A. (2002). A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood* *99*, 1458-1464.

Tang,X., Gao,J.S., Guan,Y.J., McLane,K.E., Yuan,Z.L., Ramratnam,B., and Chin,Y.E. (2007). Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor. *Cell* 131, 93-105.

Taniguchi,T. and Takaoka,A. (2002). The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 111-116.

Theunissen,K. and Verfaillie,C.M. (2005). A multifactorial analysis of umbilical cord blood, adult bone marrow and mobilized peripheral blood progenitors using the improved ML-IC assay. *Exp. Hematol.* 33, 165-172.

Thomson,B.G., Robertson,K.A., Gowan,D., Heilman,D., Broxmeyer,H.E., Emanuel,D., Kotylo,P., Brahmi,Z., and Smith,F.O. (2000). Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* 96, 2703-2711.

Tomescu,C., Chehimi,J., Maino,V.C., and Montaner,L.J. (2007). NK cell lysis of HIV-1-infected autologous CD4 primary T cells: requirement for IFN-mediated NK activation by plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 179, 2097-2104.

Tomonari,A., Iseki,T., Takahashi,S., Ooi,J., Takasugi,K., Shimohakamada,Y., Ohno,N., Nagamura,F., Uchimaru,K., Tani,K., Tojo,A., and Asano,S. (2003). Varicella-zoster virus infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. *Br. J. Haematol.* 122, 802-805.

Tonon,S., Badran,B., Benghiat,F.S., Goriely,S., Flamand,V., Willard-Gallo,K., Willems,F., Goldman,M., and De,W.D. (2006). Pertussis toxin activates adult and neonatal naive human CD4+ T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 36, 1794-1804.

Traggiai,E., Chicha,L., Mazzucchelli,L., Bronz,L., Piffaretti,J.C., Lanzavecchia,A., and Manz,M.G. (2004). Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304, 104-107.

Treilleux,I., Blay,J.Y., Bendriss-Vermare,N., Ray-Coquard,I., Bachelot,T., Guastalla,J.P., Bremond,A., Goddard,S., Pin,J.J., Barthelemy-Dubois,C., and Lebecque,S. (2004). Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 7466-7474.

Tsujimura,H., Tamura,T., and Ozato,K. (2003). Cutting edge: IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor 8 drives the development of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 170, 1131-1135.

Tuckey,R.C. (2005). Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* 26, 273-281.

Uddin,S., Fish,E.N., Sher,D.A., Gardziola,C., White,M.F., and Platanius,L.C. (1997). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase by IFN-alpha. *J. Immunol.* 158, 2390-2397.

Uddin,S., Lekmine,F., Sharma,N., Majchrzak,B., Mayer,I., Young,P.R., Bokoch,G.M., Fish,E.N., and Platanius,L.C. (2000). The Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 27634-27640.

Uddin,S., Sassano,A., Deb,D.K., Verma,A., Majchrzak,B., Rahman,A., Malik,A.B., Fish,E.N., and Platanius,L.C. (2002). Protein kinase C-delta (PKC-delta ) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727. *J. Biol. Chem.* 277, 14408-14416.

- Uematsu,S., Sato,S., Yamamoto,M., Hirotani,T., Kato,H., Takeshita,F., Matsuda,M., Coban,C., Ishii,K.J., Kawai,T., Takeuchi,O., and Akira,S. (2005). Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction. *J. Exp. Med.* *201*, 915-923.
- Urbini,B., Arpinati,M., Bonifazi,F., Chirumbolo,G., Falcioni,S., Stanzani,M., Bandini,G., Motta,M.R., Perrone,G., Giannini,B., Tura,S., Baccarani,M., and Rondelli,D. (2003). Allogeneic graft CD34(+) cell dose correlates with dendritic cell dose and clinical outcome, but not with dendritic cell reconstitution after transplant. *Exp. Hematol.* *31*, 959-965.
- Vago,L., Forno,B., Sormani,M.P., Crocchiolo,R., Zino,E., Di,T.S., Lupo Stanghellini,M.T., Mazzi,B., Perna,S.K., Bondanza,A., Middleton,D., Palini,A., Bernardi,M., Bacchetta,R., Peccatori,J., Rossini,S., Roncarolo,M.G., Bordignon,C., Bonini,C., Ciceri,F., and Fleischhauer,K. (2008). Temporal, quantitative, and functional characteristics of single-KIR-positive alloreactive natural killer cell recovery account for impaired graft-versus-leukemia activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *112*, 3488-3499.
- Vakkila,J., Thomson,A.W., Hovi,L., Vetteranta,K., and 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.
- Vallera,D.A., Taylor,P.A., Sprent,J., and Blazar,B.R. (1994). The role of host T cell subsets in bone marrow rejection directed to isolated major histocompatibility complex class I versus class II differences of bm1 and bm12 mutant mice. *Transplantation* *57*, 249-256.
- van Boxel-Dezaire,A.H., Rani,M.R., and Stark,G.R. (2006). Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity.* *25*, 361-372.
- van Burik,J.A. and Brunstein,C.G. (2007). Infectious complications following unrelated cord blood transplantation. *Vox Sang.* *92*, 289-296.
- Vandenbosch,K., Ovetchkine,P., Champagne,M.A., Haddad,E., Alexandrov,L., and Duval,M. (2008). Varicella-zoster virus disease is more frequent after cord blood than after bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *14*, 867-871.
- Varani,S., Cederarv,M., Feld,S., Tammik,C., Frascaroli,G., Landini,M.P., and Soderberg-Naucler,C. (2007). Human cytomegalovirus differentially controls B cell and T cell responses through effects on plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* *179*, 7767-7776.
- Velardi,A. (2008). Role of KIRs and KIR ligands in hematopoietic transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* *20*, 581-587.
- Verheyden,S., Schots,R., Duquet,W., and Demanet,C. (2005). A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* *19*, 1446-1451.
- Verneris,M.R., Brunstein,C.G., Barker,J., MacMillan,M.L., DeFor,T., McKenna,D.H., Burke,M.J., Blazar,B.R., Miller,J.S., McGlave,P.B., Weisdorf,D.J., and Wagner,J.E. (2009). Relapse risk after umbilical cord blood transplantation: enhanced graft-versus-leukemia effect in recipients of 2 units. *Blood* *114*, 4293-4299.
- Vicari,A.P., Chiodoni,C., Vaure,C., Ait-Yahia,S., Dercamp,C., Matsos,F., Reynard,O., Taverne,C., Merle,P., Colombo,M.P., O'Garra,A., Trinchieri,G., and Caux,C. (2002). Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *J. Exp. Med.* *196*, 541-549.

- Vilcek, J. (2006). Fifty years of interferon research: aiming at a moving target. *Immunity*. 25, 343-348.
- Villadangos, J.A. and Young, L. (2008). Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 29, 352-361.
- Vogt, T.K., Link, A., Perrin, J., Finke, D., and Luther, S.A. (2009). Novel function for interleukin-7 in dendritic cell development. *Blood* 113, 3961-3968.
- Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H.L., and Krieg, A.M. (2004). Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur. J. Immunol.* 34, 251-262.
- Wagner, H. (2008). The sweetness of the DNA backbone drives Toll-like receptor 9. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 396-400.
- Wagner, J.E., Barker, J.N., DeFor, T.E., Baker, K.S., Blazar, B.R., Eide, C., Goldman, A., Kersey, J., Krivit, W., MacMillan, M.L., Orchard, P.J., Peters, C., Weisdorf, D.J., Ramsay, N.K., and Davies, S.M. (2002). Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 100, 1611-1618.
- Wagner, J.E., Rosenthal, J., Sweetman, R., Shu, X.O., Davies, S.M., Ramsay, N.K., McGlave, P.B., Sender, L., and Cairo, M.S. (1996). Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* 88, 795-802.
- Waller, E.K., Rosenthal, H., Jones, T.W., Peel, J., Lonial, S., Langston, A., Redei, I., Jurickova, I., and Boyer, M.W. (2001). Larger numbers of CD4(bright) dendritic cells in donor bone marrow are associated with increased relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 97, 2948-2956.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., and Chen, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-351.
- Watarai, H., Sekine, E., Inoue, S., Nakagawa, R., Kaisho, T., and Taniguchi, M. (2008). PDC-TREM, a plasmacytoid dendritic cell-specific receptor, is responsible for augmented production of type I interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 2993-2998.
- Wei, S., Kryczek, I., Zou, L., Daniel, B., Cheng, P., Mottram, P., Curiel, T., Lange, A., and Zou, W. (2005). Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 65, 5020-5026.
- Weijer, K., Uittenbogaart, C.H., Voordouw, A., Couwenberg, F., Seppen, J., Blom, B., Vyth-Dreese, F.A., and Spits, H. (2002). Intrathymic and extrathymic development of human plasmacytoid dendritic cell precursors in vivo. *Blood* 99, 2752-2759.
- Wen, Z. and Darnell, J.E., Jr. (1997). Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res.* 25, 2062-2067.
- Willemze, R., Rodrigues, C.A., Labopin, M., Sanz, G., Michel, G., Socie, G., Rio, B., Sirvent, A., Renaud, M., Madero, L., Mohty, M., Ferra, C., Garnier, F., Loiseau, P., Garcia, J., Lecchi, L., Kogler, G., Beguin, Y., Navarrete, C., Devos, T., Ionescu, I., Boudjedir, K., Herr, A.L., Gluckman, E., and Rocha, V. (2009). KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. *Leukemia*.



- Wilson,C.B., Westall,J., Johnston,L., Lewis,D.B., Dower,S.K., and Alpert,A.R. (1986). Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies. *J. Clin. Invest* 77, 860-867.
- Wilson,N.J., Boniface,K., Chan,J.R., McKenzie,B.S., Blumenschein,W.M., Mattson,J.D., Basham,B., Smith,K., Chen,T., Morel,F., Lecron,J.C., Kastelein,R.A., Cua,D.J., McClanahan,T.K., Bowman,E.P., and de Waal,M.R. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.* 8, 950-957.
- Workman,C.J., Szymczak-Workman,A.L., Collison,L.W., Pillai,M.R., and Vignali,D.A. (2009). The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 2603-2622.
- Yan,S.R., Qing,G., Byers,D.M., Stadnyk,A.W., Al-Hertani,W., and Bortolussi,R. (2004). Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 72, 1223-1229.
- Yang,C.H., Murti,A., Pfeffer,S.R., Kim,J.G., Donner,D.B., and Pfeffer,L.M. (2001). Interferon alpha/beta promotes cell survival by activating nuclear factor kappa B through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *J. Biol. Chem.* 276, 13756-13761.
- Yang,G.X., Lian,Z.X., Kikuchi,K., Moritoki,Y., Ansari,A.A., Liu,Y.J., Ikehara,S., and Gershwin,M.E. (2005a). Plasmacytoid dendritic cells of different origins have distinct characteristics and function: studies of lymphoid progenitors versus myeloid progenitors. *J. Immunol.* 175, 7281-7287.
- Yang,K., Puel,A., Zhang,S., Eidenschenk,C., Ku,C.L., Casrouge,A., Picard,C., von,B.H., Senechal,B., Plancoulaine,S., Al-Hajjar,S., Al-Ghoniaim,A., Marodi,L., Davidson,D., Speert,D., Roifman,C., Garty,B.Z., Ozinsky,A., Barrat,F.J., Coffman,R.L., Miller,R.L., Li,X., Lebon,P., Rodriguez-Gallego,C., Chapel,H., Geissmann,F., Jouanguy,E., and Casanova,J.L. (2005b). Human TLR-7, -8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and -lambda Is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. *Immunity.* 23, 465-478.
- Yang,Y., Liu,B., Dai,J., Srivastava,P.K., Zammit,D.J., Lefrancois,L., and Li,Z. (2007). Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity.* 26, 215-226.
- Yazaki,M., Atsuta,Y., Kato,K., Kato,S., Taniguchi,S., Takahashi,S., Ogawa,H., Kouzai,Y., Kobayashi,T., Inoue,M., Kobayashi,R., Nagamura-Inoue,T., Azuma,H., Takanashi,M., Kai,S., Nakabayashi,M., and Saito,H. (2009). Incidence and risk factors of early bacterial infections after unrelated cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 15, 439-446.
- Yoneyama,H., Matsuno,K., Toda,E., Nishiwaki,T., Matsuo,N., Nakano,A., Narumi,S., Lu,B., Gerard,C., Ishikawa,S., and Matsushima,K. (2005). Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J. Exp. Med.* 202, 425-435.
- Zarnani,A.H., Moazzeni,S.M., Shokri,F., Salehnia,M., Dokouhaki,P., Ghods,R., Mahmoodi,A.R., and Jeddi-Tehrani,M. (2008). Microenvironment of the fetomaternal interface protects the semiallogenic fetus through its immunomodulatory activity on dendritic cells. *Fertil. Steril.* 90, 781-788.
- Zhang,J., Raper,A., Sugita,N., Hingorani,R., Salio,M., Palmowski,M.J., Cerundolo,V., and Crocker,P.R. (2006). Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors. *Blood* 107, 3600-3608.
- Zhang,Y., Joe,G., Zhu,J., Carroll,R., Levine,B., Hexner,E., June,C., and Emerson,S.G. (2004). Dendritic cell-activated CD44hiCD8+ T cells are defective in mediating acute graft-versus-host disease but retain graft-versus-leukemia activity. *Blood* 103, 3970-3978.

Zhang,Y., Louboutin,J.P., Zhu,J., Rivera,A.J., and Emerson,S.G. (2002). Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T cell-mediated acute graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest* 109, 1335-1344.

Zhao,X.Y., Huang,X.J., Liu,K.Y., Xu,L.P., and Liu,D.H. (2007). Reconstitution of natural killer cell receptor repertoires after unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and marrow transplantation: analyses of CD94:NKG2A and killer immunoglobulin-like receptor expression and their associations with clinical outcome. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13, 734-744.

Zou,W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer* 5, 263-274.

Zou,W., Machelon,V., Coulomb-L'Hermin,A., Borvak,J., Nome,F., Isaeva,T., Wei,S., Krzysiek,R., Durand-Gasselin,I., Gordon,A., Pustilnik,T., Curiel,D.T., Galanaud,P., Capron,F., Emilie,D., and Curiel,T.J. (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat. Med.* 7, 1339-1346.

Zucchini,N., Bessou,G., Traub,S., Robbins,S.H., Uematsu,S., Akira,S., Alexopoulou,L., and Dalod,M. (2008). Cutting edge: Overlapping functions of TLR7 and TLR9 for innate defense against a herpesvirus infection. *J. Immunol.* 180, 5799-5803.

## **ANNEXES**

## **Revue 1: Immunologie néonatale et greffe de sang de cordon**



MÉDECINE/SCIENCES 2007 ; 23 : 975-9

> La fréquence et la sévérité des infections néonatales sont généralement attribuées à une immaturité du système immunitaire du nouveau-né. Puisqu'il n'a jamais rencontré d'antigènes microbiens, le bras adaptatif du système immunitaire néonatal (lymphocytes T et B) dispose d'un répertoire pré-immun, naïf. Cependant, ce répertoire pré-immun est comparable au répertoire pré-immun de l'adulte. Ainsi, le fœtus et le nouveau-né sont capables de déclencher une réponse allogénique comparable à celle de l'adulte. L'étude des cellules naturelles tueuses (NK) montre que le bras inné de l'immunité dispose de toute la machinerie intracellulaire caractérisant des cellules arrivées à maturité. Au total, de nombreux arguments suggèrent que le système immunitaire néonatal humain, bien que naïf, est parvenu au stade de maturité. Cependant, le système immunitaire néonatal présente des différences fonctionnelles par rapport à celui de l'adulte ; ces différences sont attribuables à des propriétés particulières : abondance de cellules T régulatrices, réponse faible des cellules dendritiques plasmacytoïdes à leurs stimulus microbiens et forte production d'IL-10. Cela expliquerait la sensibilité du nouveau-né aux infections et le faible taux de réaction allogénique lors d'une greffe de sang de cordon. Pour expliquer ces différences fonctionnelles, nous proposons un nouveau modèle : bien que son répertoire soit pré-immun, le système immunitaire néonatal est mature. Cependant les différences fonctionnelles observées sont dues à un message actif d'origine placentaire, dont la finalité est de permettre au fœtus de tolérer sa mère. Comprendre les mécanismes à l'œuvre permettra de les manipuler dans un but thérapeutique lors d'une infection néonatale et de la greffe de sang de cordon. ◀

Sainte-Justine  
1907-2007  
100 ans  
à faire grandir la vie.

## Immunologie néonatale et greffe de sang de cordon

Emily Charrier, R'Kia Dardari,  
Annie Michaud, Paulo Cordeiro, Michel Duval



Laboratoire d'immunovirologie et de recherche sur le sang de cordon, Centre de cancérologie Charles-Bruneau, Centre de recherche, Hôpital Sainte-Justine, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada. Service d'Hématologie-Oncologie, CHU Sainte-Justine, 3175, chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, Québec, H3T 1C5 Canada.

[michel.duval@umontreal.ca](mailto:michel.duval@umontreal.ca)

**Les infections néonatales et la survie de l'espèce**

Bien que la mise en place des programmes de prévention et de vaccination ait permis de réduire considérablement le taux de mortalité néonatale, l'Organisation Mondiale de la Santé estime que chaque année 1,3 millions de nouveau-nés meurent encore de maladies d'origine infectieuse. Les maladies infectieuses représentent ainsi la première cause de mortalité néonatale. Malgré l'effet négatif certain de ces infections sur la survie de l'espèce, il est surprenant de constater que l'Évolution n'ait pas débouché sur la mise en place de mécanismes de contrôle de ces infections. Le modèle actuellement retenu pour expliquer la vulnérabilité du nouveau-né aux infections est celui de l'immaturité du système immunitaire néonatal. Une autre hypothèse que nous exposerons ici, serait que le système immunitaire du nouveau-né humain est mature, mais qu'il présente des différences fonctionnelles par rapport à celui de l'adulte. Ces différences fonctionnelles, qui le prédisposent aux infections, assureraient une fonction plus importante pour la survie de l'espèce que la protection contre les infections néonatales.

**Le sang de cordon : naïf**

Les connaissances concernant l'immunologie du nouveau-né ont grandement bénéficié de la disponibilité

REVUES



SYNTHÈSE

du sang de cordon, prélevé à partir du placenta par le cordon ombilical après que celui-ci ait été coupé. Contrairement au sang du nouveau-né, le sang de cordon peut être obtenu sans difficulté éthique majeure : le sang de cordon, d'un volume de 50 à 100 ml, est habituellement jeté avec le placenta.

Par définition, le système immunitaire du nouveau-né est naïf, c'est-à-dire qu'il n'a jamais été en contact avec un antigène étranger (excepté lors d'infections transmises par la mère, qui s'avèrent très rares). Les lymphocytes T naïfs sont caractérisés par l'expression de l'isoforme CD45RA et une faible expression de CD28. La proportion de cellules présentant ces caractéristiques est, comme prévu, plus importante dans le sang de cordon, comparativement à celui de l'adulte [1]. Cependant, la diversité du répertoire pré-immun des lymphocytes T néonataux est normale [2]. On retrouve également dans le sang de cordon des lymphocytes T anti-mélanome, tout comme dans le répertoire pré-immun de l'adulte (Hugo Soudeyns, communication personnelle). La susceptibilité néonatale aux infections est souvent expliquée par la naïveté du système immunitaire du nouveau-né. Cependant, la sévérité de ces infections est moins grande après quelques mois de vie. Or, lors de ces primo-infections, le système immunitaire de l'enfant est également naïf vis-à-vis du germe en cause.

### Le sang de cordon : immature ?

Outre son caractère naïf, pré-immun, le système immunitaire du sang de cordon présente des différences fonctionnelles avec celui de l'adulte. L'attribution de ces différences fonctionnelles à une immaturité est cependant une hypothèse contre laquelle militent plusieurs arguments. Nous avons confirmé le fort pourcentage de cellules NK dans le sang de cordon [1, 3]. Le phénotype de ces cellules est identique à celui des NK de l'adulte, à l'exception d'une faible expression des antigènes CD8, CD57, ICAM-1, CD161 et L-sélectine. Leur activité cytotoxique spontanée est faible, mais l'expression de perforine et granzyme, deux molécules effectrices de l'activité cytolytique, est normale. La faible activité cytolytique des cellules NK du sang de cordon est facilement restaurée, en présence d'IL-2 et d'IL-15, ce qui plaide en faveur d'une machinerie cytotoxique mature. De plus, les cellules NK du sang de cordon sont capables de produire de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et de proliférer après un traitement par l'IL-2, de manière comparable à celle de l'adulte. L'ensemble de ces différences n'est pas en faveur d'une immaturité des cellules NK néonatales [3]. Les différences entre les systèmes immunitaires du nouveau-né et de l'adulte concernent aussi les propriétés des cellules dendritiques présentatrices d'antigène. Il existe deux principales sous-populations de cellules dendritiques : les cellules dendritiques myéloïdes et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) [4]. Les pDC constituent la principale source d'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), qu'elles produisent en réponse au CpG (un dérivé d'ADN viral). Cette production d'IFN- $\alpha$  est considérée comme la première réaction du système immunitaire devant l'intrusion d'un virus, et marque la première étape qui non seulement conduira à l'activation des bras (aussi bien inné qu'adaptatif) de l'immunité mais encore conditionnera cette activité [5].

Chez l'adulte, les cellules dendritiques myéloïdes représentent 60 % des cellules dendritiques sanguines ; en revanche, dans le sang de cordon, elles ne composent que 25 % des cellules dendritiques [6]. De plus, elles expriment faiblement les molécules HLA et les molécules d'adhésion, et leur capacité à produire l'IL-12 est réduite [7, 8]. Néanmoins, elles sont capables d'entrer en maturation et de produire des cytokines, si elles reçoivent les signaux pro-inflammatoires combinés appropriés, comme le LPS et l'IFN- $\gamma$  [9]. Les pDC, elles, représentent 75 % des cellules dendritiques du sang de cordon, mais leur production d'IFN- $\alpha$  en réponse au CpG est nulle [10]. Notre laboratoire a relevé une plus faible expression de molécules de la voie de signalisation menant à la production d'IFN- $\alpha$  (observations non publiées). Cette absence de production d'IFN- $\alpha$  peut expliquer la faible cytotoxicité des cellules NK du sang de cordon puisque nous avons observé que l'incubation de ces cellules avec l'IFN- $\alpha$  restaure leur activité cytotoxique (observations non publiées).

Les cytokines, produites au cours d'une réaction immunitaire, jouent un rôle clé dans la polarisation de la réponse adaptative vers Th1 ou Th2. De nombreuses études ont pu mettre en évidence une réduction significative du niveau de l'ARNm et une diminution de la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (de type Th1) par les cellules mononucléées du sang de cordon [11-15]. De plus, quel que soit le stimulus, la production d'IFN- $\gamma$  dans le sang de cordon est réduite [16]. Néanmoins, la modeste production de ces cytokines, comme l'IFN- $\gamma$ , peut être restaurée en incubant les cellules mononucléées du sang de cordon en présence d'IL-12 ou d'IL-15 [13, 14].

Comparées aux lymphocytes T du sang d'adulte, les cellules T du sang de cordon présentent aussi des différences fonctionnelles : signalisation diminuée *via* CD28 [17], diminution de l'expression de CD40 [18] et expression différentielle des récepteurs de cytokines [19]. Dans des réactions lymphocytaires mixtes, les cellules T du sang de cordon montrent une alloréactivité réduite comparée à celle de l'adulte [20]. Malgré ces différences, les cellules T du fœtus sont capables de monter des réponses contre un pathogène comparables à celles de l'adulte [21]. De plus, des tentatives cliniques de transplantation de foie fœtal ont montré que les cellules T transplantées induisent de manière systématique une réponse allogénique efficace contre les cellules du receveur [22]. De même, dans un modèle de transplantation hématopoïétique *in utero*, le rejet du donneur par les cellules T du fœtus receveur révèle la capacité des cellules T fœtales à déclencher des réactions allogéniques efficaces [23].



### Le sang de cordon : tolérant

La production de cytokines de type Th2 et l'abondance des cellules T régulatrices (Treg) suggèrent que le système immunitaire néonatal est caractérisé par une tolérance aspécifique. Le sang de cordon représente ainsi une excellente source de Treg et leur isolement y est plus facile. Caractérisées par l'expression concomitante des marqueurs CD4 et CD25 et un haut niveau de la protéine nucléaire FoxP3, les Treg régulent négativement les réponses immunitaires, notamment en inhibant la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup>. L'activité suppressive des Treg issus du sang de cordon est plus puissante et plus constante que celle des Treg issus de l'adulte [24]. Le phénotype de ces Treg est plus homogène que celui des Treg du sang d'adulte. Par ailleurs, les Treg ont été trouvés dans le thymus, la rate et les ganglions du fœtus humain dès la 14<sup>e</sup> semaine de gestation [25].

Plusieurs équipes ont montré que des cytokines de type Th2 sont produites en grande quantité durant la vie fœtale. L'IL-13 est produite abondamment par les cellules T néonatales [26]. De même, l'IL-10 est produite en forte quantité dans le sang de cordon, notamment par les cellules T et les cellules trophoblastiques du placenta [27]. De plus, les lymphocytes B CD5<sup>+</sup>, abondants dans le sang de cordon, sont de grands producteurs d'IL-10 [28]. Cette cytokine est capable d'induire l'apoptose des cellules dendritiques plasmacytoïdes [29] et de réduire leur production d'IFN- $\alpha$  en réponse à une stimulation virale [30]. Ainsi, le déficit fonctionnel complet des cellules dendritiques plasmacytoïdes que nous avons observé dans le sang de cordon pourrait être dépendant de l'IL-10. De plus, l'IL-10 inhibe l'activation des monocytes, des macrophages, des cellules T et NK et la production de cytokines de type Th1. L'IL-10 engendre une population de cellules T régulatrices capable de produire de grandes quantités d'IL-10 et de supprimer les réponses spécifiques à un antigène *in vivo* et *in vitro* [29].

### La greffe de sang de cordon

Les caractéristiques du système immunitaire du nouveau-né peuvent être mises à profit pour la greffe de sang de cordon. Utilisée depuis 1988 comme source de cellules souches hématopoïétiques [31], la greffe de sang de cordon a permis de traiter avec succès des déficits immunitaires congénitaux, des aplasies médullaires congénitales ou acquises, d'autres anomalies innées du métabolisme, ainsi que des hémopathies malignes (leucémies aiguës et chroniques).

La greffe de sang de cordon présente plusieurs avantages par rapport à une greffe de moelle osseuse non apparentée. Le principal avantage tient à la disponibilité du sang de cordon. Nous avons en effet rapporté que parmi les enfants en attente d'une greffe non apparentée, 68 % seulement trouvent un greffon si la recherche est restreinte à la moelle osseuse ; ce chiffre atteint 99 % si les greffons provenant de sang de cordon sont inclus dans la recherche [32, 33]. En effet, une moins grande compatibilité HLA entre donneur et receveur peut être acceptée pour une greffe de sang de cordon. De plus, la logistique de la greffe de sang de cordon est plus simple puisque celui-ci est cryopréservé dans des banques de sang, alors que la moelle osseuse doit

être prélevée à partir d'un donneur vivant juste avant la greffe. Nous avons ainsi démontré que le temps entre la prise de décision et la transplantation est beaucoup plus court avec le sang de cordon : 25 jours pour le sang placentaire contre 61 jours pour la moelle osseuse [32].

Un autre important avantage du sang de cordon est le faible taux de maladie du greffon contre l'hôte (GvH), complication parfois fatale de la greffe de cellules souches hématopoïétiques. La GvH est une réaction allogénique engendrée par le système immunitaire du donneur qui reconnaît comme étrangères les cellules du receveur. La moindre incidence et la moindre sévérité de la GvH dans les greffes de sang de cordon sont habituellement attribuées à la naïveté ou à l'immaturation du sang de cordon. L'attribution à la naïveté est illogique, puisque les réponses allogéniques ne nécessitent pas un premier contact avec l'antigène pour se développer, comme en témoigne *in vitro* la réaction lymphocytaire mixte. Nous avons discuté l'argument de la maturité plus haut : la plupart des différences entre système immunitaire néonatal et adulte se corrigent rapidement en fournissant un signal de stimulation de type Th1. Or, la greffe de sang de cordon, comme toute greffe hématopoïétique, est caractérisée par une production majeure de cytokines de type Th1 dès les premiers jours de greffe [34]. En revanche, le caractère tolérant du sang de cordon expliquerait le faible taux de GvH. L'équilibre Th1/Th2 est biaisé vers Th2 dans le sang de cordon, avec une forte production d'IL-10 par le cytotrophoblaste placentaire et par les cellules B CD5<sup>+</sup> néonatales [27, 28]. L'abondance de Treg pourrait également jouer un rôle. En effet, dans un modèle de greffe de moelle osseuse, appauvrie en Treg, on a constaté une augmentation significative du taux de GVHD [35].

### La mère, une allogreffe que le fœtus doit tolérer

La sensibilité du nouveau-né aux infections est habituellement attribuée à la naïveté ou à l'immaturation du système immunitaire néonatal. Nous avons vu que la naïveté ne peut pas expliquer cette extrême sensibilité aux pathogènes, et que des différences fonctionnelles existent mais qu'elles sont facilement réversibles par des signaux de type Th1. En revanche, le système immunitaire du nouveau-né est caractérisé par de puissants mécanismes de tolérance reposant sur l'existence conjointe d'un grand nombre de cellules T régulatrices et d'une forte production d'IL-10, partiellement d'origine placentaire. Ces propriétés particulières pourraient aussi expliquer le faible taux de GvH observé après greffe de sang de cordon. Plutôt qu'un déficit par



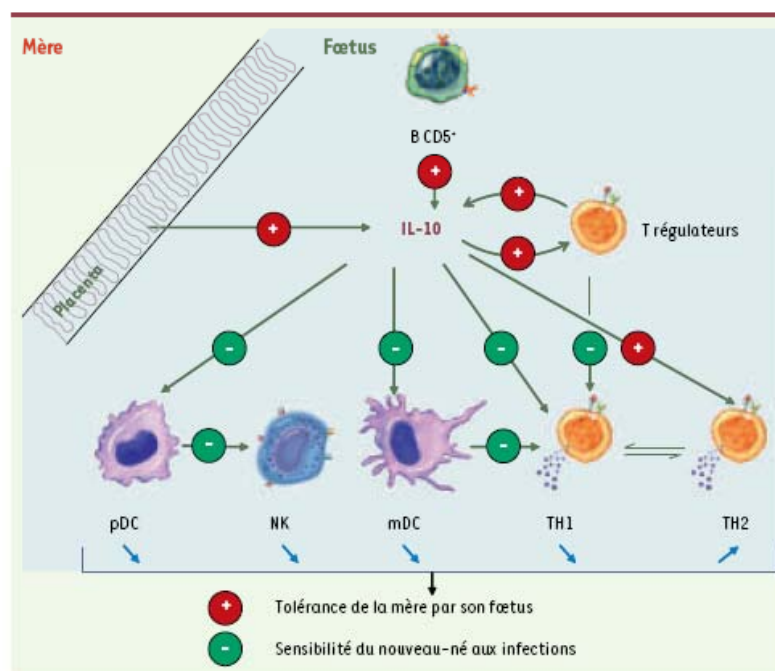
immaturité, nous émettons l'hypothèse qu'il s'agit d'un mécanisme actif d'origine placentaire, mécanisme où l'IL-10 joue un rôle-clé (Figure 1). Puisque durant la gestation, le système immunitaire maternel est exposé aux antigènes paternels présents dans le fœtus, P.B. Medawar a proposé le modèle de fœtus en tant qu'allogreffe [36]. Nous proposons le modèle symétrique, soit celui de la mère, considéré comme allogreffe à laquelle le fœtus doit être tolérant sous peine de provoquer la mort des deux protagonistes. En faveur de ce modèle, il est intéressant de noter que les cellules T du sang de cordon sont tolérantes aux antigènes HLA maternels *in utero*, que cette tolérance se poursuit jusqu'à 6 mois après la naissance [37] et que le trophoblaste des femmes enceintes en pré-éclampsie présente un déficit de production d'IL-10 [38]. La susceptibilité néonatale aux infections serait donc le prix à payer pour le bon déroulement de la grossesse, processus indispensable à la survie de l'espèce. ◊

## SUMMARY

### Neonatal immunology and cord blood transplantation

The increased susceptibility of human newborns to infections is usually ascribed to the immaturity of the neonatal immune system. The neonatal

immune system has never met microbial antigens, and thus the repertoire of its adaptative arm (T and B cells) is entirely pre-immune, or « naïve ». However this neonatal pre-immune repertoire is similar to the adult pre-immune repertoire, and cord blood natural killer cells studies show that the innate immunity cells harbor the full killing machinery that characterize mature cells. Moreover, human neonates are able to show an adult-like allogeneic response. Taken together, several lines of evidence suggest that the neonatal immune system, although naïve, is fully mature. However, newborns display phenotypic and functional differences with adults in both adaptative and innate arms. Specific properties may explain these differences, as high number of regulatory T cells, low plasmacytoid dendritic cell response to stimuli and high IL-10 production. These properties are in line with the high susceptibility of newborns to infections and the low incidence of graft-versus-host-disease after cord blood transplantation. To explain these differences, we introduce a new model. Although naïve, the neonatal immune system is mature, and these functional differences are due to a message originating from the placenta and aimed at inducing the foetus tolerance to its mother. Full understanding of the involved mechanisms will help to protect the newborn against infections and to improve cord blood transplantation outcome. ◊



**Figure 1.** La nécessaire tolérance du fœtus envers sa mère expliquerait la sensibilité du nouveau-né aux infections. L'IL-10 jouerait un rôle central dans cette tolérance. Produite par les cellules cytotrophoblastiques placentaires et les cellules B CD5<sup>+</sup>, cette cytokine régule négativement la fonction des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), les cellules naturelles tueuses (NK), les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et les cellules T effectrices (de type Th1) directement ou indirectement. Elle favorise la réponse des cellules Th2. Une boucle de rétroaction positive s'installe avec les cellules T régulatrices.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions nos collègues du groupe de recherche sur la transplantation et l'immunologie du sang de cordon du CHU Sainte-Justine (Caroline Alfieri, Christian Beauséjour, Martin Champagne, Elie Haddad, Nikolaus Heveker, Françoise Le Deist, Hugo Soudeyrs, Eric Wagner) et particulièrement le Dr José Menezes. Ce texte a été largement alimenté par leurs réflexions et soutenu par leurs encouragements. Ce travail a été possible grâce au généreux soutien de la Fondation Charles-Bruneau et du Fond de recherche en santé du Québec.



## RÉFÉRENCES

1. Theilgaard-Monch K, Raaschou-Jensen K, Palm H, et al. Flow cytometric assessment of lymphocyte subsets, lymphoid progenitors, and hematopoietic stem cells in allogeneic stem cell grafts. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28 : 1073-82.
2. Peggs KS, Verfuert S, D'Sa S, et al. Assessing diversity: immune reconstitution and T-cell receptor BV spectratype analysis following stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2003; 120 : 154-65.
3. Dalle JH, Menezes J, Wagner E, et al. Characterization of cord blood natural killer cells: Implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr Res* 2005; 57 : 649-55.
4. Rassi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005; 175 : 1373-81.
5. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005; 23 : 275-306.
6. Borrás FE, Matthews NC, Lowdell MW, Navarrete CV. Identification of both myeloid CD11c<sup>+</sup> and lymphoid CD11c<sup>+</sup> dendritic cell subsets in cord blood. *Br J Haematol* 2001; 113 : 925-31.
7. Hunt DW, Huppertz HJ, Jiang HJ, Petty RE. Studies of human cord blood dendritic cells: evidence for functional immaturity. *Blood* 1994; 84 : 4333-43.
8. Goriely S, Vincart B, Stordeur P, et al. Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. *J Immunol* 2001; 166 : 2141-6.
9. Knumbiegel D, Rohr J, Schmidtle P, et al. Efficient maturation and cytokine production of neonatal DCs requires combined proinflammatory signals. *Clin Dev Immunol* 2005; 12 : 99-105.
10. De Wit D, Ollislagers V, Goriely S, et al. Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns. *Blood* 2004; 103 : 1030-2.
11. Yan SR, Qing G, Byers DM, et al. Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide. *Infect Immun* 2004; 72 : 1223-9.
12. Chang M, Suen Y, Lee SM, et al. Transforming growth factor-beta 1, macrophage inflammatory protein-1 alpha, and interleukin-8 gene expression is lower in stimulated human neonatal compared with adult mononuclear cells. *Blood* 1994; 84 : 118-24.
13. Lee SM, Suen Y, Chang L, et al. Decreased interleukin-12 (IL-12) from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and upregulation of interferon-gamma, natural killer, and lymphokine-activated killer activity by IL-12 in cord blood mononuclear cells. *Blood* 1996; 88 : 945-54.
14. Qian JX, Lee SM, Suen Y, Knoppel E, et al. Decreased interleukin-15 from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and the effect of interleukin-15 in upregulating antitumor immune activity and cytokine production in cord blood. *Blood* 1997; 90 : 3106-17.
15. De WD, Tonon S, Ollislagers V, et al. Impaired responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 3 ligands in human cord blood. *J Autoimmun* 2003; 21 : 277-81.
16. Wilson CB, Westall J, Johnston L, et al. Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies. *J Clin Invest* 1986; 77 : 860-7.
17. Hassan J, O'Neill S, O'Neill LA, et al. Signalling via CD28 of human naive neonatal T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1995; 102 : 192-8.
18. Nonoyama S, Penix LA, Edwards CP, et al. Diminished expression of CD40 ligand by activated neonatal T cells. *J Clin Invest* 1995; 95 : 66-75.
19. Zola H, Fusco M, Macardle PJ, et al. Expression of cytokine receptors by human cord blood lymphocytes: comparison with adult blood lymphocytes. *Pediatr Res* 1995; 38 : 397-403.
20. Barbey C, Irian O, Helg C, et al. Characterisation of the cytotoxic alloresponse of cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22 (suppl 1) : S26-30.
21. Hermann E, Truysens C, Alonso-Vega C, et al. Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood* 2002; 100 : 2153-8.
22. Renda MC, Fecarotta E, Dieli F, et al. Evidence of alloreactive T lymphocytes in fetal liver: implications for fetal hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25 : 135-41.
23. Flake AW, Zanjani ED. *In utero* hematopoietic stem cell transplantation. A status report. *JAMA* 1997; 278 : 932-7.
24. Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG, et al. Cord blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 2005; 105 : 750-8.
25. Cupedo T, Nagasawa M, Weijer K, et al. Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. *Eur J Immunol* 2005; 35 : 383-90.
26. Ribeiro-da-Couto LM, Boeijs LC, Kroon JS, et al. High IL-13 production by human neonatal T cells: neonate immune system regulator? *Eur J Immunol* 2001; 31 : 3394-402.
27. Roth I, Cony DB, Locksley RM, et al. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med* 1996; 184 : 539-48.
28. O'Garra A, Howard M. IL-10 production by CD6 B cells. *Ann NY Acad Sci* 1992; 651 : 182-99.
29. Moore KW, de Waal MA, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19 : 683-765.
30. Payvand F, Amvute S, Fitzgerald-Bocarsly P. Exogenous and endogenous IL-10 regulate IFN-alpha production by peripheral blood mononuclear cells in response to viral stimulation. *J Immunol* 1998; 160 : 5861-8.
31. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321 : 1174-8.
32. Dalle JH, Duval M, Moghrabi A, et al. Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33 : 605-11.
33. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 1997; 337 : 373-81.
34. Holler E. Cytokines, viruses, and graft-versus-host disease. *Curr Opin Hematol* 2002; 9 : 479-84.
35. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2002; 196 : 401-6.
36. Medawar PB. Immunological tolerance. *Science* 1961; 133:303-6.
37. Harris DT, Schumacher MJ, LoCascio J, et al. Immunoreactivity of umbilical cord blood and post-partum maternal peripheral blood with regard to HLA-haploidentical transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14 : 63-8.
38. Rein DT, Breidenbach M, Honscheid B, et al. Preclamping women are deficient of interleukin-10 as assessed by cytokine release of trophoblast cells *in vitro*. *Cytokine* 2003; 23 : 119-25.

TIRÉS À PART  
M. Duval

REVUES



SYNTHÈSE

## **Revue 2: Complementary and Contrasting Roles of NK cells and T cells in Pediatric Umbilical Cord Blood Transplantations**

Merindol N., Charrier E., Duval M., Soudeyns H.

Accepté dans la revue *Journal of Leucocyte Biology*

**COMPLEMENTARY AND CONTRASTING ROLES OF NK CELLS AND T CELLS IN PAEDIATRIC UMBILICAL CORD BLOOD TRANSPLANTATION**

Natacha Merindol<sup>1,3,5,\*</sup>, Emily Charrier<sup>2,3,4,6,\*</sup>, Michel Duval<sup>2,3,4,7</sup>, Hugo Soudeyns<sup>1,3,5,7</sup>.

<sup>1</sup>Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine;

<sup>2</sup>Laboratoire d'immunologie du sang de cordon and <sup>3</sup>Groupe de recherche en transplantation et immunologie du sang de cordon (GRETISC), Centre de cancérologie Charles Bruneau, CHU Sainte-Justine; <sup>4</sup>Département d'héματο-oncologie, CHU Sainte-Justine; <sup>5</sup>Department of Microbiology and Immunology,

<sup>6</sup>Biomedical Sciences, and <sup>7</sup>Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. \*These authors contributed equally to this manuscript.

**Address correspondence to:** Hugo Soudeyns, Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Room 6735, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada. Phone: +1 514 345-4931 ext. 3907. Fax: +1 514 345-4794.

**Word count (text):** 4023 words. **Word count (abstract):** 110 words.

**Figure/table count:** 4 figures/2 tables. **Reference count:** 148 references.

**Scientific categories:** Immunobiology, transplantation.

**Keywords:** cord blood transplantation, NK cells, T lymphocytes, leukemia.

**ABBREVIATIONS PAGE**

UCB: umbilical cord blood  
UCBT: umbilical cord blood transplantation  
HSC: hematopoietic stem cells  
NMDP: National marrow donor program  
BM: bone marrow  
BMT: bone marrow transplantation  
HLA: Human leukocyte antigen  
MHC: major histocompatibility complex  
OI: opportunistic infection  
GvL: graft *versus* leukemia  
NK: natural killer  
ICAM-1: inter-cellular adhesion molecule 1  
IFN: interferon  
KIR: killer immunoglobulin-like receptor  
HE: homeostatic expansion  
TCR: T cell receptor  
DC: dendritic cell  
mHAg: minor histocompatibility antigen  
ATG: Anti-thymocyte globulin  
NIMA: non-inherited maternal antigen  
CMV: cytomegalovirus  
EBV: Epstein-Barr virus  
VZV: varicella-zoster virus  
APC: antigen presenting cell  
HSV: herpes simplex virus  
PD-1: programmed death-1  
CTL: cytotoxic T lymphocyte  
TGF: tumour growth factor  
LSA: leukemia-specific antigen  
AML: acute myeloid leukemia  
CML: chronic myeloid leukemia  
ALL: acute lymphoblastic leukemia  
LFA-1: lymphocyte function associated antigen 1  
MIC: MHC class I chain related protein

**ABSTRACT**

Umbilical cord blood (UCB) transplantation (UCBT) has been used for almost 25 years to treat a variety of malignant and non-malignant childhood diseases. The biological properties of NK cells and T cells and their implication in engraftment, immune reconstitution, opportunistic infections, leukemic relapse and graft versus host disease (GvHD) have been explored in the context of UCBT. These studies have established that lymphocytes have a major impact on outcome of UCBT and that NK cells and T cells play complementary and contrasting roles in immune reconstitution and the graft *versus* leukemia (GvL) effect. Therefore, novel strategies to improve outcome of UCBT recipients, including immunotherapeutic regimens, should be based on key immunologic features of UCB T lymphocytes and NK cells.

## INTRODUCTION

Umbilical cord blood (UCB) is increasingly being used in children as a source of haematopoietic stem cells (HSC) to treat malignant diseases, immunodeficiency, inborn errors of metabolism, and congenital or acquired anaemia [1-3]. In 2009, 1056 UCB transplantations (UCBT) were overseen by the National Marrow Donor Program (NMDP), representing 22% of the total number of NMDP transplants that year and an increase of 18% over 2008 [4]. UCBT has several advantages over unrelated bone marrow transplantation (BMT) (Table 1). One of the major advantages is the lower incidence of acute graft-*versus*-host disease (GvHD), allowing for greater human leukocyte antigen (HLA) disparity between donor and recipient [5, 6]. As a consequence, UCB grafts are readily available for 70 % of subjects who have no access to a compatible sibling's bone marrow. Other advantages include a lower risk of transmitting viral infections from donor to recipient [2, 7], improvement of ethnic balance by banking UCB rather than relying on volunteer donors, and shorter time from decision to transplant [8, 9]. In addition, risks for the donor are nonexistent. However, UCBT also has significant drawbacks (Table 1). First, the number of hematopoietic progenitors is limited, as UCB units contain 1 to 2 log<sub>10</sub> fewer nucleated cells than BM units [3]. For this reason, UCBT was initially restricted to paediatric patients. Second, myeloid reconstitution is slower following UCBT and engraftment is delayed [2, 5, 10, 11]. Third, opportunistic infections (OI) are a major cause of morbidity and mortality, particularly in the initial 100 days following UCBT [2, 12, 13]. Finally, the incidence of leukemic relapse (approximately 20 % at 2 years) and GvHD (approximately 20 % of acute and

chronic GvHD) impacts overall survival, even though these complications are less frequent than following BMT [6, 14, 15]. Hence, key challenges remain to overcome these limitations that include the development of novel immunotherapeutic strategies to improve engraftment and decrease the incidence of leukemic relapse without increasing the frequency or the severity of the GvHD. This review examines the properties of T cells and NK cells, with particular emphasis on their influence in engraftment, control of OIs, acute GvHD, and the graft versus leukemia (GvL) effect in paediatric UCB transplanted patients.

### **Reconstitution of T lymphocytes and NK cells following UCBT**

Previous studies on bone marrow and peripheral blood transplant recipients have established that rapid lymphocyte recovery is associated with better outcome [16-20]. In children, lymphoid reconstitution following UCBT resembles that which follows BMT [21-23] and is positively influenced by the CD45<sup>+</sup> cell dose contained in the UCB units [24]. The phenotype of NK cells from UCB is different from that of their adult counterparts (Table 2): they express low levels of ICAM-1, CD161, CD57, CD8, and killer immunoglobulin-like receptors (KIR), and higher levels of NKG2A, IFN- $\gamma$ , granzyme B and perforin. These cells are highly responsive to stimulation by IL-2, IL-7, IL12, IL-15, and IL-18. They possess high proliferative capacity but low cytotoxicity in absence of these cytokines [25, 26]. UCB NK cells undergo extensive homeostatic expansion (HE) and their counts reach normal levels as early as 1 month post-transplantation [10, 20, 21, 27, 28]. They may represent up to 80% of peripheral blood lymphocytes during the first 100 days post-transplant (Figure 1). Early NK cell

recovery is characterized by a transient predominance of CD56<sup>bright</sup> lymphocytes (precursors of CD56<sup>dim</sup> NK cells). These cells preferentially express inhibitory receptor NKG2A, are poorly cytolytic, but possess a high potential for production of cytokines, including interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [27, 29-31]. Functional CD56<sup>dim</sup> KIR<sup>+</sup> NK cells then emerge that can express both perforin/granzyme and Fas/FasL-mediated cytotoxic activity [23, 32]. Overall, NK cell recovery following UCBT is generally rapid and complete in quantitative and qualitative terms.

UCB T cells are predominantly of a naïve phenotype and their repertoire is fully diversified (Table 2) [33, 34]. In lymphodepleted hosts, the overwhelming majority of T cells that emerge during the first 100 days post-UCBT are peripherally-expanding graft-derived T lymphocytes (Figure 1). By itself, HE generates a narrow T cell repertoire with skewed distribution of T cell receptor (TCR)  $\beta$  chain CDR3 length, repertoire in which normal levels of clonal diversity are never attained [35, 36]. Furthermore, HE leads to the differentiation of naïve T cells into terminally-differentiated effectors (EMRA; CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) that display significant cytotoxic activity but an enhanced susceptibility to apoptosis [34, 37]. This contrasts with the largely « memory-like » phenotype (CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) of T cells observed early on following BMT [35, 38, 39]. Moving forward from the 100-days window, naïve CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T cells become progressively more prevalent, as a second wave of T cells repopulate the periphery as a result of *de novo* thymopoiesis (Figure 1). Thymus-dependent T cell reconstitution is gradual and the numbers of thymus-derived T cells usually do not reach normal range until 9 months following



UCBT, although normal proliferative responses to mitogens are typically reached at 6 months [10]. In the absence of significant GvHD, this pathway leads to the restoration of a functional T cell compartment, with full repertoire diversity generally achieved within 1 year in paediatric recipients [22, 23, 36, 40, 41]. Interestingly, Talvensaari *et al.* observed that greater TCR repertoire diversity was attained in UCBT recipients as compared with BMT recipients 2 years after transplant [40]. This could be related to the fact that lymphoid, myeloid and endothelial progenitors present in UCB differentiate more efficiently than their BM counterparts, leading to efficient thymopoiesis and qualitative improvements in the peripheral T cell repertoire [41-44]. Thus, while early T cell reconstitution following UCBT is qualitatively different in terms of subset composition, as compared to what is observed after BMT, both HSC sources generally lead to the generation of a diversified T cell compartment in the long term.

#### **Involvement of T and NK cells in engraftment and graft failure.**

Efficient immune reconstitution requires engraftment of donor-derived HSC and their maintenance in the graft recipient. Graft failure may result from lack of initial engraftment and/or from the loss of donor cells subsequent to engraftment (graft rejection). Engraftment failure is usually a direct consequence of low cellular dose, including lymphocytes [2, 7]. As the majority of UCBT involve HLA mismatch and low HSC dose, engraftment (measured by neutrophil and granulocyte reconstitution) is delayed and graft failure is a comparatively frequent complication (10-15% following UCBT *versus* 1-2% following BMT) [6, 14]. Increasing the cellular dose

by transplanting double, partially matched UCB units leads to significant improvements in hematologic recovery in older children and adults even if immune reconstitution remains problematic [49-53].

In contrast, graft rejection is an active process that leads to the elimination of donor cells following their recognition as non-self (recognition of HLA and/or minor histocompatibility antigens [mHAg]). T lymphocytes and NK cells from the *recipient* can actively impair the engraftment of donor HSC and part of the conditioning regimen aims to deplete recipient lymphocytes to avoid graft rejection [47, 54, 55]. Anti-thymocyte globulin (ATG) is routinely administered as part of the conditioning regimen to deplete recipient T cells [48]. Meanwhile, T lymphocytes and NK cells from the *donor* have a positive impact on engraftment, as both total nucleated cell dose and CD45<sup>+</sup> cell counts are predictive of the kinetics of myeloid engraftment following UCBT [2]. In mice, infusion of activated NK cells early after BMT is associated with faster engraftment and decreased rates of graft failure [56-58]. This effect has been attributed to the cytotoxic activity of NK cells directed against recipient hematopoietic cells. NK cell cytotoxicity is triggered when inhibitory KIR no longer recognize the presence of self HLA class I at the surface of potential target cells [59]. Work on mouse models and clinical studies alike demonstrated that when KIR and KIR ligands are mismatched, alloreactive donor NK cells facilitate engraftment by killing recipient antigen presenting cells (APCs) and T cells that survived the conditioning regimen [60]. Hence, donor NKs can improve the rate of successful engraftment and accelerate its kinetics following HSCT. Whether such an

effect can be observed in humans in the context of UCBT is presently unclear [61, 62]. Indeed, Willemze *et al.* reported no beneficial effect of KIR-ligand mismatch on engraftment or chimerism following UCBT [61]. Nevertheless, UCB NK cells are competent to trigger alloreactive cytotoxicity, as baseline expression levels of granzyme B and perforin *ex vivo* are higher in UCB NK cells as compared to adult NK cells and levels of IFN- $\gamma$  production are similar. While cytolytic activity displayed by fresh non-stimulated UCB NK cells is significantly inferior to that of adult NK cells (Table 2) [63], this activity can be readily restored by stimulation with IL-2, IL-12 and IL-15 and is enhanced by direct cell-surface binding of ATG [63-67]. Moreover, *ex vivo* expansion with IL-2 enables UCB NK cells to form lytic immunological synapses [68]. Thus, KIR-KIR ligand mismatch protocols and/or pre-treatment of the UCB graft or isolated lymphocyte subsets with cytokines could represent potential immunotherapeutic means to improve both the rate and the kinetics of engraftment following UCBT.

CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell doses in the graft were positively correlated with engraftment in UCBT recipients [69, 70]. Similar to NK cells, T lymphocytes of donor origin contribute to the prevention of graft rejection by depleting residual immunological effectors in the graft recipient, leading to efficient establishment of complete donor chimerism that eases achievement of full immune recovery [71]. T cells also facilitate engraftment at and beyond the level of HSCs, an effect that could involve T cell-derived cytokines, cell-to-cell contact, and/or stimulation of HSC differentiation [71-74]. Engraftment can be accelerated by matching recipients for the donor's non-

inherited maternal HLA antigens (NIMA), suggesting that NIMA-specific T cells present in UCB are activated upon re-exposure to cognate antigen in the recipient, though the mechanism(s) involved must be further investigated [75]. On the other hand, T cell function depends on antigen specificity and can be deleterious. Muller *et al.* recently reported that mature T cells specific for a minor antigen present in the graft inoculum delayed HSC engraftment [76]. However, this would be unlikely to occur in UCBT, where the large majority of T lymphocytes display a naïve phenotype. Because the capacity of T cells and NK cells to facilitate engraftment largely depends on the numbers of cells transferred into the recipient [6], new strategies to improve UCB engraftment should involve treatments that selectively eliminate host immune effectors while sparing donor-derived T and NK cells.

### **T cells, NK cells and the control of opportunistic infections.**

UCBT is associated with increased risks of OI, accounting for > 50% of the mortality following UCBT in children, with the majority of events occurring within the 100-days window [2, 13]. Beyond this point, OI-related mortality in UCBT recipients equates that observed in HLA-matched or one-mismatch BMT recipients [2, 13]. Hence, procedures aimed at reducing OI-associated morbidity and mortality should principally target the 100-days window [77]. Bacteria are frequent causes of OI after UCBT and risks are higher in patients with graft failure, highlighting the importance of proper immune reconstitution [13, 78] (Figure 1). Viral infections with cytomegalovirus (CMV) and Epstein-Barr virus (EBV) are particularly prevalent in the immediate post-transplant period. Up to 20% of UCBT recipients experience

CMV infections associated with unfavorable outcomes in the first 6 months post-transplant, a higher proportion than that observed following BMT [79]. UCBT recipients are also at higher risk of developing adenoviral infections [82]. In addition, *de novo* infection or reactivation of varicella zoster virus (VZV) occurs in as much as 63% of UCBT recipients, and takes place more frequently--and later--than following BMT [80, 81]. UCBT recipient with rapid recovery of absolute lymphocyte counts have a lower risk of OIs, highlighting the role of lymphocytes in fighting infection [78, 83]. However, comparative studies suggest that there is no significant difference in the incidence of severe fungal infections among children following UCBT or BMT [13, 78], suggesting that immunological impairment of the T cell compartment observed following UCBT is restricted to specific components of the T cell repertoire.

Higher NK cell doses in BM or peripheral blood grafts were associated with decreased incidence of viral OIs [84, 85]. Given the rapid functional NK reconstitution following UCBT, an efficient NK-mediated control of viral infections would be expected in UCBT recipients. However, while KIR-ligand mismatch generally has a positive effect on outcome of allogeneic HSCT, two recent studies on comparatively large series showed increased frequency of OI-related mortality in KIR-ligand mismatched UCBT recipients, a difference which in one case reached statistical significance [61, 62]. Thus, efficient NK cell recovery in a KIR-mismatched context may in fact aggravate OI-associated outcomes, perhaps *via*

destruction of host APCs and/or interference with T cell recovery (competition for growth factors).

100 days roughly corresponds to the time required for T cells generated *de novo via* thymopoiesis to become detectable in transplanted subjects. Similar to what is observed in BMT, UCB-derived T cells could theoretically provide protection against OIs during the time required for emerging post-thymic T cells to begin replenish the peripheral pool. In a longitudinal analysis of T cell responses to *Herpes simplex* virus (HSV), VZV and CMV in children with malignancies over the first 4 years post-UCBT, Cohen *et al.* reported that 43 % of UCBT recipients developed T cell responses against 1 or more of these pathogens during the 100-days window, and that the presence of these responses decreased the likelihood of OI-related mortality in UCBT recipients [86]. These results indicate that naive T lymphocytes transferred in the UCB graft can give rise to antigen-specific T cell-mediated immunity *before* thymic recovery. However, the protection afforded by these inoculum-derived T cells is not entirely effective. One possible explanation is that HE of UCB-derived T lymphocytes during immune reconstitution leads to the formation of a skewed T cell repertoire with limited responsiveness against newly-encountered antigens. Increased expression of programmed death 1 (PD-1) could also be responsible for functional impairment of T lymphocytes. This was observed in CMV disease following allogeneic HSCT, consistent with apoptosis and/or clonal exhaustion of graft-derived CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell effectors [87, 88]. Finally, the higher incidence of VZV disease following UCBT *versus* BMT and its delayed presentation (*i.e.* past the 100-

days window) are puzzling. It is possible that the late manifestations of VZV-associated OIs reflect the role of T lymphocytes in the pathogenesis of *Herpes zoster* as opposed to a problem related to functional reconstitution of the T cell compartment *per se* [80, 81]. Indeed, T cells can be productively infected with VZV and are thought to mediate transfer of the virus from the dorsal root ganglia to other peripheral sites during cutaneous and visceral VZV dissemination [89-94].

In summary, the incidence of OIs is high during the first 100 days post-UCBT despite early and functional NK recovery. This highlights the limited participation of NK cells in antiviral defences, even in the context of KIR mismatch. The relative antiviral efficacy of UCB-derived T lymphocytes observed in some patients provides experimental support for the development of strategies to improve protection against OIs by exploiting the antimicrobial potential of UCB T cells. In particular, protocols based on adoptive transfer of T cell lines or clones to protect HSCT recipients against common OI-associated pathogens during the early post-transplant period have achieved a measurable degree of success [95-100]. Approaches aimed at accelerating T cell reconstitution should likewise be investigated.

### **Involvement of T and NK cells in GvHD.**

Acute GvHD develops in 3 phases: a) host tissues are damaged by inflammation resulting from conditioning regimens; b) recipient and donor-derived APCs and inflammatory cytokines trigger activation of donor-derived T cells, which expand into differentiated effectors; and c) activated donor T cells mediate cytotoxicity

against host target cells (Figure 2) [101, 102]. Acute GvHD is thought to represent a Th1/Tc1 type of immunopathology based on the predominance of cytotoxic T lymphocyte (CTL)-mediated tissue injury and of increased production of Th1 cytokines, including IL-2, IL-12, and IFN- $\gamma$  [103]. All UCBT recipients receive GvHD prophylaxis (typically cyclosporine A and/or methotrexate and methylprednisolone). However, while efficient at preventing GvHD, these pharmaceutical agents impair the functional reconstitution of T cells and may have an impact on engraftment and on the incidence of opportunistic infections and leukemic relapse [104, 105]. In the first 100 days post-transplant, incidence and severity of acute GvHD are lower in paediatric UCBT recipients as compared to recipients of HSCT from unrelated donors, in spite of higher levels of HLA mismatch in UCBT [5, 106, 107]. This observation may simply be related to the  $\sim 1 \log_{10}$  lower nucleated cell dose used in UCBT. The overwhelming majority of T lymphocytes present in UCB are naïve, show little baseline cytotoxicity, and exhibit atypical functional properties. Indeed, they secrete lower levels of IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$  *in vitro*, and express lower levels of granzyme and perforin, molecules that are hallmarks of T<sub>H</sub>1 responses [108]. Based on their production of high levels of IL-13, UCB T cells also exhibit an anti-inflammatory T<sub>H</sub>2/T<sub>C</sub>2 bias [109]. Following mitogen stimulation, a larger proportion of UCB-derived T cells express a terminally-differentiated phenotype (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) and a lower proportion exhibits bifunctional properties (*i.e.* cytolytic activity and IFN- $\gamma$  production) than T cells derived from adult blood [34]. In addition, when placed in an HLA-mismatched context, UCB CD8<sup>+</sup> T cells display a subdued phenotype following antigenic stimulation (*i.e.* clonal exhaustion, reduced



cytolytic activity and IFN- $\gamma$  production) [34]. Finally, regulatory T cells present in the UCB could also contribute to the suppression of alloreactivity [110-112]. Thus, variant phenotype and biological functions of UCB-derived T lymphocytes are compatible with the reduced incidence of acute GvHD observed following UCBT.

NK cells are thought to play a beneficial role in the prevention of GvHD. In mice, adoptive transfer of IL-2-activated NK cells early after transplant inhibits GvHD, and this protective effect is dependent on TGF- $\beta$  [113]. Consistent with this, Ruggeri *et al.* showed that infusion of donor NK cells eliminates recipient APCs, effectively limiting T cell activation that would ultimately lead to GvHD [60]. Recently, Olson *et al.* demonstrated in a mouse model that NK cells prevented GvHD by directly inhibiting and/or killing autologous activated alloreactive T cells [114]. Clinical studies have tried to take advantage of this property of NK cells by mismatching KIR and KIR ligand between donors and recipients, leading to a clear reduction in the incidence of GvHD following BMT in adults [60]. However, two recent clinical trials failed to find such a beneficial impact of KIR-ligand mismatch in UCBT [61, 62]. In fact, Brunstein *et al.* even established that it led to a significantly higher incidence of grade III-IV acute GvHD following reduced intensity conditioning [62]. These adverse events were accounted for by the large variety of underlying diseases, by the use of double UCBT in this particular study group, and/or by the fact that only one-third of the subjects received ATG as part of their conditioning regimen, suggesting that KIR-ligand mismatch-mediated inhibition of GvHD was at least partly dependent on T cell depletion [115]. Other possible explanations include: a)

preferential expansion of NK cells in presence of T cell depletion leading to NK-mediated alloreactivity and reduced incidence of GvHD; and b) expression of KIR ligands by certain T cell subsets leading to increased GvHD in absence of T cell depletion. Additional studies will be required to sort out these alternatives.

### **Roles of T and NK cells in GvL.**

Given that subjects transplanted with UCB receive  $1 \log_{10}$  fewer lymphocytes than BMT recipients, that the vast majority of UCB T cells are naïve, and that the incidence of GvHD is lower after UCBT, concerns were raised regarding the ability of UCB-derived lymphocytes to mediate GvL reactions. In fact, the risk of leukemic relapse is equal or even lower in UCBT *versus* BMT recipients [6, 14, 116]. Factors associated with relapse after UCBT include recipient CMV seropositivity [6], 6/6 donor-recipient HLA match [2] and delayed recovery of antiviral immune responses [117], all of which suggest active participation of T and/or NK cells in GvL.

Both  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T cells can mediate Ag-specific cytotoxicity directed against leukemic cells. They recognize three classes of Ag: a) broadly-expressed mHAg [118, 119]; b) mHAg that are uniquely expressed by cells of the hematopoietic lineage; and c) leukemia-specific Ags (LSA), such as Wilms' tumor-1 (WT-1), preferentially expressed Ag of melanoma (PRAME), or fusion proteins (*e.g.* BCR-ABL) [120-123]. UCB is comprised of a diversified T cell population that may include mHAg-specific T cells (Figure 3) [124]. Evidence that T cells are implicated in GvL initially stemmed from the fact that full donor T cell chimerism is crucial for

preventing relapse [125, 126]. Moreover, Cohen *et al.* reported that patients exhibiting herpes virus-specific proliferative T cell responses at any time in the first 3 years following unrelated UCBT had a lower incidence of leukemic relapse and a higher overall rate of survival [86]. In addition, matching for NIMA was associated with reduced incidence of UCBT-related mortality and post-transplant relapse, suggesting that UCB T cells recognized and killed recipient leukemic cells [75]. While UCB T cells may protect against leukemic relapse in the early post-transplant period, their contribution to GvL is expected to increase over time as a result of thymic reconstitution. Together, these data indicate that improvement of T cell reconstitution should lead to improvements in outcome. The development of methods to selectively expand, activate, and use antitumoral T cells derived from UCB as components of adoptive immunotherapeutic regimens continues to be actively pursued [97, 127-131]. As immunotherapy shows optimal efficacy when residual malignancy is minimal, adoptive transfer of UCB-derived T cells should be performed early during the post-transplant period.

One limitation of T cell-mediated antitumoral immunity resides in the capacity of cancer cells to down-regulate cell surface MHC class I expression, leading to reduced target cell recognition by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Fortunately, this process sensitizes tumour cells to NK-mediated killing (Figure 3A). Alloreactive NK cells can kill various types of leukemic cells, including acute myeloid leukemia (AML), chronic myeloid leukemia (CML), and several types of myeloma [132]. However, *in vitro* studies showed that tumour cells from acute lymphoblastic leukemia (ALL), the most

common tumour of hematopoietic origin in children, resist NK cell cytotoxicity [133]. Resistance is associated with lack of leukocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) expression at the surface of leukemic cells and with reduced expression of MICA/MICB, two ligands of activating receptor NKG2D (Figure 3B) [134]. Strategies to enhance expression of MICA and MICB on leukemic cells (chromatin remodelling) or stimulatory receptors on NK cells (genetic modification of primary NK cells) were tested to counteract this resistance [135, 136]. KIR-KIR-ligand mismatch was also attempted to enhance the GvL potential of NK cells in HSCT recipients (Figure 3A). In the Eurocord-Netcord study, based on 218 children with acute leukemia, NK cell-mediated alloreactivity in unrelated UCBT was associated with significantly reduced incidence of relapse and heightened leukemia-free survival [61]. In contrast, Brunstein *et al.* showed that KIR-ligand mismatch had no significant effect on the relapse rate and overall survival following UCBT that involved myeloablative or reduced-intensity conditioning regimens [62]. Once again, T cell depletion (mediated by ATG) was a *sine qua non* condition to set NK-mediated GvL in motion (Figure 3B and Figure 4). Interestingly, Dalle *et al* demonstrated that ATG binds directly to NK cells and increases their production of IFN- $\gamma$  [64]. A higher nucleated cell dose in the graft and the absence of memory T cells were also associated with improved effectiveness of KIR-ligand mismatch to prevent leukemic relapse [137-140]. These data suggest that lack of competition by T cells for growth factors (IL-2, IL-7, and IL-15) leads to enhanced NK-mediated GvL following UCBT (Figure 4). NK alloreactivity was also documented in HLA-identical donor-recipient pairs without KIR-ligand mismatch, indicative of the possible involvement of other

pathways of NK cell activation [140-142]. On the whole, NK cells appear to exert their major anti-leukemic effect during the first 3 to 6 months post-transplant, when competition by T cells for cytokines is minimal. UCB-derived NK cells can be expanded up to 20-fold *ex vivo* and differentiate into mature cytolytic cells that could be potentially useful as an immunotherapeutic modality aimed at preventing leukemic relapse *via* enhancement of GvL [143, 144].

### **CONCLUDING REMARKS**

UCB has gained widespread acceptance as a source of progenitor cells for HSCT, but many challenges remain. Engraftment must be improved, the incidence of graft failure has to be reduced, and myeloid and neutrophil reconstitution must be accelerated (Figure 4). One obvious means by which this could be achieved would be to increase cell dose. Since 2005, transplantation of double UCB units has been used to treat older children and adult patients in absence of fully matched BM donors [51]. Interestingly, only one of the two UCB units usually engrafts, a process that appears to be driven by CD8<sup>+</sup> T cells derived from the engrafting unit responding against the non-engrafting unit [145]. This observation emphasizes the importance of donor lymphocytes for achieving successful engraftment. Another serious challenge relates to the comparatively high incidence of OIs following UCBT. In theory, the absence of memory T cells in the UCB graft should represent a real handicap when rapid and optimal adaptive immune responses need to be mobilized. In practice, a number of studies have now established that UCB-derived T lymphocytes are not intrinsically « immature » but are instead capable of mounting effective cytotoxic T cell responses

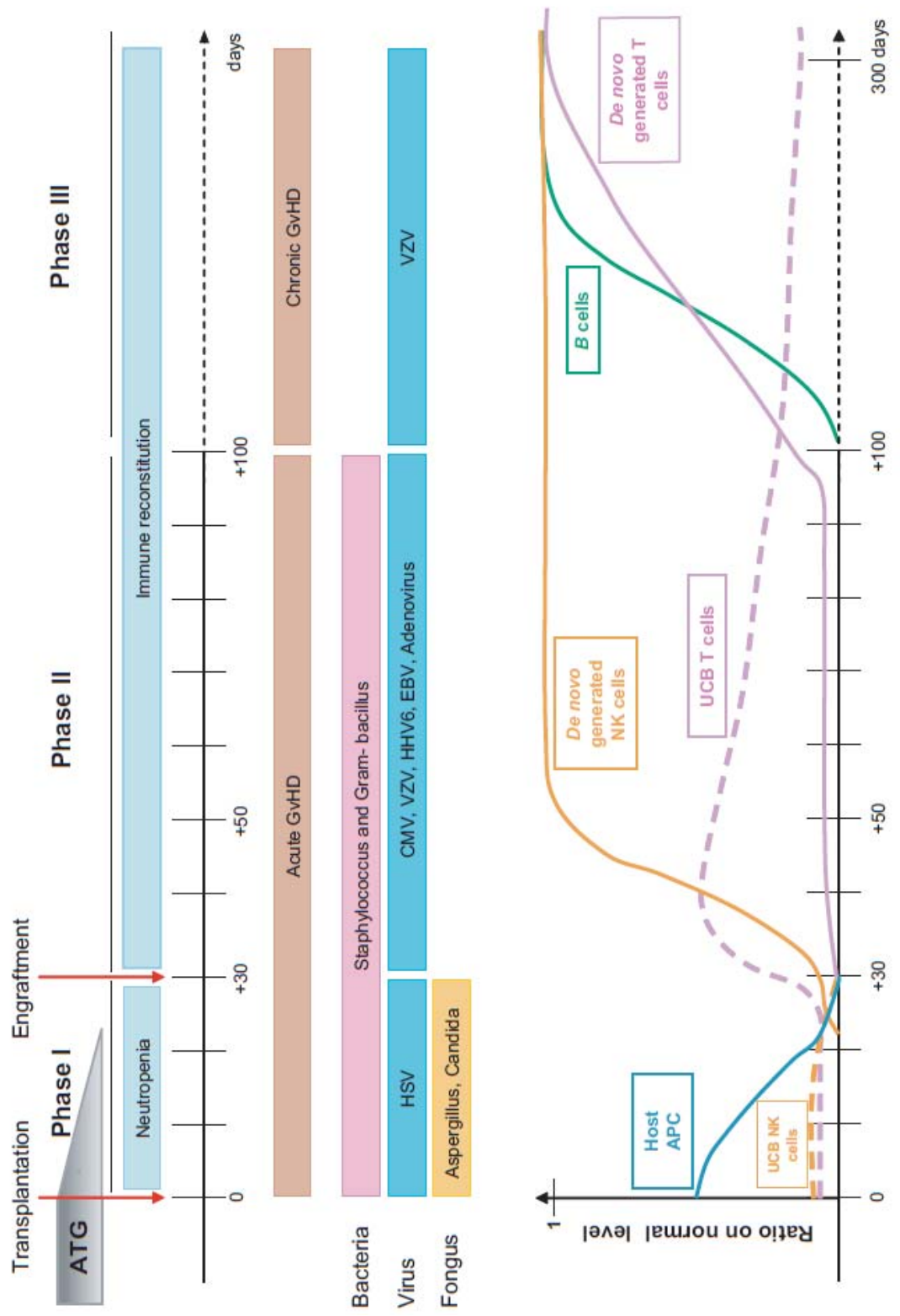
in a variety of settings [34, 124, 146-148]. Novel strategies to expand and/or promote the maturation and differentiation of UCB-derived T lymphocytes have shown promise for the control of « early » virally-associated OIs (EBV, CMV, adenovirus) during the 100-days high-risk window [97, 98]. Analogous procedures could be developed for dealing with « late » OIs such as VZV. Moreover, alternatives to ATG conditioning that would spare UCB-derived virus-specific T cells should be further explored.

Incidence of acute GvHD is comparatively low following UCBT, but it remains a clinically significant complication of the procedure. Leukemic relapse is also a major concern. Donor-recipient KIR and/or NIMA mismatch should continue to be examined as a possible means to benefit from the properties of NK cells and T cells that are associated with the prevention of GvHD and with effective GvL. The generation of UCB-derived anti-leukemic T cells and their storage for future use also represents a promising approach to improve UCBT outcomes in the high-risk window.

In the context of paediatric UCBT, T cells and NK cells fight on different frontlines. Whereas the control of « early » and « late » OIs is primarily mediated by UCB-derived and *de novo* generated T cells, NK cells contribute chiefly to the prevention of both leukemic relapse and acute GvHD. The complementarity between these two cell subsets should be taken advantage of in the context of novel, integrated

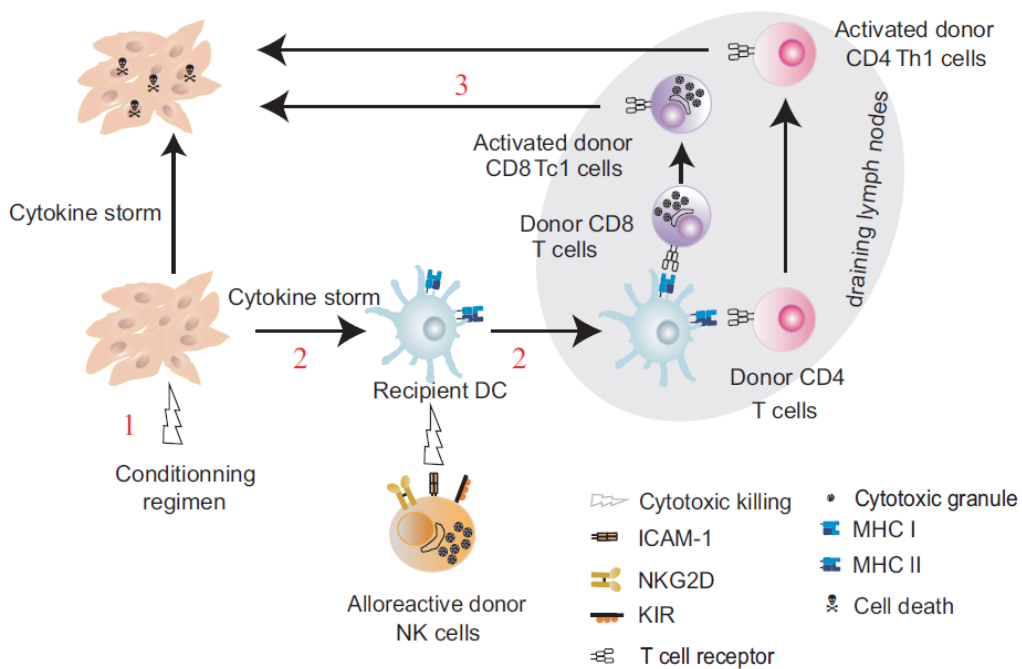
immunotherapeutic strategies aimed at improving engraftment, accelerating immune reconstitution, and mitigating complications in UCB transplanted patients.

Merindol et al., Figure 1

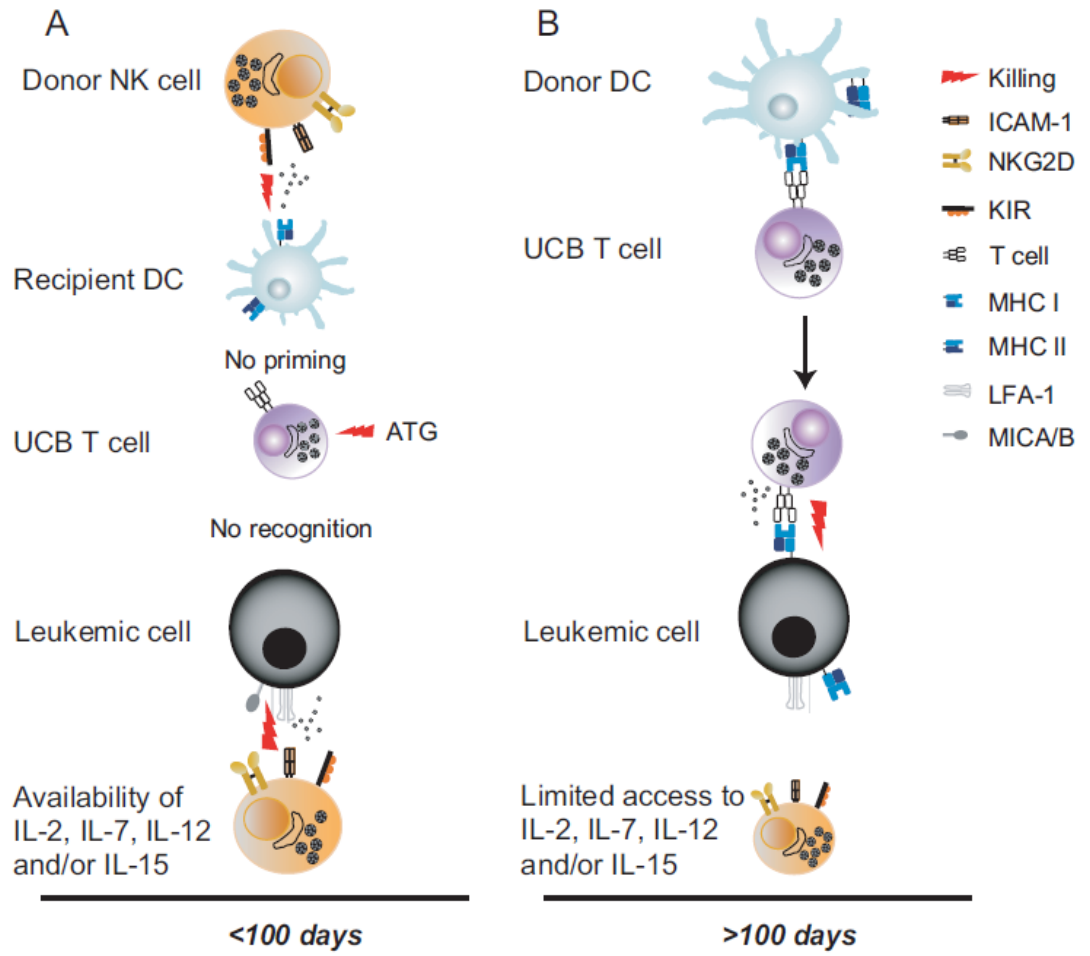


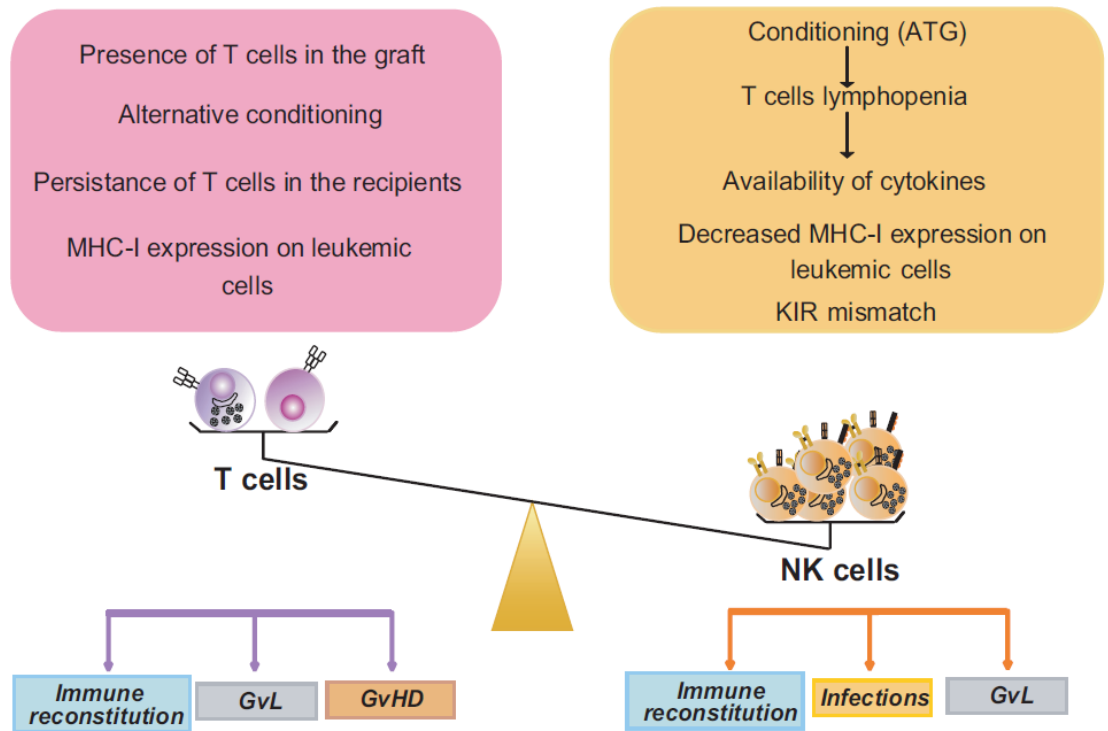


Merindol et al., Figure 2.



Merindol *et al.*, Figure 3.



Merindol *et al.*, Figure 4.

## LEGENDS TO TABLES AND FIGURES

### **Table 1: Advantages and disadvantages of umbilical cord blood transplantation compared to other sources of hematopoietic stem cells.**

HLA: human leukocyte antigen; GvHD: graft *versus* host disease; DLI: donor lymphocyte infusion.

### **Table 2: Properties of T cells and NK cells from umbilical cord blood as compared to cells from adult peripheral blood.**

NK: natural killer cells; Gr: granzymes; GrB: granzyme B; ICAM-1: inter-cellular adhesion molecule 1; IFN- $\gamma$ : interferon gamma; Th2/Tc2 T helper and T cytotoxic type 2; NFATc2: nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 2.

### **Figure 1: Kinetics of immune reconstitution and transplant-related complications in children following umbilical cord blood transplantation.**

The post-transplantation period can be divided in 3 phases. The pre-engraftment period (phase I, days 0-30) is characterized by general immunosuppression (*i.e.* depletion of lymphocytes in the recipient by anti-thymocyte globulin [ATG]), neutropenia, low platelets counts, and high susceptibility to fungal infections. Host residual antigen-presenting cells progressively disappear during phase I. Massive proliferation leads NK cells to reach normal levels within one month post-transplantation. They may represent 80% of the recipient's peripheral blood lymphocytes during the post-engraftment period (phase II; days 30-100). During phase II, patients experience high susceptibility to bacterial infections, viral

infections (*i.e.* cytomegalovirus [CMV]), and acute graft-*versus*-host disease (GvHD). Some umbilical cord blood T cells are believed to persist in the recipient and proliferate through homeostatic expansion. This period culminates with the *de novo* generation of T cells through thymopoiesis and the end of the 100-days high-risk window. The late phase (phase III) is characterized by a higher incidence of varicella-zoster virus (VZV) infection/reactivation and a progressive reconstitution of B cell and T cell subsets that can reach normal levels at 6-9 months post-transplant.

**Figure 2: Contrasting role of T cells and NK cells in the physiopathology of acute graft-*versus*-host disease following umbilical cord blood transplantation.**

The physiopathology of acute GvHD is relatively well understood. Acute GvHD occurs rapidly after HSCT (*i.e.* during the first 100 days). This period is characterized by a state of immune reactivity promoted by conditioning-induced lymphopenia, which damages host tissues and initiates a « cytokine storm » (Step 1). This in turn activates the recipient's dendritic cells (Step 2) that migrate into draining lymph nodes where they present antigens and activate donor CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. These are the major effectors of acute GvHD as they directly lyse host cells (Step 3). In contrast, NK cells prevent acute GvHD by eliminating recipient dendritic cells. The lower incidence and severity of acute GvHD following UCBT is generally attributed to the lower alloreactivity of UCB T cells. Rapid emergence of functional NK cells following UCBT concomitantly with T cells lymphopenia may also contribute to the lower incidence of acute GvHD.

**Figure 3: Involvement of T cells and NK cells in the graft-versus-leukemia effect.**

Both T and NK cells are critical for the prevention of leukemic relapse. In A, residual ATG and GvHD prophylaxis impair T cells reconstitution during the first 100 days post-transplantation. T cells do not compete with NK cells, which find the necessary cytokines to support their proliferation and activation. Donor-derived NK cells kill residual recipient DCs, interfering with T cell-mediated GvL. NK cells anti-tumoral cytotoxicity is further enhanced in the context of a donor-recipient KIR-KIR ligand mismatch and/or when leukemic cells lack MHC-I but express MICA/MICB at their surface. In B, following 100 days post-transplantation, reconstituted T cells compete with NK cells for key cytokines (*i.e.* IL-2, IL-7, IL-12, IL-15). NK cells no longer kill autologous donor-derived DCs presenting tumour Ags, which can efficiently prime T cells. MHC-I-expressing leukemic cells are recognized and killed by primed T cells. KIR: killer immunoglobulin-like receptor; ICAM-1: inter-cellular adhesion molecule 1; DC: dendritic cells; MHC: major histocompatibility complex; LFA-1: leukocyte function-associated antigen 1; UCB: umbilical cord blood; ATG: anti-thymocyte globulin. GvL: graft-versus-leukemia effect.

**Figure 4: NK cells, T cells and outcome of umbilical cord blood transplantation.**

This figure highlights the complementary and contrasting roles of NK cells and T lymphocytes in graft failure, immune reconstitution, opportunistic infections, GvL, and GvHD. When T cells are present, they compete for IL-7 and IL-15, limiting their availability for NK cells. Alternative conditioning (less severe depletion of T lymphocytes), efficient thymopoiesis and expression of MHC-I on leukemic cells

favour the development of T cell-mediated immunity. T cells may prevent graft failure, promote immune reconstitution, protect against opportunistic infections and leukemic relapse. However, they may induce GvHD. Following UCBT, equilibrium shifts towards NK cells. Indeed, the T cell lymphodepletion triggered by the use of anti-thymocyte globulin (ATG) and the absence of memory T cells in the graft enable NK cells to find required cytokines in sufficient amounts. Moreover, lack of MHC-I expression on leukemic cells and KIR-KIR ligand mismatch are favourable conditions for NK-mediated alloreactivity while being detrimental to T cell function. The presence of efficient alloreactive NK cells may prevent graft failure, improve immune reconstitution, fight leukemic relapse and prevent GvHD. On the other hand, NK cells are incapable of preventing opportunistic infections and KIR-KIR ligand mismatch may even aggravate OI-related mortality. Immunotherapy based on the presence of these cells in the recipient or on their *in vitro* expansion should favour GvL without inducing GvHD. However, the relative inefficacy of NK cells at fighting off OIs argues for the use of immunotherapeutic modalities based on T lymphocytes, at least as long as GvHD can be kept under control.

#### **ACKNOWLEDGEMENT**

Sabine Herblot, Armelle Le Champion

## REFERENCES

1. Gluckman, E., Broxmeyer, H. A. , Auerbach, A. D. , Friedman, H. S. , Douglas, G. W. , Devergie, A. , Esperou, H. , Thierry, D. , Socie, G. , Lehn, P. , Cooper, S., English, D., Kurtzberg, J., Bard J., and Boyse E.A. . (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.* **321**,:1174-1178.
2. Rubinstein, P., Carrier, C., Scaradavou, A., Kurtzberg, J., Adamson, J., Migliaccio, A. R., Berkowitz, R. L., Cabbad, M., Dobrila, N. L, Taylor, P. E., Rosenfield, R. E., and Stevens, C. E. (1998) Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N. Engl. J. Med.* **339**:1565-1577.
3. Barker, J. N., and Wagner, J. E. (2003). Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **3**:526-532.
4. National Marrow donor program: [www.wordmarrow.org](http://www.wordmarrow.org), (2010).
5. Wagner, J. E., Rosenthal, J., Sweetman, R., Shu, X. O., Davies, S. M., Ramsay, N. K., McGlave, P. B., Sender, L., and Cairo, M. S. (1996) Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood.* **88**:795-802.
6. Rocha, V., Cornish, J., Sievers, E. L., Filipovich, A., Locatelli, F., Peters, C., Remberger, M., Michel, G., Arcese, W., Dallorso, S., Tiedemann, K., Busca, A., Chan, K. W., Kato, S., Ortega, J., Vowels, M., Zander, A., Souillet, G., Oakill, A., Woolfrey, A., Pay, A. L., Green, A., Garnier, F., Ionescu, I., Wernet, P., Sirchia, G., Rubinstein, P., Chevret, S., and Gluckman, E. (2001) Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood.* **97**:2962-2971.
7. Gluckman, E., Rocha, V., Boyer-Chammard, A., Locatelli, F., Arcese, W., Pasquini, R., Ortega, J., Souillet, G., Ferreira, E., Laporte, J.P., Fernandez, M., and Chastang. C. (1997) Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N. Engl. J. Med.* **337**:373-381.
8. Rubinstein, P., Rosenfield, R. E., Adamson, J.W., and Stevens, C.E. (1993) Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood.* **81**:1679-1690.
9. Wagner, E., Duval, M., Dalle, J. H., Morin, H., Bizier, S., Champagne, J. and Champagne M.A. (2006) Assessment of cord blood unit characteristics on the day of transplant: comparison with data issued by cord blood banks. *Transfusion.* **46**:1190-1198.



10. Thomson, B. G., Robertson, K. A., Gowan, D., Heilman, D., Broxmeyer, H. E., Emanuel, D., Kotylo, P., Brahmi, Z., and Smith, F. O. (2000) Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood*. **96**:2711.
11. Dalle, J. H., Duval, M., Moghrabi, A., Wagner, E., Vachon, M. F., Barrette, S., Bernstein, M., Champagne, J., David, M., Demers, J., Rousseau, P., Winikoff, R., and Champagne, M. A. (2004) Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplant*. **33**:605-611.
12. Rocha, V., and E. Gluckman. (2006) Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biol. Blood Marrow Transplant*. **12**:34-41.
13. Barker, J. N., R. E. Hough, J. A. van Burik, T. E. DeFor, M. L. MacMillan, M. R. O'Brien, and J. E. Wagner. (2005) Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source. *Biol. Blood Marrow Transplant*. **11**:362-370.
14. Eapen, M., P. Rubinstein, M. J. Zhang, C. Stevens, J. Kurtzberg, A. Scaradavou, F. R. Loberiza, R. E. Champlin, J. P. Klein, M. M. Horowitz, and J. E. Wagner. (2007) Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet*. **369**:1947-1954.
15. Kurtzberg, J., Prasad, V.K., Carter, S.L., Wagner, J.E., Baxter-Lowe, L.A., Wall, D., Kapoor, N., Guinan, E.C., Feig, S.A., Wagner, E.L., and Kernan, N.A.(2008) Results of the Cord Blood Transplantation Study (COBLT): clinical outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with hematologic malignancies. *Blood*. **112**:4318-4327.
16. Pavletic, Z. S., Joshi, S. S., Pirruccello, S. J., Tarantolo, S. R., Kollath, J., Reed, E. C., Bierman, P. J., Vose, J. M., Warkentin, P. I., Gross, T. G., Nasrati, K., Armitage, J. O., Kessinger, A., and Bishop M. R. (1998) Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant*. **21**:33-41.
17. Le, B. K., Barrett, A. J., Schaffer, M., Hagglund, H., Ljungman, P., Ringden, O., and Remberger, M. (2009) Lymphocyte recovery is a major determinant of outcome after matched unrelated myeloablative transplantation for myelogenous malignancies. *Biol. Blood Marrow Transplant*. **15**:1108-1115.
18. Kumar, S., Chen, M. G., Gastineau, D. A., Gertz, M. A., Inwards, D. J., Lacy, M. Q., Tefferi, A., and Litzow. M. R. (2003) Lymphocyte recovery after allogeneic bone marrow transplantation predicts risk of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. **17**:1865-1870.

19. Ishaqi, M. K., Afzal, S., Dupuis, A., Doyle, J., and Gassas, A. (2008) Early lymphocyte recovery post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with significant graft-versus-leukemia effect without increase in graft-versus-host disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* **41**:245-252.
20. Kim, D. H., Kim, J. G., Sohn, S. K., Sung, W. J., Suh, J. S., Lee, K. S., and Lee, K. B. (2004) Clinical impact of early absolute lymphocyte count after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* **125**:217-224.
21. Locatelli, F., Maccario, R., Comoli, P., Bertolini, F., Giorgiani, G., Montagna, D., Bonetti, F., De, S. P., Rondini, G., Sirchia, G., and Severi, F. (1996) Hematopoietic and immune recovery after transplantation of cord blood progenitor cells in children. *Bone Marrow Transplant.* **18**:1095-1101.
22. Nihues, T., Rocha, V., Filipovich, A. H., Chan, K. W., Porcher, R., Michel, G., Ortega, J. J., Wernet, P., Gobel, U., Gluckman, E., and Locatelli, F. (2001) Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children -- a Eurocord analysis. *Br. J. Haematol.* **114**:42-48.
23. Moretta, A., Maccario, R., Fagioli, F., Giraldo, E., Busca, A., Montagna, D., Miniero, R., Comoli, P., Giorgiani, G., Zecca, M., Pagani, S. and Locatelli, F. (2001) Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp. Hematol.* **29**:371-379.
24. Barlogis, V., Glasman, L., Brunet, C., Loundou, A. D., Lemarie, C., Galambrun, C., Thuret, I., Curtillet, C., Le, M. M., Bernard, F., Chambost, H., Calmels, B., Picard, C., Chabannon, C., Dignat-George, F., and Michel, G. (2010) Impact of viable CD45 cells infused on lymphocyte subset recovery after unrelated cord blood transplantation in children. *Biol. Blood Marrow Transplant.* [Epub ahead of print]
25. Lopez-Vergès, S., Milush, J.M., Pandey, S., York, V.A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., Norris, P.J., Nixon, D.F. and Lanier, L.L. (2010) CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood.* **116**:3865-3874.
26. Le Garff-Tavernier, M., Béziat, V., Decocq, J., Siguret, V., Gandjbakhch, F., Pautas, E., Debré, P., Merle-Beral, H. and Vieillard, V. (2010) Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell.* **9**:527-535.
27. Beziat, V., Nguyen, S., Lapusan, S., Hervier, B., Dhedin, N., Bories, D., Uzunov, M., Boudifa, A., Trebeden-Negre, H., Norol, F., Marjanovic, Z., Marie, J. P., Vernant, J. P., Debre, P., Rio, B. and Vieillard, V. (2009) Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia.* **23**:721-728.

28. Björkström, N.K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Björklund, A.T., Flodström-Tullberg, M., Michaëlsson, J., Rottenberg, M.E., Guzmán, C.A., Ljunggren, H.G., and Malmberg K.J. (2010) Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*. **116**: 3853-3864.
29. Vago, L., Forno, B., Sormani, M. P., Crocchiolo, R., Zino, E., Di, T. S., Lupo Stanghellini, M. T., Mazzi, B., Perna, S. K., Bondanza, A., Middleton, D., Palini, A., Bernardi, M., Bacchetta, R., Peccatori, J., Rossini, S., Roncarolo, M. G., Bordignon, C., Bonini, C., Ciceri, F., and Fleischhauer, K. (2008) Temporal, quantitative, and functional characteristics of single-KIR-positive alloreactive natural killer cell recovery account for impaired graft-versus-leukemia activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. **112**:3488-3499.
30. Nguyen, S., Dhedin, N., Vernant, J. P., Kuentz, M., Al, J. A., Rouas-Freiss, N., Carosella, E. D., Boudifa, A., Debre, P., and Vieillard, V. (2005) NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood*. **105**:4135-4142.
31. Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D'Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., Conte, R., Strowig, T., Moretta, A., Münz, C., Thiel, A., Moretta, L., Ferlazzo, G. (2007) CD56brightCD16-killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J. Immunol.* **178**:4947-4955.
32. Brahmi, Z., Hommel-Berrey, G., Smith, F., and Thomson, B. (2001) NK cells recover early and mediate cytotoxicity via perforin/granzyme and Fas/FasL pathways in umbilical cord blood recipients. *Hum. Immunol.* **62**:782-790.
33. Garderet, L., Dulphy, N., Douay, C., Chalumeau, N., Schaeffer, V., Zilber, M. T., Lim, A., Even, J., Mooney, N., Gelin, C., Gluckman, E., Charron, D., and Toubert, A. (1998) The umbilical cord blood alphabeta T-cell repertoire: characteristics of a polyclonal and naive but completely formed repertoire. *Blood*. **91**:340-346.
34. Merindol, N., A. J. Grenier, M. Caty, E. Charrier, A. Duval, M. Duval, M. A. Champagne, and H. Soudeyins. (2010) Umbilical cord blood T cells respond against the Melan-A/MART-1 tumor antigen and exhibit reduced alloreactivity as compared with adult blood-derived T cells. *J. Immunol.* **185**:856-866.
35. Mackall, C. L., Bare, C. V., Granger, L. A., Sharrow, S. O., Titus, J. A., and Gress, R. E. (1996) Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J. Immunol.* **156**:4609-4616.

36. Klein, A. K., Patel, D. D., Gooding, M. E., Sempowski, G. D., Chen, B. J., Liu, C., Kurtzberg, J., Haynes, B. F., and Chao, N. J. (2001) T-Cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **7**:454-466.
37. Komanduri, K. V., St John, L. S., de Lima, M., McMannis, J., Rosinski, S., McNiece, I., Bryan, S. G., Kaur, I., Martin, S., Wieder, E. D., Worth, L., Cooper, L. J., Petropoulos, D., Molldrem, J. J., Champlin, R. E., and Shpall, E. J. (2007) Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood.* **110**:4543-4551.
38. Gorla, R., Airo, P., Ferremi-Leali, P., Rossi, G., Prati, E., Brugnoli, D., and Cattaneo, R. (1993) Predominance of 'memory' phenotype within CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant.* **11**:346-347.
39. Eyrich, M., Leiler, C., Lang, P., Schilbach, K., Schumm, M., Bader, P., Greil, J., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Niethammer, D., and Schlegel, P. G. (2003) A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34+ peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. *Bone Marrow Transplant.* **32**:379-390.
40. Talvensaari, K., Clave, E., Douay, C., Rabian, C., Garderet, L., Busson, M., Garnier, F., Douek, D., Gluckman, E., Charron, D., and Toubert, A. (2002) A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood.* **99**:1458-1464.
41. Robin, C., Bennaceur-Griscelli, A., Louache, F., Vainchenker, W., Coulombel, L. (1999) Identification of human T-lymphoid progenitor cells in CD34+ CD38<sup>low</sup> and CD34+ CD38<sup>+</sup> subsets of human cord blood and bone marrow cells using NOD-SCID fetal thymus organ cultures. *Br J Haematol.* **104**:809-819;
42. Canque, B., Camus, S., Dalloul, A., Kahn, E., Yagello, M., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Schmitt, C., Gluckman, JC. (2000) Characterization of dendritic cell differentiation pathways from cord blood CD34+CD7+CD45RA<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood.* **96**: 3748-3756.
43. Murohara, T., Ikeda, H., Duan, J., Shintani, S., Sasaki, K., Eguchi, H., Onitsuka, I., Matsui, K., Imaizumi, T. (2000) Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J. Clin. Invest.* **105**:1527-1536.

44. Crisa, L., Cirulli, V., Smith, K.A., Ellisman, M.H., Torbett, B.E., Salomon, D.R. (1999) Human cord blood progenitors sustain thymic T-cell development and a novel form of angiogenesis. *Blood*. **94**:3928-3940
45. Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2005) T cell development and receptor diversity during aging. *Curr. Opin. Immunol.* **7**:468-475.
46. Finocchi, A., Romiti, M. L., Di Cesare, S., Puliafito, P., Pensieroso, S., Rana, I., Pinto, R., Cancrini, C., De Rossi, G., Caniglia, M., and Rossi, P. (2006) Rapid T-cell receptor CD4+ repertoire reconstitution and immune recovery in unrelated umbilical cord blood transplanted pediatric leukemia patients. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **28**:403-411.
47. Voogt, P. J., Fibbe, W. E., Marijt, W. A., Goulmy, E., Veenhof, W. F., Hamilton, M., Brand, A., Zwann, F. E., Willemze, R., van Rood, J. J *et al.* (1990) Rejection of bone-marrow graft by recipient-derived cytotoxic T lymphocytes against minor histocompatibility antigens. *Lancet*. **335**:131-134.
48. Duval, M., Pedron, B., Rohrlich, P., Legrand, F., Faye, A., Lescoeur, B., Bensaid, P. Larchee, R., Sterkers, G., and Vilmer, E. (2002) Immune reconstitution after haematopoietic transplantation with two different doses of pre-graft antithymocyte globulin. *Bone Marrow Transplant.* **30**:421-426.
49. Ballen, K. K., Spitzer, T. R., Yeap, B. Y., McAfee, S., Dey, B. R., Attar, E., Haspel, R., Kao, G., Liney, D., Alyea, E., Lee, S., Cutler, C., Ho, V., Soiffer, V., and Antin, J. H. (2007). Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **13**:82-89.
50. Brunstein, C. G., Barker, J. N., Weisdorf, D. J., DeFor, T. E., Miller, J. S., Blazar, B. R., McGlave, P. B., and Wagner, J. E. (2007) Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood*. **110**:3064-3070.
51. Barker, J. N., Weisdorf, D. J., DeFor, T. E., Blazar, B. R., McGlave, P. B., Miller, J. S., Verfaillie, C. M., and Wagner, J. E. (2005) Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*. **105**:1343-1347.
52. Kang, H.J., Yoo, K.H., Lee, J.W., Kim, H., Lee, S.H., Sung, K.W., Park, K.D., Koo, H.H., Shin, H.Y., and Ahn, H.S. (2010) Double umbilical cord blood transplantation for children and adolescents. *Ann. Hematol.* **89**:1035-1044.
53. Verneris, M.R., Brunstein, C.G., Barker, J., MacMillan, M.L., DeFor, T., McKenna, D.H., Burke, M.J., Blazar, B.R., Miller, J.S., McGlave, P.B., Weisdorf, D.J., and Wagner, J.E. (2009) Relapse risk after umbilical cord

- blood transplantation: enhanced graft-versus-leukemia effect in recipients of 2 units. *Blood*. **114**:4293-4299.
54. Marijt, W. A., Kernan, N. A., Diaz-Barrientos, T., Veenhof, W. F., O'Reilly, R. J., Willemze, R., and Falkenburg, J. H. (1995) Multiple minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones can be generated during graft rejection after HLA-identical bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. **16**:125-132.
  55. Mattsson, J., Ringden, O., and Storb, R. (2008). Graft failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant*. **14**:165-170.
  56. Murphy, W. J., Keller, J. R., Harrison, C. L., Young, H. A., and Longo, D. L. (1992) Interleukin-2-activated natural killer cells can support hematopoiesis in vitro and promote marrow engraftment in vivo. *Blood*. **80**:670-677.
  57. Hirayama, M., Genyeva, C., Brownell, A., and Kaplan, J. (1998) IL-2-activated murine newborn liver NK cells enhance engraftment of hematopoietic stem cells in MHC-mismatched recipients. *Bone Marrow Transplant*. **21**:1245-1252.
  58. Siefer, A. K., D. L. Longo, C. L. Harrison, C. W. Reynolds, and W. J. Murphy. (1993) Activated natural killer cells and interleukin-2 promote granulocytic and megakaryocytic reconstitution after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Blood*. **82**:2577-2584.
  59. Lanier, L. L. (1998) NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol*. **16**:359-393.
  60. Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi A. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. **295**:2097-2100.
  61. Willemze, R., Rodrigues, C. A., Labopin, M., Sanz, G., Michel, G., Socie, G., Rio, B., Sirvent, A., Renaud, M., Madero, L., Mohty, M., Ferra, C., Garnier, F., Loiseau, P., Garcia, J., Lecchi, L., Kogler, G., Beguin, Y., Navarrete, C., Devos, T., Ionescu, I., Boudjedir, K., Herr, A. L., Gluckman, E., and Rocha, V. (2009) KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. *Leukemia*. **23**:492-500.
  62. Brunstein, C. G., Wagner, J. E., Weisdorf, D. J., Cooley, S., Noreen, H., Barker, J. N., DeFor, T., Verneris, M. R., Blazar, B. R., and Miller, J. S. (2009) Negative effect of KIR alloreactivity in recipients of umbilical cord blood transplant depends on transplantation conditioning intensity. *Blood*. **113**:5628-5634.

63. Dalle, J. H., Menezes, J., Wagner, E., Blagdon, M., Champagne, J., Champagne, M. A., and Duval, M. (2005) Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr. Res.* **57**:649-655.
64. Dalle, J. H., Dardari, R., Menezes, J., Cordeiro, P., Champagne, M. A., and Duval, M. (2009) Binding of thymoglobulin to natural killer cells leads to cell activation and interferon-gamma production. *Transplantation.* **87**:473-481.
65. Lau, A. S., Sigaroudinia, M., Yeung, M. C., and Kohl, S. (1996) Interleukin-12 induces interferon-gamma expression and natural killer cytotoxicity in cord blood mononuclear cells. *Pediatr. Res.* **39**:150-155.
66. Umemoto, M., Azuma, E., Hirayama, M., Nagai, M., Hiratake, S., Qi, J., Kumamoto, T., Komada, Y., and Sakurai, M. (1997) Two cytotoxic pathways of natural killer cells in human cord blood: implications in cord blood transplantation. *Br. J. Haematol.* **98**:1037-1040.
67. Tanaka, H., Kai, S., Yamaguchi, M., Misawa, M., Fujimori, Y., Yamamoto, M., and Hara, H. (2003) Analysis of natural killer (NK) cell activity and adhesion molecules on NK cells from umbilical cord blood. *Eur. J. Haematol.* **71**:29-38.
68. Xing, D., Ramsay, A. G., Gribben, J. G., Decker, W. K., Burks, J. K., Munsell, M. Li, S., Robinson, S. N., Yang, H., Steiner, D., Shah, N., McMannis, J. D., Champlin, R. E., Hosing, C., Zweidler-McKay, P. A., Shpall, E. J., and Bollard, C. M. (2010). Cord Blood Natural Killer Cells Exhibit Impaired Lytic Immunological Synapse Formation That Is Reversed With IL-2 Ex vivo Expansion. *J. Immunother.* **33**:684-696.
69. van Heeckeren, W. J., Fanning, L. R., Meyerson, H. J., Fu, P., Lazarus, H. M., Cooper, B. W., Tse, W. W., Kindwall-Keller, T. L., Jaroscak, J., Finney, M. R., Fox, R. M., Solchaga, L., Forster, M., Creger, R. J., and Laughlin, M. J. (2007) Influence of human leucocyte antigen disparity and graft lymphocytes on allogeneic engraftment and survival after umbilical cord blood transplant in adults. *Br. J. Haematol.* **139**:464-474.
70. Terakura, S., Azuma, E., Murata, M., Kumamoto, T., Hirayama, M., Atsuta, Y., Kodera, Y., Yazaki, M., Naoe, T., and Kato, K. (2007) Hematopoietic engraftment in recipients of unrelated donor umbilical cord blood is affected by the CD34+ and CD8+ cell doses. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **13**:822-830.
71. Jiang, Z., Adams, G. B., Hanash, A. M., Scadden, D. T., and Levy, R. B. (2002) The contribution of cytotoxic and noncytotoxic function by donor T-cells that support engraftment after allogeneic bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **8**:588-596.

72. Hexner, E. O., Danet-Desnoyers, G. A., Zhang, Y., Frank, D. M., Riley, J. L., Levine, B. L., Porter, D. L., June, C. H., and Emerson, S. G. (2007) Umbilical cord blood xenografts in immunodeficient mice reveal that T cells enhance hematopoietic engraftment beyond overcoming immune barriers by stimulating stem cell differentiation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **13**:1135-1144.
73. Martin, P. J. (1990) The role of donor lymphoid cells in allogeneic marrow engraftment. *Bone Marrow Transplant.* **6**:283-289.
74. Charak, B. S., Brown, E. G., and Mazumder, A. (1995) Augmentation of murine hematopoiesis by interleukin 2-activated irradiated T cells. *Transplantation.* **60**:589-594.
75. van Rood, J. J., Stevens, C. E., Smits, J., Carrier, C., Carpenter, C., and Scaradavou, A. (2009). Reexposure of cord blood to noninherited maternal HLA antigens improves transplant outcome in hematological malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:19952-19957.
76. Muller, A. M., Linderman, J. A., Florek, M., Miklos, D., and Shizuru, J. A. (2010) Allogeneic T cells impair engraftment and hematopoiesis after stem cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:14721-14726.
77. Tomblyn, M., Chiller, T., Einsele, H., Gress, R., Sepkowitz, K., Storek, J., Wingard, J. R., Young, J. A., and Boeckh, M. J. (2009). Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **15**:1143-1238.
78. Hamza, N. S., Lisgaris, M., Yadavalli, G., Nadeau, L., Fox, R., Fu, P., Lazarus, H. M., Koc, O. N., Salata, R. A., and Laughlin, M. J. (2004) Kinetics of myeloid and lymphocyte recovery and infectious complications after unrelated umbilical cord blood versus HLA-matched unrelated donor allogeneic transplantation in adults. *Br. J. Haematol.* **124**:488-498.
79. Beck, J. C., Wagner, J. E., DeFor, T. E., Brunstein, C. G., Schleiss, M. R., Young, J. A., Weisdorf, D. H., Cooley, S., Miller, J. S., and Verneris, M. R. (2010) Impact of cytomegalovirus (CMV) reactivation after umbilical cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **16**:215-222.
80. Tomonari, A., Iseki, T., Takahashi, S., Ooi, J., Takasugi, K., Shimohakamada, Y., Ohno, N., Nagamura, F., Uchamaru, K., Tani, K., Tojo, A., and Asano, S. (2003) Varicella-zoster virus infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. *Br. J. Haematol.* **122**:802-805.
81. Vandembosch, K., Ovetchkine, P., Champagne, M. A., Haddad, E., Alexandrov, L., and Duval, M. (2008) Varicella-zoster virus disease is more



- frequent after cord blood than after bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **14**:867-871.
82. Benjamin, D. K. Jr., Miller, W. C., Bayliff, S., Martel, L., Alexander, K. A., and Martin, P. L. (2002) Infections diagnosed in the first year after pediatric stem cell transplantation. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **21**:227-234.
  83. Burke, M. J., Vogel, R. I., Janardan, S. K., Brunstein, C., Smith, A. R., Miller, J. S., Weisdorf, D., Wagner, J. E., and Verneris, M. R. (2010) Early Lymphocyte Recovery and Outcomes after Umbilical Cord Blood Transplantation (UCBT) for Hematologic Malignancies. *Biol. Blood Marrow Transplant.* [Epub ahead of print]
  84. Larghero, J., Rocha, V., Porcher, R., Fillion, A., Ternaux, B., Lacassagne, M. N., Robin, M., Peffault de Latour, R., Devergie, A., Biscay, N., Ribaud, P., Benbunan, M., Gluckman, E., Marolleau, J. P., and Socie, G. (2007) Association of bone marrow natural killer cell dose with neutrophil recovery and chronic graft-versus-host disease after HLA identical sibling bone marrow transplants. *Br. J. Haematol.* **138**:101-109.
  85. Kim, D. H., Sohn, S. K., Lee, N. Y., Baek, J. H., Kim, J. G., Won, D. I., Suh, J. S., Lee, K. B., and Shin, I. H. (2005) Transplantation with higher dose of natural killer cells associated with better outcomes in terms of non-relapse mortality and infectious events after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from HLA-matched sibling donors. *Eur. J. Haematol.* **75**:299-308.
  86. Cohen, G., Carter, S. L., Weinberg, K. I., Masinsin, B., Guinan, E., Kurtzberg, J., Wagner, J. E., Kernan, N. A., and Parkman, R. (2006) Antigen-specific T-lymphocyte function after cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **12**:1335-1342.
  87. Lin, S. J., Peacock, C. D., Bahl, K., and Welsh, R. M. (2007) Programmed death-1 (PD-1) defines a transient and dysfunctional oligoclonal T cell population in acute homeostatic proliferation. *J. Exp. Med.* **204**:2321-2333.
  88. Gallez-Hawkins, G. M., Thao, L., Palmer, J., Dagis, A., Li, X., Franck, A. E., Tegtmeier, B., Lacey, S. F., Diamond, D. J., Forman, S. J., and Zaia, J. A. (2009) Increased programmed death-1 molecule expression in cytomegalovirus disease and acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **15**:872-880.
  89. Soong, W., Schultz, J. C., Patera, A. C., Sommer, M. H., and Cohen, J. I. (2000) Infection of human T lymphocytes with varicella-zoster virus: an analysis with viral mutants and clinical isolates. *J. Virol.* **74**:1864-1870.

90. Arvin, A. M. (2000) Varicella-Zoster virus: pathogenesis, immunity, and clinical management in hematopoietic cell transplant recipients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **6**:219-230.
91. Schaap, A., Fortin, J. F., Sommer, M., Zerboni, L., Stamatis, S., Ku, C. C., Nolan, G. P., and Arvin, A. M. (2005). T-cell tropism and the role of ORF66 protein in pathogenesis of varicella-zoster virus infection. *J. Virol.* **79**:12921.
92. Zerboni, L., Ku, C. C., Jones, C. D., Zehnder, J. L., and Arvin, A. M. (2005) Varicella-zoster virus infection of human dorsal root ganglia in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:6490-6495.
93. Ku, C. C., Zerboni, L., Ito, H., Graham, B. S., Wallace, M., and Arvin, A. M. (2004) Varicella-zoster virus transfer to skin by T Cells and modulation of viral replication by epidermal cell interferon-alpha. *J. Exp. Med* **200**:917-925.
94. Abendroth, A., Morrow, G., Cunningham, A. L., and Slobedman, B. (2001) Varicella-zoster virus infection of human dendritic cells and transmission to T cells: implications for virus dissemination in the host. *J. Virol.* **75**:6183-6192.
95. Perruccio, K., Tosti, A., Burchielli, E., Topini, F., Ruggeri, L., Carotti, A., Capanni, M., Urbani, E., Mancusi, A., Aversa, F., Martelli, M. F., Romani, L., and Velardi, A. (2005) Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood.* **106**:4397-4406.
96. Feuchtinger, T., Matthes-Martin, S., Richard, C., Lion, T., Fuhrer, M., Hamprecht, K., Handgretinger, R., Peters, C., Schuster, F. R., Beck, R., Schumm, M., Lotfi, R., Jahn, G., and Lang, P. (2006) Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* **134**:64-76.
97. Micklethwaite, K. P., Savoldo, B., Hanley, P. J., Leen, A. M., Demmler-Harrison, G. J., Cooper, L. J., Liu, H., Gee, A. P., Shpall, E. J., Rooney, C. M., Heslop, H. E., Brenner, M. K., Bollard, C. M., and Dotti, G. (2010) Derivation of human T lymphocytes from cord blood and peripheral blood with antiviral and antileukemic specificity from a single culture as protection against infection and relapse after stem cell transplantation. *Blood.* **115**:2695-2703.
98. Hanley, P. J., Cruz, C. R., Savoldo, B., Leen, A. M., Stanojevic, M., Khalil, M., Decker, W., Molldrem, J. J., Liu, H., Gee, A. P., Rooney, C. M., Heslop, H. E., Dotti, G., Brenner, M. K., Shpall, E. J., and Bollard, C. M. (2009) Functionally active virus-specific T cells that target CMV, adenovirus, and EBV can be expanded from naive T-cell populations in cord blood and will target a range of viral epitopes. *Blood.* **114**:1958-1967.

99. Leen, A. M., Christin, A., Myers, G. D., Liu, H., Cruz, C. R., Hanley, Kennedy-Nasser, A. A., Leung, K. S., Gee, A. P., Krance, R. A., Brenner, M. K., Heslop, H. E., Rooney, C. M., and Bollard, C. M. (2009) Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*. **114**:4283-4292.
100. Okas, M., Gertow, J., Uzunel, M., Karlsson, H., Westgren, M., Karre, K., Ringden, O., Mattsson, J., and Uhlin, M. (2010) Clinical expansion of cord blood-derived T cells for use as donor lymphocyte infusion after cord blood transplantation. *J. Immunother*. **33**:96-105.
101. Shlomchik, W. D., Couzens, M. S., Tang, C. B., McNiff, J., Robert, M. E., Liu, J., Shlomchik, M. J., and Emerson, S. G. (1999) Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*. **285**:412-415.
102. Ferrara, J. L., Cooke, K. R., Pan, L., and Krenger, W. (1996) The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells*. **14**:473-489.
103. Krenger, W., and Ferrara, J. L. (1996) Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Res*. **15**:50-73.
104. Haczku, A., Alexander, A., Brown, P., Assoufi, B., Li, B., Kay, A.B., and Corrigan, C. (1994) The effect of dexamethasone, cyclosporine, and rapamycin on T-lymphocyte proliferation in vitro: comparison of cells from patients with glucocorticoid-sensitive and glucocorticoid-resistant chronic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*. **93**:510-519.
105. Gratama, J.W., Würsch, A.M., Nissen, C., Gratwohl, A., D'Amaro, J., de Gast, G.C., van Rood, J.J., and Speck, B. (1986) Influence of graft-versus-host disease prophylaxis on early T-lymphocyte regeneration following allogeneic bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol*. **62**:355-365.
106. Rocha, V., Wagner, J. E. Jr., Sobocinski, K. A., Klein, J. P., Zhang, M. J., Horowitz, M. M., and Gluckman, E. (2000) Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N. Engl. J. Med*. **342**:1846-1854.
107. MacMillan, M. L., Weisdorf, D. J., Brunstein, C. G., Cao, Q., DeFor, T. E., Verneris, M. R., Blazar, B. R., and Wagner, J. E. (2009) Acute graft-versus-host disease after unrelated donor umbilical cord blood transplantation: analysis of risk factors. *Blood*. **113**:2410-2415.

108. Berthou, C., Legros-Maida, S., Soulie, A., Wargnier, A., Guillet, J., Rabian, C., Gluckman, E., and Sasportes, M. (1995) Cord blood T lymphocytes lack constitutive perforin expression in contrast to adult peripheral blood T lymphocytes. *Blood*. **85**:1540-1546.
109. Ribeiro-do-Couto, L. M., Boeije, L. C., Kroon, J. S., Hooibrink, B., Breur-Vriesendorp, B. S., Aarden, L. A., and Boog, C. J. (2001). High IL-13 production by human neonatal T cells: neonate immune system regulator? *Eur. J. Immunol.* 31:3394-3402.
110. Godfrey, W. R., Spoden, D. J., Ge, Y. G., Baker, S. R., Liu, B., Levine, B. L., June, C. H., Blazar, B. R., and Porter, S. B. (2005) Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood*. **105**:750-758.
111. Cupedo, T., Nagasawa, M., Weijer, K., Blom, B., and Spits, H. (2005) Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. *Eur. J. Immunol.* **35**:383-390.
112. Mold, J. E., Michaelsson, J., Burt, T. D., Muench, M. O., Beckerman, K. P., Busch, M. P., Lee, T. H., Nixon, D. F., and McCune, J. M. (2008) Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science*. **322**:1562-1565.
113. Asai, O., Longo, D. L., Tian, Z. G., Hornung, R. L., Taub, D. D., Ruscetti, F. W., and Murphy, W. J. (1998) Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* **101**:1835-1842.
114. Olson, J.A., Leveson-Gower, D.B., Gill, S., Baker, J., Beilhack, A., and Negrin, R.S. (2010) NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood*. **115**:4293-4301.
115. Yabe, T., Matsuo, K., Hirayasu, K., Kashiwase, K., Kawamura-Ishii, S., Tanaka, H., Ogawa, A., Takanashi, M., Satake, M., Nakajima, K., Tokunaga, K., Inoko, H., Saji, H., Ogawa, S., Juji, T., Sasazuki, T., Kodera, Y., and Morishima, Y. (2008) Donor killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype-patient cognate KIR ligand combination and antithymocyte globulin preadministration are critical factors in outcome of HLA-C-KIR ligand-mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **14**:75-87.
116. Michel, G., Rocha, V., Chevret, S., Arcese, W., Chan, K. W., Filipovich, A., Takahashi, T. A., Vowels, M., Ortega, J., Bordigoni, P., Shaw, P. J., Yaniv, I., Machado, A., Pimentel, P., Fagioli, F., Verdeguer, A., Jouet, J. P., Diez, B., Ferreira, E., Pasquini, R., Rosenthal, J., Sievers, E., Messina, C., Iori, A. P., Garnier, F., Ionescu, I., Locatelli, F., and Gluckman, E. (2003) Unrelated cord

- blood transplantation for childhood acute myeloid leukemia: a Eurocord Group analysis. *Blood*. **102**:4290-4297.
117. Parkman, R., Cohen, G., Carter, S. L., Weinberg, K. I., Masinsin, B., Guinan, E., Kurtzberg, J., Wagner, J. E., and Kernan, N. A. (2006). Successful immune reconstitution decreases leukemic relapse and improves survival in recipients of unrelated cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant*. **12**:919-927.
  118. Goulmy, E. 1997. Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol. Rev*. **157**:125-140.
  119. Falkenburg, J. H., Marijt, W. A., Heemskerk, M. H., and Willemze, R. (2002) Minor histocompatibility antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions. *Curr. Opin. Hematol*. **9**:497-502.
  120. Bergmann, L., Miething, C., Maurer, U., Brieger, J., Karakas, T., Weidmann, E., and Hoelzer, D. (1997) High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood*. **90**:1217-1225.
  121. Menssen, H. D., Renkl, H. J., Rodeck, U., Maurer, J., Notter, M., Schwartz, S., Reinhardt, R., and Thiel, E. (1995) Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia*. **9**:1060-1067.
  122. Inoue, K., Sugiyama, H., Ogawa, H., Nakagawa, M., Yamagami, T., Miwa, H., Kita, K., Hiraoka, A., Masaoka, T., and Nasu, K. (1994) WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*. **84**:3071-3079.
  123. Inoue, K., Ogawa, H., Sonoda, Y., Kimura, T., Sakabe, H., Oka, Y., Miyake, S., Tamaki, H., Oji, Y., Yamagami, T., Tatekawa, T., Soma, T., Kishimoto, T., and Sugiyama, H. (1997) Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood*. **89**:1405-1412.
  124. Mommaas, B., Stegehuis-Kamp, J. A., van Halteren, A. G., Kester, M., Enczmann, J., Wernet, P., Kogler, G., Mutis, T., Brand, A., and Goulmy, E. (2005) Cord blood comprises antigen-experienced T cells specific for maternal minor histocompatibility antigen HA-1. *Blood*. **105**:1823-1827.
  125. Keil, F., Prinz, E., Moser, K., Mannhalter, C., Kalhs, P., Worel, N., Rabitsch, W., Schulenburg, A., Mitterbauer, M., and Greinix, H. (2003) Rapid establishment of long-term culture-initiating cells of donor origin after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, and significant prognostic impact of donor T-cell chimerism on stable engraftment and progression-free survival. *Transplantation*. **76**:230-236.

126. Huisman, C., de Weger, R. A., de Vries, L., Tilanus, M. G., and Verdonck, L. F. (2007) Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* **39**:285-291.
127. Joshi, S. S., Babushkina-Patz, N. N., Verbik, D. J., Gross, T. G., Tarantolo, S. R., Kuszynski, C. A., Pirruccello, S. J., Bishop, M. R., and Kessinger, A. (1998) Antitumor activity of human umbilical cord blood cells: A comparative analysis with peripheral blood and bone marrow cells. *Int. J. Oncol.* **13**:791-799.
128. Joshi, S. S., Tarantolo, S. R., Kuszynski, C. A., and Kessinger, A. (2000) Antitumor therapeutic potential of activated human umbilical cord blood cells against leukemia and breast cancer. *Clin. Cancer. Res.* **6**:4351-4358.
129. Clark, E. M., Joshi, D. S., Grimm, A. B., Joshi, A. D., Wang, P., and Joshi, S. S. (2010) Ultrastructural basis of enhanced antitumor cytotoxicity of cord blood-derived CTLs: a comparative analysis with peripheral blood and bone marrow. *Int. J. Oncol.* **37**:645-653.
130. Mazur, M. A., Davis, C. C., and Szabolcs, P. (2008) Ex vivo expansion and Th1/Tc1 maturation of umbilical cord blood T cells by CD3/CD28 costimulation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **14**:1190-1196.
131. Davis, C. C., Marti, L. C., Sempowski, G. D., Jeyaraj, D. A., and Szabolcs, P. (2010) Interleukin-7 permits Th1/Tc1 maturation and promotes ex vivo expansion of cord blood T cells: a critical step toward adoptive immunotherapy after cord blood transplantation. *Cancer Res.* **70**:5249-5258.
132. Ruggeri, L., Mancusi, A., Burchielli, E., Capanni, M., Carotti, A., Aloisi, T., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A. (2008) NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol. Dis.* **40**:84-90.
133. Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R. S., Martelli, M. F., and Velardi, A. (1999) Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* **94**:333-339.
134. Romanski, A., Bug, G., Becker, S., Kampfmann, M., Seifried, E., Hoelzer, D., Ottmann, O. G., and Tonn, T. (2005) Mechanisms of resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute lymphoblastic leukemia. *Exp. Hematol.* **33**:344-352.
135. Kato, N., Tanaka, J., Sugita, J., Toubai, T., Miura, Y., Ibata, M., Syono, Y., Ota, S., Kondo, T., Asaka, M., and Imamura, M. (2007) Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin

remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia*. **21**:2103-2108.

136. Imai, C., Iwamoto, S., and Campana, D. (2005) Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood*. **106**:376-383.
137. Giebel, S., Locatelli, F., Lamparelli, T., Velardi, A., Davies, S., Frumento, G., Maccario, R., Bonetti, F., Wojnar, J., Martinetti, M., Frassoni, F., Giorgiani, G., Bacigalupo, A., and Holowiecki, J. (2003). Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 102:814-819.
138. Beelen, D. W., Ottinger, H. D., Ferencik, S., Elmaagacli, A. H., Peceny, R., Trenchel, R., and Grosse-Wilde, H. (2005) Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood*. **105**:2594-2600.
139. Pende, D., Marcenaro, S., Falco, M., Martini, S., Bernardo, M. E., Montagna, D., Romeo, E., Cognet, C., Martinetti, M., Maccario, R., Mingari, M. C., Vivier, E., Moretta, L., Locatelli, F., and Moretta, A. (2009) Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*. **113**:3119-3129.
140. Cook, M. A., Milligan, D. W., Fegan, C. D., Darbyshire, P. J., Mahendra, P., Craddock, C. F., Moss, P. A., and Briggs, D. C. (2004) The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood*. **103**:1521-1526.
141. Hsu, K. C., Keever-Taylor, C. A., Wilton, A., Pinto, C., Heller, G., Arkun, K., O'Reilly, R. J., Horowitz, M. M. and Dupont, B. (2005) Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood*. **105**:4878-4784.
142. Verheyden, S., Schots, R., Duquet, W., and Demanet, C. (2005) A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. **19**:1446-1452.
143. Ayello, J., van de Ven, C., Cairo, E., Hochberg, J., Baxi, L., Satwani, P., and Cairo, M. S. (2009) Characterization of natural killer and natural killer-like T cells derived from ex vivo expanded and activated cord blood mononuclear cells: implications for adoptive cellular immunotherapy. *Exp. Hematol*. **37**:1216-1229.

144. Velardi, A., Ruggeri, L., Mancusi, A., Aversa, F., and Christiansen, F. T. (2009) Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Curr. Opin. Immunol.* **21**:525-530.
145. Gutman, J. A., Turtle, C. J., Manley, T. J., Heimfeld, S., Bernstein, I. D., Riddell, S. R., and Delaney, C. (2010) Single-unit dominance after double-unit umbilical cord blood transplantation coincides with a specific CD8+ T-cell response against the nonengrafted unit. *Blood.* **115**:757-765.
146. Marchant, A., and Goldman, M. (2005) T cell-mediated immune responses in human newborns: ready to learn? *Clin. Exp. Immunol.* **141**:10-18.
147. Malhotra, I., Wamachi, A. N., Mungai, P. L., Mzungu, E., Koech, D., Muchiri, E., Moormann, A. M., and King, C. L. (2008) Fine specificity of neonatal lymphocytes to an abundant malaria blood-stage antigen: epitope mapping of Plasmodium falciparum MSP1(33). *J Immunol.* **180**:3383-3390.
148. Hermann, E., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Even, J., Rodriguez, P., Berthe, A., Gonzalez-Merino, E., Torrico, F., and Carlier, Y. (2002) Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood.* **100**:2153-2158.