

Université de Montréal

**Immunorégulation de la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD) dans un modèle murin  
xénogénique : le rôle des immunoglobulines intraveineuses (IVIG)**

par

Joëlle Gregoire-Gauthier

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de doctorat

en microbiologie et immunologie

Août 2014

© Joëlle Gregoire-Gauthier, 2014

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Immunorégulation de la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD) dans un modèle murin  
xénogénique : le rôle des immunoglobulines intraveineuses (IVIG)**

présentée par :

Joëlle Gregoire-Gauthier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Carolina Alfieri

*président-rapporteur*

Elie Haddad

*directeur de recherche*

Martin Guimond

*membre de jury*

Renée Bazin

*examineur externe*

Nathalie Arbour

*représentant du doyen*

## Résumé français et mots clés

---

La réaction du greffon contre l'hôte (GvHD) est une complication majeure de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (HSCT). Les traitements de prophylaxie contre le développement de la GvHD reposent essentiellement sur l'utilisation d'agents immunosuppresseurs, ce qui contribue à ralentir la reconstitution immunitaire post-greffe et à prolonger la durée de l'état immunosupprimé des patients. Le développement de prophylaxie pour la GvHD à base d'agents immunomodulateurs est ainsi privilégié. À l'aide d'un modèle murin xénogénique chez les souris NOD/*scid*-IL2 $\gamma$ <sup>-/-</sup> (NSG), on a étudié le potentiel immunomodulateur des immunoglobulines intraveineuses (IVIG) dans la prévention de la GvHD, ainsi que leurs effets sur la qualité et la cinétique de la reconstitution immunitaire. On a déterminé qu'un traitement hebdomadaire d'IVIG peut effectivement réduire l'incidence de la GvHD, ainsi que la mortalité qui y est reliée, avec une efficacité similaire à celle obtenue avec la cyclosporine A, un immunosuppresseur couramment utilisé dans la prophylaxie de la GvHD. Par ailleurs, on a déterminé que le mécanisme d'action des IVIG dans la réduction de la GvHD est distinct de celui des immunosuppresseurs. De plus, on a démontré que les IVIG induisent l'expansion et l'activation des cellules NK présentes au sein du greffon, lesquelles sont nécessaires pour l'obtention de l'effet protecteur des IVIG contre le développement de la GvHD, et sont dépendantes de la présence de lymphocytes T activés. Grâce à un modèle murin humanisé, on a également démontré que le traitement hebdomadaire d'IVIG induit un délai transitoire de la reconstitution humorale, ce qui n'affecte toutefois pas la qualité globale de la reconstitution immunitaire. Ces résultats mettent cependant en doute la pertinence de l'utilisation des IVIG dans les protocoles cliniques de prophylaxie de la GvHD, puisque les immunosuppresseurs seront toujours utilisés, et qu'on a démontré que les IVIG ont besoin de lymphocytes T activés afin de prévenir efficacement le développement de la GvHD.

**Mots clés :** GvHD, IVIG, cellules NK, souris NSG, immunomodulation, modèle murin xénogénique, modèle murin humanisé, reconstitution immunitaire

## **Abstract and keywords**

---

Graft-versus-Host Disease (GvHD) is a major complication following hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Prophylactic treatments for the prevention of GvHD rely mostly on the use of immunosuppressors, which contribute to inhibit the patient's immune reconstitution and prolong their immunosuppressed state. Development of immunomodulator-based prophylactic treatments is therefore preferred. Using NOD/*scid*-IL2 $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice, we developed a xenogeneic mouse model to assess the immunomodulatory potential of intravenous immunoglobulins (IVIG) for the prevention of GvHD, along with assessing their effect on the kinetics and the quality of the immune reconstitution in mice. We determined that weekly IVIG treatments reduced the incidence of GvHD and its related mortality. The effectiveness of IVIG for the prevention of GvHD was similar to that of cyclosporine A, an immunosuppressive drug routinely used for the prophylactic treatment of GvHD. Furthermore, we demonstrated that IVIG has a mechanism of action that is different from that of immunosuppressors. IVIG induce the expansion and activation of NK cells from the graft, which is mandatory for the preventive effect of IVIG on GvHD development. Furthermore, this IVIG-induced expansion and activation of NK cells require the presence of activated T lymphocytes. Using our humanized mouse model, we have also demonstrated that weekly IVIG treatments cause a transient delay of the humoral reconstitution, but do not affect the overall quality of the immune reconstitution. We have demonstrated that activated T lymphocytes are mandatory for the effective expansion and activation of NK cells, which in turn are essential to the IVIG-induced prevention of GvHD, and immunosuppressors will always be part of the prophylactic regimen of GvHD, therefore shining a doubt on the usefulness of adding IVIG to the prophylactic treatments for the prevention of GvHD.

**Keywords:** GvHD, IVIG, NK cells, NSG mice, immunomodulation, xenogeneic mouse model, humanized mouse model, immune reconstitution

## Table des matières

---

Liste des tableaux .....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Dédicace .....	xx
Remerciements .....	xxi
Chapitre 1 Introduction.....	1
1.1 Mise en contexte .....	2
1.2 Les greffes de cellules souches hématopoïétiques.....	2
1.2.1 Le traitement de conditionnement pré-greffe.....	5
1.2.2 Sources de cellules souches pour les HSCT .....	8
1.2.3 Reconstitution immunitaire post-greffe .....	9
1.2.4 Les cellules NK.....	10
1.3 Réaction du greffon contre l'hôte .....	12
1.3.1 Description de la réaction .....	13
1.3.2 Déroulement de la réaction en trois temps.....	14
1.3.3 L'effet GvL .....	18
1.3.4 La prophylaxie de la réaction du greffon contre l'hôte.....	20
1.4 Les immunoglobulines intraveineuses.....	22
1.4.1 Description du produit .....	23
1.4.2 Administration du produit.....	24
1.4.3 Applications du produit acceptées par la FDA .....	24
1.4.4 Les IVIG et leurs récepteurs .....	26
1.4.4.1 Les FcγRs.....	28
1.4.4.2 Les récepteurs Siglec .....	29
1.4.4.3 Les récepteurs lectine de type C .....	30
1.4.4.4 Les FcRn.....	30
1.4.5 Les fragments des IVIG .....	32
1.4.5.1 Le fragment F(ab') <sub>2</sub> de l'IgG.....	32
1.4.5.2 Le fragment Fc de l'IgG .....	33
1.4.6 Mécanisme anti-inflammatoire FcγRIIb-dépendant des IVIG.....	34
1.4.7 Dimères d'IVIG .....	37

1.4.8	Effet des IVIG sur les lymphocytes T.....	37
1.4.9	Effet sur les cellules NK.....	39
1.5	Les modèles murins xénogéniques.....	40
1.5.1	Les souris <i>scid</i> .....	40
1.5.2	Les souris NOD/ <i>scid</i> .....	40
1.5.3	Les souris RAG2 <sup>null</sup> IL2r $\gamma$ <sup>null</sup> .....	41
1.5.4	Les souris NOD/ <i>scid</i> -IL2R $\gamma$ <sup>-/-</sup> (NSG).....	42
1.6	Problématique du projet de recherche.....	42
1.7	Objectifs du projet de recherche.....	43
1.8	Hypothèses de recherche.....	43
Chapitre 2	Premier article.....	44
2.1	Mise en contexte du premier article.....	45
2.2	<i>Abstract</i> .....	47
2.3	<i>Introduction</i> .....	48
2.4	<i>Materials and Methods</i> .....	49
2.5	<i>Results</i> .....	51
2.6	<i>Discussion</i> .....	54
2.7	<i>Acknowledgements</i> .....	57
2.8	<i>References</i> .....	58
2.9	<i>Legends</i> .....	68
2.10	Discussion du premier article.....	78
Chapitre 3	Deuxième article.....	79
3.1	Mise en contexte du deuxième article.....	80
3.2	<i>Abstract</i> .....	83
3.3	<i>Introduction</i> .....	84
3.4	<i>Methods</i> .....	85
3.5	<i>Results</i> .....	88
3.6	<i>Discussion</i> .....	91
3.7	<i>Acknowledgments</i> .....	94
3.8	<i>References</i> .....	95
3.9	<i>Figure Legends</i> .....	100
3.10	Discussion du deuxième article.....	109

Chapitre 4	Discussion.....	110
4.1	L'utilité des IVIG dans la prévention de la GvHD.....	111
4.2	Validité du modèle murin xénogénique choisi.....	112
4.3	Les IVIG contribuent à réduire la GvHD dans le modèle murin xénogénique.....	114
4.4	Le rôle des cellules NK dans la prévention de la GvHD.....	118
4.5	Mécanisme d'action des IVIG sur les cellules NK.....	120
4.6	L'effet des IVIG sur la reconstitution immunitaire.....	122
4.7	Translation vers la pratique clinique.....	124
Chapitre 5	Conclusions et perspectives.....	126
5.1	Conclusions.....	127
5.2	Perspectives.....	128
Chapitre 6	Troisième article (projet connexe).....	130
6.1	Mise en contexte du troisième article.....	131
6.2	<i>Abstract</i> .....	134
6.3	<i>Introduction</i> .....	135
6.4	<i>Methods</i> .....	136
6.5	<i>Results</i> .....	141
6.6	<i>Discussion</i> .....	144
6.7	<i>Acknowledgements</i> .....	148
6.8	<i>References</i> .....	149
6.9	<i>Figure Legends</i> .....	155
Sources documentaires	.....	165
<i>Curriculum vitae</i>	.....	xxii

## Liste des tableaux

---

Tableau 1.I – Détermination du stage et grade de la GvHD aiguë. ....	14
Tableau 1.II – Contribution des populations cellulaires impliquées dans les effets GvHD et GvL suite à la HSCT .....	19
Tableau 1.III – <i>Clinical Uses of IVIg</i> .....	25
Tableau 1.IV – Activités anti-inflammatoire et immunomodulatrice potentielles des IgG.....	32



## Liste des figures

---

Figure 1.2.1 – Principaux diagnostics nécessitant une HSCT allogénique (1990-2010).....	3
Figure 1.2.2 – Effet du degré de disparité HLA-A, -B, -C, -DRB1 ou –DQB1 sur la GvHD aiguë de grade III-IV. ....	4
Figure 1.2.3 – Conditionnement pré-greffe et facteurs pouvant influencer le résultat de la HSCT. ....	7
Figure 1.2.4 – Les récepteurs des cellules NK et leurs ligands. ....	11
Figure 1.3.1 – Immunopathogenèse de la réponse alloréactive et approches développementales pour la séparation des effets GvHD et GvL.....	16
Figure 1.3.2 – Incidence cumulative de la GvHD aiguë de grade III-IV selon le nombre de cellules CD56 <sup>+</sup> du greffon et le type de donneur. ....	20
Figure 1.4.1 – Membres de la famille des récepteurs Fcγ humains. ....	27
Figure 1.4.2 – La famille des FcγRs murins et humains.....	29
Figure 1.4.3 – Mécanismes d’action des IVIG dépendant des fragments F(ab') <sub>2</sub> et Fc. ....	31
Figure 1.4.4 - IgG et la structure du glycan Fc. ....	35
Figure 1.4.5 – La composition du Fc glycan dicte l’affinité au FcγR.....	36
Figure 2.9.1 - <i>IVIG, CsA, and OKT3, reduce mortality in a xenogeneic model of GvHD in NSG mice</i>	70
Figure 2.9.2 – <i>Liver histopathology of a NSG mouse with xeno-GvHD.</i> .....	71
Figure 2.9.3 – <i>IVIG reduce the incidence of xeno-GvHD.</i> .....	72
Figure 2.9.4 – <i>IVIG do not inhibit proliferation of human cells in xeno-GvHD mice.</i> .....	73
Figure 2.9.5 – <i>Modulation of human cytokines in plasma of xeno-GvHD mice induced by IVIG, CsA, and OKT3.</i> .....	74
Figure 2.9.6 – <i>IVIG transiently delay B-cell reconstitution in a humanized mouse model of immune reconstitution.</i> ....	75
Figure 2.9.7 – <i>IVIG do not affect the kinetic of thymopoiesis in a humanized mouse model of immune reconstitution.</i> ....	76
Figure 2.9.8 – <i>Effect of CsA and OKT3 in a humanized mouse model of immune reconstitution.</i> ....	77
Figure 3.9.1 – <i>Weekly IVIG treatment induces expansion of human NK cells.</i> ....	102
Figure 3.9.2 – <i>Phenotype and function of IVIG-induced NK cells.</i> ....	103
Figure 3.9.3 – <i>IVIG induce the functional activation of human NK cells.</i> .....	104
Figure 3.9.4 – <i>IVIG treatment reduces the incidence of GvHD and mortality in mice injected with huPBMCs, but not with NK-depleted huPBMCs.</i> ....	105

Figure 3.9.5 – <i>IVIg must be administered by the same route and the same day as huPBMCs for effective expansion of human NK cells.</i> .....	106
Figure 3.9.6 – <i>T cells are required for IVIG-induced NK-cell expansion in vivo.</i> .....	107
Figure 3.9.7 – <i>Analysis of T cell proliferation and apoptosis in vivo in xeno-GvHD mice.</i> .....	108
Figure 6.9.1 – <i>MSCs increase survival following induction of xeno-GvHD in NSG mice.</i> .....	157
Figure 6.9.2 – <i>MSCs have a protective effect against radiation-induced damages.</i> .....	158
Figure 6.9.3 – <i>MSCs reduce the percentage but not the absolute number of human cells after xeno-GvHD induction.</i> .....	159
Figure 6.9.4 – <i>MSCs reduce both the percentage and the absolute number of human cells in non-irradiated mice injected with PBMCs.</i> .....	160
Figure 6.9.5 – <i>MSC treatment affects human T-cell proliferation and infiltration and murine cell apoptosis in the liver of NSG mice upon xeno-GvHD induction.</i> .....	161
Figure 6.9.6 – <i>MSC injection does not modify the activation marker profile of human T-cells.</i> .....	162
Figure 6.9.7 – <i>Human APCs are able to present murine antigens and trigger T-cell activation.</i> .....	163
Figure 6.9.8 – <i>Phenotypic profile and ability to mineralize in vitro of late passage (PD 53) cord blood-derived MSCs.</i> .....	164

## Liste des sigles et abréviations

---

### 0-9

---

7-AAD      *7-aminoactinomycin D*

### A

---

ADCC      Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps  
*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*

AMR      *Antibody-mediated rejection*

ANCA      Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles  
*Antineutrophil cytoplasm antibodies*

APC      Cellules présentatrices d'antigène  
*Antigen presenting cells*

APC      *Allophycocyanin*

Asialo-GM1      *Asialo ganglio-N-tetraosylceramide*

ATG      Globuline anti-thymocyte  
*Anti-thymocyte globulin*

### B

---

BAT3      *Human leukocyte antigen HLA-B associated transcript 3*

BP      Pemphigoïde bulleuse  
*Bullous pemphigoid*

BrdU      5-bromo-2'-deoxyuridine

## C

---

CB	Sang de cordon ombilical <i>Cord blood</i>
CD	Groupe de différenciation <i>Cluster of differentiation</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CIDP	Polyradiculonévrite inflammatoire demyélinisante chronique <i>Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy</i>
CLL	Leucémie lymphoïde chronique <i>Chronic lymphoid leukemia</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CPM	Compte par minute <i>Counts per minute</i>
CRA	Test de relargage de chrome <i>Chromium release assay</i>
CRTAM	<i>Class I-restricted T-cell-associated molecule</i>
CsA	Cyclosporine A
CTL	Lymphocytes T cytotoxiques <i>Cytotoxic T lymphocytes</i>
Cy	Cyclophosphamide

## D

---

DAMP	Motifs moléculaires associés au danger <i>Danger-associated molecular pattern</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DC	Cellules dendritiques <i>Dendritic cells</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin</i>

## E

---

EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale <i>Experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
EBV	Virus de l'Epstein-Barr <i>Epstein-Barr virus</i>

## F

---

Fab/F(ab') <sub>2</sub>	Fragment de liaison à l'antigène
Fc	Fragment cristallisable
FcγRs	Récepteurs Fcγ
FcRn	Récepteur Fc néonatal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>

## G

---

GBS	Syndrome de Guillain-Barré <i>Guillain-Barré syndrome</i>
GI	Gastro-intestinal
GLPAR	Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche <i>Good Laboratory Practices for Animal Research</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GvHD	Réaction du greffon contre l'hôte <i>Graft-versus-host disease</i>
GvL/GvT	Effet du greffon contre la leucémie/Effet du greffon contre la tumeur <i>Graft-versus-leukemia/Graft-versus-tumor</i>

## H

---

HA	Hémagglutinine
HLA	Antigène des leucocytes humains <i>Human leukocyte antigen</i>
HSCT	Grefe de cellules souches hématopoïétiques <i>Hematopoietic stem cell transplantation</i>
huPBMCs	Cellules mononucléées de sang périphérique humain <i>Human peripheral blood mononuclear cells</i>

# I

---

ICAM	Molécule d'adhésion cellulaire intracellulaire <i>Intracellular adhesion molecule</i>
IFN- $\gamma$	Interféron- $\gamma$
IgA	Immunoglobuline A
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IL	Interleukine
IP	Intrapéritonéale
ITAM	Motifs permettant l'activation des immunorécepteurs <i>via</i> une tyrosine <i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	Motifs permettant l'inhibition des immunorécepteurs <i>via</i> une tyrosine <i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
ITP	Thrombocytopénie immune <i>Idiopathic thrombocytopenic purpura</i>
IV	Intraveineux
IVIG	Immunoglobuline intraveineuse <i>Intravenous immunoglobulin</i>

## J

---

JIA            Arthrite juvénile idiopathique  
*Juvenile idiopathic arthritis*

## K

---

KIRs           Récepteurs d'inhibition des cellules tueuses  
*Killer-cell immunoglobulin-like receptors*

## L

---

LFA-1           *Leukocyte function-associated antigen-1*

LLT1           *Lectin-like transcript 1*

LPS            Lipopolysaccharides

## M

---

mHag           Antigène mineur d'histocompatibilité  
*Minor histocompatibility antigen*

MIP            Protéines inflammatoires des macrophages  
*Macrophage inflammatory proteins*

MM            Myélome multiple

MMF           Mycophenolate mofetil

MMN           Neuropathie motrice multifocale  
*Multifocal motor neuropathy*

MSC            Cellules stromales mésenchymateuses  
*Mesenchymal stromal cells*



MTX	Methotrexate
mTOR	Cible de la rapamycine chez les mammifères <i>Mammalian target of rapamycin</i>

## N

---

NCR	Récepteurs de cytotoxicité naturel <i>Natural cytotoxicity receptors</i>
-----	---

NK	<i>Natural killer</i>
----	-----------------------

NLR	Récepteur de type NOD <i>NOD-like receptor</i>
-----	---

NOD	Diabétique non obèse <i>Non-obese diabetic</i>
-----	---

NSG	NOD/ <i>scid</i> -IL2 $\gamma$ <sup>-/-</sup>
-----	---

## O

---

OKT3	<i>Muromonab-CD3</i>
------	----------------------

## P

---

PAMPs	Motifs moléculaires associés aux pathogènes <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
-------	--

PBS	Saline phosphate tamponnée <i>Phosphate buffered saline</i>
-----	--

PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
-------	----------------------------------

PE	<i>R-phycoerythrin</i>
PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein complex</i>
PF	<i>Pemphigus foliaceus</i>
PGNase F	Peptide <i>N</i> -glycosidase F
PV	<i>Pemphigus vulgaris</i>

## R

---

RAG	Gène activateur de la recombinaison <i>Recombination activating gene</i>
-----	---

## S

---

scid	Immunodéficience combinée grave <i>Severe combined immunodeficiency</i>
Siglecs	<i>Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins</i>
SIGNR1	<i>Specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin homolog-related 1</i>
SIRP $\alpha$	<i>Signal regulatory protein <math>\alpha</math></i>
SLE	Lupus érythémateux disséminé <i>Systemic lupus erythematosus</i>
SLO	Organe lymphoïde secondaire <i>Secondary lymphoid organ</i>
Stat	Transducteur du signal et activateur de la transcription <i>Signal transducer and activator of transcription</i>

## T

---

TCR	Récepteur des cellules T <i>T cell receptor</i>
Teff	Lymphocyte T effecteur
TEN	Nécrolyse épidermique toxique <i>Toxic epidermal necrolysis</i>
TGF- $\beta$	Facteur de croissance transformant $\beta$ <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TIGIT	<i>T cell immunoglobulin and ITIM domain</i>
TLR	Récepteurs de type Toll <i>Toll-like receptors</i>
TNF	Facteur de nécrose tumorale <i>Tumor necrosis factor</i>
Treg	Lymphocyte T régulateur <i>Regulatory T cell</i>

## V

---

VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
-----	-------------------------------------

## X

---

Xeno-GvHD	GvHD xénogénique <i>Xenogeneic GvHD</i>
-----------	--

## Dédicace

---

*Ce n'est pas de faire une thèse qui est difficile, c'est de la terminer !*

*Dr Denis Gauthier*

## Remerciements

---

Je tiens à remercier Dr Elie Haddad qui m'a accueillie au sein de son équipe de recherche. Il m'a permis d'y effectuer mes travaux de recherche de maîtrise, et fut enthousiaste à l'idée de poursuivre l'aventure jusqu'à l'obtention de ma thèse de doctorat. Merci d'avoir accepté de me superviser lors de ces travaux, j'ai grandement appris lors de mon séjour au sein de votre équipe. Ces connaissances demeureront toujours avec moi.

Évidemment, rien n'aurait été possible sans l'appui de l'incroyable équipe de recherche à laquelle j'ai eu le privilège d'appartenir. François, Massar, Arnaud, Ludovic, Silvia, Simon, Frédéric et Lionel, merci pour votre présence, soutien et entraide. Vous avez fait du laboratoire un endroit exceptionnel et inoubliable à jamais.

# **Chapitre 1 Introduction**

## **1.1 Mise en contexte**

---

Plus de 25 000 procédures de greffe de cellules souches hématopoïétiques (*hematopoietic stem cell transplantation* : HSCT) allogéniques sont effectuées de par le monde annuellement pour le traitement de maladies hématologiques (1-3). Les améliorations réalisées lors des dernières années au niveau des techniques de typage de l'antigène des leucocytes humains (*human leukocyte antigen* : HLA) et des soins en aval de la greffe ont grandement contribué à diminuer l'incidence de la réaction du greffon contre l'hôte (*graft-versus-host disease* : GvHD) et de la mortalité chez les patients greffés. Cependant, il pourrait sembler que le souci d'améliorer la prophylaxie et les protocoles cliniques de prévention de la GvHD ait été ignoré depuis quelque temps (4). Ainsi, malgré les avancées technologiques qu'a connues le protocole clinique de transplantation au cours des dernières années et malgré l'accès à de meilleurs traitements prophylactiques disponibles, près de 50% des patients receveurs de HSCT développent toujours aujourd'hui une GvHD qui s'avère fatale dans 15% des cas (1, 5). En effet, à ce jour, la GvHD est un problème très sérieux et représente la plus grande cause de mortalité post-HSCT, bien avant la rechute de la maladie initiale (6). Une telle prévalence de la GvHD limite le nombre d'interventions effectuées chaque année, principalement à cause des risques encourus par le patient (3). Il est donc impératif d'améliorer les protocoles cliniques de prophylaxie et de traitement de première ligne dans les cas de GvHD, afin de pouvoir étendre l'utilisation de la HSCT au traitement de maladies hématologiques, immunitaires et inflammatoires.

## **1.2 Les greffes de cellules souches hématopoïétiques**

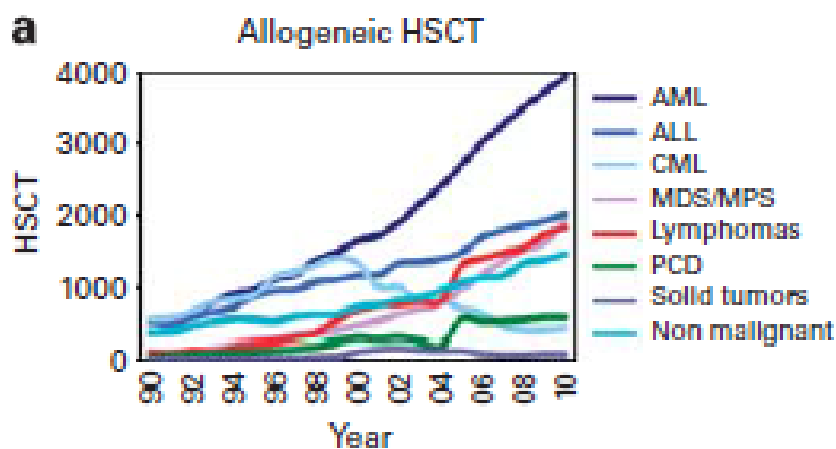
---

Dans le cas du traitement d'une maladie hématologique, la HSCT se déroule selon un protocole précis et bien établi. Les patients reçoivent d'abord un traitement de chimiothérapie et/ou radiothérapie qui cible spécifiquement la maladie hématologique qui les afflige, dans le but d'éliminer le plus grand nombre de cellules responsables de la maladie avant d'entreprendre la greffe. Par la suite, les patients reçoivent un traitement de pré-conditionnement. Ce traitement élimine les cellules résiduelles de la maladie résistantes à la chimiothérapie et/ou radiothérapie, mais immunosupprime malheureusement également le patient. Cette immunosuppression contribue à éviter le rejet de la greffe par le système immunitaire du patient. Une fois greffées, les cellules immunocompétentes du greffon peuvent alors éliminer, grâce à leur alloréactivité envers les cellules du patient, les cellules résiduelles de la maladie. Cet effet est nommé réaction du greffon contre la leucémie (*graft-versus-leukemia* : GvL). Les cellules

immunocompétentes du greffon participent également à la reconstruction du système immunitaire, essentielle pour le patient (2, 4, 6, 7).

Tel que spécifié précédemment, la GvHD est la première cause de complication post-HSCT, mais suivent derrière celle-ci l'échec de la prise de la greffe et la susceptibilité immunitaire du patient, causée par le délai de la reconstitution immunitaire post-greffe (6). Ces complications sont par ailleurs plus fréquentes et sévères lorsque le greffon ayant servi à la greffe provient d'un donneur qui n'est pas apparenté au niveau HLA vis-à-vis au patient receveur de la greffe (8), soulignant l'importance de bien sélectionner le donneur potentiel dans les cas où la greffe est nécessaire dans le traitement de la maladie.

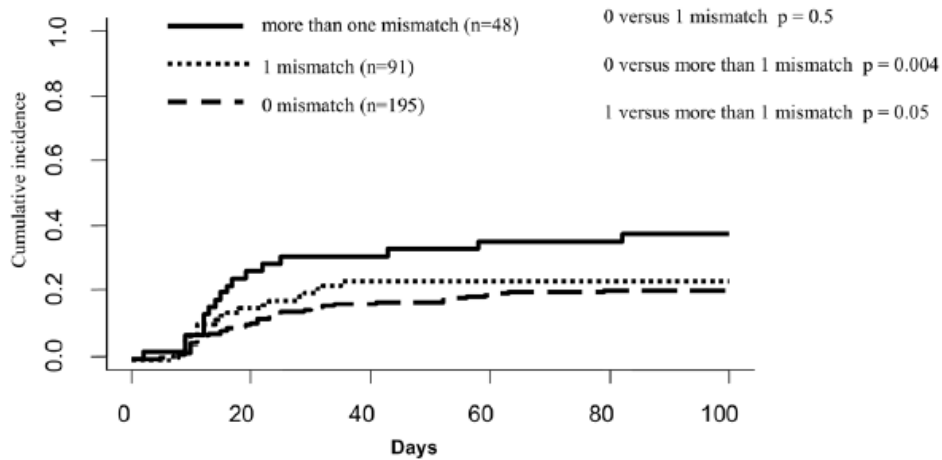
Des 13 345 HSCT allogéniques réalisées en Europe en 2010, 71% ont été effectuées chez des patients leucémiques (Figure 1.2.1, p.3). Les cellules souches proviennent de sang périphérique, de moelle osseuse ou de sang de cordon ombilical (*cord blood*: CB) dans 71%, 22% et 6% des cas, respectivement (9).



**Figure 1.2.1 – Principaux diagnostics nécessitant une HSCT allogénique (1990-2010).** Nombre absolu de patients qui ont reçu une HSCT allogénique selon le diagnostic principal pour les années 1990-2010. *Reprinted and translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: Bone Marrow Transplantation (9), copyright 2012. License number 3418990373066.*

Le niveau de disparité HLA entre le donneur et le receveur a un impact majeur sur le pronostic. En effet, plus le degré de disparité HLA est élevé, plus le risque de développer une GvHD devient élevé (Figure 1.2.2, p.4), sans toutefois que ceci affecte le risque de rechute de la maladie (8, 10-12).





**Figure 1.2.2 – Effet du degré de disparité HLA-A, -B, -C, -DRB1 ou -DQB1 sur la GvHD aiguë de grade III-IV.** Reprinted from *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 13, Loiseau P, Busson M, Balere ML, et al., *HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival*, 965-974, Copyright (2007), with permission from Elsevier. License number 3418991065808.

Les donneurs potentiels sont donc testés pour leur génotype HLA et sélectionnés en fonction de leur degré de similarité avec le receveur qui est en attente de greffe. Classiquement, pour qu'un patient soit greffé, le niveau de compatibilité HLA du greffon devait être d'au moins 5/6 pour les loci HLA-A, -B et -DRB1. Cependant, depuis 2005, le HLA-C a été ajouté à cette liste, puisqu'on a découvert que la compatibilité à ce locus réduit le risque de complications post-HSCT. On parle donc aujourd'hui de greffon avec compatibilité HLA d'au moins 7/8 pour procéder à la greffe (12, 13). Lorsque plusieurs donneurs sont envisagés pour une même greffe, on peut également tester le locus HLA-DPB1, lequel permettra de choisir le donneur avec le plus grand degré de similitude, réduisant ainsi les risques de complications post-HSCT (8).

Il semble exister quelques discordances en ce qui concerne le risque relatif de développer une GvHD en fonction des loci où sont situées les disparités HLA. Certaines études suggèrent que les disparités au niveau des loci HLA-B et -C sont associées à un plus haut risque de développer une GvHD (8), alors que d'autres suggèrent que les disparités HLA-A et -DRB1 sont plus importantes (11). Sommes toutes, les disparités au niveau HLA-A, -B, -C, et -DRB1 sont fortement corrélées à une diminution de la survie du patient post-HSCT (8, 11, 12, 14). La disparité HLA-DQB1 est par ailleurs plutôt pauvre de conséquence, à moins qu'elle ne soit jumelée à une autre disparité HLA. En effet, l'expérience

internationale en HSCT a prouvé que les effets négatifs de la disparité HLA sont cumulatifs (11, 12). Cette même expérience a permis de démontrer que le taux de survie est meilleur chez les patients qui reçoivent une HSCT provenant d'un donneur HLA-compatible apparenté que ceux qui reçoivent un greffon comportant une disparité HLA ou provenant d'un donneur non-apparenté (10).

Bien que le degré de disparité HLA soit un facteur important pour établir le succès de la HSCT, il ne faut pas négliger d'autres paramètres qui peuvent influencer le succès de la procédure, tels que l'âge du patient, la nature de la maladie, le stade de la maladie au diagnostic, le statut sérologique CMV (cytomégalovirus) et l'ethnicité. Ces paramètres, malgré les améliorations apportées aux protocoles cliniques de traitement pré- et post-HSCT, demeurent les facteurs prédictifs les plus critiques pour la survie du patient (11).

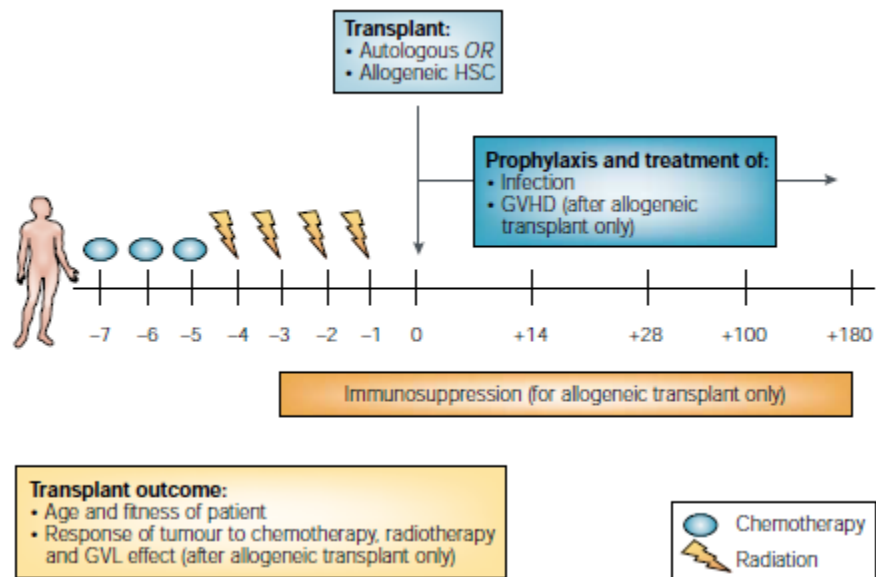
Seulement 25% des patients qui nécessitent une HSCT allogénique peuvent compter sur l'existence d'un donneur HLA-identique apparenté. Lorsqu'il est question de patients leucémiques pédiatriques, ce ne sont que 33% de ce nombre qui peuvent compter sur la présence d'un donneur apparenté avec compatibilité HLA parfaite (10). De plus, moins de 60% des patients caucasiens en attente d'une greffe peuvent compter sur un donneur HLA-compatible non-apparenté, alors que pour les ethnies non caucasiennes, ce ne sont que 20 à 45% des patients qui trouveront un donneur HLA 8/8 (HLA-A, -B, -C, -DR) (15). En l'absence d'un donneur approprié, le recours à l'utilisation de greffon provenant de CB ou de donneurs apparentés HLA-haploidentiques est en constante augmentation (16).

### **1.2.1 Le traitement de conditionnement pré-greffe**

---

Le traitement de conditionnement pré-greffe sert d'abord et avant tout à éliminer les cellules responsables de la maladie et à immunosupprimer le patient afin d'augmenter l'efficacité de la transplantation. Ces méthodes de conditionnement pour la transplantation peuvent comprendre la combinaison de divers médicaments (drogues alkylantes, antimétabolites, anticorps naturels ou monoclonaux), avec ou sans l'irradiation corporelle totale du patient. Historiquement, le traitement pré-greffe causait une destruction totale de la moelle osseuse du patient, ce qu'on décrit comme étant une thérapie myéloablative. Bien que ceci soit un avantage dans la lutte contre la maladie, un risque significatif de toxicité est associé à ce traitement, ce qui peut mener à des complications découlant d'infections et de dommages aux organes (2).

Afin de remédier à ces effets secondaires négatifs, le traitement pré-greffe avec conditionnement d'intensité réduite a fait son apparition dans les dernières années, menant à la réduction de l'incidence de la GvHD (17). Ce traitement d'intensité réduite ne détruit pas complètement la moelle osseuse et est donc considéré non-myéloablatif (2). Environ 40% des HSCT aujourd'hui sont effectuées avec ce type de conditionnement, moins létal pour le patient (9). Dans ces conditions, les macrophages sont moins sensibles aux lipopolysaccharides (LPS), qui sont surtout relâchés au niveau du tractus gastro-intestinal suite au dommage tissulaire infligé par le traitement pré-greffe. Cette perte de sensibilité réduit la production de TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor* : facteur de nécrose tumorale  $\alpha$ ), une cytokine impliquée dans la tempête de cytokines, et donc réduit la GvHD (18), tout en augmentant les chances que le patient développe une GvHD à déclenchement tardif (19). Une diminution de la GvHD est également paradoxalement corrélée à une augmentation du taux d'échec de greffe, de rechute de la maladie (l'effet GvL est atténué) et des infections (3, 20). Suite au traitement de conditionnement approprié, celui-ci reçoit la HSCT, qui est accompagnée du traitement de prophylaxie pour la GvHD (Figure 1.2.3, p.7).



**Figure 1.2.3 – Conditionnement pré-greffe et facteurs pouvant influencer le résultat de la HSCT.** Les patients recevant une HSCT pour le traitement d’une maladie hématologique doivent tout d’abord recevoir un traitement de chimiothérapie ou radiothérapie sur une période pouvant atteindre sept à dix jours (débutant au jour -7 sur l’échelle thérapeutique). Ces patients reçoivent ensuite une HSCT allogénique provenant d’un donneur apparenté ou non (jour 0), à la suite d’un conditionnement pré-greffe à haute dose ou à intensité réduite. Les patients reçoivent des immunosuppresseurs pour la prévention du rejet des cellules greffées. Les principaux paramètres pouvant affecter le résultat de la HSCT incluent la susceptibilité de la maladie à la chimiothérapie, l’induction de la GvL par les cellules immunitaires du greffon et l’état de santé du patient (âge, thérapies anti-cancer préalables, infections existantes). La composition du conditionnement pré-greffe et la source des cellules souches utilisées pour la HSCT peuvent également affecter la réussite de la HSCT. D’autres variables importantes à considérer lors de la HSCT allogénique incluent le type d’immunosuppresseurs utilisés, le traitement de prophylaxie, le développement de GvHD, ainsi que la présence d’infections opportunistes. *Reprinted and translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer (7), copyright (2003). License number 3418991364384.*

## 1.2.2 Sources de cellules souches pour les HSCT

---

Historiquement, les cellules souches nécessaires à la HSCT étaient récupérées de la moelle osseuse. Au fil des ans, avec les progrès technologiques, les cellules souches ont pu être obtenues d'échantillons de sang périphérique, ce qui comporte moins de risques et occasionne moins de douleur pour le donneur. De plus, les cellules souches mobilisées de sang périphérique permettent une reconstitution immunitaire plus rapide que celle obtenue suite à la greffe de cellules souches de moelle osseuse. Toutefois, l'utilisation de cellules souches mobilisées de sang périphérique est accompagnée d'un plus haut taux d'infections chez le patient greffé (21). Aussi, une étude effectuée sur des patients adultes démontre que cette source de cellules souches cause un plus haut taux de GvHD, ce qui réduit considérablement le taux de rechute de la maladie. Ce phénomène est attribué à l'effet GvL plus puissant dans ces conditions, ainsi qu'au nombre plus élevé de lymphocytes T cytotoxiques (*cytotoxic T lymphocytes* : CTL) au sein des greffons provenant du sang périphérique (22).

Lors de greffes de cellules souches de CB, le nombre de cellules au sein du greffon est un paramètre important, qui est directement corrélé à la rapidité de la prise de greffe (12). Du fait que le CB contient plus de lymphocytes T naïfs, les disparités HLA du CB sont mieux tolérées et causent moins de GvHD que les autres sources de cellules souches (7, 23-25). Les unités de CB ont été utilisées comme source de cellules souches pour HSCT pour la première fois en 1988. Depuis, plus de 25 000 HSCT de CB ont été effectuées mondialement (7, 15, 26) et dans 75% des cas, les patients pédiatriques greffés avec les CB souffraient de leucémie aiguë (27). On estime qu'il y a à ce jour plus de 200 000 unités de CB entreposées dans près d'une quarantaine de banques de CB à l'échelle mondiale (28). Leur disponibilité immédiate, la plus grande facilité d'organisation des procédures (traitement de conditionnement pré-greffe et initiation de la prophylaxie), l'absence de risque pour le donneur, le risque diminué de transmission virale latente, la plus grande variété de HLA disponibles, la longueur des télomères des cellules et le plus faible risque de développer une GvHD en font une source de cellules souches attrayante pour la HSCT. Il ne faut cependant pas oublier les inconvénients d'une telle greffe, notamment la présence prépondérante de lymphocytes naïfs contre les virus et bactéries, l'absence de cellules accessoires qui peuvent faciliter la prise de greffe, le délai de reconstitution immunitaire et l'impossibilité d'obtenir plus de cellules dans le but d'améliorer la reconstitution immunitaire et l'effet GvL (7, 24, 25, 28). À cet effet, lorsqu'il existe des unités de CB possédant un degré de disparité HLA de deux ou moins, la sélection de l'unité doit être effectuée selon le nombre de cellules au sein du greffon, afin d'augmenter les chances de prise de greffe, diminuer la mortalité liée à la greffe, et augmenter la survie (26). Lorsqu'une seule unité de CB n'est pas suffisante en terme de

nombre de cellules pour une greffe, un problème qui est le plus souvent rencontré chez la population adulte, la greffe de deux ou plusieurs unités de CB est effectuée, avec comme conséquence directe, une augmentation de l'incidence de la GvHD (15). Somme toute, la survie et le risque de rechute à long terme post-HSCT de CB sont semblables à ceux obtenus avec d'autres sources de cellules souches (7).

Les lymphocytes T de CB semblent devenir plus facilement tolérants aux antigènes HLA du receveur que les lymphocytes T de moelle osseuse, et ce pour un même degré de disparité HLA entre le donneur et le receveur (28). Ceci pourrait expliquer en partie le risque et la sévérité réduite de la GvHD suite aux HSCT de CB. De plus, les lymphocytes T de CB produisent moins de cytokines, dû à leur immaturité fonctionnelle, réduisant ainsi la sévérité de la tempête de cytokines caractéristique du développement de la GvHD (28).

### **1.2.3 Reconstitution immunitaire post-greffe**

---

Un facteur déterminant dans l'évaluation de la réussite de la greffe est la qualité de la reconstitution immunitaire. En effet, le patient est immunosupprimé avant de recevoir la greffe et se trouve donc dans un état de vulnérabilité face aux infections (bactériennes, virales, fongiques). Il est donc primordial d'avoir une reconstitution immunitaire robuste dans les meilleurs délais afin de diminuer la morbidité et la mortalité post-greffe.

La reconstitution immunitaire se déroule habituellement dans un ordre précis. Le système immunitaire inné se développe d'abord, avec l'apparition des monocytes, granulocytes, macrophages et cellules NK (*natural killer*). Le système immunitaire adaptatif est plus lent à se différencier, pouvant prendre jusqu'à six mois ou un an pour reconstituer les lymphocytes B, et deux ans pour la reconstitution complète des lymphocytes T. Plusieurs facteurs peuvent influencer la rapidité de la reconstitution immunitaire, tels que l'âge du patient, le type de donneur, la source des cellules souches hématopoïétiques, la méthode de déplétion des lymphocytes T, ainsi que le traitement prophylactique utilisé contre la GvHD (29).

Une étude récente sur des patients pédiatriques de HSCT allogéniques démontre qu'après trois mois, 54% des patients ont achevé la reconstitution des cellules NK, alors que 46% des patients seulement ont reconstitué leurs lymphocytes T cytotoxiques. Un an après la greffe, ce sont seulement 23% et 47% des patients qui ont achevé les reconstitutions lymphocytaires T auxiliaires et B, respectivement (29). Évidemment, la GvHD peut influencer la qualité de la reconstitution immunitaire. Ainsi, la

reconstitution peut être compromise pour les compartiments cellulaires lymphocytes T et B, ainsi que les cellules NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> chez les patients atteints de GvHD (29).

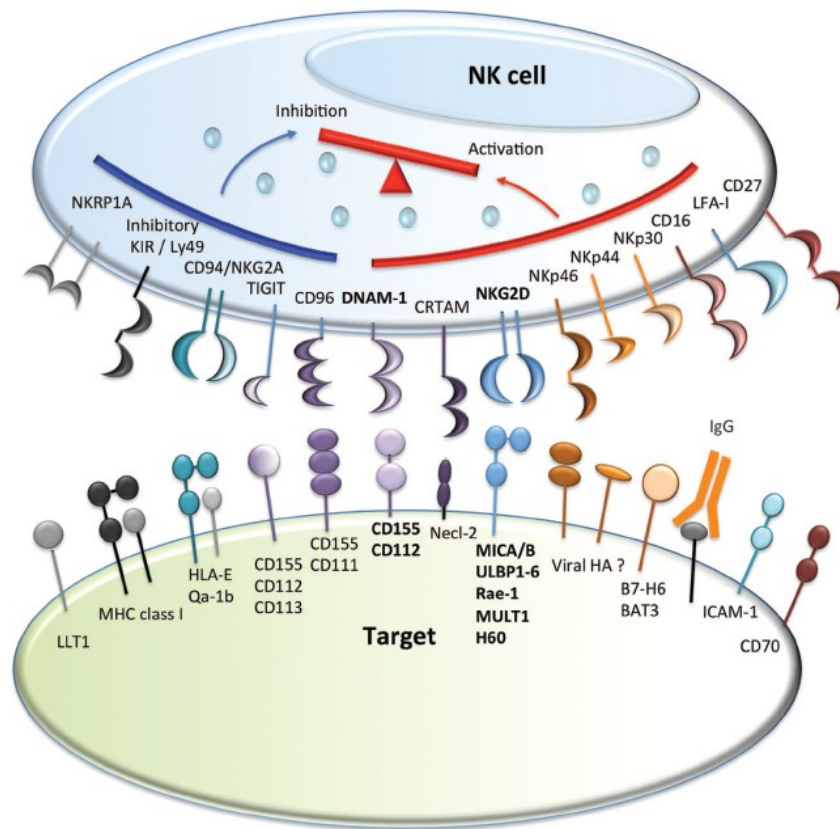
Il est intéressant de noter que la source des cellules souches pour la HSCT peut également avoir un effet sur la reconstitution immunitaire post-greffe. Bien qu'elle soit plus lente à se manifester, la reconstitution immunitaire post-greffe de CB demeure toutefois équivalente à celle obtenue suite à une greffe de moelle osseuse (7, 30).

#### **1.2.4 Les cellules NK**

---

Les cellules NK sont des cellules lymphoïdes innées, dérivées des progéniteurs lymphoïdes communs provenant de la moelle osseuse. Dans la moelle osseuse, les cellules stromales fournissent les cytokines nécessaires (IL-3, IL-7, ligand flt3 et ligand c-kit) pour transformer les cellules progénitrices hématopoïétiques afin qu'elles expriment l'IL-15R, une étape clé dans leur engagement vers la lignée cellulaire NK (31-38). Ces cytokines favorisent également l'homéostasie des cellules dendritiques (*dendritic cells* : DC), une population de cellules accessoires hématopoïétiques qui fournissent l'IL-15 et améliorent ainsi la production des cellules NK (39). Une fois l'IL-15R $\beta$  acquis par les cellules progénitrices hématopoïétiques (40), le processus de différenciation cellulaire vers la lignée NK se met en branle, en promouvant la différenciation, la maturation fonctionnelle et la survie des cellules NK (41). Les progéniteurs de cellules NK, possédant déjà les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  de l'IL-15R et étant déficientes pour les marqueurs de surface spécifiques aux autres lignées cellulaires (42), poursuivent leur développement en acquérant de façon progressive et ordonnée les récepteurs fonctionnels CD161, CD56, CD94/NKG2A, NKp46, NKG2D, les récepteurs d'inhibition des cellules tueuses (*killer-cell immunoglobulin-like receptors* : KIRs) et le CD16 (31, 43, 44). À ce point, les cellules NK matures, qui ont une durée de vie d'environ 10 à 20 jours (45-47), peuvent être divisées en deux groupes fonctionnels distincts, qui diffèrent également par leur distribution *in vivo* : les cellules NK CD56<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup>, prédominantes dans les organes lymphoïdes secondaires, qui sécrètent des cytokines (interféron- $\gamma$  : IFN- $\gamma$ ), et les cellules NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, prédominantes dans le sang périphérique, capables de cytotoxicité cellulaire par un mécanisme dépendant de la perforine (48).

Contrairement aux lymphocytes B et T, les cellules NK n'ont pas besoin de subir un réarrangement clonal de leurs récepteurs pour détecter les antigènes et ne subissent pas d'expansion clonale suite à leur activation, qui est plutôt régulée par l'intégration de signaux provenant des récepteurs de surface activateur et inhibiteur (Figure 1.2.4, p.11).



**Figure 1.2.4 – Les récepteurs des cellules NK et leurs ligands.** Les principaux récepteurs inhibiteurs et activateurs des cellules NK, ainsi que leurs ligands exprimés par les cellules cibles. BAT3, *human leukocyte antigen HLA-B-associated transcript 3*; CRTAM, *class I-restricted T-cell-associated molecule*; HA, hémagglutinine; HLA-E, *HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain E*; IgG, immunoglobuline G; LFA-1, *leukocyte function-associated antigen-1*; LLT1, *lectin-like transcript 1*; TIGIT, *T cell immunoglobulin and ITIM domain*. Reprinted and translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Cell Death & Differentiation* (49), copyright 2013. License number 3419040523167.

Les ligands pour les récepteurs activateurs sont des protéines du Soi qui sont habituellement rarement exprimées sur les cellules normales, mais dont l'expression est augmentée lors d'une infection ou d'une transformation maligne (23). Ainsi, les cellules NK peuvent reconnaître, sans exposition préalable, les cellules transformées et les éliminer. Afin d'éviter d'être reconnues par les lymphocytes T, et ainsi déclencher une réponse immunitaire à médiation cellulaire, les cellules transformées peuvent réduire l'expression du HLA à leur surface. Cependant, cette réduction de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface cellulaire peut être reconnue par les cellules NK par le mécanisme de la reconnaissance du Soi manquant, ce qui veille à leur élimination (23).



Parmi les récepteurs activateurs, on trouve principalement le NKG2D, les récepteurs de cytotoxicité naturels (*natural cytotoxicity receptors* : NCRs; NKp30, NKp44 et NKp46) et le CD16. Ces récepteurs des cellules NK jouent un rôle primordial dans la surveillance tumorale (carcinomes, mélanomes, neuroblastomes, leucémies myéloïdes et lymphoïdes, myélomes multiples et lymphocytes B modifiés par le virus de l'Epstein-Barr (EBV)), leurs ligands étant majoritairement exprimés à la surface de ces cellules (50). L'engagement de ces récepteurs avec leur ligand engendre donc de la cytotoxicité, ainsi que la production de cytokines (49-51). Tel qu'expliqué précédemment, les IgG contenues dans les IVIG et spécifiques à certains antigènes exprimés par les cellules pourront s'y lier et seront par la suite reconnues par le récepteur Fc $\gamma$ III (Fc $\gamma$ RIII (CD16)) à la surface des cellules NK. La liaison du fragment cristallisable (Fc) de l'IgG et du CD16 engendra la sécrétion de cytokines. Ce mécanisme pourra donc protéger le patient traité de certaines infections. Les cellules NK portent également à leur surface des récepteurs de type Toll (*Toll-like receptors* : TLR), qui peuvent, grâce à un mécanisme semblable, rapidement reconnaître les cellules infectées par différents pathogènes (52) et ainsi protéger le patient, sans avoir besoin d'une exposition préalable.

Les cellules NK expriment également à leur surface des KIRs (52). Suite à une HSCT allogénique, les cellules NK peuvent persister chez un patient pendant plusieurs années (53). Dans la plupart des cas, il existe une incompatibilité au niveau des KIRs entre le donneur et le receveur. On privilégie habituellement les greffons où les cellules NK expriment des KIRs qui ne reconnaîtront pas les HLA du receveur, ce qui mène à l'effet bénéfique GvL, où les cellules NK peuvent tuer les cellules tumorales résiduelles ainsi que les DC et les lymphocytes T du receveur, sans pour autant causer un effet GvHD (16, 23, 51, 53-55).

### **1.3 Réaction du greffon contre l'hôte**

---

La GvHD, ainsi que la rechute de la leucémie et la déficience immunitaire post-greffe, sont les limitations majeures de la HSCT (56). Lorsqu'un patient développe une GvHD, ceci peut se résumer en quatre conséquences directes : une atteinte des organes, qui nécessite une thérapie immunosuppressive, des risques d'infections secondaires, un risque élevé de développer une GvHD chronique, et dans certains cas, un effet GvL bonifié (19, 57). Malheureusement, l'effet bénéfique GvL de la HSCT se traduit également en un effet délétère potentiellement mortel de GvHD, où les cellules immunocompétentes du greffon s'attaquent aux cellules du patient (4). Tel que décrit précédemment, le raffinement des techniques de génotypage HLA, ainsi que les méthodes plus efficaces de prévention et

de traitement de la GvHD des dernières années a beaucoup aidé à améliorer le taux de survie, ainsi que la survie à long terme chez les receveurs de HSCT pédiatriques (19), mais ces améliorations sont encore insuffisantes.

### **1.3.1 Description de la réaction**

---

Les organes cibles de la GvHD sont la peau, le foie et le tractus gastro-intestinal (58), tous des organes exposés à l'environnement extérieurs qui sont riches en DC (59), et donc on peut suspecter qu'il y a une forte présentation d'antigènes étrangers. Cliniquement, on peut suspecter une GvHD lorsque le receveur de HSCT développe des signes et symptômes tels que : dermatite (éruptions cutanées), ampoules cutanées, crampes abdominales accompagnées ou non de diarrhée, anorexie, nausée persistante et vomissements, hépatite (avec élévation de bilirubine et/ou enzymes du foie). Ces signes et symptômes débutent habituellement avec la prise de la greffe et s'ils ne sont pas rapidement pris en charge, pourront s'avérer fatals pour le patient (3, 4, 58). Lorsque le médecin traitant suspecte un cas de GvHD chez un patient, il doit tout d'abord s'assurer de confirmer le diagnostic par biopsie, puisque plusieurs de ces symptômes peuvent s'apparenter à ceux d'infections virales ou à de la toxicité découlant de l'utilisation des médicaments pour le traitement pré-greffe et la prophylaxie de la GvHD (58).

La peau est généralement le premier organe affecté (3) et sa biopsie peut mettre en évidence des kératinocytes dyskératotiques, avec ou sans la présence de lymphocytes satellites, l'exocytose de lymphocytes, la nécrose de cellules basales, ainsi que la déplétion des cellules de Langerhans. L'endoscopie du tractus gastro-intestinal peut par ailleurs révéler de l'œdème, un détachement de la muqueuse, et possiblement des saignements. Ces symptômes sont typiquement retrouvés au niveau du caecum, de l'iléum, et du colon, mais peuvent aussi être répertoriés au niveau de la partie supérieure du tractus intestinal. Au niveau du foie, l'étude pathologique démontre habituellement des attaques de lymphocytes cytotoxiques au niveau du canal cholédoque, ou un canal cholédoque irrégulier. Les cellules épithéliales peuvent être aplaties avec des noyaux manquants alors que dans d'autres cas, les noyaux peuvent être élargis, irréguliers et hyperchromatiques (58).

Plusieurs facteurs de risque peuvent influencer le développement de la GvHD : l'existence de disparité HLA entre le donneur et le receveur, l'âge et le sexe du receveur, la source des cellules souches utilisées pour la greffe, la prophylaxie utilisée pour la GvHD, le type de conditionnement pré-greffe, ainsi que l'omission de la déplétion des lymphocytes T du greffon (19).

La caractérisation de la GvHD aiguë est divisée en stages, et la sévérité, en grades. Les critères consensus utilisés pour caractériser les GvHD ont été établis lors de la conférence consensus de Keystone en 1994 (5) (Tableau 1.1, p.14) et prennent en considération le degré d'implication des trois organes cibles de la GvHD. Plus le grade de GvHD est sévère, plus le pronostic de survie à long terme pour le patient est négatif, pouvant atteindre un taux de survie d'à peine 5% chez les patients de grade IV sur la période de cinq ans post-greffe (60).

**Tableau 1.1 – Détermination du stage et grade de la GvHD aiguë.** Tiré de Arora M. *GVHD stage/grade interpretation : CIBMTR Summary Slides, 2010. Disponible au <http://www.cibmtr.org> (61).*

Stage	Peau (% aire de surface du corps)	Foie (bilirubine mg/dL)	Tractus gastro-intestinal Diarrhée (mL/jour)	
1	<25	2-3	500-1000	
2	25-50	3,1-6	1000-1500	
3	Erythrodermie généralisée	6,1-15	>1500	
4	Erythrodermie avec formation de cloches	>15	Douleur +/- iléus	

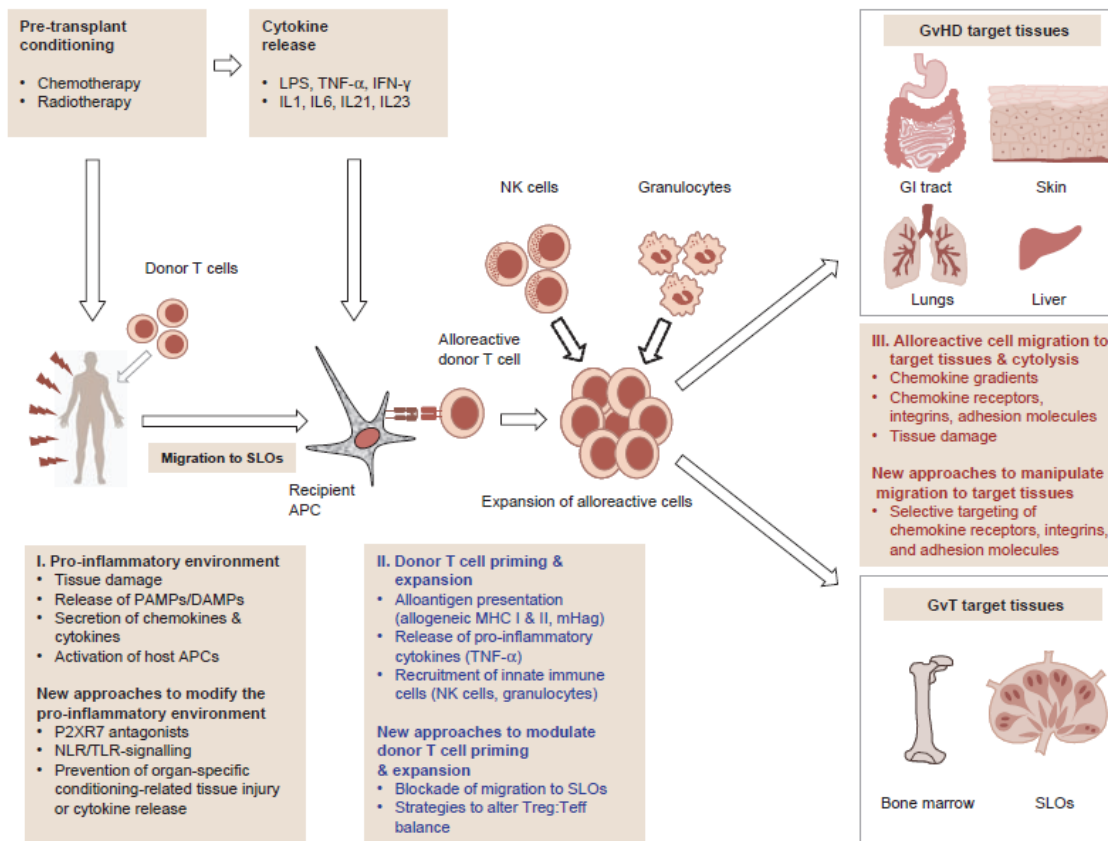
Grade	Peau	Foie	Tractus gastro-intestinal	Tractus gastro-intestinal supérieur
I	Stage 1-2	0	0	0
II	Stage 1-3	Stage 1	Stage 1	Stage 1
III	Stage 2-3	Stage 2-4	Stage 2-3	
IV	Stage 4		Stage 4	

### 1.3.2 Déroulement de la réaction en trois temps

Il y a cinquante ans, Billingham décrivait les trois conditions *sine qua non* du développement de la GvHD : l'utilisation d'un greffon immunocompétent, la disparité HLA entre les cellules du donneur et du receveur, ainsi que l'incapacité du receveur à produire une réponse immunitaire efficace (62). Si toutes ces conditions sont réunies, la GvHD se développe lorsque les lymphocytes T du donneur réagissent contre les protéines polymorphiques HLA présentes à la surface des cellules du receveur.

Ces protéines sont encodées par le CMH et se divisent en deux classes : les protéines HLA-A, -B et -C (CMH de classe I) qui sont exprimées sur la totalité des cellules nucléées, et les protéines HLA-DP, -DQ et -DR (CMH de classe II) exprimées principalement sur les cellules présentatrices d'antigènes (*antigen presenting cells* : APC) (3). La prévalence de la GvHD est directement reliée au degré de disparité entre les protéines HLA du donneur et du receveur. C'est pourquoi il est primordial pour chaque patient de trouver un donneur présentant la meilleure compatibilité HLA possible. Lors de HSCT avec des cellules souches provenant de CB, il est possible d'utiliser des unités de CB présentant une disparité HLA sans pour autant que le patient doive affronter d'importantes conséquences, étant donné la plus grande permissivité de ces cellules (3). Malgré tout, même dans le cas d'une greffe HLA-identique, environ 40% des receveurs développeront une GvHD qui nécessitera un traitement aux stéroïdes à forte dose (3).

La GvHD est une réaction de mécanismes inflammatoires qui se déroule en trois étapes et qui est mue par les lymphocytes fonctionnels du donneur infusés chez un receveur qu'ils ne reconnaissent pas. Que ce soit en raison de la maladie initiale, des infections préalables ou du conditionnement pré-greffe, les tissus du receveur sont endommagés, particulièrement au niveau de la muqueuse intestinale. Ces lésions contribuent à l'activation des APC par la translocation systémique de stimuli inflammatoires, comme par exemple les LPS des produits bactériens et les patrons moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns* : PAMPs) (63), ce qui stimule la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (64, 65). Ces événements augmentent l'expression des molécules d'adhésion, des molécules co-stimulatrices et des antigènes du CMH sur les APC du receveur, facilitant ainsi leur activation et migration vers les organes cibles, ce qui améliore l'efficacité de la présentation des protéines HLA aux cellules immunitaires du greffon (65). Les DC de l'hôte peuvent également acquérir et présenter les antigènes de l'hôte aux lymphocytes T contenus dans le greffon, ce qui les active (66). Une fois activés, les lymphocytes T naïfs du greffon sécrètent des cytokines inflammatoires, prolifèrent et entament leur migration vers les organes cibles de la GvHD. Ces événements déclenchent la GvHD et la maintiennent, notamment par la destruction des organes cibles de la GvHD (Figure 1.3.1, p.16) (3, 17, 64, 66-69).



**Figure 1.3.1 – Immunopathogénèse de la réponse alloréactive et approches développementales pour la séparation des effets GvHD et GvL.** Le modèle intégré de la pathophysiologie des réponses immunitaires alloréactives qui dominent les effets GvHD et GvL impliquent trois phases inter-relées. I) L'établissement d'un environnement pro-inflammatoire. II) L'activation et la prolifération des lymphocytes T du donneur. III) La migration des cellules immunitaires effectrices aux organes cibles et fonction cytolytique. Cette revue de littérature discute de stratégies émergentes afin de réduire la GvHD aiguë, tout en préservant des effets GvT regroupés dans le contexte des trois phases. Celles-ci incluent de nouveaux moyens de modifier sélectivement l'environnement pro-inflammatoire, de moduler l'apprêtement et l'expansion des lymphocytes T du donneur et de manipuler la migration des cellules immunitaires effectrices vers les tissus cibles du receveur. HSCT, greffe de cellules souches hématopoïétiques; LPS, lipopolysaccharide; TNF- $\alpha$ , facteur de nécrose tumorale alpha; IFN- $\gamma$  interféron gamma; IL, interleukine; SLO, organe lymphoïde secondaire; APC, cellules présentatrices d'antigènes; PAMP, motifs moléculaires associés aux pathogènes; DAMP, motifs moléculaires associés au danger; TLR, récepteurs de type Toll; NLR, récepteur de type NOD; MHC, complexe majeur d'histocompatibilité; mHag, antigène mineur d'histocompatibilité; NK, *natural killer*; GI, gastro-intestinal; Treg, lymphocyte T régulateur; Teff, lymphocyte T effecteur. *Reprinted by permission from New ways to separate Graft-versus-Host Disease and Graft-versus-Tumour effects after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation, Kotsiou and Davies, British Journal of Haematology, 160(2), copyright © 2013 Blackwell Publishing Ltd. (70). License number 3419010036905.*

On a déterminé que les lymphocytes T mémoires n'étaient pas aptes à l'induction de la GvHD, potentiellement à cause de leur incapacité de migrer vers les organes lymphoïdes, possiblement puisqu'ils n'ont pas les molécules d'adhésion nécessaires, ou encore à cause de leur répertoire de récepteur de cellule T (*T cell receptor* : TCR) très restreint, ou encore une combinaison de ces deux hypothèses (71).

Les dommages causés aux tissus par les lymphocytes T cytotoxiques du greffon initient le recrutement de cellules effectrices supplémentaires, comme les cellules NK et les neutrophiles. Les cellules nouvellement recrutées dans les tissus cibles de la GvHD contribuent à l'augmentation de l'insulte tissulaire et alimente ainsi une boucle d'amplification de la GvHD. L'amplification de l'exposition subséquente au LPS mène à la tempête de cytokines caractéristique de la GvHD et amplifie le dommage infligé aux cellules, contribuant à l'amplification de la réponse inflammatoire (64). Pour cette raison, la GvHD est très difficile à contrôler une fois qu'elle a débutée (17).

Bien que les lymphocytes T du greffon soient les cellules effectrices du développement de la GvHD, les APC qui présentent les antigènes du receveur aux lymphocytes T du donneur, initiant et maintenant la GvHD peuvent provenir du greffon comme du receveur (6). Les APC du receveur sont nécessaires et suffisantes à l'initiation de la GvHD, puisqu'elles peuvent présenter une grande quantité de peptides dérivés de l'hôte (67, 72). La GvHD est ensuite amplifiée grâce aux APC du donneur, présentes au sein du greffon, et qui présentent les peptides du receveur par la présentation croisée (73). Bien qu'il n'y ait pas de consensus à ce sujet, il semblerait, dans certains cas du moins, que les DC du donneur puissent également initier la GvHD (73, 74).

À la lumière de ces informations, on pourrait être tenté de cibler l'activité des DC du receveur pour réduire l'incidence de la GvHD (75). Cependant, les DC sont très robustes, ce qui rend cette solution très difficile à atteindre. À preuve, plus de 24 heures après l'irradiation sub-létale des souris, environ 30% des DC de la rate sont toujours présentes. Malgré un traitement de conditionnement pré-greffe myélo-ablatif, les DC persistent et permettent l'activation rapide des lymphocytes T suite à la HSCT, ce qui mène à la GvHD (75).

### 1.3.3 L'effet GvL

---

Dès 1956, Barnes et Loutit ont observé que la réaction allo-immunitaire responsable de la GvHD pouvait être impliquée dans la réponse anti-leucémique (76). Il fallut cependant attendre jusqu'en 1979 pour que la première preuve clinique de réduction de la rechute de la leucémie soit observée par l'équipe de Weiden (77). Plus d'une décennie plus tard, Horowitz et son équipe ont suggéré que les lymphocytes T pouvaient être responsables de l'effet bénéfique contre la leucémie lors de la HSCT (20), lorsqu'ils ont décrit l'effet GvL sur les cellules résiduelles de la maladie. Ils ont rapidement été rejoints par Bacigalupo et son équipe, en 1991 (78), lorsqu'ils ont décrit qu'une immunosuppression post-greffe plus agressive augmentait le risque de rechute de la maladie. On a depuis également suggéré que les cellules NK, en plus des CTL, pouvaient avoir un rôle important dans la réaction GvL. L'implication de ces deux types cellulaires relèverait d'ailleurs des APC du receveur (68), tout comme le déclenchement de la GvHD.

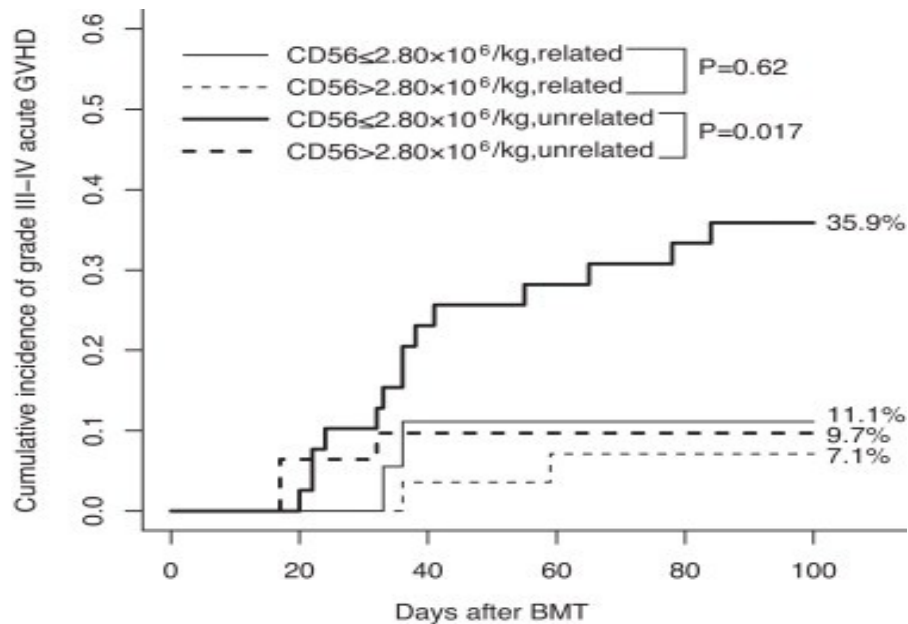
Il est donc de prime importance de développer un traitement permettant de réduire la GvHD, tout en maintenant l'effet GvL. À cette fin, deux approches peuvent être envisagées : 1) réduire l'environnement pro-inflammatoire chez le receveur, ou 2) tenter d'augmenter la spécificité anti-tumorale des lymphocytes T du donneur (70). Bien que la déplétion directe des lymphocytes T du greffon permette de réduire la GvHD de façon significative, celle-ci est fortement corrélée à la réactivation virale et à une hausse des cas d'infection (79). La déplétion en lymphocytes T du greffon est difficilement envisageable, puisqu'elle se traduit par une augmentation de l'échec de la greffe, d'infections opportunistes, de rechute de la maladie et d'autres complications non-relées à la rechute de la maladie (5, 20, 66, 79). Les cellules responsables des effets GvHD et GvL étant les mêmes, la ségrégation de ces deux effets est ardue. Afin de s'y retrouver plus facilement, la contribution de chacune des populations cellulaires impliquées dans ces deux effets est résumée dans le Tableau 1.II (p.19). En un coup d'œil, on réalise rapidement que les lymphocytes T et les cellules NK possèdent un double rôle, en étant impliquées autant dans la GvHD que dans l'effet GvL.

**Tableau 1.II – Contribution des populations cellulaires impliquées dans les effets GvHD et GvL suite à la HSCT**

<b>Populations cellulaires</b>	<b>Contribution</b>	<b>Références</b>
Lymphocytes T	Cellules effectrices de la GvHD; leur expansion irrégulière mène à la GvHD	(63, 80-82)
	Les CTL du donneur sont les cellules effectrices de l'effet GvL, en permettant la réponse immunitaire envers les cellules malignes	(80, 83, 84)
Cellules NK	Leur implication dans la GvHD est mitigée : certains les catégorisent comme cellules effectrices de la GvHD, alors que d'autres ne leur attribuent aucun rôle, ou encore un effet protecteur	(82, 84-89)
	Cellules effectrices de l'effet GvL, elles permettent d'éradiquer les cellules malignes, ainsi que les APC résiduelles du receveur	(84, 85, 87)
APC du receveur	Responsables du déclenchement de la GvHD	(3, 67, 68, 72, 82, 90)
	Participent à la présentation antigénique de la tumeur; induisent un effet GvL plus fort que les APC du donneur	(68, 90)
APC du donneur	Responsables du déclenchement d'une GvHD modérée	(68, 73, 74)
	Participent à la présentation antigénique de la tumeur; induisent un effet GvL considérable lorsque la charge tumorale est réduite	(68, 91)

Non seulement les cellules NK contribuent au développement de la GvHD et jouent un rôle primordial dans l'effet GvL (Tableau 1.II, p.19), une étude clinique leur attribue également un rôle dans la prévention de la GvHD aiguë. En effet, une étude effectuée chez des patients recevant des HSCT provenant de donneurs non-apparentés démontre qu'une forte dose de cellules NK au sein du greffon est corrélée à une plus faible incidence de GvHD aiguë de grades III-IV (Figure 1.3.2, p.20). Cet effet bénéfique pour la GvHD n'est toutefois pas observé au niveau de l'effet GvL (88).





**Figure 1.3.2 – Incidence cumulative de la GvHD aiguë de grade III-IV selon le nombre de cellules CD56<sup>+</sup> du greffon et le type de donneur.** Un nombre élevé de cellules NK réduit l'incidence de GvHD aiguë de grade III-IV après une HSCT de cellules de donneur non-apparenté, mais pas dans le cas d'un donneur apparenté. *Reprinted from Leukemia Research, 36/6, Tanaka M, Kobayashi S, Numata A et al, The impact of the dose of natural killer cells in the graft on severe acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation, 699-703, Copyright (2012), with permission from Elsevier. License number 3419010528114.*

### 1.3.4 La prophylaxie de la réaction du greffon contre l'hôte

Au début des années 1970, le premier traitement prophylactique de la GvHD se résumait à l'utilisation du methotrexate (MTX), un antagoniste du folate qui peut éliminer les lymphocytes en prolifération provenant du donneur (5, 92). La décennie 1980 a apporté un changement majeur à la prophylaxie de la GvHD, à savoir l'ajout d'un inhibiteur de la calcineurine qui empêche l'activation des lymphocytes T (cyclosporine A (CsA) ou tacrolimus) au traitement de MTX. Ces deux agents sont synergiques et s'avèrent plus efficaces pour prévenir la GvHD lorsqu'ils sont jumelés que lorsqu'ils sont utilisés seuls (14, 93, 94). Les stéroïdes, grâce à leur activité anti-inflammatoire et anti-lymphocyte (inhibition de la

présentation antigénique, de la production de cytokines et de la prolifération (95)) constituent aussi un traitement standard pour la prophylaxie de la GvHD et peuvent être utilisés de pair avec les inhibiteurs de calcineurine pour une meilleure efficacité (5).

Puisque l'administration à long terme d'inhibiteurs de calcineurine a des effets toxiques pour le patient et affecte le développement des lymphocytes T issus de la reconstitution immunitaire, la cyclophosphamide (Cy) est désormais considérée comme traitement prophylactique de la GvHD. Lorsqu'elle est administrée tôt après la HSCT, la Cy agit de façon similaire au MTX, en étant capable d'éliminer les lymphocytes T alloréactifs en prolifération (5).

Malgré les améliorations technologiques des dernières décennies, la majorité des thérapies de prophylaxie ou de traitement de la GvHD reposent toujours sur le ciblage des lymphocytes T à large spectre, par l'utilisation de stéroïdes, de Cy, d'anticorps et d'inhibiteurs de calcineurine (5, 6), qui ont des effets négatifs sur la GvL et la reconstitution immunitaire (17). Les effets secondaires causés par les agents immunosuppresseurs ont permis l'introduction de l'utilisation de nouveaux produits pour la prophylaxie de la GvHD, comme le mycophenolate mofetil (MMF) et le sirolimus (un inhibiteur de mTOR (*mammalian target of rapamycin* : cible de la rapamycine chez les mammifères)). Le MMF, via son métabolite l'acide mycophénolique, et le sirolimus ont le pouvoir d'inhiber la prolifération des lymphocytes. Ces deux agents peuvent également agir en synergie avec les inhibiteurs de calcineurine pour la prévention de la GvHD (5, 79). En plus de son effet inhibiteur sur les lymphocytes T du donneur, le sirolimus peut préserver les cellules de la population de lymphocytes T régulateurs (Treg), qui peuvent avoir un rôle positif dans la prévention de la GvHD après la greffe. Toutefois, le sirolimus ne devrait pas être utilisé dans les protocoles cliniques de HSCT qui utilisent un conditionnement pré-greffe myéloablatif à cause de risque élevé de maladie véno-occlusive (5).

Malgré une prophylaxie adéquate, environ 50% des patients ne répondent pas au traitement et développent une GvHD, habituellement dans les deux premiers mois après la HSCT (3, 4, 57, 79). Ces patients doivent alors recevoir dans les plus brefs délais le traitement de première ligne pour contrer le développement de la GvHD. Celui-ci consiste habituellement en l'administration de stéroïdes et d'inhibiteurs de calcineurine, lesquels devraient inhiber la réponse allogénique des lymphocytes T. Ce traitement de première ligne est efficace chez environ 50% des patients atteints de GvHD (96), et l'efficacité atteint 80% chez les patients pédiatriques (19). S'il y a progression de la GvHD après trois jours, qu'il n'y a aucun changement clinique ou biochimique après sept jours, ou lorsqu'il y a une réponse incomplète après 14 jours de traitement aux stéroïdes, on parle alors par convention de GvHD résistante aux traitements de première ligne (96). Chez ces patients, le pronostic est très mauvais et un

traitement secondaire est envisagé et nécessaire (79). Bien que plusieurs produits aient été testés lors des trente dernières années pour le traitement de la GvHD, nul n'a encore reçu l'approbation de la *Food and Drug Association* (FDA) pour leur utilisation unique dans la prévention ou la thérapie de la GvHD (5). À cet effet, il n'existe actuellement aucun traitement consensus. Les patients peuvent donc recevoir des thérapies simple ou multiple composées d'immunosuppresseurs (MMF, sirolimus, everolimus, pentostatin), d'anticorps mono- ou polyclonaux (globulines anti-thymocytes (*anti-thymocytes globulins* : ATG), anti-CD25, anti-TNF- $\alpha$ , anti-CD20, anti-CD52), d'immunomodulateurs tels que les cellules stromales mésenchymateuses (*mesenchymal stromal cells* : MSC), de la photophérèse extracorporelle et de la thérapie cellulaire (19, 96). Les traitements secondaires sont associés à de hauts taux de toxicité et les patients n'ont habituellement que 20-30% de chances de survie (5). Dans un futur proche, on espère pouvoir compter sur des traitements plus personnalisés en thérapie cellulaire, ciblant la survie, l'activation et la fonction des lymphocytes T alloréactifs permettant de réduire la toxicité ou susceptibilité immunitaire causées par les traitements actuels (17, 96).

#### **1.4 Les immunoglobulines intraveineuses**

---

Les immunoglobulines intraveineuses (*intravenous immunoglobulin* : IVIG) ont fait leur apparition dans les protocoles cliniques il y a plus de 50 ans, au départ principalement pour traiter les patients immunodéficients atteints d'hypogammaglobulinémie (97). Les applications cliniques des IVIG n'ont cessé d'augmenter et de se diversifier lors des dernières années. L'apparition d'applications hors d'autorisation de mise sur le marché est en hausse constante, ce qui met une pression énorme sur les réserves d'IVIG. La nature biologique des IVIG, un produit dérivé du sang, ainsi que l'absence d'étude appropriée validant l'efficacité des IVIG dans la majorité de ces nouvelles applications remettent vraiment en question l'utilisation qui en est faite et confirme l'importance primordiale d'élucider leurs mécanismes d'action afin de pouvoir optimiser leur utilisation (97, 98). Il y a à peine 30 ans, on utilisait près de 300 kg d'IVIG/année mondialement, alors que ce chiffre avait grimpé à plus de 60 000 kg pour l'année 2007, ce qui représente une dépense de plus de 7,5 milliards de dollars (98, 99). Au courant de l'année 2013-2014, ce sont près de 5 880 kg d'IVIG qui ont été distribuées aux centres hospitaliers canadiens (100, 101), totalisant ainsi une facture d'environ 300 millions de dollars (102).

### 1.4.1 Description du produit

---

Les préparations commerciales d'immunoglobulines sont préparées à partir de plasma groupés provenant de plusieurs milliers de donneurs sains. Elles consistent donc d'immunoglobuline G (IgG) avec une distribution de sous-classes d'IgG, représentative de celle retrouvée dans un sérum humain normal et contiennent alors tout un répertoire de régions variables d'anticorps contre des pathogènes et antigènes étrangers. On estime qu'une préparation commerciale d'IgG contient probablement plus de dix millions d'anticorps spécifiques, majoritairement des anticorps naturels ou anti-idiotypes (99, 103, 104).

La préparation commerciale de Gamunex®, celle qui est utilisée dans le cadre de cette thèse, est prête à l'utilisation et consiste en une solution contenant de 9-11% de protéines dans un véhicule constitué de glycine 0.16-0.24 M, qui assure l'isotonicité et permet la conservation des IgG (105). Au-delà de 98% des protéines contenues dans la préparation sont des IgG, et le 2% manquant est constitué de traces d'IgA et d'IgM. Le processus de préparation des IVIG se résume à la récolte de plasma, provenant de milliers de donneurs sains. Ceux-ci sont groupés et subissent ensuite une série d'étapes qui mène à leur purification : fractionnement à l'éthanol froid, précipitation, filtration et chromatographie par échange d'ions. Ces étapes de préparation purifient les IgG et permettent également de réduire significativement la charge virale potentielle, d'éliminer les facteurs de coagulation sanguine et les agrégats d'IgG qui peuvent causer un syndrome de relâche de cytokines. Le pH de la solution est par la suite ramené à un niveau bas (pH 4.0-4.3), afin de réduire au maximum la présence des multimères d'IgG. Malgré tout, entre 1-15% des IgG sont sous forme dimérique dans les préparations d'IVIG, le plus souvent formées par la liaison des extrémités distales du fragment de liaison à l'antigène (Fab) (106-109), et moins de 1% sous forme d'agrégats (97, 105, 110-112). La proportion de dimères et d'agrégats d'IgG dans les préparations d'IVIG peut dépendre de plusieurs facteurs, dont le nombre de donneurs de plasma et l'âge de la solution (97, 106). Ces multimères d'IgG en trop grand pourcentage peuvent s'avérer dangereux pour les patients en causant l'apparition de graves effets secondaires, tels que la cytotoxicité des DC et des réactions anaphylactiques systémiques potentiellement fatales (110, 112, 113).

Outre l'immense diversité d'anticorps IgG spécifiques à toute une panoplie de virus, bactéries et antigènes exogènes, le résultat de la combinaison du répertoire antigénique de chacun des milliers de donneurs, les IVIG contiennent également des peptides solubles immunomodulateurs (CD4, CD8, HLA) (114, 115). Parmi les nombreux anticorps de la préparation, certains sont dirigés contre des cytokines, ce qui peut mener soit à leur neutralisation ou à l'augmentation de leur demi-vie (116, 117).

D'autres sont des anticorps agonistes ou bloquants de Fas (CD95), le récepteur du Fas ligand qui transduit le signal d'apoptose dans les cellules (118, 119).

### **1.4.2 Administration du produit**

---

L'administration des IVIG est normalement bien toléré, mais elle peut toutefois causer des effets secondaires tels que des maux de tête (la réaction la plus fréquente chez <20% des patients), frissons, nausées, fatigue, malaise, fièvre, anorexie, symptômes de grippe, myalgie, arthralgie, maux de dos et augmentation de la pression artérielle chez 5-15% des patients (97, 112, 120-122). Ces effets se font habituellement ressentir dans les trente premières minutes d'infusion et peuvent diminuer en réduisant le rythme d'infusion (120). Heureusement, les réactions sévères ne se produisent que dans moins de 1% des infusions (112). En raison de leur usage extensif dans le cadre de thérapies de remplacement depuis plus de 30 ans, on sait que l'utilisation des IVIG à long terme n'a pas d'effets indésirables pour le patient (123).

### **1.4.3 Applications du produit acceptées par la FDA**

---

Les IVIG étaient initialement utilisés à titre de thérapie de remplacement, chez les patients souffrant d'immunodéficiences. Avec le temps, on leur a attribué plusieurs autres applications, notamment pour le traitement d'un grand nombre de maladies auto-immunes et inflammatoires, énumérées dans le Tableau 1.III (p.25). Ainsi, aux États-Unis, plus de 75% des IVIG utilisées en clinique sont administrées à des patients atteints de maladies auto-immunes ou inflammatoires (124).

**Tableau 1.III – Clinical Uses of IVIg.** Reprinted from Springer and the Journal of Clinical Immunology, 27, 2007, 233-245, Intravenous Immunoglobulin: An Update on the Clinical Use and Mechanisms of Action, Negi VS, Elluru S, Sibérl S et al, Table I, original copyright 2007 (125): with kind permission from Springer Science and Business Media. License number 3419030692456.

---

**A. Replacement (low dose) therapy**

- I. Primary immunodeficiency diseases
- II. Secondary immunodeficiency  
B-cell malignancies (CLL, MM)  
HIV infection

**B. Immunomodulator (high dose) therapy**

- I. Hematological diseases  
Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)<sup>a</sup>  
Acquired immune thrombocytopenias  
Autoimmune neutropenia  
Autoimmune hemolytic anemia  
Parvovirus B19-associated red cell aplasia  
Antifactor VIII autoimmune disease  
Acquired von Willebrand's disease
- II. Neuroimmunological diseases  
Guillain-Barré syndrome (GBS)<sup>a</sup>  
Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP)<sup>a</sup>  
Multifocal motor neuropathy (MMN)<sup>a</sup>  
Multiple sclerosis  
Myasthenia Gravis<sup>a</sup>  
Lambert-Eaton syndrome  
Stiff person syndrome
- III. Rheumatic diseases  
Kawasaki disease<sup>a</sup>  
ANCA-positive systemic vasculitis  
Polymyositis  
Dermatomyositis<sup>a</sup>  
Antiphospholipid syndrome  
Recurrent spontaneous abortions  
Rheumatoid arthritis and Felty's syndrome  
Systemic lupus erythematosus (SLE)  
Juvenile idiopathic arthritis (JIA)
- IV. Dermatological diseases  
Toxic epidermal necrolysis (TEN)  
Autoimmune skin blistering diseases (BP, PF, PV)<sup>a</sup>  
Streptococcal toxic shock syndrome  
Steroid-dependent severe atopic dermatitis
- V. Other conditions  
Graft versus host disease<sup>a</sup>  
Antibody-mediated rejection (AMR) of the graft  
Sepsis syndrome

---

<sup>a</sup>Indicates diseases in which evidence for the effect of IVIg has been obtained in controlled trials.

Dans les années 1980, les IVIG ont été introduites dans les protocoles cliniques de traitement de la GvHD. À cette époque, plusieurs études cliniques contrôlées leur ont attribué un effet prophylactique sur le développement de la GvHD. En effet, le recours au traitement à haute dose d'IVIG démontrait une nette diminution du taux d'infections virales au CMV, de pneumonies interstitielles, de septicémie, de la nécessité de recourir à la transfusion de plaquettes sanguines, ainsi que de l'incidence et la sévérité de la GvHD chez les patients âgés de plus de 20 ans recevant une greffe allogénique (126-130). Toutefois, avec l'amélioration des antimicrobiens disponibles (antifongiques et antibactériens), de même que le perfectionnement de la prophylaxie anti-CMV, l'utilisation de traitement à haute dose d'IVIG n'est désormais plus associée à la réduction de l'incidence et de la sévérité de la GvHD ou des infections (127, 131-133). De plus, leur utilisation est aujourd'hui corrélée avec une augmentation du risque de développer une maladie véno-occlusive (131). De pair avec l'absence d'études cliniques récentes démontrant clairement l'efficacité des IVIG dans la réduction de l'incidence et sévérité de la GvHD, leur disponibilité réduite et leur coût élevé ont forcé la communauté scientifique à remettre en question leur pertinence dans les protocoles cliniques de prophylaxie de la GvHD (127, 133, 134).

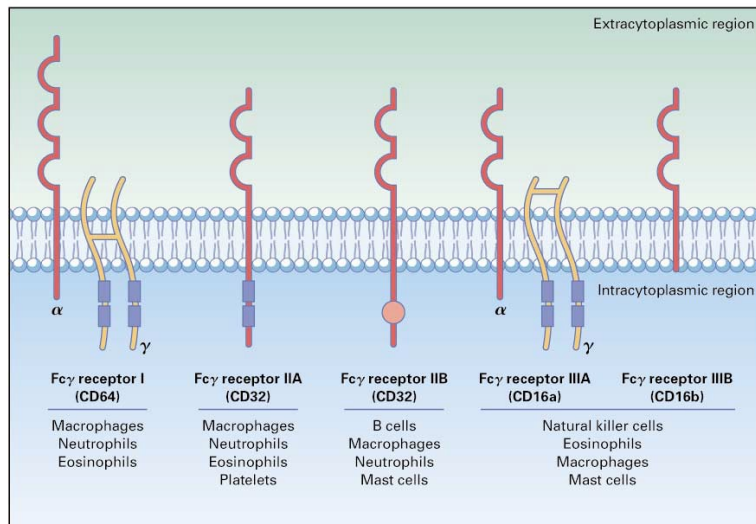
#### **1.4.4 Les IVIG et leurs récepteurs**

---

Classiquement, les traitements à faible dose d'IVIG (0,5 g/kg de poids corporel) sont réservés aux thérapies de remplacement, tandis que les traitements à haute dose d'IVIG (1-3 g/kg de poids corporel) sont considérés anti-inflammatoires et sont donc ainsi réservés aux thérapies de maladies immunologiques et inflammatoires. Selon toute probabilité, l'effet immunologique des IVIG n'est pas mutuellement exclusif et nécessite un travail synergique de plusieurs mécanismes, notamment la modulation de l'expression et la fonction des récepteurs Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ Rs), la liaison du fragment cristallisable (Fc) des IVIG aux Fc $\gamma$ Rs exprimés par les cellules du système immunitaire inné, l'interférence dans l'activation de la cascade du complément et du réseau des cytokines, la neutralisation des auto-anticorps et la régulation de la prolifération cellulaire (97, 124, 125, 135-137). De plus, les effets bénéfiques des IVIG dépassent leur durée de vie, suggérant alors qu'elles peuvent modifier les composants de l'immunité cellulaire (136, 138). Étant donné la nature du projet de recherche présenté, on élaborera ci-dessous sur le mécanisme d'action des traitements d'IVIG à haute dose.

Il existe deux classes de Fc $\gamma$ Rs : les activateurs, qui sont caractérisés par leurs motifs permettant l'activation des immunorécepteurs *via* une tyrosine (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif* :

ITAM), et les inhibiteurs, possédant des motifs permettant l'inhibition des immunorécepteurs *via* une tyrosine (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*: ITIM). Ces deux classes de récepteurs travaillent de concert et sont habituellement co-exprimés à la surface cellulaire (139). Effectivement, les récepteurs activateurs sont retrouvés à la surface des monocytes, macrophages, cellules NK, mastocytes, éosinophiles, neutrophiles, DC et plaquettes. Le récepteur inhibiteur est par ailleurs exprimé par les lymphocytes B, macrophages, neutrophiles, DC et mastocytes (Figure 1.4.1, p.27) (97, 98, 137, 139-141). Les IVIG peuvent aussi se fixer sur les lymphocytes T, mais pour y parvenir doivent emprunter un mécanisme Fc $\gamma$ R-indépendant (97), puisque les lymphocytes T n'expriment pas de Fc $\gamma$ Rs.



**Figure 1.4.1 – Membres de la famille des récepteurs Fc $\gamma$  humains.** Au-dessous des différents récepteurs sont énumérées les populations cellulaires qui les expriment. Les structures semi-circulaires de la région extracytoplasmique représentent les domaines *immunoglobuline-like*. Les sous-unités individuelles des Fc récepteurs dans la région intracytoplasmique sont identifiées  $\alpha$  et  $\gamma$ . Les immunorécepteurs à motif d'activation à base de tyrosine sont représentés par les bandes bleues, et l'immunorécepteur à motif d'inhibition à base de tyrosine du Fc $\gamma$ RIIB est représenté par le cercle rose. Les Fc $\gamma$ RIII des cellules NK portent une chaîne  $\zeta$  plutôt qu'une chaîne  $\alpha$ . *Reproduced with permission from Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. N Engl J Med. 2001 Sep 6;345(10):747-55., Copyright Massachusetts Medical Society.*

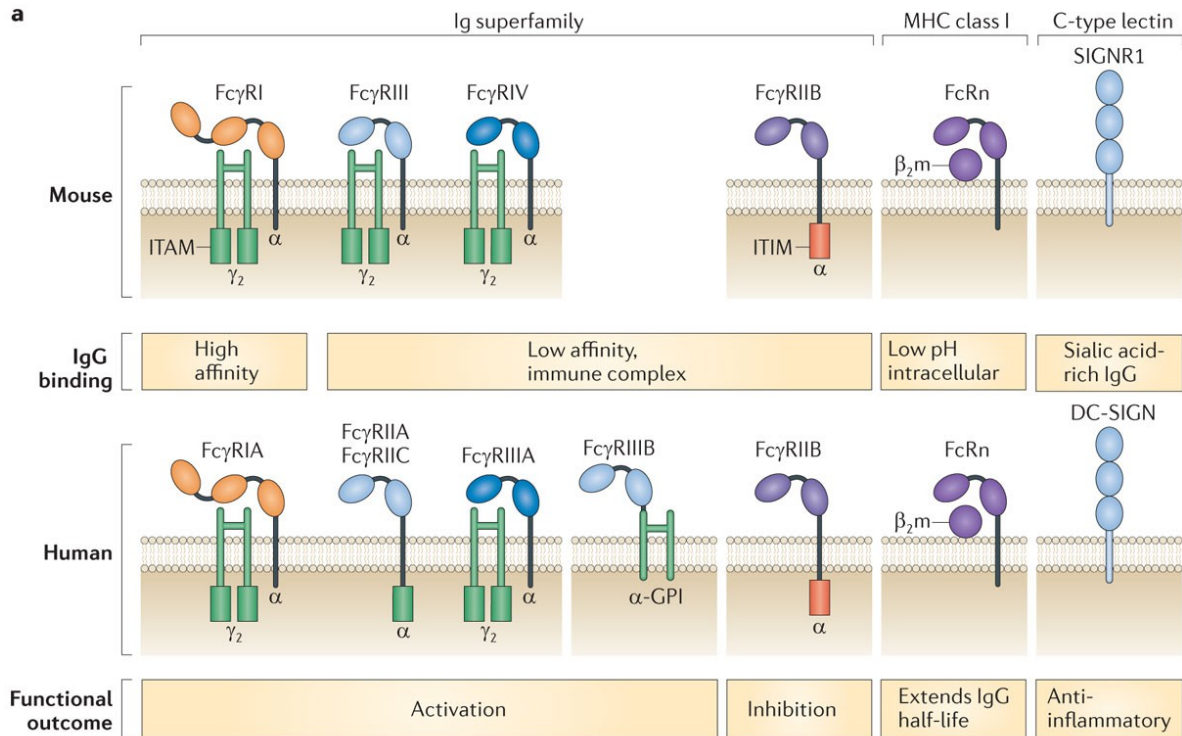
Les IVIG peuvent se lier aux cellules du système immunitaire *via* plusieurs classes de récepteurs : les Fc $\gamma$ Rs, les récepteurs Siglec, les récepteurs lectine de type C et le récepteur Fc néonatal (FcRn).



#### 1.4.4.1 Les Fc $\gamma$ Rs

---

Les Fc $\gamma$ Rs sont aussi bien exprimés à la surface des cellules humaines et murines. La principale différence entre les Fc $\gamma$ Rs humains et murins réside dans le nombre : il existe quatre Fc $\gamma$ Rs activateurs de faible affinité chez les humains, alors que les souris n'en ont que deux (Figure 1.4.2, p.29) (141). Mis à part cette différence en nombre, les systèmes humain et murin présentent tous deux des récepteurs de forte et faible affinité. Puisque les Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIIA, Fc $\gamma$ RIIIB et Fc $\gamma$ RIIB sont tous des récepteurs de faible affinité et de spécificité comparable, ceux-ci peuvent tous être engagés simultanément sur une cellule unique, ce qui dicte le seuil d'activation cellulaire et la magnitude de la réponse des cellules effectrices suite à la liaison des IgG aux récepteurs (97, 139). Les Fc $\gamma$ Rs, à l'exception du Fc $\gamma$ RI, ont une faible affinité pour les IgG monomériques et préfèrent se lier à des complexes immuns (IgG multimériques), ce qui mène à leur activation (97), après quoi ils peuvent exhiber des phénotypes cellulaires caractéristiques, tels que la dégranulation, la phagocytose, la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*: ADCC), la transcription de gènes de cytokines et la libération de médiateurs inflammatoires (139). Autant chez les humains que chez la souris, le Fc $\gamma$ RI est le seul récepteur activateur de haute affinité, alors que Fc $\gamma$ RIIB/Fc $\gamma$ RIIb est le seul récepteur inhibiteur (Figure 1.4.2, p.29). Plusieurs études indiquent que ces récepteurs ont un rôle dans les propriétés anti-inflammatoires des IVIG (136, 142, 143).



**Figure 1.4.2 – La famille des FcγRs murins et humains.** Ci-haut sont présentées les familles de FcγRs murin et humain, qui comprennent plusieurs récepteurs activateurs et un récepteur inhibiteur. Chez les humains, mais pas chez les souris, un FcγR ancré au glycosylphosphatidylinositol (GPI) est exprimé exclusivement sur les neutrophiles. Le récepteur Fc néonatal (FcRn) est responsable de la longue demi-vie des IgG et appartient à la famille des molécules du CMH de classe I. La protéine 1 reliée au DC-SIGN murin (SIGNR1) et son orthologue humain, la protéine non-intégrine liée à l'ICAM3 spécifique aux DC (DC-SIGN) sont également des protéines qui peuvent se fixer aux IgG et peuvent être considérées comme des FcγRs d'IgG glycoforme-spécifique. On dénote également sur cette figure les résultats fonctionnels de la liaison de l'IgG à chaque récepteur. *Reprinted and translated by permission from Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Immunology (97), copyright (2013). License number 3419031361245.*

### 1.4.4.2 Les récepteurs Siglec

Les cellules hématopoïétiques, qui pour la majeure partie n'expriment pas de FcγRs à leur surface, possèdent en revanche les protéines Siglec, qui sont impliquées dans des mécanismes de signalisation cellulaire. Celles-ci peuvent lier les ligands glycans possédant des acides sialiques, telles que les IVIG (144). Des anticorps naturels dirigés contre les Siglec présents dans les préparations d'IVIG peuvent alors contribuer à leurs mécanismes anti-inflammatoires (145).

### **1.4.4.3 Les récepteurs lectine de type C**

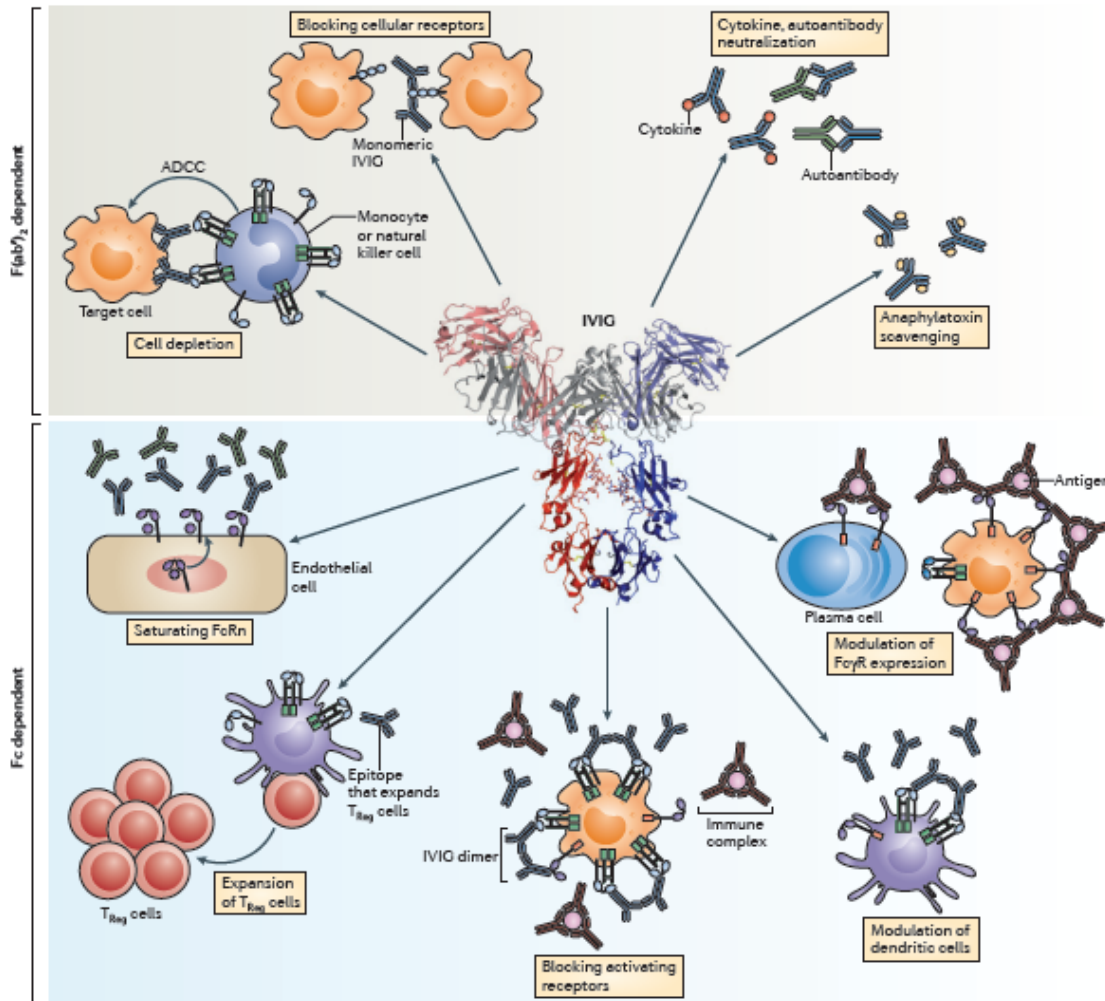
---

Un autre type de récepteur des IgG est le récepteur lectine de type C (Figure 1.4.2, p.29). Chez les souris, ce récepteur est désigné SIGNR1 et est retrouvé au niveau des macrophages spléniques de la zone marginale (144). Son orthologue humain, le DC-SIGN, est par ailleurs retrouvé au niveau des DC. Bien que la spécificité de liaison des IgG à ces deux récepteurs soit la même, cette différence de localisation cellulaire peut expliquer la différence observée sur l'effet protecteur des IVIG chez ces deux espèces (135).

### **1.4.4.4 Les FcRn**

---

Le dernier type de récepteur des IgG, le récepteur FcRn (Figure 1.4.2, p.29), est majoritairement responsable de l'extension de la demi-vie des IgG (97). Bien que la demi-vie des IVIG infusées chez des hôtes immunocompétents soit de trois semaines (97, 125, 137), celle-ci baisse drastiquement à six jours chez les patients de HSCT, ce qui peut être attribué à un catabolisme accru des protéines, à la GvHD, ou à une combinaison de ces deux événements (132). Suite à leur liaison sur les FcRn, les IVIG sont endocytées et retournées à la surface cellulaire, ce qui peut expliquer les fortes doses requises pour observer une activité thérapeutique (97, 137). En se liant aux FcRn, les IVIG les saturent ce qui augmente le catabolisme des auto-anticorps inflammatoires (146). Par contre, puisque la liaison des IVIG à ces récepteurs est glycan-dépendante (Figure 1.4.3, p.31) (98, 146), il est très peu probable que l'effet anti-inflammatoire des IVIG leur soit relié.



**Figure 1.4.3 – Mécanismes d’action des IVIG dépendant des fragments F(ab')<sub>2</sub> et Fc.** Voici un résumé des différents mécanismes d’action qui sont impliqués dans l’immunomodulation médiée par les IVIG. Les mécanismes F(ab')<sub>2</sub>-dépendant incluent : l’élimination des cellules cibles par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant des anticorps (ADCC), le blocage des interactions intercellulaires médiée par les récepteurs de surface cellulaire, tels que le CD95 et le CD95 ligand (CD95L); la neutralisation des cytokines; la neutralisation des auto-anticorps par les anticorps anti-idiotypes; le piégeage des anaphylatoxines C3a et C5a. Les mécanismes Fc-dépendant incluent : la saturation du récepteur néonatal (FcRn); l’expansion des lymphocytes T régulateurs (Treg); le blocage de la liaison des complexes immuns aux FcγRs de faible affinité; la modulation de l’activation des DC *via* le FcγRIII; la modulation de l’expression des FcγRs activateurs et inhibiteur sur les cellules immunitaires effectrices et les lymphocytes B. *Reprinted and translated by permission from Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Immunology (97), copyright (2013). License number 3419031361245.*

## 1.4.5 Les fragments des IVIG

---

Les IVIG possèdent deux fragments distincts qui peuvent être impliqués dans leur mécanisme d'action : le fragment F(ab')<sub>2</sub>, avec ses millions de spécificités uniques, et le fragment Fc qui se fixe aux FcγRs. Ces deux types de fragments peuvent contribuer aux activités anti-inflammatoire et immunomodulatrice des IVIG (Figure 1.4.3, p.31 et Tableau 1.IV, p.32) (97).

**Tableau 1.IV – Activités anti-inflammatoire et immunomodulatrice potentielles des IgG.** *Reproduced with permission from Gelfand EW. Intravenous immune globulin in autoimmune and inflammatory diseases. N Engl J Med. 2013 Feb 21;368(8):777, Copyright Massachusetts Medical Society.*

---

### Activités médiées par le fragment Fab

---

Suppression ou neutralisation des auto-anticorps  
Suppression ou neutralisation des cytokines  
Neutralisation des composants activés du complément  
Restauration des réseaux idiotype-anti-idiotype  
Blocage de la fixation des molécules d'adhésion des leucocytes  
Ciblage de récepteurs de surface spécifiques des cellules immunitaires  
Modulation de la maturation et fonction des DC

---

### Activités dépendante du fragment Fc

---

Blocage du FcRn  
Blocage des FcγRs activateurs  
Augmentation de l'expression du FcγRIIB inhibiteur  
Immunomodulation par les IgG sialylées

---

### 1.4.5.1 Le fragment F(ab')<sub>2</sub> de l'IgG

---

Tel que démontré sur la Figure 1.4.3 (p.31), du fragment F(ab')<sub>2</sub> peut se lier aux fragments potentiellement dommageables du système du complément, prévenant du coup la formation du complexe d'attaque membranaire et lors des étapes subséquentes, le dépôt des composants activés sur leur cible, ce qui prévient la destruction cellulaire ainsi que l'inflammation excessive (137, 147, 148). Les IVIG peuvent également accélérer la décomposition de la molécule C3b du complément vers sa forme inactive, iC3b, ce qui halte les dommages causés par les complexes immuns (149).

Le fragment F(ab')<sub>2</sub> des IVIG est également capable de supprimer la différenciation et l'amplification des lymphocytes Th17, ainsi que la production des cytokines Th17 (IL-17A, IL-17F, IL-21 et CCL20)

en inhibant la forme phosphorylée de Stat3 (150). Puisque ces cellules peuvent s'infiltrer dans les organes cibles de la GvHD et contribuent ainsi à son développement, leur inactivation par les IVIG est un événement favorable dans la prévention de la GvHD par les IVIG (150-152).

En se fixant à certaines molécules de surface cellulaire, les fragments (Fab')<sub>2</sub> peuvent bloquer des récepteurs cellulaires, ou encore déclencher de l'ADCC, réduisant ainsi l'activation des cellules pouvant causer des maladies (97).

### **1.4.5.2 Le fragment Fc de l'IgG**

---

La plupart des études effectuées sur les IVIG ont toutefois suggéré que la partie active de la préparation réside sur le fragment Fc des IgG. Ceci implique donc un effet sur les FcγRs, plutôt qu'un effet neutralisant du fragment F(ab')<sub>2</sub> (153). Toutefois, la piste de mécanisme anti-inflammatoire qui a été la mieux décrite dans la littérature est sûrement celle de la modulation de l'expression du FcγRIIb, ou du nombre de cellules myéloïdes exprimant le FcγRIIb, qui serait impliqué dans les mécanismes d'immunomodulation (142, 144, 146, 154-163).

Les IVIG, en se fixant aux macrophages régulateurs de la rate, enclenchent un mécanisme suppressif qui atténue l'habileté des macrophages effecteurs à répondre aux IgG qui se fixent aux FcγRs activateurs. Ce mécanisme suppressif fonctionne en augmentant le seuil d'activation des FcγRs activateurs, en augmentant l'expression du FcγRIIb sur les cellules, ou encore en augmentant le nombre de cellules exprimant le FcγRIIb (98), inhibant du coup l'inflammation IgG-dépendante (140, 160). Tout récemment, certains ont émis l'hypothèse que l'effet anti-inflammatoire des IVIG pourrait également réduire l'expression des FcγRs activateurs sur les cellules myéloïdes et NK, autant dans les systèmes humain que murin (154, 164). Toutefois, la nécessité absolue du FcγRIIb dans le rôle anti-inflammatoire des IVIG est remise en question dans les modèles murins (142, 144, 155, 156, 158). De plus, les IVIG ne peuvent altérer l'expression du FcγRIIb à la surface des DC humaines, ni le niveau de leur transcrits dans les monocytes humains. Pour ces raisons, leur implication dans le mécanisme anti-inflammatoire des IVIG chez les humains est incertaine (136, 165-167).

### **1.4.6 Mécanisme anti-inflammatoire Fc $\gamma$ RIIb-dépendant des IVIG**

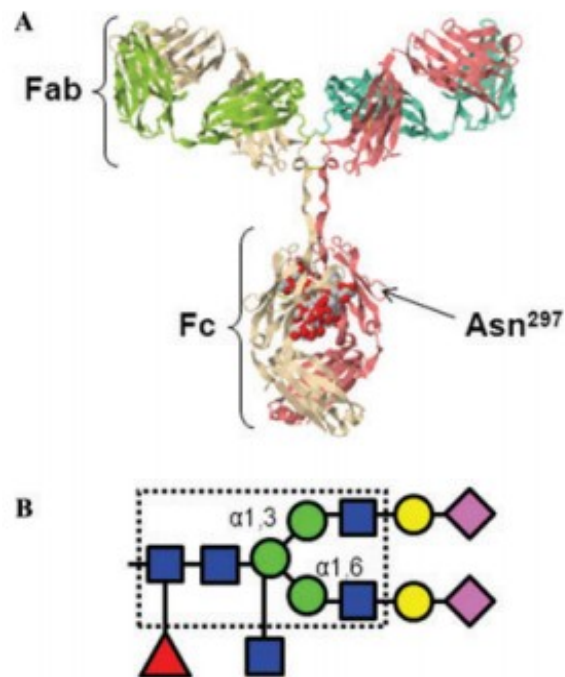
---

Toutes les études qui attribuent un rôle anti-inflammatoire aux IVIG par le mécanisme de modulation de l'expression du Fc $\gamma$ RIIb s'entendent pour dire que la glycosylation des IVIG est un paramètre crucial (168). Récemment, Anthony *et al* ont toutefois suggéré un mécanisme de type Th2 impliquant l'IL-4, l'IL-4R et l'IL-33 dans l'augmentation de l'expression à la surface cellulaire du Fc $\gamma$ RIIb (158).

Dans les préparations commerciales d'IVIG, le motif de glycosylation du fragment Fc des IgG est très hétérogène. Il existe donc plus d'une trentaine de glycovariants pour chaque classe d'IgG (169). Cette glycosylation est très importante dans le rôle des IVIG, car elle permet le maintien de la conformation ouverte des chaînes lourdes du fragment Fc des IgG, qui est absolument nécessaire pour l'interaction entre les IgG et les Fc $\gamma$ Rs (140, 158).

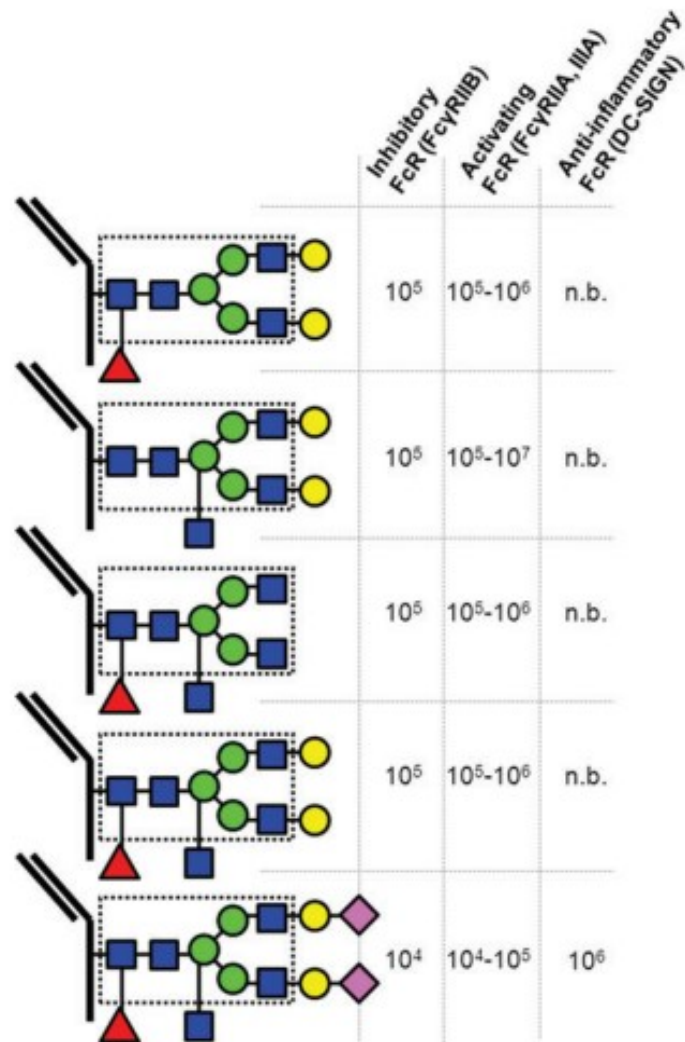
Un glycovariant d'IgG en particulier porte un résidu d'acide sialique de structure en conformation  $\alpha$ -2,6 biantennaire complexe sur le glycan à la position Asn297 du fragment Fc (Figure 1.4.4, p.35). Ce glycovariant peut se fixer aux récepteurs de type lectine C (DC-SIGN et SIGNR1), lui conférant du coup un rôle dans le mécanisme anti-inflammatoire (97, 98, 135, 144, 158, 170, 171).

Un argument de taille dans l'attribution d'un rôle anti-inflammatoire au motif de sialylation des IVIG réside dans l'activité observée avec l'utilisation de lots d'IVIG aglycosylées et asialylées. Sans cette conformation particulière, les IVIG ne démontrent plus aucun effet anti-inflammatoire (158, 168), ce qui est cependant aujourd'hui contesté par d'autres études (172-175). Néanmoins, des préparations recombinantes du fragment Fc sialylées en conformation biantennaire  $\alpha$ -2,6 répliquent les effets anti-inflammatoires observés avec les préparations d'IVIG (170). De plus, ce glycovariant sialylé des IVIG possède une affinité réduite pour les Fc $\gamma$ Rs (Figure 1.4.5, p.36) réduisant ainsi leur efficacité lors du processus d'ADCC (158, 170, 176).



**Figure 1.4.4 - IgG et la structure du glycan Fc.** (A) La structure en forme de Y de l'anticorps humain b12 IgG1 (numéro PDB 1HZH montrée en utilisant *FirstGlance* dans *Jmol*). La structure de la protéine est affichée en conformation de ruban, avec un remplissage de l'espace représentant le glycan (177). Les chaînes lourde et légère de la protéine IgG se combinent pour former le fragment Fab qui se fixe aux antigènes, alors que la chaîne lourde s'étend pour former le fragment Fc, qui est responsable d'initier les fonctions effectrices. (B) Le glycan complètement transformé possède une structure biantennaire complexe. Le noyau de la structure à l'intérieur de la boîte est composé de N-acétylglucosamine (carrés bleus) et de mannose (cercles verts). Le glycan central peut être modifié par l'addition de fucose (triangle rouge), de N-acétylglucosamine bissectrice, et les deux bras, définis par les liens mannose  $\alpha 1,3$  et  $\alpha 1,6$ , peuvent être allongés par l'addition de galactose (cercles jaunes), et d'acide sialique (losanges roses). *Reprinted with permission from Novel roles for the IgG Fc glycan, Anthony RM, Wermeling F, Ravetch JV, Annals of the New York Academy of Sciences, 1253, copyright © 2012 New York Academy of Sciences. License number 3419040303365.*





**Figure 1.4.5 – La composition du Fc glycan dicte l’affinité au FcγR.** Gamme de constante d’association approximative ( $K_a$  en  $M^{-1}$ ) des FcγRs activateurs, inhibiteur, anti-inflammatoire pour plusieurs glycoformes d’IgG1 humains. N-acétylglucosamine (carrés bleus), mannose (cercles verts), fucose (triangles rouges), galactose (cercles jaunes), acide sialique (losanges roses). *Reprinted with permission from Novel roles for the IgG Fc glycan, Anthony RM, Wermeling F, Ravetch JV, Annals of the New York Academy of Sciences, 1253, copyright © 2012 New York Academy of Sciences. License number 3419040303365.*

Puisque seulement 2-4% de la préparation d’IVIG possède cette conformation spécifique de sialylation (170), ceci peut expliquer le besoin d’une haute dose d’IVIG pour obtenir un effet anti-inflammatoire (158, 170) et un effet favorable contre la GvHD (131, 146, 178). Cette hypothèse de mécanisme

d'action des IVIG est d'autant plus supportée par la faible affinité des monomères d'IgG pour les Fc $\gamma$ Rs. Bien que certaines équipes de recherche croient qu'il soit peu probable que l'activité anti-inflammatoire des IVIG découle de la saturation des Fc $\gamma$ Rs activateurs, ce qui empêcherait ainsi la fixation de complexes immuns d'anticorps pathogéniques sur les cellules effectrices innées, et donc leur activation (98, 144, 146, 158), d'autres démontrent plutôt que les IVIG peuvent saturer les Fc $\gamma$ Rs activateurs et ainsi dispenser leur effet anti-inflammatoire (143) ou inhibiteur de la phagocytose (175).

### **1.4.7 Dimères d'IVIG**

---

Un autre mécanisme d'action potentiel des IVIG qui expliquerait la nécessité de recourir à de si fortes doses afin d'observer un effet anti-inflammatoire repose sur la formation de dimères dans les préparations commerciales d'IVIG. En effet, la combinaison de plasmas provenant de milliers de donneurs mène à la formation de dimères *via* les interactions idiotypes-anti-idiotypes (111, 135, 179). Ces dimères peuvent constituer un élément anti-inflammatoire, absent chez les individus sains (136), ce qui peut contribuer à expliquer l'effet observé suite à l'administration des IVIG, mais pas chez la population générale. De plus, le faible pourcentage de dimères d'IgG dans les préparations d'IVIG explique le besoin d'une forte dose pour obtenir l'effet anti-inflammatoire.

### **1.4.8 Effet des IVIG sur les lymphocytes T**

---

Un dernier mécanisme d'action des IVIG réside dans leur capacité de supprimer les réponses cellulaires T, qu'elles soient mono- ou polyclonale (143, 180, 181), et peut avoir lieu autant dans la phase d'apprêtement que dans la phase effectrice (113). Cette réduction de la réponse T par les IVIG est telle qu'elle atteint parfois les niveaux habituellement obtenus avec les inhibiteurs de calcineurine (182). Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans cette régulation de la réponse T par les IVIG. Parmi ceux-ci, l'inhibition de la production de cytokines et de leurs antagonistes (137, 182-192), la suppression de la prolifération et de l'activation des cellules, laquelle est mue par la régulation à la baisse du CD25 et l'induction de l'apoptose des lymphocytes T (113, 182-184, 190, 193, 194). Dans les cas d'apoptose, celle-ci peut être induite par la voie des protéases et caspases ou par les anticorps Fas contenus dans les préparations d'IVIG (119, 195-197).

Puisque les lymphocytes T n'expriment pas de Fc $\gamma$ Rs, les IVIG n'agissent vraisemblablement pas *via* leur fragment Fc (193). Il est donc beaucoup plus raisonnable d'imaginer que l'inhibition de

l'activation et de la prolifération soit consécutive de l'activité des IVIG sur les APC, en réduisant leur capacité de présentation antigénique (139, 143), tout probablement par un mécanisme de compétition entre les complexes immuns et les IVIG pour les sites de liaison libres des Fc $\gamma$ R activateurs des APC. La liaison d'IVIG sur ces sites réduit alors effectivement la capacité de présentation des APC, inhibant du même coup le niveau d'activation et la prolifération des lymphocytes T (143, 193, 198, 199).

Les DC sont une importante population d'APC qui ont la capacité de fixer les IVIG et qui sont largement impliquées dans l'activation des lymphocytes T et le développement de la GvHD (139). La fixation des IVIG sur les DC se traduit par l'inhibition de leur maturation, supportant leur capacité à stimuler les lymphocytes T allogéniques (126, 182, 197), un mécanisme qui implique les fragments Fc et F(ab')<sub>2</sub> (197). Les DC régulent habituellement à la hausse l'expression des molécules du CMH de classe II, ainsi que plusieurs molécules de costimulation (CD1a, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR) (200). Lorsque les IVIG se fixent aux DC, l'expression des molécules de costimulation CD40 et CD80 est inhibée (182) et la modulation de la sécrétion des cytokines IL-10 et IL-12 est altérée (197, 199), ce qui affecte ultimement leur capacité de signalisation *via* le TCR, et donc leur aptitude à activer les lymphocytes T (197, 201-206). Les IVIG ont également le pouvoir d'éliminer les DC par mort cellulaire (126, 182, 197), ce qui contribue à la réduction de la stimulation cellulaire T. Ainsi, l'altération par les IVIG de la maturation des DC peut avoir un très grand impact sur le développement et la prévention de la GvHD (74, 201, 207, 208).

Bien que les lymphocytes T n'expriment pas de Fc $\gamma$ R (137), les IVIG peuvent néanmoins s'y fixer (209), notamment *via* le TCR, ce qui contribue à réduire leur activation (210). De plus, des évidences suggèrent qu'elles peuvent également se fixer à la sous-population des Tregs par un mécanisme Fc $\gamma$ R-indépendant, impliquant probablement plutôt le TCR ou un récepteur activateur portant un ITAM (138). La liaison des IVIG aux Tregs permettrait d'augmenter leurs fonctions suppressives et leur prolifération (211, 212). Ces cellules sont caractérisées par leur capacité à supprimer les lymphocytes T effecteurs impliqués dans le processus inflammatoire, et ce de façon antigène spécifique, *via* un mécanisme contact-dépendant (211). Ainsi, elles jouent un rôle important dans le maintien de la tolérance immunitaire (211, 212). Leur augmentation suite au traitement aux IVIG peut contribuer à restaurer cette tolérance chez les patients (213), qui peut ensuite inhiber l'activation des lymphocytes T alloréactifs (214). Le traitement aux IVIG peut neutraliser les cytokines inflammatoires, ce qui favorise l'expansion des Tregs (215).

### 1.4.9 Effet sur les cellules NK

---

L'effet des IVIG sur les DC a non seulement des répercussions sur l'activation des lymphocytes T, mais également sur l'activation des cellules NK. Ainsi, l'interaction entre les DC traitées avec les IVIG et les cellules NK semble être bidirectionnelle : les cellules NK peuvent dicter la lyse par ADCC (FcγRIII-dépendante), l'inhibition ou la maturation des DC, et inversement, les DC peuvent contribuer à activer ou inhiber la fonction des cellules NK (113). La lyse par ADCC des DC par les cellules NK activées par les IVIG contribue à la réduction des APC disponibles pour l'activation des lymphocytes T, ce qui diminue effectivement l'apprêtement des lymphocytes T, c'est-à-dire leur activation (113), ce qui peut diminuer le développement de la GvHD. Dans leur modèle, Tha-In *et al* ont rapporté qu'afin d'obtenir une activation complète avec prolifération des cellules NK dans leur système de coculture DC-NK, les DC devaient être traitées avec des dimères ou multimères d'IVIG. Les DC ainsi traitées sont par la suite en mesure d'activer les cellules NK. Cependant, afin de subir une prolifération suite à leur activation, ces NK doivent être en présence des lymphocytes T (113).

Un recensement de la littérature scientifique souligne toutefois des observations contradictoires au sujet des effets des IVIG sur les cellules NK. Dans un premier temps, les études portant sur les avortements spontanés répétitifs rapportent une baisse du pourcentage de cellules NK, ainsi que de leur activité fonctionnelle suite au traitement aux IVIG, permettant ainsi aux femmes traitées avec IVIG de mener la grossesse à terme (164, 216-229). Cette malfonction cytotoxique des cellules NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> est dépendante de la dose d'IVIG infusée, et est probablement indépendante des agrégats du fragment Fc (229).

En deuxième lieu, une étude sur des patients atteints de la maladie de Kawasaki rapporte que les traitements avec haute dose d'IVIG permet de restaurer après une période de trois jours le nombre et l'activité des cellules NK dans le sang périphérique à un niveau normal, probablement par la modification des facteurs impliqués dans l'homéostasie des cellules NK (230).

À la lumière de ces informations, on peut donc conclure que le mécanisme d'action des IVIG sur les cellules NK est complexe et est dépendant de la dose qui est administrée. On croit également qu'une des facettes de leurs mécanismes d'actions repose sur leur liaison *via* le fragment Fc aux FcRs exprimés à la surface des cellules NK (130). La haute dose d'IVIG infusée pourrait également être la source de compétition pour les sites de liaison sur le FcγRIII (CD16), empêchant la liaison du fragment Fc d'anticorps sur le FcγR activateur, expliquant la plus faible fonction NK observée dans certains cas (231).

## **1.5 Les modèles murins xénogéniques**

---

Les modèles murins sont utilisés en recherche depuis plusieurs décennies. L'utilisation d'un modèle vivant, par opposition au recours aux essais de culture cellulaire *in vitro*, permet de mettre en évidence de façon plus physiologique les effets des composés testés et donc ainsi d'approfondir les connaissances sur l'effet de nouveaux médicaments et le développement de certaines maladies. Plus récemment, avec le développement de plusieurs souches murines immunodéficientes, on a pu améliorer les modèles murins existants et augmenter la pertinence de leur utilisation dans les essais pré-cliniques (232). En effet, l'humanisation des modèles murins permet d'étudier l'effet des médicaments et les interactions intercellulaires sur des cellules humaines, plutôt que des cellules murines qui peuvent agir différemment de leur homologue humain. Ainsi, il est devenu possible de tester la réponse de cellules humaines à un médicament donné dans un contexte physiologique, grâce aux modèles murins humanisés ou xénogéniques.

### **1.5.1 Les souris *scid***

---

La première avancée technologique qui a permis le développement de souches murines immunodéficientes fut l'avènement de la mutation *Prkdc<sup>scid</sup>* (*severe combined immunodeficiency* : *scid* - immunodéficiences combinées graves) chez les souris CB17. Cette mutation élimine efficacement le développement des lymphocytes T et B. Les souris conservent toutefois leurs cellules NK et conservent une certaine immunité, ce qui limite la prise de greffe des cellules injectées (232, 233). Afin de remédier à ce contretemps, on utilise l'anticorps anti-asialo-GM1 et à l'irradiation des animaux, afin de diminuer ou d'éliminer l'activité des cellules NK (234), ce qui contribue à améliorer le modèle.

### **1.5.2 Les souris NOD/*scid***

---

Par la suite, des modèles de souris NOD/*scid* ont été développés, obtenus en croisant des souris *scid* à des souris de fond génétique NOD (*non obese diabetic* – diabétique non-obèse). Les souris NOD possèdent des macrophages défectueux et des cellules NK de moindre activité que les souris normales. Les souris provenant du croisement de souris NOD et *scid* possèdent donc des déficiences de l'immunité innée, ainsi qu'une fonction NK amoindrie et des macrophages défectueux, leur permettant donc d'accepter avec une plus grande efficacité les greffes de cellules humaines (232). De plus, les souris NOD/*scid* sont moins sujettes à la fuite lymphocytaire qui se produit lorsque les souris *scid*

vieillissent, ce qui peut compromettre l'immunodéficience et la capacité de prise de greffe humaine de ces souris (235). Malgré tout, ces modèles n'étaient toujours pas parfaits et nécessitaient toujours l'irradiation subléthale des souris avant l'injection des cellules. De plus, l'injection de doses massives de cellules mononucléées de sang périphérique humain (*human peripheral blood mononuclear cells* : huPBMCs) est nécessaire dans ce modèle pour induire de la GvHD, qui par surcroît ne se déclare pas de façon reproductible (232). Ces souris ont d'autant plus propension à former des tumeurs spontanément, notamment des lymphomes thymiques. Ces tumeurs, de pair avec la fuite lymphocytaire dont ces souris souffrent toujours réduisent considérablement leur espérance de vie (234, 236). Il y avait donc une nécessité de développer de meilleurs modèles, ce qui a été fait en utilisant une nouvelle souche murine.

### 1.5.3 Les souris RAG2<sup>null</sup>IL2r<sup>null</sup>

---

Tout comme la mutation *scid*, la mutation du gène *rag2* (*recombination activating gene 2* - gène activateur de la recombinaison 2) permet d'éliminer les lymphocytes T et B (234). En croisant des souris Rag2<sup>null</sup> à des souris IL2r<sup>null</sup>, on obtient des souris ne possédant ni lymphocytes T, B ou cellules NK, ni ne pouvant effectuer de signalisation cellulaire *via* la chaîne  $\gamma$  du récepteur de cytokines (IL2r $\gamma$ ), c'est-à-dire utilisant les IL-2, -4, -7, -9, -15 et -21 (237). Les souris RAG2<sup>null</sup>IL2r<sup>null</sup> ont cet avantage vis-à-vis des souris NOD/*scid* qu'elles ne souffrent pas de fuite lymphocytaire ou de formation de tumeurs spontanée (232). La plus grande immunodéficience de ce modèle comparativement aux modèles précédents (*scid* et NOD/*scid*) permet une plus grande prise de greffe des cellules humaines, malgré qu'il faille toujours irradier les souris préalablement à l'injection de fortes doses de cellules humaines (232). Le modèle peut davantage être amélioré par le recours aux liposomes contenant du clodronate afin d'éliminer les macrophages murins, et ainsi améliorer la prise de greffe (234). Cette souche de souris hautement immunodéficiente n'est malheureusement pas appropriée pour le développement d'un modèle de souris humanisée. L'absence d'interaction fonctionnelle entre le SIRP $\alpha$  (*signal regulatory protein  $\alpha$* ) murin exprimé par les cellules phagocytaires de ces souris, et son ligand, le CD47 humain exprimé par les cellules hématopoïétiques humaines, nuit à la prise de greffe, ainsi qu'à l'homéostasie des lymphocytes T et cellules NK humaines lors de la reconstitution du système immunitaire humain (238).

#### **1.5.4 Les souris NOD/*scid*-IL2R $\gamma$ <sup>-/-</sup> (NSG)**

---

Les souris IL2R $\gamma$ <sup>-/-</sup> ont également été croisées avec les souris NOD/*scid* décrites précédemment, donnant lieu aux souris NOD/*scid*-IL2R $\gamma$ <sup>-/-</sup> (NSG), lesquelles sont hautement immunodéficientes. En effet, ces souris n'ont ni lymphocytes T, B, cellules NK, signalisation *via* les cytokines de la chaîne  $\gamma$ , ainsi que des macrophages et DC aux fonctions réduites (236, 237), ce qui représente une nette amélioration versus les modèles précédents, permettant ainsi une bien meilleure prise de greffe des cellules humaines injectées, en raison de la plus haute immunodéficiência du modèle murin (239). Tout comme pour les souris RAG2<sup>null</sup>IL2r<sup>null</sup>, les souris NSG sont résistantes au développement de lymphomes et peuvent donc survivre à plus long terme, même après leur irradiation sub-létale (236). Ainsi, dans ce modèle hautement immunodéficient, il est possible d'obtenir un très haut taux de prise de greffe suite à l'injection de huPBMCs. Suite à l'irradiation sub-létale, l'injection d'au moins 2,5x10<sup>6</sup> huPBMCs par la voie intraveineuse (i.v.) ou de 10<sup>7</sup> huPBMCs par la voie intrapéritonéale (i.p.) permet d'induire une GvHD xénogénique avec infiltration de cellules humaines dans les organes cibles de la GvHD, et qui est accompagnée des symptômes caractéristiques (perte de poids, anémie, baisse du compte de plaquettes) dans 100% des souris injectées (232, 239-241).

#### **1.6 Problématique du projet de recherche**

---

Malgré le suivi rigoureux des traitements pré-greffe et de prophylaxie dans les protocoles cliniques de HSCT, de nombreux patients continuent de développer de la GvHD et un trop grand nombre en meurt toujours. Il est donc impératif d'améliorer les traitements de prophylaxie, ainsi que les traitements de première ligne une fois la GvHD déclenchée, afin d'augmenter le taux de survie post-greffe et de diminuer le taux de complications post-HSCT, lesquelles sont aussi souvent mortelles pour le patient.

À ce jour, la majorité des traitements se résument à l'usage d'immunosuppresseurs, afin de réduire l'activation des lymphocytes T, effecteurs de la GvHD. Par contre, le recours aux agents immunosuppresseurs retardent la reconstitution immunitaire chez les patients post-HSCT, ce qui les maintient dans un état immunosupprimé, donc vulnérable, à de maintes infections (bactériennes, fongiques, virales). Les patients ne bénéficient donc pas d'une bonne qualité de vie, en plus de courir un haut risque de mourir, soit de GvHD, soit de complication post-greffe non-reliée à la GvHD, mais influencée par l'état immunosupprimé dans lequel les patients se trouvent.

Le développement de thérapies immunomodulatrices, contrairement aux thérapies immunosuppressives, ont le potentiel de contrôler le développement de la GvHD, sans toutefois mettre en péril la reconstitution du système immunitaire du patient. Les IVIG, de par leurs propriétés immunomodulatrices, pourraient constituer un traitement prometteur pour la prévention de la GvHD. De surcroît, puisque les IVIG sont utilisées depuis plus de 30 ans dans divers protocoles cliniques, la découverte de leur utilité dans la prévention de la GvHD pourrait rapidement être suivie de leur mise en application dans les protocoles cliniques de traitement.

## **1.7 Objectifs du projet de recherche**

---

L'objectif principal de cette thèse est de déterminer le potentiel immunomodulateur des IVIG dans un modèle pré-clinique murin xénogénique de GvHD. Si l'utilisation des IVIG permet la prévention de la GvHD, l'objectif suivant est de déterminer le mécanisme d'action privilégié dans ce modèle.

## **1.8 Hypothèses de recherche**

---

En se basant sur les connaissances acquises suite à l'utilisation extensive des IVIG dans le traitement de plusieurs maladies immunitaires et inflammatoires, on émet l'hypothèse que les IVIG peuvent moduler la réponse immunitaire suivant la HSCT et ainsi réduire l'intensité et l'incidence de la GvHD. De plus, cette modulation de la réponse immunitaire ne serait pas accompagnée d'un effet négatif sur la qualité et la rapidité de la reconstitution immunitaire chez les patients.



## **Chapitre 2 Premier article**

## **2.1 Mise en contexte du premier article**

---

Le premier objectif dans la réalisation de ce projet de recherche est de déterminer si l'administration à haute dose d'IVIG dans un modèle murin xénogénique de GvHD permet la réduction de son incidence ou de sa sévérité. À cet effet, on a d'abord développé un modèle fiable et reproductible de GvHD xénogénique, en ayant recours aux souris hautement immunodéficientes NSG, dans lequel on a également démontré l'efficacité des traitements immunosuppresseurs contre les lymphocytes T, responsables du déclenchement de la GvHD. Une fois la validité du modèle expérimental établi, on a pu utiliser ce modèle afin de tester l'efficacité des IVIG à haute dose dans la prévention de la GvHD.

Les souris NSG pouvant également être utilisées afin de développer un modèle de reconstitution de cellules immunitaires humaines, il a été possible d'évaluer l'effet des traitements immunosuppresseurs et des IVIG à haute dose sur la qualité et la cinétique de la reconstitution immunitaire, ce qui représente un paramètre crucial dans la rémission des patients qui reçoivent une HSCT.

Le détail de tous ces travaux est décrit dans l'article "*Use of immunoglobulins in the prevention of GvHD in a xenogeneic NOD/scid/γc- mouse model*" par J Gregoire-Gauthier, L Durrieu, A Duval, F Fontaine, MM Dieng, M Bourgey, N Patey-Mariaud de Serre, I Louis et E Haddad, qui a été publié dans la revue *Bone Marrow Transplantation* en 2012.

J Gregoire-Gauthier, F Fontaine, I Louis et E Haddad ont élaboré les plans expérimentaux. J Gregoire-Gauthier a effectué toutes les expériences, aidée à l'occasion par L Durrieu, A Duval, F Fontaine et MM Dieng. J Gregoire-Gauthier, L Durrieu, A Duval, F Fontaine, MM Dieng, I Louis et E Haddad ont tous participé à l'analyse des résultats. M Bourgey a contribué à l'analyse statistique des résultats et N Patey-Mariaud de Serre a effectué les analyses histologiques. J Gregoire-Gauthier et E Haddad ont rédigé l'article.

**"Use of immunoglobulins in the prevention of GvHD in a xenogeneic NOD/scid/γc- mouse model" Gregoire-Gauthier J, Durrieu L, Duval A et al, *Bone Marrow Transplant.* 2012, 47(3):439-50**

Use of Immunoglobulins in the prevention of Graft versus Host Disease in a xenogeneic NOD/scid gc-  
mouse model

**Running Title:** Immunoglobulins in a xenogeneic mouse model of GvHD

**Name and Address of Authors:**

Joëlle Gregoire-Gauthier<sup>1</sup> M.Sc., Ludovic Durrieu<sup>1</sup> M.Sc., Arnaud Duval<sup>1</sup> M.Sc., François Fontaine<sup>1</sup>  
M.Sc., Mame Massar Dieng<sup>1</sup> M.Sc., Mathieu Bourgey<sup>1</sup> Ph.D., Natalie Patey-Mariaud de Serre<sup>1,2</sup> M.D.,  
Ph.D., Isabelle Louis<sup>1,3</sup> Ph.D., Elie Haddad<sup>1,3,4</sup> M.D., Ph.D.

<sup>1</sup>CHU Sainte-Justine Research Centre, Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, <sup>2</sup>Department of  
Pathology, <sup>3</sup>Department of Paediatrics, and <sup>4</sup>Department of Microbiology and Immunology, Université  
de Montréal

3175, chemin de la Côte-Ste-Catherine  
Montréal, QC H3T 1C5  
Canada

**Corresponding Author: Elie Haddad, MD, PhD**

CHU Sainte-Justine Research Centre  
3175, chemin de la Côte-Ste-Catherine  
Montréal, Québec H3T 1C5  
Canada

Telephone: (+1) 514-345-4931 x6217

Fax: (+1) 514-345-4897



This work was funded by grants awarded to E.H. from the Bayer-Talecris-Canadian Blood Services-  
Héma-Québec Partnership Fund, from Talecris Biotherapeutics and from the Fonds de Recherche en  
Santé du Québec (FRSQ).

## 2.2 Abstract

---

The efficacy of Intravenous Immunoglobulins (IVIG) in preventing Graft versus Host Disease (GvHD) has not been definitely demonstrated clinically. Using a xenogenic model of GvHD in NOD/SCID/ $\gamma$ c- (NSG) mice, we showed that weekly administration of IVIG significantly reduced the incidence and associated mortality of GvHD to a degree similar to Cyclosporine A (CsA). Unlike CsA and OKT3, IVIG were not associated with an inhibition of human T-cell proliferation in mice. Instead, IVIG significantly inhibited the secretion of human IL-17, IL-2, IFN- $\gamma$ , and IL-15 suggesting that IVIG prevented GvHD by immunomodulation. Furthermore, the pattern of modification of the human cytokine storm differed from that observed with CsA and OKT3. Finally, in a humanized mouse model of immune reconstitution, in which NSG mice were engrafted with human CD34<sup>+</sup> stem cells, IVIG transiently inhibited B-cell reconstitution, while peripheral T-cell reconstitution and thymopoiesis were unaffected. Together these *in vivo* data raise debate related to the appropriateness of IVIG in GvHD prophylaxis. In addition, this model provides an opportunity to further elucidate the precise mechanism(s) by which IVIG inhibit GvHD.

**Keywords:** GvHD, IVIG, Humanized Mice, Immune Reconstitution

## 2.3 Introduction

---

Graft-versus-Host Disease (GvHD) is a major complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) (1-4). Clinically significant acute GvHD may occur in 9 to 50% of patients who receive an allogeneic HLA-matched HSCT, even when intense immunoprophylaxis is used (4). Since the incidence of GvHD may approach 100% in the absence of prophylaxis (5, 6), GvHD prophylaxis is essential in all patients undergoing allogeneic HSCT (7). This prophylaxis is usually provided by means of immunosuppressive drugs, mainly steroids, cyclosporine A (CsA) and methotrexate, usually used in combination (8-10). Albeit effective in GvHD prophylaxis by reducing its incidence, these agents impair the quality and kinetics of immune reconstitution. These effects enhance the risk of morbidity and mortality, mainly due to infection and relapse in the context of HSCT performed for malignancy. Intravenous immunoglobulins (IVIG) have been shown to be an effective immunomodulator in many autoimmune diseases (11) and to prevent infections in primary immunodeficiencies. Thus, it was tempting to hypothesize that IVIG might be very attractive in the context of allogeneic HSCT by inhibiting GvHD and preventing infectious diseases. This is supported by the current status of IVIG as an approved therapy for GvHD prophylaxis, although many authors question their utility (12). On one hand, Sullivan *et al.* (13) showed in a randomized trial that weekly IVIG reduced the cumulative incidence of acute GvHD and that this effect was significant in patients receiving HLA-identical HSCT. Also, in patients older than 20 receiving HLA-identical HSCT, the incidence of non-relapse mortality was significantly less in patients receiving IVIG. On the other hand, many other studies (14-18) have failed to demonstrate that IVIG significantly reduced the incidence of acute GvHD or overall mortality. In addition, Sullivan *et al.* (17) showed that extending IVIG treatment for longer than 3 months post-HSCT was associated with a significantly delayed recovery of humoral immunity and a significant increase in infections while overall and non-relapse mortality did not differ. Given the impossibility of conducting a blinded-randomized clinical trial and the high heterogeneity amongst patients (age, disease, conditioning regimen, prophylaxis treatments and donor source), a relevant animal model is the only way to determine the role of IVIG in GvHD reduction. We developed a xenogenic model of GvHD and a humanized mouse model of human immune reconstitution following HSCT that both used NOD/SCID/ $\gamma$ c- (NSG) mice. We used these models to determine the impact of IVIG on reducing GvHD and impairing thymic and peripheral immune reconstitution.

## 2.4 Materials and Methods

---

### *Mice*

NOD/LtSz-*scid*IL2rg<sup>-/-</sup> mice were obtained from the Jackson Laboratory and bred in the animal care facility at the CHU Sainte-Justine Research Centre. NOD/LtSz-*scid*IL2rg<sup>-/-</sup> were also generated in house by backcrossing NOD.CB17-Prkdc<sup>*scid*</sup> and C.12954-IL2rg<sup>tm1WjL/J</sup> mice as described by Shultz *et al.* (19). All mice (after called NSG mice) were equally used for the purpose of this study. Mice were housed under specific pathogen-free conditions in sterile ventilated racks. All procedures were previously approved by the institutional committee for Good Laboratory Practices for Animal Research (GLPAR), as per our research protocols (SST08-77 and SST09-22). Irradiated mice were given 0.08 mg/mL ciprofloxacin (Sandoz, Boucherville, Canada) in their drinking water.

### *Xenogeneic model of GvHD*

Human PBMC (huPBMC) collected from leukapheresis from three healthy donors following informed written consent were isolated by Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Following sub-lethal 3 Gy irradiation, 7 to 9 week-old mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 10<sup>7</sup> huPBMC at day 0 and treated with either PBS or IVIG (Gamunex 50 mg/mouse) (Talecris Biotherapeutics, Research Triangle Park, USA) once a week from day -1 to day +42. Mice treated with CsA (0.375 mg/mouse) were injected i.p. daily from day 0 to day +23 (20) and mice treated with OKT3 (0.05 mg/mouse) were injected i.p. on days +1, +3, and +5 (21).

### *Assessment of GvHD*

Mice were evaluated in a blinded fashion every other day using a GvHD assessment scale. The GvHD assessment scale, inspired by the grading system established by Cooke *et al.* (22), refers to weight loss, general appearance of the fur and mobility. GvHD diagnosis was given to a mouse upon a 10% weight loss, appearance of ruffled fur and limited mobility. Survival was also noted for each group. As requested by our GLPAR committee, mice were sacrificed when clinical endpoints were reached (weight loss >20% and appearance of either limited mobility or disruption of general appearance of the mice). The liver, gut and skin were collected from the euthanized mice and analysed by a pathologist for GvHD lesions. 100 µL of peripheral blood was drawn weekly from the saphenous vein. Circulating cells were analyzed by flow cytometry to determine lymphocyte populations and plasma was collected to determine human cytokine concentrations.

### *Humanized mouse model of human immune reconstitution*

Human CD34<sup>+</sup> (hCD34<sup>+</sup>) hematopoietic stem cells were isolated from cord blood units using CD34<sup>+</sup> magnetic beads (MACS Miltenyi Biotec, Auburn, USA). Cord blood units were obtained from the CHU Sainte-Justine Research Cord Blood Bank following approval by the ethics committee. Mice were injected intravenously (i.v.) with 10<sup>5</sup> hCD34<sup>+</sup> cells following 3 Gy sub-lethal irradiation and treated with either PBS or IVIG (Gamunex 50 mg/mouse) (23, 24) once a week from day -1 until the end of the experiment. Engraftment and immune reconstitution were assessed weekly on blood samples by flow cytometry. Upon sacrifice of the mice, the thymi were analyzed by flow cytometry.

### *Flow cytometry*

Human and murine cell populations in peripheral blood samples collected weekly from xeno-GvHD and from human immune reconstituted mice were analyzed by flow cytometry. Upon sacrifice of the reconstituted mice, thymi were collected and analyzed. FITC anti-mouse CD45, FITC anti-human CD4, FITC anti-human CD14, PE anti-mouse CD45, PE anti-human CD8, PE anti-human CD19, PE anti-human CD45RA, PE anti-human CD56, APC anti-human CD45, APC anti-human CD45RO, APC-Cy7 anti-human CD3 and APC-Cy7 anti-human CD45 antibodies (all purchased from BD Biosciences, Mississauga, Canada) were used to identify cell populations, along with 7-AAD for dead cell discrimination (BD Biosciences, Mississauga, Canada). CountBright beads were added prior to FACS acquisition to determine the absolute number of cells in each sample (Invitrogen, Burlington, Canada). Samples were acquired on a FACS Aria flow cytometer and analyzed using the FACSDiva software (BD Bioscience, Mississauga, Canada).

### *Histology*

Organs were frozen in OCT cubes, fixed in 10% formaldehyde, embedded in paraffin wax and oriented for histological analysis. Sections were stained with hematoxylin and eosin. Specimens were assessed by a pathologist.

### *Cytokine concentration*

The concentration of human IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  were determined in 30  $\mu$ L of mice plasma using a customized Bio-Plex Pro Human Cytokine 9-plex Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). The experiments were conducted according to the manufacturer's recommendation and results were analyzed on a CS 1000 Autoplex Analyzer (Perkin Elmer Inc., Waltham, USA).

### *Human IgG concentration*

The concentration of human IgG was determined in plasma of mice using a human IgG ELISA kit, as per manufacturer's instructions (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA).

### *Statistics*

Results were analyzed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Softwares Inc., La Jolla, USA). Survival statistics were determined using the Mantel-Cox (log-rank) test which was stratified in time when needed. Elsewhere, Student's t test, 2-by-2 Fisher's exact test with Bonferroni's correction and non-parametric one-way analysis of variance (Kruskal-Wallis) with Dunn's Multiple Comparison Test were used. Taking into account the post-test corrections, the threshold for significance was set at  $p \leq 0.05$ .

## **2.5 Results**

---

### *IVIG reduced mortality in our xenogeneic GvHD model*

To test whether IVIG could inhibit GvHD, we used a xenogeneic model of GvHD that consists of injecting huPBMC into sub-lethally irradiated NSG mice (25, 26). As shown in Figure 2.9.1 (p.70), almost all control mice injected with  $10^7$  huPBMCs and PBS died within a period of 50 days. Histopathology performed at the time of sacrifice showed severe characteristic lesions of GvHD with infiltrating human T-cells and biliary lesions (Figure 2.9.2, p.71), confirming that mice died from GvHD. Upon weekly IVIG treatment, GvHD-related mortality was both attenuated and delayed compared to PBS control mice ( $p < 0.05$ , Figure 2.9.1, p.70). We also tested whether OKT3 and CsA could inhibit GvHD in this model. CsA is a key drug used in GvHD prophylaxis in humans (27-30) and OKT3 is used for steroid-refractory GvHD (31-36). We showed that OKT3 and CsA significantly prevented GvHD-related mortality (Figure 2.9.1, p.70), with a greater efficacy for OKT3. CsA was not significantly better than IVIG in preventing mortality ( $p = 0.681$ ), while as expected, there was evidence of superior efficacy of OKT3 over IVIG ( $p = 0.009$ ).

### *IVIG reduced the incidence of GvHD*

As shown in Figure 2.9.3 (p.72), PBS-treated mice had a significantly greater incidence of GvHD than IVIG-treated mice, suggesting that IVIG prevented mortality by inhibiting GvHD. Also, CsA and OKT3 both significantly reduced the incidence of GvHD as compared to PBS control group. We showed that CsA was not more efficient than IVIG in preventing GvHD while OKT3 was the best



treatment to reduce the incidence of GvHD (Figure 2.9.3, p.72). As an additional control group, 10 mice were injected i.p. weekly with the IVIG vehicle (200 mM glycine) and displayed the same mortality and GvHD incidence as the PBS control group (not shown).

The plasmatic concentration of human IgG in IVIG treated mice was 13 mg/mL (not shown). This is within the range of what is observed in patients treated with IVIG for GvHD (37) and to that reported by Siragam *et al.* (23) in their model of prevention of immune thrombocytopenia in mice. These reports validate that the IVIG dose in our protocol is relevant to clinical and experimental practice.

#### *IVIG did not reduce human T-cell proliferation in mice.*

The percentage of human CD45<sup>+</sup> (hCD45<sup>+</sup>) cells (determined by the ratio of human CD45<sup>+</sup> cells/human + murine CD45<sup>+</sup> cells), assessed weekly in peripheral blood, was not modified by IVIG (Figure 2.9.4A, p.73). Over 90% of hCD45<sup>+</sup> cells were CD3<sup>+</sup> T-cells in both groups (not shown), as observed by others in the same model (25). Since the ratio of hCD45<sup>+</sup> cells depends largely on murine CD45<sup>+</sup> cells, we quantified the absolute number of circulating human T-cells and showed that IVIG did not induce a reduction of T-cells in peripheral blood (Figure 2.9.4B, p.73) or modify the ratio of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells (not shown). As expected, both CsA and OKT3 induced a significant decrease of both the ratio of hCD45<sup>+</sup> cells and the absolute number of hCD3<sup>+</sup> cells in blood when compared to PBS and IVIG (Figure 2.9.4, p.73). These results suggest that IVIG do not inhibit the proliferation of human T-cells in mice and support the hypothesis that IVIG reduce GvHD via immunomodulatory actions, as suggested by other authors (38-43).

#### *Determination of human plasmatic cytokine concentration*

We found a strong increase of IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-2, and a moderate increase of IL-6, IL-8, IL-10, and IL-15 in PBS-treated mice when compared to baseline levels (set as levels prior to huPBMC injection). This confirmed the generation of a human cytokine storm in our xenogeneic GvHD model. Notably, we observed very low levels of TNF- $\alpha$ , and no IL-4 increase. IVIG treatment induced a significant reduction of IL-2 at day 14, IFN- $\gamma$  at day 7, IL-15 at day 14, and a dramatic reduction of IL-17 from day 7 to day 21. There was also a trend for a decrease of IL-8 although this was not significant (Figure 2.9.5, p.74). As a control experiment, we verified that the addition of 13 mg/mL IVIG (as observed in plasma of IVIG-treated mice) did not modify the cytokine concentration detected by the Bio-Plex Assay (not shown). These results suggest that IVIG have an immunomodulatory effect that might contribute to reducing GvHD in our model. Both CsA and OKT3 induced a significant reduction of IL-2 and IL-8 and a dramatic decrease of INF- $\gamma$ . Also, CsA induced a significant reduction of IL-15 and

IL-17 while OKT3 induced a significant reduction of IL-10. By comparing IVIG to CsA and OKT-3, we showed that the levels of IL-17 were significantly lower in IVIG-treated mice while the levels of IFN- $\gamma$  and IL-10 were significantly lower in CsA- and OKT3-treated mice. Taken together, these results suggest that IVIG treatment works by different mechanisms than OKT3 and CsA for both CD3<sup>+</sup> T-cell proliferation and cytokine secretion.

#### *Effect of IVIG on human immune reconstitution*

Since it has been suggested that IVIG inhibit immune reconstitution (17), we evaluated the effect of IVIG on immune reconstitution in a humanized mouse model of cord blood transplantation. Sub-lethally irradiated NSG mice were injected with human cord blood CD34<sup>+</sup> cells and mice were treated weekly with either PBS (n=4) or IVIG (n=5) from week 1 and until sacrifice. Blood was drawn weekly to study the appearance of circulating human cells. As seen in Figure 2.9.6A (p.75), IVIG-treated mice showed a delayed engraftment of human CD45<sup>+</sup> cells for the first 56 days following hCD34<sup>+</sup> cell injection when compared to PBS-treated mice (p<0.05). To determine which cell populations were targeted by IVIG, we evaluated the relative percentage of all major cell populations (T, B, NK, and monocytes) in the blood. Our results show that the kinetics of appearance of all analyzed human cell populations were the same in PBS- and IVIG-treated mice, except for the B-cell population (Figure 2.9.6, p.75). The appearance of peripheral human B-cells mirrored almost exactly the appearance of hCD45<sup>+</sup> cells. IVIG had no negative impact on the appearance of T-cells. Finally, T-cells were detected in peripheral blood by day 84 post-transplantation in both groups with the same kinetics (Figure 2.9.6C, p.75). When mice reached limit points and had to be sacrificed (average time of sacrifice was 27.9 and 28.2 weeks post-injection in the PBS- and IVIG-treated groups, respectively), thymi were harvested and analyzed by flow cytometry. PBS- and IVIG-treated mice showed no significant difference in the percentage of human CD45<sup>+</sup> cells (Figure 2.9.7A, p.76) or in its T-cell subsets, namely double positive (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), single positive (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> or CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>) (Figure 2.9.7B, p.76), CD45RO<sup>+</sup> and CD45RA<sup>+</sup> cells (Figure 2.9.7C, p.76). These results suggest that IVIG did not affect the kinetics of thymopoiesis in this humanized mouse model. We also tested the effect of CsA and OKT3 on human immune reconstitution in our humanized mouse model. NSG mice injected with human cord blood cells were treated with CsA (daily from d0 until sacrifice at d42) or with OKT3 (weekly from d0 until sacrifice at d42). As shown in Figure 2.9.8 (p.77), CsA and OKT3 did not modify the engraftment of human CD45<sup>+</sup> cells in blood. Nevertheless, we showed at sacrifice that CsA reduced significantly the number of human CD45<sup>+</sup> cells in the thymus. The same trend, although not significant, was observed in OKT3-treated mice. Taken together, these results suggest that IVIG delayed leukocyte

engraftment of human CD45<sup>+</sup> cells by its negative effect on B-cell reconstitution in the first two months of treatment. Moreover, IVIG did not affect monocyte, NK cell or T-cell reconstitution and did not influence the thymopoiesis.

## 2.6 Discussion

---

Despite its approval by the FDA for reducing infections and preventing GvHD complications in bone marrow transplantation, the utility of IVIG in preventing GvHD is still a matter of debate (12). While some studies show that IVIG reduce GvHD and mortality, many others fail to demonstrate the same effect (14-18). As reviewed by Sokos *et al.* (12), IVIG were shown to be efficient in reducing GvHD in only 3 (13, 44, 45) of 8 studies (13-18, 44, 45) that together, comprised 2507 patients. Determining the true effect of IVIG in these clinical studies is a key challenge since it is difficult to derive quality data from comparisons of heterogenous stages of pathology and treatment regimens. In this work, we showed that weekly treatments with IVIG monotherapy induced a significant reduction of the incidence of GvHD and its related mortality in a xenograft mouse model. To our knowledge, this is the first *in vivo* demonstration of efficacy of IVIG alone for prevention of GvHD. Our model also allowed the comparison between IVIG, OKT3, and CsA, an approach that is absolutely impossible in clinical setting for obvious ethical reasons. CsA is a calcineurin inhibitor that inhibits T-cell activation and proliferation (46) by preventing or blocking the synthesis of many cytokines, including IL-2 and IFN- $\gamma$  (47-50). OKT3 is a monoclonal antibody that directly reacts with the  $\epsilon$  chain of the CD3 receptor on the TCR, initiating its clearance from the membrane surface which leads to the silencing of T-cell allo-reactivity by inducing apoptosis (36, 51). We showed that OKT3 and CsA reduced the incidence of GvHD by up to 60% and also decreased related mortality in NSG mice. These results are relevant from a clinical perspective since OKT3 is usually used for refractory GvHD (31-36) and despite first-line prophylaxis usually consisting of CsA and Methotrexate, GvHD still occurs in 10 to 50% of patients depending on the HLA disparity between host and donor (29, 52). While CsA is considered a cornerstone in GvHD prophylaxis, we showed that its reduction of GvHD-related mortality was comparable to that observed by IVIG in our model. In a clinical setting, IVIG are used with CsA and other immunosuppressive drugs, while in our model IVIG and CsA were used alone. This likely explains why IVIG monotherapy prevented GvHD in our model while not considered to be efficient clinically in the context of polytherapy. Also, we have not tested whether the addition of IVIG to CsA could reduce the incidence of GvHD in our model. One could hypothesize that the immunosuppressive effect of CsA or other immunosuppressive drugs used in clinical setting overrides the effects of adjunct

IVIG. Although our results cannot be taken as evidence-based medicine for the use of IVIG monotherapy in preventing GvHD, they strongly suggest that IVIG have an effect *in vivo* in preventing GvHD.

Literature suggests that IVIG could play a role in preventing GvHD by immunomodulation, although the exact mechanism(s) have never been precisely demonstrated. Our model provides the opportunity to study the mechanism(s) by which IVIG prevent GvHD. Since patients often receive many immunosuppressive drugs simultaneously to prevent GvHD, it is very difficult to assess the individual role of a single drug. As expected, we found that after CsA or OKT3 treatment, the number of circulating human CD3<sup>+</sup> cells was reduced in NSG mice. Indeed CsA inhibits T-cell activation and proliferation (46-50) whereas OKT3 induces T-cell apoptosis (36, 51). Unlike OKT3 and CsA, IVIG did not inhibit the proliferation of human T-cells. Since inhibition of T-cell proliferation is one of the caveats of immunosuppression because it leads to the inhibition of the graft versus leukemia, this finding could have an impact on clinical practice. Many studies showed that IVIG inhibit T-cell proliferation or induce apoptosis (42, 43, 53-57) while others failed to demonstrate any direct effect of IVIG on T-cells (58, 59). Interestingly, studies showing an inhibition of T-cell proliferation or an induction of apoptosis were performed *in vitro* while studies that failed to demonstrate any direct effect on T-cell proliferation were performed *in vivo*. Moreover, Ephrem *et al.* demonstrated in an experimental model of autoimmune encephalomyelitis that IVIG controlled the disease by inducing an expansion of regulatory T-cells (58). We tested this hypothesis in our model and failed to detect regulatory T-cell expansion, both in the peripheral blood and spleen (not shown).

Our GvHD xenogeneic model allowed us to quantify human cytokines and to assess the impact of various treatments on their secretion. We showed that IVIG had a significant impact on the human cytokine storm, thereby strongly suggesting that the prevention of GvHD by IVIG in our model was due to immunomodulation rather than a nonspecific effect. Interestingly, the pattern of cytokine inhibition induced by IVIG was different from one observed with CsA or OKT3. As expected, given their mechanisms of action (36, 46-51, 60-62), CsA and OKT3 inhibited most cytokines and particularly pro-inflammatory Th1 (IFN- $\gamma$  and IL-2). Of all the cytokines tested, secretion of IFN- $\gamma$  was the highest recorded in PBS-treated mice suggesting that the reduction of GvHD in CSA and OKT3 mice was related to its inhibition. The moderate inhibition of IFN- $\gamma$  in the IVIG-treated group as compared to the strong inhibition in the CsA- and OKT3-treated groups is consistent with the observation that human T-cell proliferation was inhibited by OKT3 and CsA and not by IVIG. The significant reduction of IL-15 and IL-17 secretion in CsA-treated mice is consistent with CsA's ability

to suppress IL-15 mediated IL-17 production (60). IVIG dramatically reduced the levels of IL-17 while OKT3 did not inhibit IL-17 secretion and CsA inhibited its secretion only at week 2. The role of IL-17-producing T-helper cells is increasingly being recognized in GvHD (63-67). Tournadre *et al.* recently showed by analyzing muscle biopsies of patients with inflammatory myopathies that IVIG could mediate their immunomodulation by acting on the Th17 pathway (68). One could speculate that IVIG exert their modulatory effect on GvHD by impairing the Th17 pathway, although more analysis on other Th17-family cytokines and on the nature of IL-17 secreting cells in our model will be required to confirm this hypothesis. Taken together, these results indicate that IVIG have the potential to significantly alter the cytokine storm observed in our GvHD model. We did not find any predictive factor for the efficacy of IVIG in preventing GvHD in our model. Particularly, human T-cells counts and cytokine levels were not different in GvHD-free IVIG-treated mice compared to IVIG-treated mice that developed GvHD.

The kinetics and the quality of immune reconstitution are crucial for preventing morbidity and mortality following HSCT (69-72). IVIG are considered an immunomodulatory rather than an immunosuppressive drug and thus could be very useful following HSCT as they should not inhibit immune reconstitution. Nevertheless, it has never been demonstrated that IVIG do not inhibit immune reconstitution post-HSCT. In addition, Sullivan *et al.* have shown that extending IVIG treatment after 3 months post-HSCT was associated with a significant delayed recovery of humoral immunity and a significant increase in the rate of infections without affecting overall and non-relapse mortality (17). By injecting human CD34<sup>+</sup> cells in NSG mice, we observed a human immune reconstitution very similar to what is observed by others using the same mouse model (73-77). This model does not mimic exactly what is usually observed after HSCT in clinical setting, but is nevertheless considered the best animal model to study *in vivo* immune reconstitution induced by human CD34<sup>+</sup> cells. As for GvHD, this model also allows the study of a given treatment used alone. We showed that CsA significantly inhibited human thymopoiesis and a similar trend (although not significant) was observed with OKT3. Using this model, we showed that peripheral T-cell reconstitution, as well as thymopoiesis, was not affected by IVIG. However, we demonstrated a transient delay in B-cell reconstitution for the first 49 days post-injection in the IVIG-treated mice. It was recently shown by Séité *et al.* (78) that IVIG reduced B-cell viability and promoted apoptosis of B-cells by binding to CD22. Our model should allow us to test this hypothesis and investigate the potential other mechanism(s) by which early B-cell reconstitution is affected by IVIG. Since IVIG are used for immunoglobulin replacement in primary B-cell deficiencies, it is likely that this transient B-cell deficiency should not have any significant clinical impact and should not preclude their use in a clinical setting after HSCT.

Our data provides new *in vivo* evidence that IVIG monotherapy reduce mortality induced by GvHD in a xenogenic model with an efficacy comparable to CsA. Unlike CsA, this biological effect was not associated with an inhibition of T-cell proliferation. Instead, it was accompanied by a profound modification of the cytokine storm associated to GvHD, suggesting an immunomodulatory role *in vivo*. We also showed in a humanized mouse model of immune reconstitution that IVIG did not inhibit T-cell reconstitution and thymopoiesis, but instead induced a transient delay in B-cell reconstitution. Although our models do not mimic exactly GvHD and immune reconstitution observed in clinical setting, our data obtained *in vivo* with human cells may argue for the use of IVIG in GvHD prophylaxis. In addition, our models should help us to better understand the mechanism(s) by which IVIG inhibit GvHD, without confounding interference from other immunosuppressive drugs.

## **2.7 Acknowledgements**

---

This research was supported by a Bayer-Talecris-Canadian Blood Services-Héma-Québec Partnership Fund to E.H. (“Mechanisms of action of Intravenous Immunoglobulins (IVIG) on Graft versus Host Disease and their influence on immune reconstitution after cord blood transplantation by using a new *in vivo* model of humanized NOD/SCID/ $\gamma$ c- mice”), a Fonds de Recherche en Santé du Québec where E.H. was co-applicant (“Greffe de sang de cordon : exploration des déterminants moléculaires de la prise de greffe et de la reconstitution immunitaire et mise au point de nouveaux traitements des complications grâce à des modèles précliniques”), and an Investigator Initiated Trial, funded by Talecris Biotherapeutics to E.H. (“Efficacy and mechanisms of action of immunoglobulins in graft versus host disease and impact on immune reconstitution following cord blood transplantation in a humanized mice model”). J.G.G. received a scholarship from the Fondation de l’Hôpital Sainte-Justine/Fondation des Étoiles.

### **Conflict of Interest**

E.H. received honoraria from CSL Behring as member of adboard committee.

## 2.8 References

---

1. Ferrara JL, Cooke KR, Pan L, Krenger W. The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells* 1996; **14**(5): 473-89.
2. Ferrara JL, Cooke KR, Teshima T. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 2003; **78**(3): 181-7.
3. Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991; **324**(10): 667-74.
4. Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol* 2001; **29**(3): 259-77.
5. Lazarus HM, Coccia PF, Herzig RH, Graham-Pole J, Gross S, Strandjord S *et al.* Incidence of acute graft-versus-host disease with and without methotrexate prophylaxis in allogeneic bone marrow transplant patients. *Blood* 1984; **64**(1): 215-20.
6. Sullivan KM, Deeg HJ, Sanders J, Klosterman A, Amos D, Shulman H *et al.* Hyperacute graft-v-host disease in patients not given immunosuppression after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1986; **67**(4): 1172-5.
7. Chao NJ. *Graft-vs-host disease*, 2nd edn: Austin, 1999.
8. Balduzzi A, Gooley T, Anasetti C, Sanders JE, Martin PJ, Petersdorf EW *et al.* Unrelated donor marrow transplantation in children. *Blood* 1995; **86**(8): 3247-56.
9. Martin PJ. Increased disparity for minor histocompatibility antigens as a potential cause of increased GVHD risk in marrow transplantation from unrelated donors compared with related donors. *Bone Marrow Transplant* 1991; **8**(3): 217-23.
10. Anasetti C, Beatty PG, Storb R, Martin PJ, Mori M, Sanders JE *et al.* Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Hum Immunol* 1990; **29**(2): 79-91.

11. Negi VS, Elluru S, Siberil S, Graff-Dubois S, Mouthon L, Kazatchkine MD *et al.* Intravenous immunoglobulin: an update on the clinical use and mechanisms of action. *J Clin Immunol* 2007; **27**(3): 233-45.
12. Sokos DR, Berger M, Lazarus HM. Intravenous immunoglobulin: appropriate indications and uses in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; **8**(3): 117-30.
13. Sullivan KM, Kopecky KJ, Jocom J, Fisher L, Buckner CD, Meyers JD *et al.* Immunomodulatory and antimicrobial efficacy of intravenous immunoglobulin in bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1990; **323**(11): 705-12.
14. Cordonnier C, Chevret S, Legrand M, Rafi H, Dhedin N, Lehmann B *et al.* Should immunoglobulin therapy be used in allogeneic stem-cell transplantation? A randomized, double-blind, dose effect, placebo-controlled, multicenter trial. *Ann Intern Med* 2003; **139**(1): 8-18.
15. Feinstein LC, Seidel K, Jocom J, Bowden RA, Anasetti C, Deeg HJ *et al.* Reduced dose intravenous immunoglobulin does not decrease transplant-related complications in adults given related donor marrow allografts. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999; **5**(6): 369-78.
16. Klaesson S, Ringden O, Ljungman P, Aschan J, Hagglund H, Winiarski J. Does high-dose intravenous immune globulin treatment after bone marrow transplantation increase mortality in veno-occlusive disease of the liver? *Transplantation* 1995; **60**(11): 1225-30.
17. Sullivan KM, Storek J, Kopecky KJ, Jocom J, Longton G, Flowers M *et al.* A controlled trial of long-term administration of intravenous immunoglobulin to prevent late infection and chronic graft-vs.-host disease after marrow transplantation: clinical outcome and effect on subsequent immune recovery. *Biol Blood Marrow Transplant* 1996; **2**(1): 44-53.
18. Winston DJ, Antin JH, Wolff SN, Bierer BE, Small T, Miller KB *et al.* A multicenter, randomized, double-blind comparison of different doses of intravenous immunoglobulin for



- prevention of graft-versus-host disease and infection after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; **28**(2): 187-96.
19. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S *et al.* Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 2005; **174**(10): 6477-89.
  20. Gan R, Yin Z, Liu T, Wang L, Tang Y, Song Y. Cyclosporine A effectively inhibits graft-versus-host disease during development of Epstein-Barr virus-infected human B cell lymphoma in SCID mouse. *Cancer Sci* 2003; **94**(9): 796-801.
  21. Roychowdhury S, Blaser BW, Freud AG, Katz K, Bhatt D, Ferketich AK *et al.* IL-15 but not IL-2 rapidly induces lethal xenogeneic graft-versus-host disease. *Blood* 2005; **106**(7): 2433-5.
  22. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J, Jr., Crawford JM *et al.* An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 1996; **88**(8): 3230-9.
  23. Siragam V, Crow AR, Brinc D, Song S, Freedman J, Lazarus AH. Intravenous immunoglobulin ameliorates ITP via activating Fc gamma receptors on dendritic cells. *Nat Med* 2006; **12**(6): 688-92.
  24. Aubin E, Lemieux R, Bazin R. Indirect inhibition of in vivo and in vitro T-cell responses by intravenous immunoglobulins due to impaired antigen presentation. *Blood* 2010; **115**(9): 1727-34.
  25. Ito R, Katano I, Kawai K, Hirata H, Ogura T, Kamisako T *et al.* Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. *Transplantation* 2009; **87**(11): 1654-8.
  26. King MA, Covassin L, Brehm MA, Racki W, Pearson T, Leif J *et al.* Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor

gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clin Exp Immunol* 2009; **157**(1): 104-18.

27. Locatelli F, Bruno B, Zecca M, Van-Lint MT, McCann S, Arcese W *et al.* Cyclosporin A and short-term methotrexate versus cyclosporin A as graft versus host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia given allogeneic bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling: results of a GITMO/EBMT randomized trial. *Blood* 2000; **96**(5): 1690-7.
28. Locatelli F, Zecca M, Rondelli R, Bonetti F, Dini G, Prete A *et al.* Graft versus host disease prophylaxis with low-dose cyclosporine-A reduces the risk of relapse in children with acute leukemia given HLA-identical sibling bone marrow transplantation: results of a randomized trial. *Blood* 2000; **95**(5): 1572-9.
29. Olsson R, Remberger M, Hassan Z, Omazic B, Mattsson J, Ringden O. GVHD prophylaxis using low-dose cyclosporine improves survival in leukaemic recipients of HLA-identical sibling transplants. *Eur J Haematol* 2010; **84**(4): 323-31.
30. Storb R, Deeg HJ, Farewell V, Doney K, Appelbaum F, Beatty P *et al.* Marrow transplantation for severe aplastic anemia: methotrexate alone compared with a combination of methotrexate and cyclosporine for prevention of acute graft-versus-host disease. *Blood* 1986; **68**(1): 119-25.
31. Gratama JW, Jansen J, Lipovich RA, Tanke HJ, Goldstein G, Zwaan FE. Treatment of acute graft-versus-host disease with monoclonal antibody OKT3. Clinical results and effect on circulating T lymphocytes. *Transplantation* 1984; **38**(5): 469-74.
32. Knop S, Hebart H, Gscheidle H, Holler E, Kolb HJ, Niederwieser D *et al.* OKT3 muromonab as second-line and subsequent treatment in recipients of stem cell allografts with steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2005; **36**(9): 831-7.
33. Gleixner B, Kolb HJ, Holler E, Liesenfeld S, Riedner C, Hiller E *et al.* Treatment of aGVHD with OKT3: clinical outcome and side-effects associated with release of TNF alpha. *Bone Marrow Transplant* 1991; **8**(2): 93-8.

34. Martin PJ, Hansen JA, Anasetti C, Zutter M, Durnam D, Storb R *et al.* Treatment of acute graft-versus-host disease with anti-CD3 monoclonal antibodies. *Am J Kidney Dis* 1988; **11**(2): 149-52.
35. Hebart H, Ehninger G, Schmidt H, Berner B, Reuss-Borst M, Waller HD *et al.* Treatment of steroid-resistant graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation with anti-CD3/TCR monoclonal antibodies. *Bone Marrow Transplant* 1995; **15**(6): 891-4.
36. Benekli M, Hahn T, Williams BT, Cooper M, Roy HN, Wallace P *et al.* Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3), methylprednisolone and cyclosporine for acute graft-versus-host disease prophylaxis in allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006; **38**(5): 365-70.
37. Cantoni N, Weisser M, Buser A, Arber C, Stern M, Heim D *et al.* Infection prevention strategies in a stem cell transplant unit: impact of change of care in isolation practice and routine use of high dose intravenous immunoglobulins on infectious complications and transplant related mortality. *Eur J Haematol* 2009; **83**(2): 130-8.
38. Tha-In T, Bayry J, Metselaar HJ, Kaveri SV, Kwekkeboom J. Modulation of the cellular immune system by intravenous immunoglobulin. *Trends Immunol* 2008; **29**(12): 608-15.
39. Kessel A, Ammuri H, Peri R, Pavlotzky ER, Blank M, Shoenfeld Y *et al.* Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function. *J Immunol* 2007; **179**(8): 5571-5.
40. Anthony RM, Nimmerjahn F, Ashline DJ, Reinhold VN, Paulson JC, Ravetch JV. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science* 2008; **320**(5874): 373-6.
41. Anthony RM, Wermeling F, Karlsson MC, Ravetch JV. Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**(50): 19571-8.

42. Tha-In T, Metselaar HJ, Tilanus HW, Boor PP, Mancham S, Kuipers EJ *et al.* Superior immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulins on human T-cells and dendritic cells: comparison to calcineurin inhibitors. *Transplantation* 2006; **81**(12): 1725-34.
43. Tha-In T, Metselaar HJ, Tilanus HW, Groothuismink ZM, Kuipers EJ, de Man RA *et al.* Intravenous immunoglobulins suppress T-cell priming by modulating the bidirectional interaction between dendritic cells and natural killer cells. *Blood* 2007; **110**(9): 3253-62.
44. Cottler-Fox M, Lynch M, Pickle LW, Cahill R, Spitzer TR, Deeg HJ. Some but not all benefits of intravenous immunoglobulin therapy after marrow transplantation appear to correlate with IgG trough levels. *Bone Marrow Transplant* 1991; **8**(1): 27-33.
45. Abdel-Mageed A, Graham-Pole J, Del Rosario ML, Longmate J, Ochoa S, Amylon M *et al.* Comparison of two doses of intravenous immunoglobulin after allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1999; **23**(9): 929-32.
46. Halloran PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J. The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation* 1999; **68**(9): 1356-61.
47. Rao A. NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* 1994; **15**(6): 274-81.
48. Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 1995; **7**(3): 333-42.
49. Serfling E, Avots A, Neumann M. The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1263**(3): 181-200.
50. Podtschaske M, Benary U, Zwinger S, Hofer T, Radbruch A, Baumgrass R. Digital NFATc2 activation per cell transforms graded T cell receptor activation into an all-or-none IL-2 expression. *PLoS One* 2007; **2**(9): e935.

51. Cosimi AB. Clinical development of Orthoclone OKT3. *Transplant Proc* 1987; **19**(2 Suppl 1): 7-16.
52. Pinana JL, Valcarcel D, Fernandez-Aviles F, Martino R, Rovira M, Barba P *et al.* MTX or mycophenolate mofetil with CsA as GVHD prophylaxis after reduced-intensity conditioning PBSCT from HLA-identical siblings. *Bone Marrow Transplant* 2010.
53. Amran D, Renz H, Lack G, Bradley K, Gelfand EW. Suppression of cytokine-dependent human T-cell proliferation by intravenous immunoglobulin. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; **73**(2): 180-6.
54. Andersson J, Skansen-Saphir U, Sparrelid E, Andersson U. Intravenous immune globulin affects cytokine production in T lymphocytes and monocytes/macrophages. *Clin Exp Immunol* 1996; **104 Suppl 1**: 10-20.
55. Modiano JF, Amran D, Lack G, Bradley K, Ball C, Domenico J *et al.* Posttranscriptional regulation of T-cell IL-2 production by human pooled immunoglobulin. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; **83**(1): 77-85.
56. MacMillan HF, Lee T, Issekutz AC. Intravenous immunoglobulin G-mediated inhibition of T-cell proliferation reflects an endogenous mechanism by which IgG modulates T-cell activation. *Clin Immunol* 2009; **132**(2): 222-33.
57. Aktas O, Waiczies S, Grieger U, Wendling U, Zschenderlein R, Zipp F. Polyspecific immunoglobulins (IVIg) suppress proliferation of human (auto)antigen-specific T cells without inducing apoptosis. *J Neuroimmunol* 2001; **114**(1-2): 160-7.
58. Ephrem A, Chamat S, Miquel C, Fisson S, Mouthon L, Caligiuri G *et al.* Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 2008; **111**(2): 715-22.
59. Achiron A, Margalit R, HersHKoviz R, Markovits D, Reshef T, Melamed E *et al.* Intravenous immunoglobulin treatment of experimental T cell-mediated autoimmune disease. Upregulation

- of T cell proliferation and downregulation of tumor necrosis factor alpha secretion. *J Clin Invest* 1994; **93**(2): 600-5.
60. Zhang C, Zhang J, Yang B, Wu C. Cyclosporin A inhibits the production of IL-17 by memory Th17 cells from healthy individuals and patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2008; **42**(3): 345-52.
  61. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 683-765.
  62. Brandt C, Liman P, Bendfeldt H, Mueller K, Reinke P, Radbruch A *et al.* Whole blood flow cytometric measurement of NFATc1 and IL-2 expression to analyze cyclosporine A-mediated effects in T cells. *Cytometry A* 2010; **77**(7): 607-13.
  63. Yi T, Zhao D, Lin CL, Zhang C, Chen Y, Todorov I *et al.* Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood* 2008; **112**(5): 2101-10.
  64. Chen X, Vodanovic-Jankovic S, Johnson B, Keller M, Komorowski R, Drobyski WR. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2007; **110**(10): 3804-13.
  65. Kappel LW, Goldberg GL, King CG, Suh DY, Smith OM, Ligh C *et al.* IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood* 2009; **113**(4): 945-52.
  66. Carlson MJ, West ML, Coghill JM, Panoskaltis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood* 2009; **113**(6): 1365-74.
  67. Iclozan C, Yu Y, Liu C, Liang Y, Yi T, Anasetti C *et al.* T helper17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; **16**(2): 170-8.

68. Tournadre A, Lenief V, Miossec P. Expression of TLR3 and TLR7 in muscle is characteristic of inflammatory myopathy and is differentially regulated by Th1 and Th17 cytokines. *Arthritis Rheum* 2010.
69. Giraud P, Thuret I, Reviron D, Chambost H, Brunet C, Novakovitch G *et al.* Immune reconstitution and outcome after unrelated cord blood transplantation: a single paediatric institution experience. *Bone Marrow Transplant* 2000; **25**(1): 53-7.
70. Niehues T, Rocha V, Filipovich AH, Chan KW, Porcher R, Michel G *et al.* Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children -- a Eurocord analysis. *Br J Haematol* 2001; **114**(1): 42-8.
71. Talvensaari K, Clave E, Douay C, Rabian C, Garderet L, Busson M *et al.* 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* 2002; **99**(4): 1458-64.
72. Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, Heilman D, Broxmeyer HE, Emanuel D *et al.* Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* 2000; **96**(8): 2703-11.
73. Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T, Ito M, Kobayashi K, Katamura K *et al.* Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/gammanull mice model. *Blood* 2003; **102**(3): 873-80.
74. Rajesh D, Zhou Y, Jankowska-Gan E, Roenneburg DA, Dart ML, Torrealba J *et al.* Th1 and Th17 immunocompetence in humanized NOD/SCID/IL2rgammanull mice. *Hum Immunol* 2010; **71**(6): 551-9.
75. Yahata T, Ando K, Nakamura Y, Ueyama Y, Shimamura K, Tamaoki N *et al.* Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34+ cells in nonobese diabetic/Shi-scid, IL-2 receptor gamma null mice. *J Immunol* 2002; **169**(1): 204-9.

76. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G *et al.* Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* 2005; **106**(5): 1565-73.
77. Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y *et al.* Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood* 2007; **109**(1): 212-8.
78. Seite JF, Cornec D, Renaudineau Y, Youinou P, Mageed RA, Hillion S. IVIg modulates BCR-signaling through CD22 and promotes apoptosis in mature human B lymphocytes. *Blood* 2010.



## 2.9 Legends

---

**Figure 2.9.1 (p.70) – IVIG, CsA, and OKT3, reduce mortality in a xenogeneic model of GvHD in NSG mice.** IVIG (50 mg/mouse, injected i.p. once a week from day -1 to day +42, n= 20 mice), CsA (0.375 mg/mouse, injected i.p. daily from day 0 to day +23, n= 12 mice) and OKT3 (0.05 mg/mouse, injected i.p. at days +1, +3, and +5, n=12 mice) significantly reduced mortality when compared with PBS-treated mice (injected i.p. once a week from day-1 to day +42, n=20 mice), ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ , and  $p<0.0001$  respectively). CsA did not significantly increase survival when compared to IVIG ( $p=0.681$ ) whereas OKT3 did increase survival when compared to IVIG ( $p=0.009$ ).

**Figure 2.9.2 (p.71) - Liver histopathology of a NSG mouse with xeno-GvHD.** A) (HPS x 200) Lymphocytic portal infiltration and apoptotic bodies (insert, arrows). B) (HPS x 400) lymphocytic lobular infiltration (star), bile duct infiltrated by lymphocyte (triangle). Representative data from 1 mouse treated with PBS, sacrificed at day 20.

**Figure 2.9.3 (p.72) – IVIG reduce the incidence of xeno-GvHD.** The incidence of GvHD was evaluated in PBS-, IVIG-, CsA-, and OKT3-treated NSG mice. GvHD diagnosis was given to a mouse with 10% weight loss, appearance of ruffled fur, and limited mobility. n=20 in PBS and IVIG groups, n=12 in CsA and OKT3 groups. Results of 2-by-2 Fisher's exact test followed by multiple testing correction (Bonferroni, n=5) are shown in the table. -: Fisher's exact test results are not significant.

**Figure 2.9.4 (p.73) – IVIG do not inhibit proliferation of human cells in xeno-GvHD mice.** A) The percentage of hCD45<sup>+</sup>, determined by the ratio of human CD45<sup>+</sup> cells/human + murine CD45<sup>+</sup> cells, and B) the absolute number of human T-cells (hCD3<sup>+</sup>) per microlitre of peripheral blood were assessed weekly by flow cytometry. The insert shows a close-up of hCD3<sup>+</sup> cells at day+7 post-injection. One-way analysis of variance using Kruskal-Wallis with Dunn's Multiple Comparison Test results are shown in the table. -: test results are not significant.

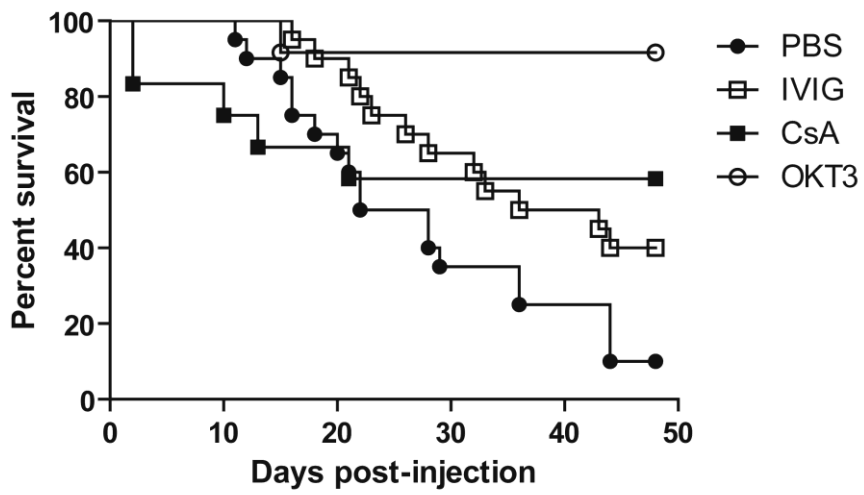
**Figure 2.9.5 (p.74) – Modulation of human cytokines in plasma of xeno-GvHD mice induced by IVIG, CsA, and OKT3.** Concentration of human cytokines determined by the Bio-Plex Pro Human Cytokine 9-plex Assay were assessed on 30  $\mu$ l plasma collected weekly from day 0 until day+28 from xeno-GvHD mice treated with PBS (n=12), IVIG (n=10), CsA (n=11), and OKT3 (n=12). Baseline levels obtained from mice before injection of huPBMC were subtracted to samples' results. One-way

analysis of variance using Kruskal-Wallis with Dunn's Multiple Comparison Test results are shown in the table. - : test results are not significant.

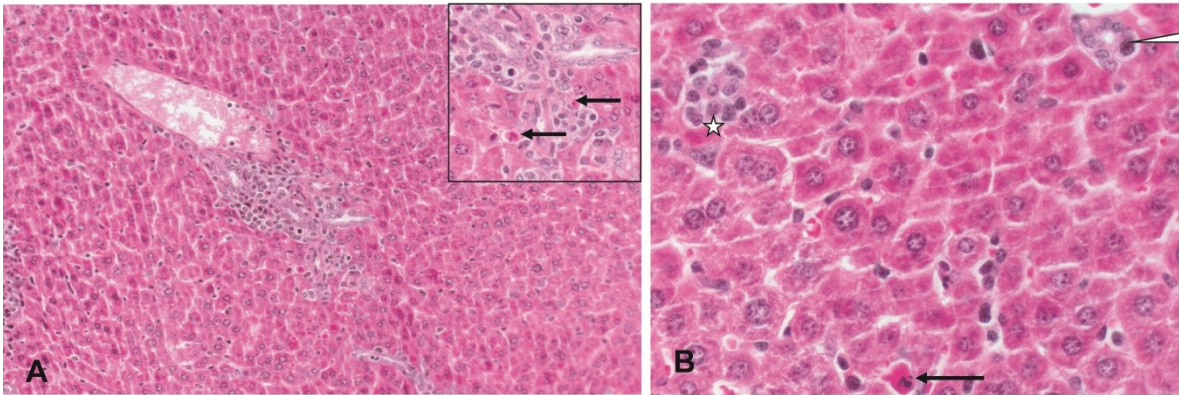
**Figure 2.9.6 (p.75) – IVIG transiently delay B-cell reconstitution in a humanized mouse model of immune reconstitution.** After injection of human CD34<sup>+</sup> cord blood cells in sub-lethally irradiated NSG mice treated either by PBS (n=4) or IVIG (n=5), engraftment of human CD45<sup>+</sup> cells (A) and of human cell subsets, i.e. B-cells (B), T-cells (C), monocytes (D) and NK cells (E), were assessed on peripheral blood by flow cytometry. \* Student t test, p<0.05.

**Figure 2.9.7 (p.76) – IVIG do not affect the kinetic of thymopoiesis in a humanized mouse model of immune reconstitution.** Twenty-eight weeks after injection of human CD34<sup>+</sup> cord blood cells, mice treated by PBS (n=3) or IVIG (n=5) were sacrificed and thymus cells were analyzed by flow cytometry to determine human cell populations. Data are expressed as percentage of (A) hCD45<sup>+</sup> among total CD45<sup>+</sup> cells, (B) percentage of single positive CD4<sup>+</sup> (SP CD4<sup>+</sup>), single positive CD8<sup>+</sup> (SP CD8<sup>+</sup>) and double positive CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP) cells among hCD45<sup>+</sup> cells, and (C) percentage of CD45RO<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> cells among hCD45<sup>+</sup> cells. Student t test: p was not significant in all occurrences.

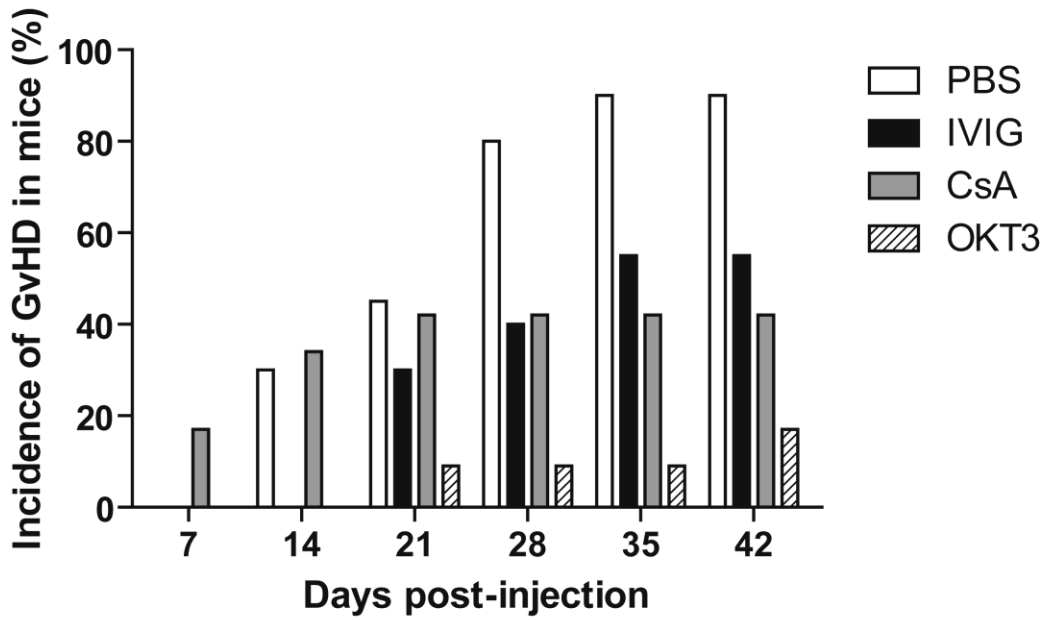
**Figure 2.9.8 (p.77) – Effect of CsA and OKT3 in a humanized mouse model of immune reconstitution.** After injection of human CD34<sup>+</sup> cord blood cells in sub-lethally irradiated NSG mice treated either by PBS (n=4), CsA (n=3) or OKT3 (n=3), engraftment of human CD45<sup>+</sup> cells (A) and of human cell subsets, i.e. B-cells (B), T-cells (C), monocytes (D) and NK cells (E), were assessed on peripheral blood by flow cytometry. Six weeks post-injection, mice were sacrificed and thymi were harvested to determine the percentage of human CD45<sup>+</sup> cells in the tissue (F). \* Significant results of the non-parametric one way analysis of variance using Kruskal-Wallis with Dunn's Multiple Comparison Test, p=0.05.



**Figure 2.9.1 – IVIG, CsA, and OKT3, reduce mortality in a xenogeneic model of GvHD in NSG mice.**

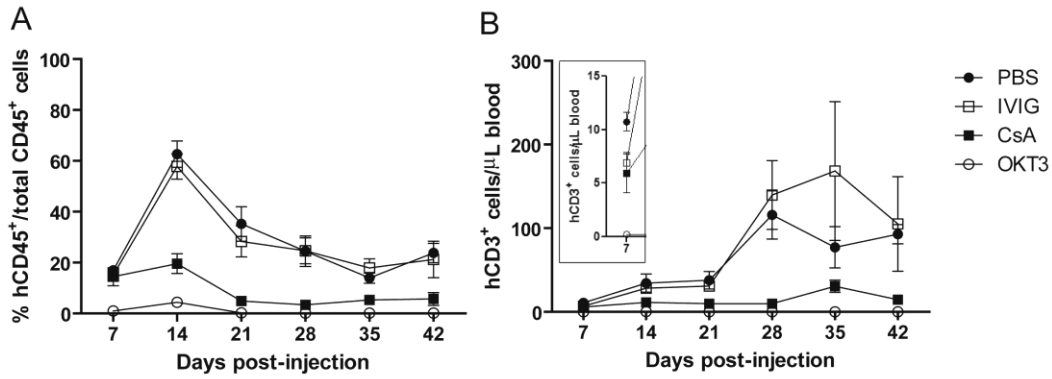


**Figure 2.9.2 – Liver histopathology of a NSG mouse with xeno-GvHD.**



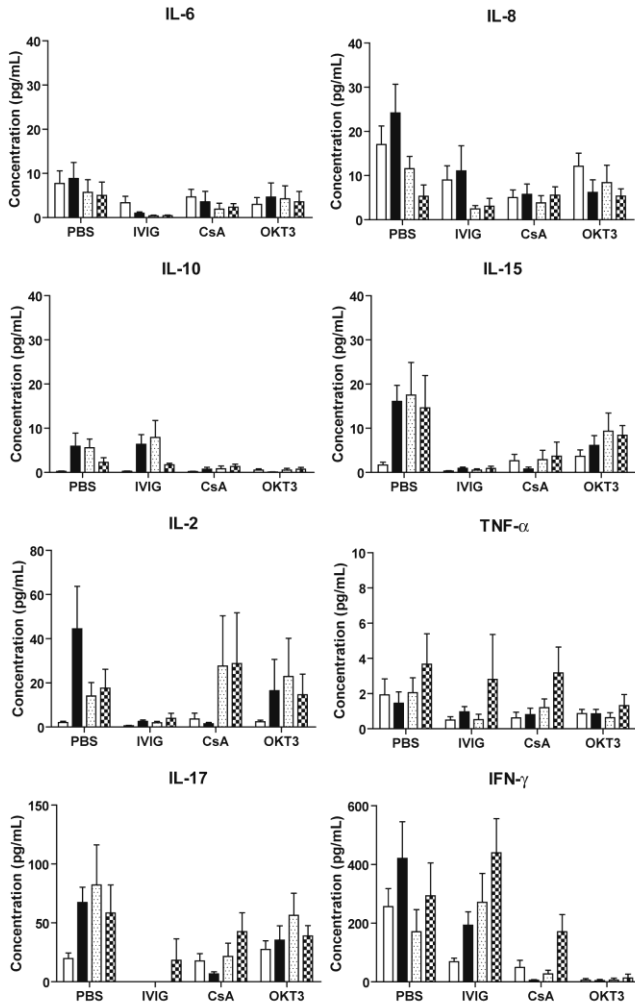
Days post-injection	PBS vs IVIG	PBS vs CsA	PBS vs OKT3	IVIG vs CsA	IVIG vs OKT3
	14	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001
21	-	-	<0.0001	-	<0.01
28	<0.0001	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001
35	<0.0001	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001
42	<0.0001	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001

Figure 2.9.3 – IVIG reduce the incidence of xeno-GvHD.



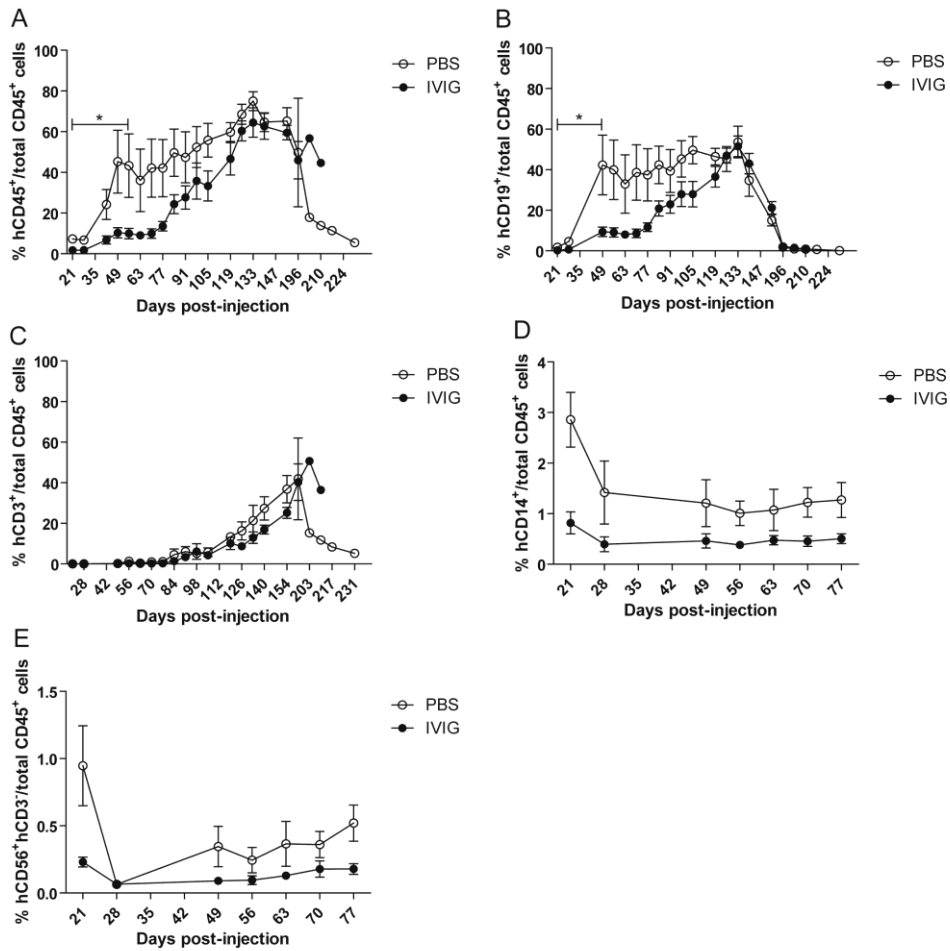
	Days post-injection	PBS vs IVIG	PBS vs CsA	PBS vs OKT3	IVIG vs CsA	IVIG vs OKT3
%hCD45 <sup>+</sup> /total CD45 <sup>+</sup> cells	7	-	-	<0.001	-	<0.001
	14	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	21	-	<0.01	<0.001	<0.01	<0.001
	28	-	<0.01	<0.01	<0.01	<0.001
	35	-	-	<0.01	<0.05	<0.01
	42	-	-	<0.05	-	<0.01
hCD3 <sup>+</sup> cells/ $\mu$ L blood	7	<0.01	<0.05	<0.001	-	<0.001
	14	-	-	<0.001	-	<0.001
	21	-	-	<0.001	-	<0.001
	28	-	<0.01	<0.001	<0.05	<0.001
	35	-	-	<0.01	-	<0.001
	42	-	-	<0.01	-	<0.001

**Figure 2.9.4 – IVIG do not inhibit proliferation of human cells in xeno-GvHD mice.**



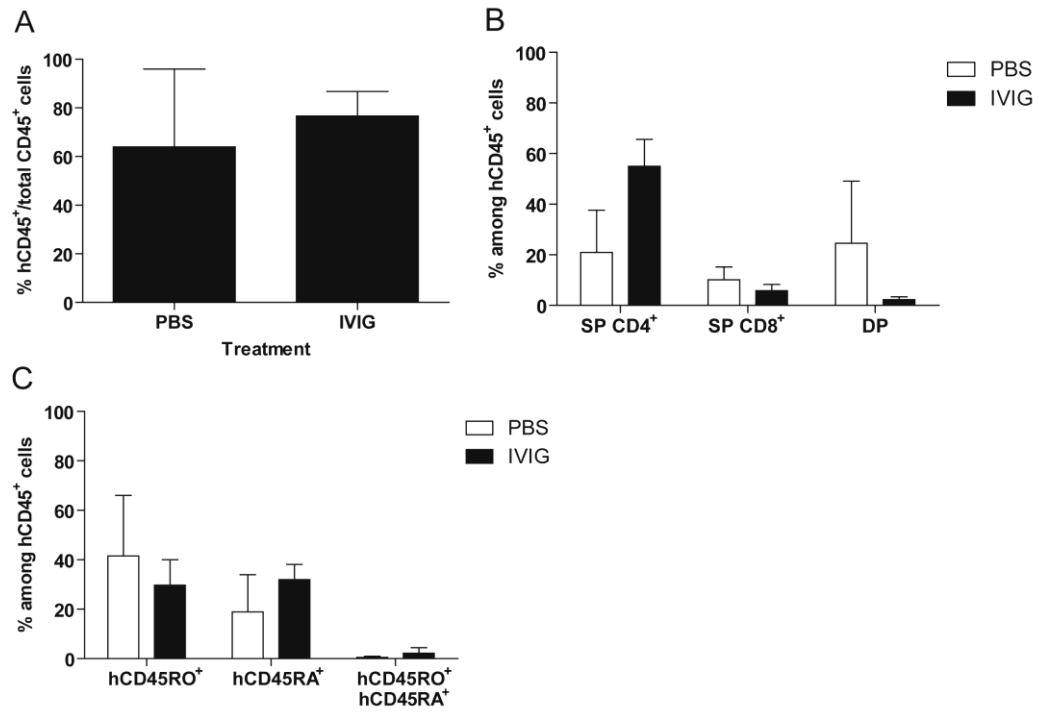
Cytokines	Days post-injection	PBS	PBS	PBS	MG	MG
		vs	vs	vs	vs	vs
		MG	CsA	OKT3	CsA	OKT3
IL-2	7	-	-	-	-	-
	14	<0.05	<0.01	<0.05	-	-
	21	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-
IL-6	7	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-
IL-8	7	-	-	-	-	-
	14	-	<0.05	<0.01	-	-
	21	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-
IL-10	7	-	-	-	-	-
	14	-	-	<0.01	<0.05	<0.01
	21	-	-	<0.05	-	<0.01
	28	-	-	-	-	-
IL-15	7	-	-	-	-	-
	14	<0.001	<0.01	-	-	-
	21	-	-	-	-	<0.05
	28	-	-	-	-	-
IL-17	7	<0.01	-	-	<0.001	<0.001
	14	<0.001	<0.01	-	<0.01	<0.001
	21	<0.05	-	-	<0.01	<0.01
	28	-	-	-	-	-
TNF- $\alpha$	7	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-
IFN- $\gamma$	7	<0.01	<0.05	<0.001	-	<0.001
	14	-	<0.01	<0.01	<0.001	<0.001
	21	-	-	<0.05	<0.05	<0.01
	28	-	-	<0.05	-	<0.01

**Figure 2.9.5 – Modulation of human cytokines in plasma of xeno-GvHD mice induced by IVIG, CsA, and OKT3.**

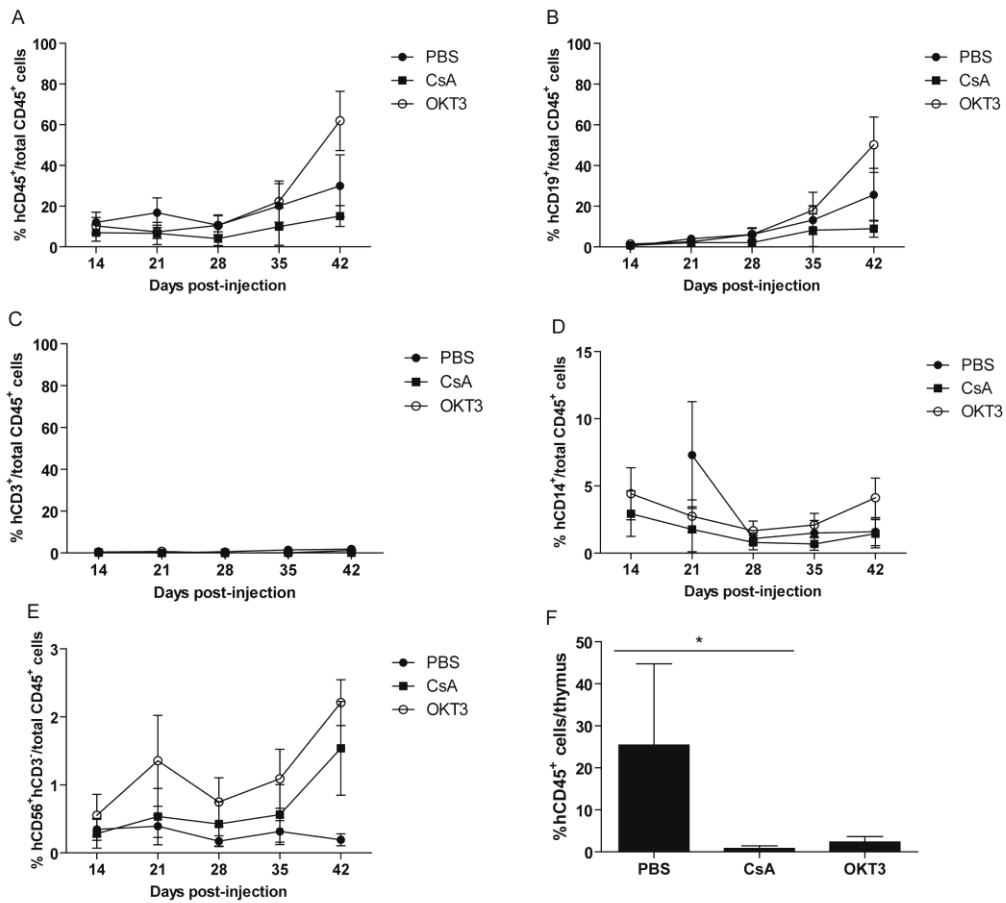


**Figure 2.9.6 – IVIG transiently delay B-cell reconstitution in a humanized mouse model of immune reconstitution.**





**Figure 2.9.7 – IVIG do not affect the kinetic of thymopoiesis in a humanized mouse model of immune reconstitution.**



**Figure 2.9.8 – Effect of CsA and OKT3 in a humanized mouse model of immune reconstitution.**

## 2.10 Discussion du premier article

---

En premier lieu, ces expériences ont tout d'abord permis de valider le modèle expérimental développé au sein du laboratoire. Comme pour le modèle murin xénogénique élaboré avec les souris NOD/scid-IL2R $\gamma^{\text{null}}$  préalablement décrit et publié (232), l'injection de cellules humaines dans le modèle murin xénogénique développé au laboratoire cause le développement de la GvHD dans 100% des cas, avec apparition de signes et symptômes caractéristiques de la GvHD.

L'étude présentée ci-dessus pousse par contre l'analyse plus loin, en testant l'efficacité d'immunosuppresseurs connus dans ce modèle murin xénogénique de GvHD. En effet, on doit tout d'abord démontrer la capacité d'immunosuppresseurs connus à pouvoir prévenir le développement de la GvHD dans le modèle utilisé si on espère pouvoir observer un tel résultat à la suite d'un traitement expérimental. Ainsi, la démonstration de la prévention du développement de la GvHD suite aux traitements à la CsA et à l'OKT3 (*muromonab-CD3*) sert de contrôle positif dans ce modèle, en plus de confirmer que l'apparition des signes cliniques et la mortalité des animaux sont attribuables au développement de la GvHD suite à l'injection des cellules humaines, et qu'il ne s'agit pas d'un artefact découlant de l'irradiation sub-létale ou d'autres conditions expérimentales.

Avec ces résultats, cette étude a permis de démontrer clairement que l'utilisation à haute dose d'IVIG permet effectivement de retarder le développement de la GvHD dans le modèle murin xénogénique, ainsi que de réduire la sévérité de la GvHD, suite à son déclenchement. On a pu confirmer, tel que mentionné dans notre hypothèse, que l'effet protecteur des IVIG sur le développement de la GvHD émane certainement de leurs propriétés immunomodulatrices. De surcroît, l'utilisation de ces fortes doses d'IVIG n'avait aucun effet négatif sur la reconstitution immunitaire suite à l'injection de cellules souches de cordon ombilical dans le modèle murin utilisé.

Ces résultats sont donc encourageants pour une utilisation des IVIG dans un cadre clinique de prévention de la GvHD suite à une HSCT, sans avoir à craindre une prolongation du statut immunodéprimé du patient, le laissant ainsi plus à risque de contracter des infections et ou de subir une rechute de la maladie. C'est ainsi qu'on a pu entamer la deuxième phase du projet de recherche et tenter de déterminer quel est le mécanisme d'action des IVIG dans la prévention de la GVHD dans notre modèle murin xénogénique.

## **Chapitre 3    Deuxième article**

### **3.1 Mise en contexte du deuxième article**

---

La preuve faite de l'efficacité des IVIG utilisées à haute dose dans la prévention du développement de la GvHD dans le modèle murin xénogénique, on a voulu élucider leur mécanisme d'action dans cette utilisation. Afin d'y parvenir, on a procédé en décortiquant l'effet des IVIG à haute dose sur les différentes sous-populations lymphocytaires impliquées dans le développement de la GvHD. Le détail de ces travaux est décrit dans le manuscrit soumis à la revue *Blood*, intitulé "*Role of NK cells in IVIG-Induced GvHD Inhibition in NSG Mice*" par Joëlle Gregoire-Gauthier, François Fontaine, Lionel Benchimol, Mame Massar Dieng et Elie Haddad.

Joëlle Gregoire-Gauthier et Elie Haddad ont élaboré les plans expérimentaux. Joëlle Gregoire-Gauthier a effectué toutes les expériences, aidée à l'occasion par François Fontaine, Lionel Benchimol et Mame Massar Dieng. Joëlle Gregoire-Gauthier et Elie Haddad ont analysé les résultats et rédigé le manuscrit.

**"*Role of NK cells in IVIG-Induced GvHD Inhibition in NSG Mice*" Gregoire-Gauthier J, Fontaine F, Benchimol L *et al*, manuscrit soumis à la revue *Blood* (Blood/2014/580761)**

***ROLE OF NK CELLS IN IVIG-INDUCED GVHD INHIBITION IN NSG MICE***

Short title: Role of NK cells in IVIG-induced GvHD inhibition

Joëlle Gregoire-Gauthier<sup>1</sup>, François Fontaine<sup>1</sup>, Lionel Benchimol<sup>2</sup>, Mame Massar Dieng<sup>1</sup>, and Elie Haddad<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>CHU Sainte-Justine Research Center, <sup>2</sup>Department of Health Biochemistry, Université de Sherbrooke, <sup>3</sup>Department of Pediatrics, and <sup>4</sup>Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal

Corresponding Author:

**Elie Haddad, MD, PhD**

CHU Sainte-Justine Research Center  
3175 chemin de la Côte-Ste-Catherine  
Montréal QC H3T 1C5  
CANADA



Telephone: (+1) 514-345-4931 ext. 6217

Fax: (+1) 514-345-4897

Word count - Text: 3730 words; Abstract: 185 words

Figure/Table count: 7 figures/0 table

Reference count: 50

Scientific category: Transplantation; Immunobiology

**Key Points:**

- IVIG treatment induces NK cell proliferation, which is essential for IVIG-mediated protection of GvHD in our xenogeneic mouse model.
- Inhibition of T cell-activation abolishes the IVIG-induced NK cell proliferation.

## 3.2 Abstract

---

We showed in a previous work that, unlike in available studies to date in humans, intravenous immunoglobulin (IVIG) can prevent graft-versus-host disease (GvHD) in a xenogeneic mouse model. Here, we aimed to determine the mechanism of action by which IVIG contribute to GvHD prevention in this model. Sublethally irradiated NOD/LtSz-scidIL2rg<sup>-/-</sup> (NSG) mice were injected with human peripheral blood mononuclear cells (huPBMCs) to induce xenogeneic GvHD, and were treated weekly with PBS or 50 mg IVIG. IVIG treatment resulted in a robust and consistent proliferation of human NK cells that were activated, as suggested by their expression of NK cell activation markers and their cytotoxicity against K562 target cells. IVIG treatment did not inhibit GvHD when huPBMCs were depleted in NK cells, strongly suggesting that this NK cell expansion was required for the IVIG-mediated prevention of GvHD. Moreover, inhibition of T-cell activation by either cyclosporine A (CsA) or OKT3 abolished the IVIG-induced NK cell expansion. These results shed light on a new mechanism of action of IVIG and could explain why the efficacy of IVIG in preventing GvHD in a clinical setting, where patients receive CsA, has never been undoubtedly demonstrated.



### 3.3 Introduction

---

Graft-versus-host disease (GvHD) remains a major complication following hematopoietic stem cell transplantation<sup>1-4</sup> despite the use of proper prophylactic treatments. These treatments comprise a combination of immunosuppressive drugs that can include steroids, cyclosporine A (CsA), methotrexate, mycophenolate mofetil, or serotherapy by alemtuzumab or antithymocyte globulin.<sup>5-8</sup> These prophylactic treatments negatively impact immune reconstitution, both in terms of time to recovery and effectiveness, hence making the patient vulnerable to various illnesses and infections. Clinical studies conducted over the past 20 years have not clearly demonstrated the therapeutic efficacy of intravenous immunoglobulin (IVIG) in the prevention of GvHD. Indeed, while only a handful of these studies have found a positive effect of IVIG treatment on GvHD outcome,<sup>9,10</sup> most studies concur that there does not seem to be an advantage to IVIG treatment.<sup>11-16</sup> However, recent work in our laboratory has demonstrated that IVIG were effective in decreasing the incidence of GvHD and its related mortality in a xenogeneic GvHD (xeno-GvHD) mouse model in which human PBMCs (huPBMCs) were injected into NOD/LtSz-*scid*IL2rg<sup>-/-</sup> (NSG) mice, without affecting the onset or robustness of the immune reconstitution when these humanized mice were injected with human cord blood CD34<sup>+</sup> cells.<sup>17</sup> We showed, in the xeno-GvHD model, that IVIG did not modify the percentage or absolute numbers of human T lymphocytes, therefore suggesting they contribute to prevent GvHD by an immunomodulating effect.

Evidence arose in the literature that natural killer (NK) cells may play important role in GvHD prevention.<sup>18-22</sup> In the present manuscript, we investigated the effect of IVIG on NK cells and unexpectedly observed that IVIG induced an expansion of NK cells that were required for the IVIG-induced inhibition of GvHD in our xeno-GvHD model.

### 3.4 Methods

---

#### *Mice*

NOD/LtSz-*scid*IL2rg<sup>-/-</sup> (NSG) mice were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and bred in the animal care facility at the CHU Sainte-Justine Research Centre. Mice were housed under specific pathogen-free conditions in sterile ventilated racks. All procedures were previously approved by the Institutional Committee for Good Laboratory Practices for Animal Research, as per our research protocols (SST08-77, SST09-22, SST10-40, and E466). Irradiated mice were given either 0.08 mg/mL ciprofloxacin (Sandoz, Boucherville, QC, Canada) or 0.20 mg/mL enrofloxacin (Bayer Inc., Montreal, QC, Canada) in their drinking water.

#### *Xenogeneic model of GvHD*

Leukapheresis were obtained from six healthy donors following informed written consent. Human peripheral blood mononuclear cells (huPBMCs) were isolated using a Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) density gradient. Following sub-lethal 2-3 Gy irradiation, 7-9 week-old NSG mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 10<sup>7</sup> huPBMCs on day 0 and treated i.p. once a week from day -1 until day +42 with either PBS (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) or IVIG (Gamunex 50 mg/mouse; Grifols Canada Ltd., Mississauga, ON, Canada). For some experiments, as indicated in the results section, huPBMCs were injected intravenously (i.v.). Mice treated with monoclonal anti-human CD3 antibodies (OKT3; Bio X Cell, West Lebanon, NH, USA; 0.05 mg/mouse) were injected i.p. on days +1, +3 and +5, while mice treated with CsA (Novartis, Dorval, QC, Canada; 0.375 mg/mouse) were injected i.p. daily from day 0 until day +23.<sup>17</sup> NK cells were depleted from huPBMCs using CD56 MicroBeads as per the manufacturer's recommendations (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). T cell-depleted huPBMCs were obtained by sorting CD3<sup>-</sup> cells on a BD FACSAriaI (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada).

#### *Assessment of GvHD*

Mice were evaluated in a blinded fashion every other day using a GvHD assessment scale and GvHD diagnosis was given as previously described.<sup>17,23</sup> Survival was noted daily for each experimental group. Mice were sacrificed when specific clinical endpoints were reached, as previously described.<sup>17</sup> A volume of 100  $\mu$ L of peripheral blood was drawn weekly from the saphenous vein and collected in heparin-coated Microvettes (Sarstedt Inc., Montreal, QC, Canada). Circulating cells were analyzed by flow cytometry to determine the lymphocyte populations.

### *Flow cytometry*

Human and murine cell populations were analyzed by flow cytometry. Fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-mouse CD45, FITC anti-human CD16, FITC anti-human HLA-DR, R-phycoerythrin (PE) anti-mouse CD45, PE anti-human CD56, PE anti-human CD337 (NKp30), PE anti-human CD25, allophycocyanin (APC) anti-human CD19, APC anti-human CD45, APC anti-human NKG2D, Alexa Fluor 700 anti-human CD56, APC-Cy7 anti-human CD45, APC-Cy7 anti-human CD3, APC-Cy7 anti-human CD14, V500 anti-human CD3 (BD Biosciences), peridinin-chlorophyll-protein complex (PerCP) anti-mouse CD45, PerCP anti-human CD45, APC anti-human CD16, Pacific Blue anti-human CD3 (BioLegend, San Diego, CA, USA), PE anti-mouse CD115, PE-Cy7 anti-mouse CD11c (eBioscience, San Diego, CA, USA), and PE-Texas Red anti-human CD45 (Invitrogen) antibodies were used to identify cell populations, along with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) or 7-aminoactinomycin D (7-AAD) for dead cell discrimination (BD Biosciences). CountBright beads were added before flow cytometry acquisition to determine the absolute number of cells in each sample (Invitrogen). Samples were acquired on a BD FACSAriaI or BD LSRFortessa flow cytometer and analyzed using FACSDiva software (BD Biosciences).

### *Cell cycle analysis*

For bromodeoxyuridine (BrdU, Sigma) labeling and staining, xeno-GvHD mice received an initial i.p. injection of 1 mg BrdU on day +10 of the experiment, followed by three days of BrdU in the drinking water (0.8 mg/mL). On day +14, mice were sacrificed and BrdU incorporation was detected by flow cytometry with the FITC-BrdU flow kit (BD Biosciences).

### *Apoptosis assay*

Apoptosis was measured using the annexin V-binding assay (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were washed with PBS and resuspended in 100  $\mu$ L of 1 $\times$  annexin V-binding buffer. FITC-labelled annexin V and 7-AAD were added to each sample and subsequently analyzed by flow cytometry.

### *Cytotoxicity assay*

Spleens were collected from xeno-GvHD mice on day +10 post-injection and splenocytes were obtained following disruption of the organ in PBS on a 70  $\mu$ m cell strainer. Mononuclear cells were isolated from the splenocytes on a Ficoll-Paque PLUS density gradient and their cytotoxic activity was

measured in a standard 4-hour chromium release assay (CRA).  $10^6$  K562 cells were incubated for 45 minutes with  $50 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$  at  $37^\circ\text{C}$ . Triplicate of effector to target cell ratios of 5:1, 10:1, 20:1, and 40:1 were plated in a final volume of  $200 \mu\text{L}$  in U-bottom 96-well plates (Corning Inc., Corning, NY, USA). After a 4-hour incubation at  $37^\circ\text{C}$ ,  $100 \mu\text{L}$  of supernatant was transferred to borosilicate glass tubes (Kimble Chase, Vineland, NJ, USA) and the counts per minute (cpm) were measured in a gamma counter (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Cytotoxic activity was calculated according to the formula: percent specific lysis =  $[(\text{cpm test} - \text{cpm spontaneous release}) / (\text{cpm maximum release} - \text{cpm spontaneous release})] \times 100$ .

### *Statistics*

Results were analyzed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Incidence and survival statistics were determined using the Mantel-Cox (log-rank) test. Elsewhere, the Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test was used with a threshold for significance set at  $p \leq 0.05$ . Figures show means  $\pm$  S.E.M.

## 3.5 Results

---

### *Weekly IVIG treatment in xeno-GvHD mice induces NK cell expansion*

We have previously demonstrated that mice injected i.p with  $10^7$  huPBMCs and treated weekly with 50 mg IVIG i.p. showed a decreased incidence of xeno-GvHD and increased survival, without affecting their level of circulating T lymphocytes.<sup>17</sup> To understand the mechanism of action of IVIG in our model, we assessed the presence of other cell populations in the peripheral blood of mice. We confirmed our previous result on T lymphocytes,<sup>17</sup> and observed that the activation status of T cells was not affected by IVIG, as determined by HLA-DR and CD25 expression (data not shown). Importantly, we observed a significant increase in the percent (Figure 3.9.1A, p.102) and absolute number (Figure 3.9.1B, p.102) of circulating NK cells (Figure 3.9.1C, p.102) in the peripheral blood of IVIG-treated mice compared to the PBS-treated control group. This increase in NK cells reached a maximum by day +14, after which the number of NK cells in the peripheral blood started to decrease, reaching a stable level by day +21 that remained unchanged throughout the rest of the experiment, despite continuous weekly IVIG injections (Figure 3.9.1A and Figure 3.9.1B, p.102).

### *Phenotype and function of IVIG-induced NK cells*

We next analyzed whether IVIG-induced NK cell increase was due to the proliferation of NK cells rather than to reduced cell death. We first performed a BrdU incorporation assay (Figure 3.9.2A, p.103). As shown in Figure 3.9.2B (p.103), over 20% of NK cells were in the S phase of the cell cycle on day +14 in blood, spleen and liver. By assessing viability and apoptosis of NK cells, we observed that over 80% of NK cells in the peripheral blood were viable while NK cells were mostly non-viable in the organs since more than 80% and 60% of the NK cells were apoptotic in the liver and spleen, respectively (Figure 3.9.2C, p.103). Together, these results strongly suggest that the IVIG-induced expansion of NK cells was mediated by active proliferation rather than by prolonged survival of the NK cells.

To phenotype the IVIG-induced NK cells, we analyzed the expression of NK cell activation markers CD25, NKG2D, NKp30, and CD16 by flow cytometry (Figure 3.9.3A, p.104). With the exception of CD25, all of the activation markers were homogeneously expressed on NK cells in the blood as well as those found in various organs, suggesting that IVIG not only induced the proliferation, but also the activation of NK cells. To confirm the activated phenotype of IVIG-induced NK cells, we performed a <sup>51</sup>Chromium Release Assay (CRA) using K562 as the target cell line. Splenocytes collected on day +10 from IVIG-treated mice demonstrated cytotoxic activity against the K562 cells. This cytotoxic activity,

although very modest, was significantly higher than the one of splenocytes from PBS-treated control mice, which showed no detectable cytotoxic activity (Figure 3.9.3B, p.104).

#### *The presence of NK cells is required for IVIG-mediated prevention of xeno-GvHD in mice*

Because weekly IVIG treatment led to the expansion of NK cells *in vivo*, we investigated the role of the NK cells in IVIG-mediated reduction of xeno-GvHD by injecting NK cell-depleted huPBMCs (> 99% purity) into mice that were treated weekly with PBS or IVIG. As expected, no NK cells were observed in the peripheral blood of mice at any time during the experiment (data not shown). As previously demonstrated,<sup>17</sup> in xeno-GvHD mice injected with total huPBMCs, weekly treatment with IVIG significantly decreased the incidence of GvHD ( $p=0.003$ ; Figure 3.9.4A, p.105) and led to greater survival ( $p=0.04$ ; Figure 3.9.4B, p.105) compared to PBS-treated control mice. The absence of NK cells in the graft did not affect the development of GvHD as demonstrated by the similar GvHD incidence and mortality rate between PBS-treated mice injected with total huPBMCs and with NK cell depleted huPBMCs (incidence:  $p=0.91$ ; mortality:  $p=0.74$ ). However, IVIG had no protective effect against GvHD incidence and mortality in mice that received NK cell-depleted huPBMCs, when compared to PBS-treated mice (Figure 3.9.4, p.105). Together, these results suggest that NK cells are required for the IVIG-mediated GvHD prevention in our model.

#### *Importance of IVIG route of administration*

In our model of xeno-GvHD, IVIG and huPBMCs are both injected within a 24-hour period via the i.p. route. The route of injection and the time-delay between the injections are two parameters that could potentially account for the expansion of NK cells. First, we modified the route of injection of huPBMCs from i.p. to i.v., without altering that of IVIG. Others<sup>24</sup> and we have demonstrated that i.v. injection of huPBMCs in this mouse model effectively generated xeno-GvHD (data not shown). When IVIG were administered i.p. and huPBMCs i.v., no NK cells could be detected in the peripheral blood or organs of the treated mice and all mice died of xeno-GvHD (Figure 3.9.5A, p.106 and data not shown). Therefore, to be efficient IVIG must be injected by the same route of administration as huPBMCs. These results suggest that IVIG and huPBMCs need to interact in order to induce the expansion of NK cells and protect the treated mice from developing GvHD. We next assessed the effect of the timing of the initial IVIG injection on NK cell expansion by designing experimental groups where the initial IVIG treatment was administered on days -1 and +7 with respect to the huPBMCs injection. Thereafter, IVIG treatment was given weekly and NK cell expansion was evaluated. As shown in Figure 3.9.5B (p.106), the delay of the initial IVIG treatment significantly

decreased the percent of circulating NK cells ( $p=0.04$ ,  $0.04$ , and  $0.01$  for days +7, +14, and +21 post-injection, respectively). Together, these results suggest that IVIG must be administered early and close to the time of huPBMCs administration to allow for NK cell expansion. Furthermore, the reduction of circulating NK cells caused by the delay in initial IVIG treatment induced a higher incidence of GvHD in mice (Figure 3.9.5C, p.106, initial IVIG treatment at day-1 compared to day +7:  $p=0.02$ ).

#### *Activated T cells are required for IVIG-induced NK cell expansion*

We previously showed that CsA and OKT3 both inhibited GvHD in our model.<sup>17</sup> To determine if IVIG acted directly on NK cells or via T cells, IVIG-treated mice were given either CsA to inhibit T cell activation, or OKT3 to deplete T cells *in vivo*. Interestingly, we noted that the presence of T cells was necessary in order for IVIG-induced NK cell expansion to occur since no NK cells were detected in the OKT3-treated mice (Figure 3.9.6, p.107). Furthermore, no NK cells were detected in the CsA-treated mice thereby suggesting that the activation of T cells was also mandatory for the IVIG-induced expansion of NK cells (Figure 3.9.6, p.107). To further validate this result, we injected T cell-depleted huPBMCs (> 98% purity) in IVIG-treated mice and observed that despite weekly IVIG treatment, these mice showed absolutely no NK cell expansion (Figure 3.9.6, p.107).

#### *Mechanism of action of IVIG-induced NK cells in GvHD prevention*

NK cells are known to reduce GvHD,<sup>18-22</sup> and it has been suggested that this is mediated through an effect on T cells, either by regulating T cell proliferation<sup>25-27</sup> or increasing T cell apoptosis,<sup>28</sup> or through reduction of antigen-presenting cells (APCs), thus affecting T cell activation.<sup>18-22,29</sup> Towards this end, we first assessed the possible anti-proliferative and pro-apoptotic effects on T cells. A BrdU incorporation and an annexin V assays showed that the presence of IVIG-induced NK cells in mice neither affected the proliferation (Figure 3.9.7A, p.108) nor the apoptosis (Figure 3.9.7B, p.108) of donor T cells in the blood, spleen and liver of xeno-GvHD mice that were sacrificed at day +14. Next, we tested the possibility that the IVIG-induced NK cells could contribute to reduce the pool of APCs.<sup>25-27,30</sup> Mice injected with total huPBMCs or NK-depleted huPBMCs and treated weekly with either PBS or IVIG were sacrificed at day +14, where human and murine APCs were enumerated in the blood, spleen, and liver. We did not observe any reduction of the number or percent of both human and murine APCs in IVIG-treated mice when compared to PBS-treated mice (data not shown). These results suggest that in our model the IVIG-induced NK cells prevent GvHD development neither by affecting the proliferation and apoptosis of T cells nor via the destruction of host or donor APCs.

### 3.6 Discussion

---

We have previously demonstrated that weekly IVIG treatment reduced the incidence of GvHD and its related mortality in a xenogeneic mouse model of acute GvHD<sup>17</sup>. Here, we demonstrate that in the same model, IVIG induce the expansion of NK cells, representing over 30% of circulating lymphocytes by day +14, and that this expansion is required for the inhibition of GvHD by IVIG. This expansion was due to NK cell proliferation and not to a reduction of NK cell apoptosis, and was T-cell dependent. In addition, we show that the delay of the initial administration of IVIG resulted in the failure of NK cell expansion, as did injecting IVIG and huPBMCs by different routes of administration. In both cases, the lack of expansion of the NK cell population *in vivo* was accompanied by a failure to prevent the development of GvHD. All together, our results confirm that IVIG play a genuine immunomodulatory role in GvHD prevention, rather than simply acting as a plasma-filling agent, as demonstrated by the absence of GvHD prevention in IVIG-treated mice injected with NK cell-depleted huPBMCs.

Many potential target mechanisms have been suggested to explain the immunomodulatory function of IVIG.<sup>31</sup> Possible mechanisms include the downregulation of proinflammatory cytokines and adhesion molecules, the reduction of complement intake, the saturation of FcRn, the blockade of activating Fc receptors, the up-regulation of FcγRIIB,<sup>32</sup> and immunomodulation by sialylated IgG.<sup>33</sup> Until recently, the possible role of NK cells in mediating the immunomodulatory effect of IVIG had never been mentioned. On the contrary, it was suggested that for prevention of miscarriage, IVIG could act by inhibiting NK cells.<sup>34-42</sup> However, very recently, Chong *et al*<sup>43</sup> have elegantly demonstrated that NK cells are necessary for the prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by IVIG treatment. They showed that IVIG could not prevent EAE in NK-depleted mice and that adoptive transfer of Ig-treated NK cells into these mice rescued the protective effect against development of EAE. Furthermore, the effect of IVIG on NK cells led to an increase in CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, which were responsible for the protective effect on EAE. In our model, the presence of IVIG-induced NK cells did not affect the regulatory T cells.<sup>17</sup> Also, we observed proliferation of NK cells in our model while Chong *et al* do not mention whether NK cell counts were increased by IVIG or not. To our knowledge, the only already published situation where NK cell proliferation has been reported after IVIG is in Kawasaki disease.<sup>44</sup> Therefore, although both we and Chong *et al* demonstrate that IVIG mediate immunomodulation through NK cells, the mechanism by which NK cells modulate the GvHD in our model, and EAE in their model may be different.



In addition to the proliferation of NK cells, we showed that IVIG induced their activation, as demonstrated by the expression of the activation markers CD25, NKG2D, NKp30, and CD16. NKG2D and NKp30 are potent activating receptors involved in cytotoxicity,<sup>45-47</sup> and CD16 is commonly used to discriminate the cytokine producing NK cells (CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>) from the cytotoxic NK cells (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>).<sup>48</sup> It is of note that many studies have reported a decrease in NK cell activity after IVIG treatment, notably by inducing a functional impairment of CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK cells.<sup>34,35,37,38,49</sup> Interestingly, in our model not only do the IVIG-induced NK cells have an activated phenotype, they also show modest cytotoxicity against the K562 target cell line. An undisputed limitation in this experiment was the number of splenocytes that were isolated from the mice. A huge number of mice were necessary to achieve the effector to target cell ratios used in this experiment, and for this reason it was impossible to reach higher ratios and demonstrate a greater cytotoxic activity of IVIG-induced NK cells.

In an elegant experiment, Tha-In *et al*<sup>30</sup> have demonstrated that the Ig multimers from the IVIG preparations could stimulate NK cell-mediated ADCC of mature DC, therefore reducing the pool of available APC for T cell activation. Thus, reduced GvHD in mice treated with IVIG could be attributed to the reduced pool of APC unable to activate allogeneic T cells responsible for GvHD development. However, we could not demonstrate in our model that the pool of murine or human APC was reduced, although the IVIG-induced NK cells were activated and proliferated. Nevertheless, one cannot rule out this mechanism of action since demonstrating a moderate reduction of the pool of APC is technically difficult in an *in vivo* model.

As already mentioned, clinical studies on Kawasaki disease reported that IVIG could partially reverse an initially low number of NK cells,<sup>50</sup> and contribute to both their expansion and activity as well as to an increase in the number of circulating CD16<sup>+</sup> cells.<sup>44</sup> However, many clinical studies where IVIG were given to woman suffering from recurrent spontaneous abortions, a non-inflammatory condition, reported the opposite results, i.e. decreased NK cell cytolytic activity and/or decreased number or percent of circulating NK cells in treated woman.<sup>34-37,39-42</sup> These discrepancies could be explained by the various conditions in which IVIG are used, and particularly the existence or not of an inflammatory state. The observed effect of IVIG on NK cells, therefore, seems to be dependent on the inflammatory condition and cytokine milieu.

Specifically, we have demonstrated that T cells are necessary for NK cell proliferation. Our data suggest that T cells play a supporting role in NK cell survival. Indeed, as previously demonstrated, human pro-inflammatory cytokines are produced in our xeno-GvHD model.<sup>17</sup> The creation of an inflammatory milieu, reminiscent of Kawasaki disease, could explain why we observe NK cell expansion upon IVIG treatment, and why in the absence of T cells no NK cells are detected (Figure 3.9.6, p.107). In the clinical setting, patients at risk for GvHD always receive CsA, an inhibitor of T-cell activation. Therefore, there is a distinct possibility that patients in an immunosuppressed state would not benefit from IVIG treatment to prevent GvHD, and this could explain why previous clinical studies have failed to demonstrate a role for IVIG in GvHD prevention.<sup>11-16</sup>

In summary, our data indicate that weekly treatment of xeno-GvHD mice with IVIG leads to the expansion and activation of NK cells that play a critical role in reducing the incidence and mortality of GvHD. Furthermore, in the absence of NK cells, IVIG provide no beneficial effect against xeno-GvHD in our model. More importantly, our results highlight the importance of the presence of T cells for successful NK cell proliferation upon IVIG treatment, which could explain why clinical protocols involving IVIG do not yield the same results as seen in our xeno-GvHD mouse model.

### **3.7 Acknowledgments**

---

We would like to thank Rose-Marie Brito for the cell sorting of CD3 negative huPBMCs.

This work was supported by a Bayer-Talecris-Canadian Blood Services-Héma-Québec Partnership Fund to EH (“Mechanisms of action of Intravenous Immunoglobulin (IVIG) on Graft versus Host Disease and their influence on immune reconstitution after cord blood transplantation by using a new *in vivo* model of humanized NOD/SCID/ $\gamma$ c- mice”), an Investigator Initiated Trial, funded by Talecris Biotherapeutics to EH (“Efficacy and mechanisms of action of immunoglobulins in graft versus host disease and impact on immune reconstitution following cord blood transplantation in a humanized mice model”), and an Investigator Initiated Trial, funded by CSL Behring Canada Inc. to EH (“Research on the mechanisms of action of immunoglobulins”). JGG received scholarships from the Fondation du CHU Sainte-Justine/Fondation des étoiles, and the Fonds de la recherche du Québec – Santé (FRQS). EH is a scholar of the FRQS.

#### **Authorship and Conflict-of-Interest Statements**

Contribution: JGG and EH designed the research and analyzed the data; JGG, FF, LB, MMD performed experiments; JGG and EH wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: EH was a member of an ad board committee for CSL Behring and received honoraria.

### 3.8 References

---

1. Ferrara JL, Cooke KR, Pan L, Krenger W. The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells*. 1996;14:473-489.
2. Ferrara JL, Cooke KR, Teshima T. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol*. 2003;78:181-187.
3. Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 1991;324:667-674.
4. Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol*. 2001;29:259-277.
5. Balduzzi A, Gooley T, Anasetti C, et al. Unrelated donor marrow transplantation in children. *Blood*. 1995;86:3247-3256.
6. Ho VT, Aldridge J, Kim HT, et al. Comparison of Tacrolimus and Sirolimus (Tac/Sir) versus Tacrolimus, Sirolimus, and mini-methotrexate (Tac/Sir/MTX) as acute graft-versus-host disease prophylaxis after reduced-intensity conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15:844-850.
7. Anasetti C, Beatty PG, Storb R, et al. Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Hum Immunol*. 1990;29:79-91.
8. Martin PJ. Increased disparity for minor histocompatibility antigens as a potential cause of increased GVHD risk in marrow transplantation from unrelated donors compared with related donors. *Bone Marrow Transplant*. 1991;8:217-223.
9. Sullivan KM, Kopecky KJ, Jocom J, et al. Immunomodulatory and antimicrobial efficacy of intravenous immunoglobulin in bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1990;323:705-712.
10. Abdel-Mageed A, Graham-Pole J, Del Rosario ML, et al. Comparison of two doses of intravenous immunoglobulin after allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23:929-932.
11. Cottler-Fox M, Spitzer TR. Immunoglobulin preparations, acute graft-versus-host disease, and infection after marrow transplant. *Lancet*. 1993;341:1592.
12. Sullivan KM, Storek J, Kopecky KJ, et al. A controlled trial of long-term administration of intravenous immunoglobulin to prevent late infection and chronic graft-vs.-host disease after marrow transplantation: clinical outcome and effect on subsequent immune recovery. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1996;2:44-53.

13. Feinstein LC, Seidel K, Jocum J, et al. Reduced dose intravenous immunoglobulin does not decrease transplant-related complications in adults given related donor marrow allografts. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1999;5:369-378.
14. Cordonnier C, Chevret S, Legrand M, et al. Should immunoglobulin therapy be used in allogeneic stem-cell transplantation? A randomized, double-blind, dose effect, placebo-controlled, multicenter trial. *Ann Intern Med.* 2003;139:8-18.
15. Winston DJ, Antin JH, Wolff SN, et al. A multicenter, randomized, double-blind comparison of different doses of intravenous immunoglobulin for prevention of graft-versus-host disease and infection after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28:187-196.
16. Cantoni N, Weisser M, Buser A, et al. Infection prevention strategies in a stem cell transplant unit: impact of change of care in isolation practice and routine use of high dose intravenous immunoglobulins on infectious complications and transplant related mortality. *Eur J Haematol.* 2009;83:130-138.
17. Gregoire-Gauthier J, Durrieu L, Duval A, et al. Use of immunoglobulins in the prevention of GvHD in a xenogeneic NOD/SCID/gammac- mouse model. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47:439-450.
18. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002;295:2097-2100.
19. Asai O, Longo DL, Tian ZG, et al. 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.* 1998;101:1835-1842.
20. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol.* 2005;23:3447-3454.
21. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood.* 2007;110:433-440.
22. Yamasaki S, Henzan H, Ohno Y, et al. Influence of transplanted dose of CD56+ cells on development of graft-versus-host disease in patients receiving G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells from HLA-identical sibling donors. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:505-510.
23. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood.* 1996;88:3230-3239.

24. Ito R, Katano I, Kawai K, et al. Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. *Transplantation*. 2009;87:1654-1658.
25. Noval Rivas M, Hazzan M, Weatherly K, Gaudray F, Salmon I, Braun MY. NK cell regulation of CD4 T cell-mediated graft-versus-host disease. *J Immunol*. 2010;184:6790-6798.
26. Rabinovich BA, Li J, Shannon J, et al. Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells. *J Immunol*. 2003;170:3572-3576.
27. Cerboni C, Zingoni A, Cippitelli M, Piccoli M, Frati L, Santoni A. Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK- cell lysis. *Blood*. 2007;110:606-615.
28. Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood*. 2010;115:4293-4301.
29. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*. 1999;285:412-415.
30. Tha-In T, Metselaar HJ, Tilanus HW, et al. Intravenous immunoglobulins suppress T-cell priming by modulating the bidirectional interaction between dendritic cells and natural killer cells. *Blood*. 2007;110:3253-3262.
31. Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat Rev Immunol*. 2013;13:176-189.
32. Anthony RM, Kobayashi T, Wermeling F, Ravetch JV. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature*. 2011;475:110-113.
33. Gelfand EW. Intravenous immune globulin in autoimmune and inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 2012;367:2015-2025.
34. Roussev RG, Ng SC, Coulam CB. Natural killer cell functional activity suppression by intravenous immunoglobulin, intralipid and soluble human leukocyte antigen-G. *Am J Reprod Immunol*. 2007;57:262-269.
35. Perricone R, Di Muzio G, Perricone C, et al. High levels of peripheral blood NK cells in women suffering from recurrent spontaneous abortion are reverted from high-dose intravenous immunoglobulins. *Am J Reprod Immunol*. 2006;55:232-239.
36. Heilmann L, Schorsch M, Hahn T. CD3-CD56+CD16+ natural killer cells and improvement of pregnancy outcome in IVF/ICSI failure after additional IVIG-treatment. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63:263-265.

37. Kwak JY, Kwak FM, Ainbinder SW, Ruiz AM, Beer AE. Elevated peripheral blood natural killer cells are effectively downregulated by immunoglobulin G infusion in women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol.* 1996;35:363-369.
38. Ruiz JE, Kwak JY, Baum L, et al. Intravenous immunoglobulin inhibits natural killer cell activity in vivo in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol.* 1996;35:370-375.
39. Thum MY, Bhaskaran S, Abdalla HI, Ford B, Sumar N, Bansal A. Prednisolone suppresses NK cell cytotoxicity in vitro in women with a history of infertility and elevated NK cell cytotoxicity. *Am J Reprod Immunol.* 2008;59:259-265.
40. van den Heuvel MJ, Peralta CG, Hatta K, Han VK, Clark DA. Decline in number of elevated blood CD3(+) CD56(+) NKT cells in response to intravenous immunoglobulin treatment correlates with successful pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2007;58:447-459.
41. Kotlan B, Padanyi A, Batorfi J, et al. Alloimmune and autoimmune background in recurrent pregnancy loss - successful immunotherapy by intravenous immunoglobulin. *Am J Reprod Immunol.* 2006;55:331-340.
42. Engelhard D, Waner JL, Kapoor N, Good RA. Effect of intravenous immune globulin on natural killer cell activity: possible association with autoimmune neutropenia and idiopathic thrombocytopenia. *J Pediatr.* 1986;108:77-81.
43. Chong WP, Ling MT, Liu Y, et al. Essential role of NK cells in IgG therapy for experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One.* 2013;8:e60862.
44. Finberg RW, Newburger JW, Mikati MA, Heller AH, Burns JC. Effect of high doses of intravenously administered immune globulin on natural killer cell activity in peripheral blood. *J Pediatr.* 1992;120:376-380.
45. Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999;285:727-729.
46. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:197-223.
47. Pende D, Parolini S, Pessino A, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med.* 1999;190:1505-1516.
48. Beziat V, Duffy D, Quoc SN, et al. CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. *J Immunol.* 2011;186:6753-6761.

49. Jacobi C, Claus M, Wildemann B, et al. Exposure of NK cells to intravenous immunoglobulin induces IFN gamma release and degranulation but inhibits their cytotoxic activity. *Clin Immunol.* 2009;133:393-401.
50. Giordani L, Quaranta MG, Marchesi A, et al. Increased frequency of immunoglobulin (Ig)A-secreting cells following Toll-like receptor (TLR)-9 engagement in patients with Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol.* 2011;163:346-353.



### 3.9 Figure Legends

---

**Figure 3.9.1 (p.102). Weekly IVIG treatment induces expansion of human NK cells.** PBMC from PBS- (n=10, *empty circles*) and IVIG-treated mice (n=10, *filled circles*) were analyzed for percent (A) and (B) absolute numbers of NK cells. (C) PBMC isolated from PBS- and IVIG-treated mice and gated on hCD45<sup>+</sup> cells were analyzed for CD3 and CD56 expression. Representative data of contour plots on day +14.

**Figure 3.9.2 (p.103). Phenotype and function of IVIG-induced NK cells.** (A) IVIG-treated xeno-GvHD mice were injected with 1 mg BrdU on day +10, and received additional BrdU in their drinking water until being sacrificed on day +14. Cells were collected from the blood, spleen and liver of IVIG-treated mice and analyzed by flow cytometry for BrdU incorporation and expression of annexin V and 7-AAD. Representative data of contour plots on day +14 (*left quadrant: subG0-G1 phase; lower left quadrant: G0-G1 phase; upper quadrant: S phase; lower right quadrant: G2-M phase*). (B) Percent of NK cells in the S phase of the cell cycle (n=6). (C) Analysis of NK cells of blood and different tissue origin on day +14 for apoptosis (n=5; *black bars: live cells; dotted bars: early apoptotic cells; white bars: late apoptotic cells*).

**Figure 3.9.3 (p.104). IVIG induce the functional activation of human NK cells.** (A) NK-cell specific activation markers were analyzed on day +14 on cells isolated from the blood (*white bars*), spleen (*dotted bars*), and liver (*black bars*) of IVIG-treated mice (n=5). (B) Splenocytes collected on day +10 from PBS- (*empty circles*) and IVIG-treated (*filled circles*) mice were used in cytotoxic assay against the K562 cells. Representative data (from 1 of 4 independent experiments) on cytotoxicity assay after a standard 4-hour 51Chromium Release Assay (CRA).

**Figure 3.9.4 (p.105). IVIG treatment reduces the incidence of GvHD and mortality in mice injected with huPBMCs, but not with NK-depleted huPBMCs.** (A) Incidence of GvHD and (B) survival of PBS- and IVIG-treated (*empty circles*, n=23; *filled circles*; n=22, respectively) huPBMCs-injected mice, and PBS- and IVIG-treated NK-depleted (*empty squares*; n=7; *filled squares*; n=6, respectively) huPBMCs-injected mice.

**Figure 3.9.5 (p.106). IVIG must be administered by the same route and the same day as huPBMCs for effective expansion of human NK cells.** (A) IVIG were administered i.p. and huPBMCs i.v. and PBMC on day +14 were isolated from PBS- (n=10) and IVIG-treated (n=10) mice, gated on hCD45<sup>+</sup> cells, and analyzed for CD3 and CD56 expression. Representative data of contour

plots on day +14. **(B)** Expansion of NK cells with initial IVIG treatment on day -1 (n=33), day +7 (n=6) (p=0.04, 0.04, and 0.01 at days +7, +14, and +21 post-injection, respectively). **(C)** Incidence of GvHD in mice treated with IVIG from day -1 (dotted line; n=33) or +7 (line; n=6); p=0.02.

**Figure 3.9.6 (p.107). T cells are required for IVIG-induced NK-cell expansion *in vivo*.** NK cell expansion was analyzed in IVIG-treated control (*filled circles*; n=10), OKT3-treated (*empty squares*, n=4), CsA-treated (*filled triangles*, n=7), or T cell-depleted huPBMCs-injected mice (*empty circles*; n=3).

**Figure 3.9.7 (p.108). Analysis of T cell proliferation and apoptosis *in vivo* in xeno-GvHD mice.** A BrdU incorporation and an annexin V assays were performed on cells from the blood, spleen, and liver of xeno-GvHD mice that were sacrificed at day +14. **(A)** Proliferation, assessed by the percentage of T cells in the S phase of the cell cycle and **(B)** apoptosis of T cells *in vivo* in PBS- (n=5, white), and IVIG-treated (n=6, black) mice.

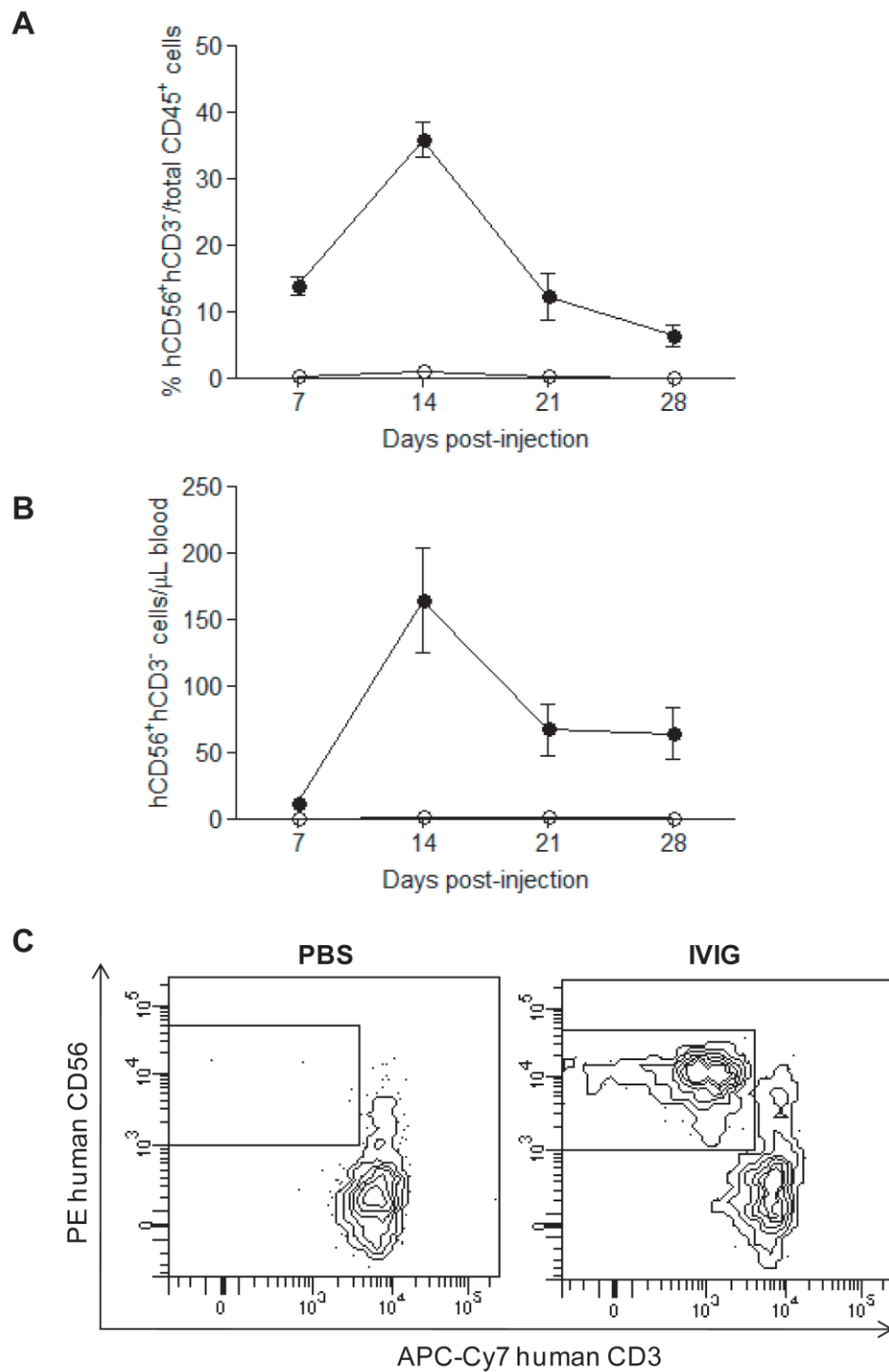
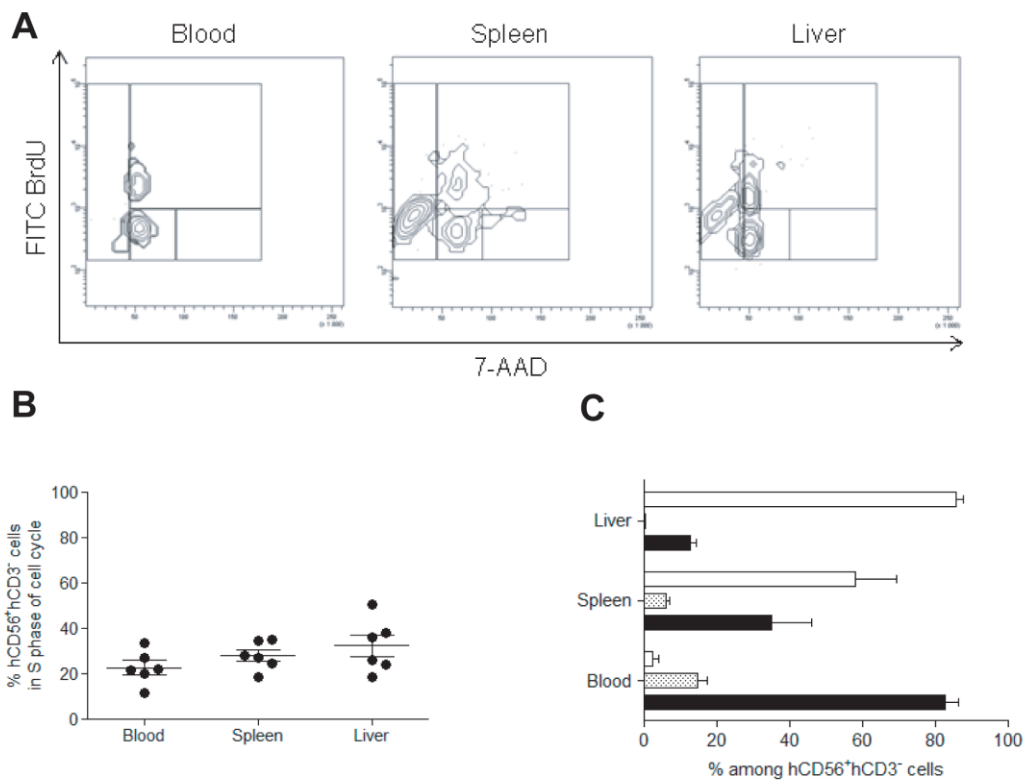
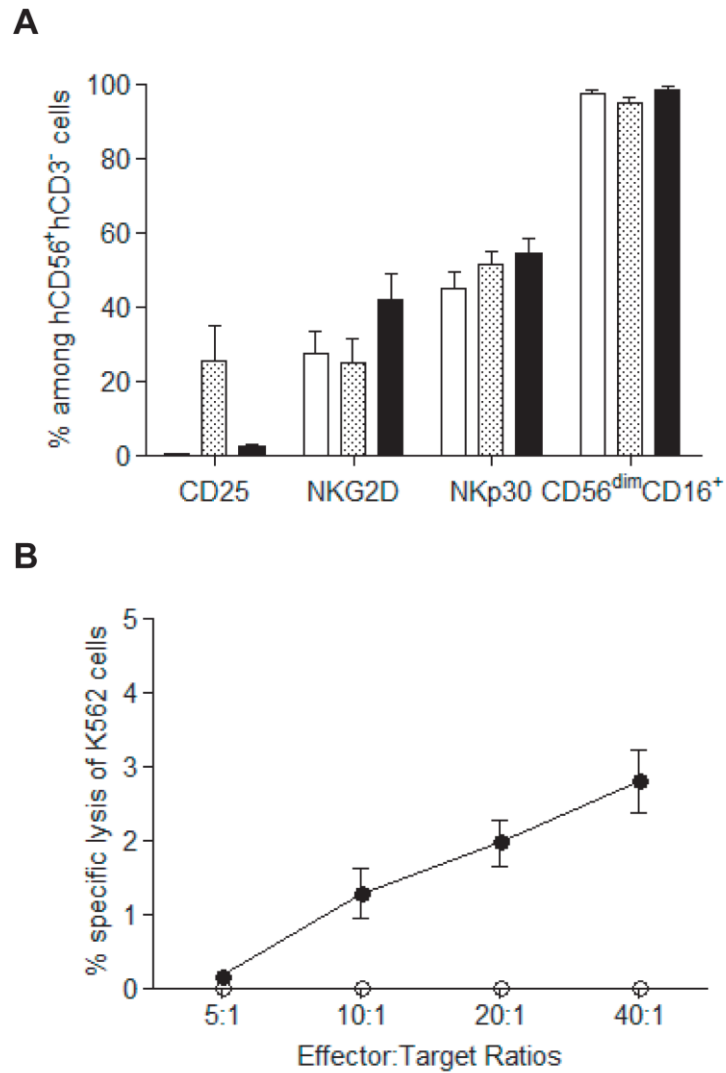


Figure 3.9.1 – Weekly IVIG treatment induces expansion of human NK cells.



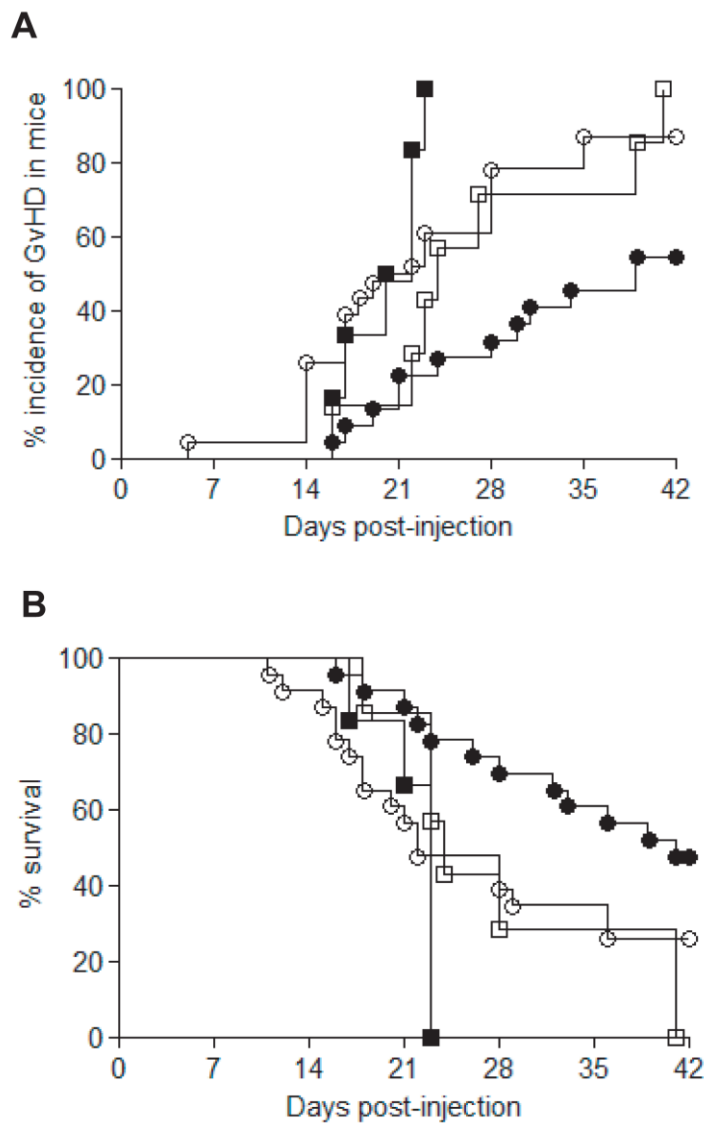
**Figure 2**

**Figure 3.9.2 – Phenotype and function of IVIG-induced NK cells.**



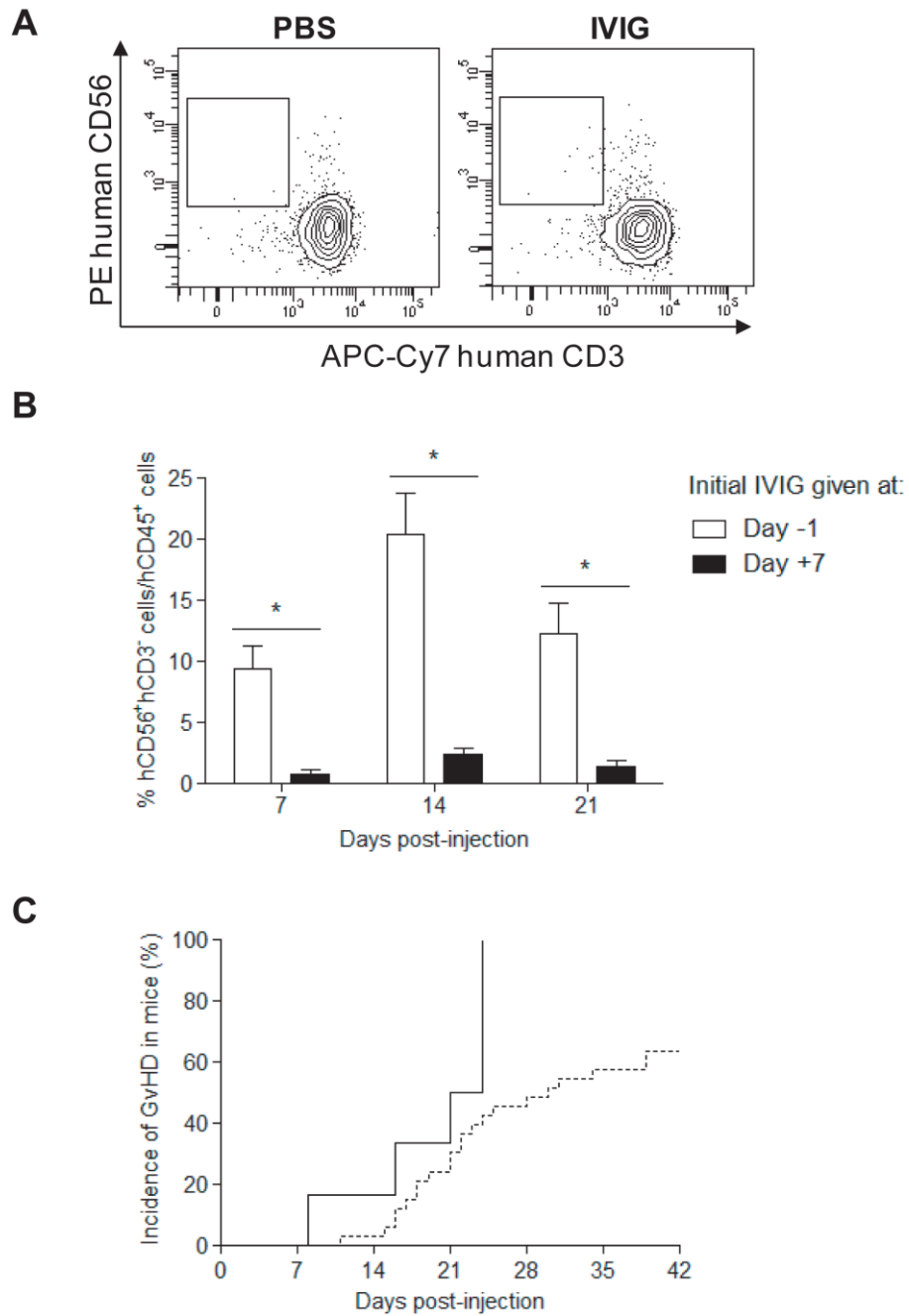
**Figure 3**

**Figure 3.9.3 – IVIG induce the functional activation of human NK cells.**



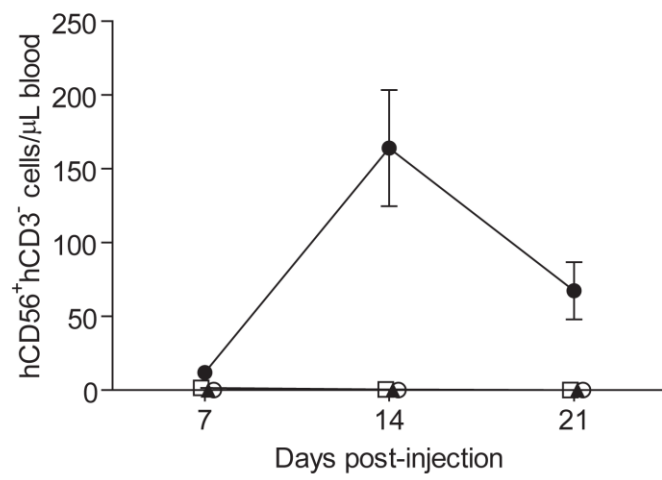
**Figure 4**

**Figure 3.9.4 – IVIG treatment reduces the incidence of GvHD and mortality in mice injected with huPBMCs, but not with NK-depleted huPBMCs.**



**Figure 5**

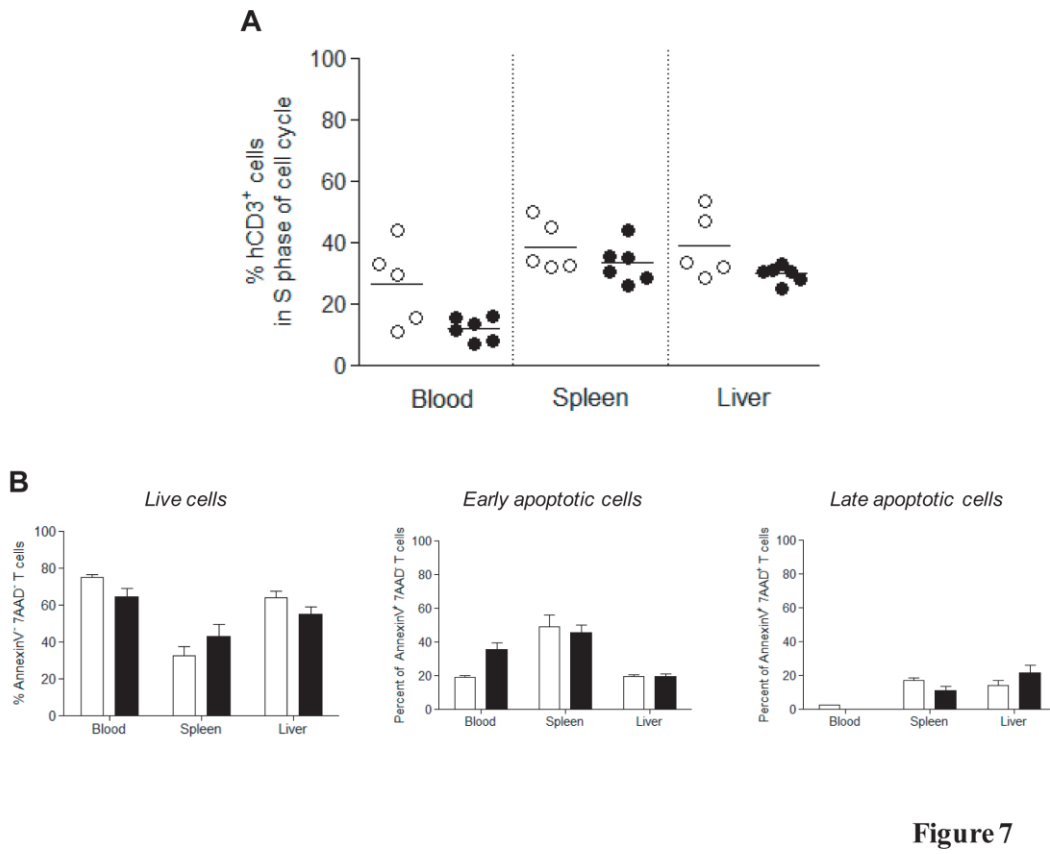
**Figure 3.9.5 – IVIG must be administered by the same route and the same day as huPBMCs for effective expansion of human NK cells.**



**Figure 6**

**Figure 3.9.6 – T cells are required for IVIG-induced NK-cell expansion *in vivo*.**





**Figure 3.9.7 – Analysis of T cell proliferation and apoptosis *in vivo* in xeno-GvHD mice.**

### **3.10 Discussion du deuxième article**

---

Les travaux décrits dans ce dernier article ont permis de déterminer que l'effet protecteur des IVIG sur la prévention de la GvHD dans le modèle murin xénogénique utilisé au sein de notre laboratoire n'était pas lié à une inhibition indirecte de l'activation ou de la prolifération des lymphocytes T. Possédant ainsi l'information que les IVIG ne semblaient pas agir de façon directe sur les cellules effectrices responsables du développement de la GvHD, et ayant remarqué l'expansion de la population cellulaire NK lors des trois premières semaines de traitement, on a exploré la possibilité que les cellules NK soient impliquées dans le processus préventif du développement de la GvHD initié par le traitement aux IVIG. On a démontré que sans la présence de cellules NK au sein du greffon, les IVIG n'avaient plus d'effet protecteur contre le développement de la GvHD, leur attribuant ainsi un rôle de première importance dans le mécanisme d'action des IVIG sur la prévention de la GvHD.

Une facette importante de cette étude est la preuve de la nécessité pour la prévention efficace de la GvHD par l'utilisation d'IVIG à forte dose, malgré la présence de cellules NK, de lymphocytes T activés. La mise en évidence de cette particularité s'avère de grande importance dans un cadre d'application clinique du traitement à haute dose d'IVIG pour le traitement de prophylaxie de la GvHD.

L'information la plus novatrice de cette étude demeure toutefois la démonstration de l'expansion de la sous-population lymphocytaire des cellules NK suite au traitement aux IVIG. En effet, malgré leur très grande utilisation dans le cadre de multiples protocoles cliniques, personne auparavant n'avait démontré le potentiel des IVIG pour l'expansion des cellules NK.

## **Chapitre 4 Discussion**

## **4.1 L'utilité des IVIG dans la prévention de la GvHD**

---

Alors que certains groupes ont rapporté que les IVIG ont un effet bénéfique chez les patients de HSCT pour la prévention de la GvHD (126, 128), plusieurs autres n'ont pu démontrer leur utilité dans ce cadre clinique (129, 131, 178, 242-244). Il faut considérer que les données probantes de ces études cliniques émanent d'un contexte expérimental qui n'est pas idéal. En effet, l'hétérogénéité qui existe au niveau de l'historique médical et des protocoles de traitement des patients participant à ces études rend leur analyse laborieuse. La nature clinique de ces études rend impossible l'homogénéisation des variables expérimentales, telles que le conditionnement pré-greffe, la prophylaxie, la source des cellules souches, le degré de disparité HLA, la dose de cellules injectée, tout comme l'est leur élimination sélective. Pour ces raisons, l'étude de l'effet du traitement unique par les IVIG pour la prévention de la GvHD dans un contexte d'étude clinique demeure impossible, d'autant plus qu'il existera toujours un risque que les traitements des protocoles cliniques camouflent un potentiel effet bénéfique des IVIG.

À la lumière de ces résultats peu concluants, et malgré l'efficacité démontrée des IVIG dans plusieurs autres applications cliniques (thérapie de remplacement pour les immunodéficiences primaires (245-247), ITP (248-250), CIDP (251, 252), maladie de Kawasaki (253)), leur utilisation dans les traitements de prophylaxie de la GvHD fut peu à peu abandonnée. Le caractère biologique de ce produit, et par conséquent sa disponibilité limitée, ainsi que son prix obligent nécessairement à faire preuve de diligence lorsqu'on considère son utilisation. Puisqu'il existe plusieurs conditions médicales qui peuvent efficacement être traitées par les IVIG, on leur réserve habituellement prioritairement ce traitement. Ainsi, le manque d'évidences cliniques claires soutenant l'efficacité des IVIG pour la prophylaxie de la GvHD a potentiellement précipité leur retrait des protocoles cliniques.

Notre laboratoire a donc jugé bon d'investiguer le rôle et l'utilité des IVIG dans la prophylaxie de la GvHD en utilisant un modèle murin xénogénique. On souhaitait ainsi déterminer clairement et définitivement si les IVIG ont un effet positif sur la prévention du développement de la GvHD.

Un des plus grands avantages du modèle murin xénogénique est la possibilité d'étudier individuellement l'effet des IVIG dans la prévention de la GvHD, avec la possibilité ultérieure d'intégrer les immunosuppresseurs utilisés dans la prophylaxie clinique dans le but de calquer le plus fidèlement possible les protocoles cliniques. Cette stratégie expérimentale a permis de déterminer clairement l'utilité des IVIG dans la prévention de la GvHD, tout en considérant l'influence des traitements de conditionnement ou de prophylaxie, ce qui n'avait encore jamais été fait à ce jour.

## 4.2 Validité du modèle murin xénogénique choisi

---

Le modèle murin de GvHD choisi afin d'effectuer ce projet de recherche se devait d'être fiable et de reproduire fidèlement et de façon robuste la GvHD humaine. Bien que plusieurs variantes d'un modèle murin de GvHD murine étaient disponibles au début de ce projet de recherche (brièvement, il s'agit d'un modèle de transplantation de moelle osseuse CMH-incompatible (254, 255)), on tenait absolument à étudier l'effet immunomodulateur des IVIG sur les cellules immunitaires humaines. En effet, il existe plusieurs différences au niveau de la diversité et de l'expression des FcγRs murins et humains (256), qui ont été révisées dans l'introduction de cette thèse. Ainsi, la réalisation de ce projet de recherche en utilisant un modèle murin aurait pu donner des résultats forts intéressants, sans pour autant que ceux-ci ne soient transposables dans un contexte cellulaire humain.

Au commencement du projet de recherche, les souris NSG étaient le meilleur outil disponible en terme de modèle murin immunodéficient. Ces souris étant hautement immunosupprimées, on peut leur injecter des cellules humaines sans que celles-ci ne soient reconnues par le système immunitaire de l'hôte, et donc ainsi rejetées. Ce modèle permet donc l'injection d'un nombre important de cellules humaines provoquant une réaction du greffon contre l'hôte chez la souris, accompagnée de l'apparition des signes cliniques caractéristiques (232). Dans nos mains, cette souche murine a permis l'élaboration d'un modèle robuste de GvHD, accompagné des signes cliniques caractéristiques, telle l'atteinte viscérale, observée dans notre modèle au niveau du foie (infiltration lymphocytaire et présence de corps apoptotiques) (Figure 2.9.2, p.71). On observe également de façon très reproductible la prolifération des lymphocytes T humains, ainsi que l'apparition de signes cliniques caractéristiques de la GvHD (perte de mobilité, perte de poids et dégradation de l'apparence générale des souris) (Figure 2.9.1, p.70 et Figure 2.9.3, p.72). On est alors confiant d'avoir à notre portée un modèle murin xénogénique représentatif de la GvHD humaine, qui permet l'étude du rôle immunomodulateur des IVIG dans la prophylaxie de la GvHD.

Tout au long de la réalisation du projet de recherche, les modèles murins xénogéniques ont cependant évolués et se sont sophistiqués. Il existe désormais des souches de souris NSG déficientes pour les CMH de classes I et II, respectivement NSG(K<sup>b</sup>D<sup>b</sup>)<sup>null</sup> et NSG-Ab<sup>0</sup>, lesquelles ne développent pas de GVHD (241, 257). De plus, l'avènement des souris déficientes pour le CMH de classe II et transgéniques pour le HLA-DRB1-0401 (NSG-Ab<sup>0</sup>DR4) permet le développement d'un modèle de GvHD allogénique humaine. En effet, l'injection de lymphocytes T humains CD4<sup>+</sup>DR4<sup>-</sup> dans ces souris se solde par le développement d'une GvHD allogénique humaine, à cause de la disparité au niveau de l'allèle HLA-DRB1-0401, tout en évitant le développement de GvHD xénogénique, grâce à

l'absence de CMH de classe II murin (257). Il est évident que si ce dernier modèle avait existé au début de ce projet de recherche, il aurait permis d'améliorer la pertinence des résultats obtenus, par l'obtention d'une GvHD humaine allogénique, plus fidèle à la réalité clinique, plutôt qu'une GvHD xénogénique.

Malgré tout, les IVIG pourraient toujours avoir un impact sur le développement de la GvHD dans le modèle choisi suite à leur interaction avec les cellules murines. Bien que les souris NSG soient très immunosupprimées et ne possèdent ni lymphocytes T et B, ou cellules NK, il n'en demeure pas moins qu'elles possèdent des macrophages qui expriment les FcγRIIB, FcγRIII et FcRn (258-260) qui ont le potentiel de lier les IgG humaines (142, 256), ainsi que des DC et des granulocytes, bien que leur fonctionnalité soit remise en doute (237). Les souris NSG possèdent donc des APC, bien qu'on ne connaisse pas exactement leur fonctionnalité, qui sont somme toute susceptibles d'être influencées par le traitement aux IVIG, et qui pourraient être impliquées dans le mécanisme de réduction de développement de la GvHD (3, 6, 67, 72, 75, 261).

Toutefois, les modèles plus récents de GvHD xénogéniques suggèrent que les APC responsables du déclenchement de la GvHD proviennent du greffon, plutôt que du receveur (262). On a d'ailleurs montré au laboratoire que les splénocytes isolés de souris NSG ne semblent pas capables de stimuler les huPBMCs (263) (Chapitre 6, p.130). Dans un essai de réaction lymphocytaire mixte, les splénocytes de souris NSG irradiées et mélangées à un ratio 1:1 avec des lymphocytes T humains isolés n'ont pas réussi à induire leur prolifération, alors que des huPBMCs allogéniques irradiées en ont été capables (Figure 6.9.7, p.163). On a ainsi conclu que les lymphocytes T humains dans ces conditions *in vitro* précises ne peuvent être activés dans un contexte de CMH murin, ce qui corrobore néanmoins l'idée que les APC murines chez les souris NSG ne sont pas responsables du déclenchement de la GvHD (262). De plus, on a démontré que des DC humaines chargées d'un lysat préparé à partir de splénocytes de souris NSG peuvent stimuler les huPBMCs (263), ce qui confirme que les antigènes murins peuvent activer les lymphocytes T humains, à condition d'être présentés dans un contexte de CMH humain. Ceci est d'autant plus confirmé par l'absence d'activation des lymphocytes T lorsqu'ils sont incubés seuls avec le lysat de splénocytes murins (Figure 6.9.7, p.163). Ce dernier résultat suggère alors que les APC du donneur, en apprêtant des antigènes provenant du receveur par la voie indirecte de présentation antigénique, peuvent initier la GvHD.

Une autre possibilité peut être que les APC du donneur acquièrent des complexes MHC:peptide du receveur par trogocytose, permettant ainsi la présentation antigénique croisée. Ce mécanisme de présentation croisée n'induit pas l'activation des lymphocytes T, mais favorise plutôt la formation de

synapse immunologique, essentielle à la réponse proliférative complète des lymphocytes T (264). Ainsi, de deux choses l'une : soit les IVIG fixées aux APC murines peuvent inhiber le phénomène de trogocytose, essentiel pour la présentation croisée, ou encore elles sont transférées avec le complexe MHC:peptide lors de la trogocytose et peuvent ensuite affecter la formation de synapses immunologiques, ce qui pourrait réduire ou ralentir l'activation des lymphocytes T chez les souris traitées aux IVIG.

### **4.3 Les IVIG contribuent à réduire la GvHD dans le modèle murin xénogénique**

---

On a clairement démontré dans ce modèle murin xénogénique que l'administration hebdomadaire d'IVIG à haute dose retarde le développement de la GvHD, ainsi que la mortalité qui y est reliée (Figure 2.9.1, p.70 et Figure 2.9.3, p.72). Cette réduction de l'incidence de la GvHD ne semble toutefois pas découler de la réduction de la prolifération des lymphocytes T, ni de leur activation (Figure 2.9.4, p.73 et Chapitre 3, p.79), ce qui confirme que les IVIG ont un effet immunomodulateur, plutôt qu'immunosuppresseur.

Padet *et al* ont par ailleurs démontré que les IVIG se fixent aux lymphocytes T humains (nécessairement par un mécanisme Fc $\gamma$ R-indépendant (97)), en bloquant vraisemblablement les voies de co-stimulation, ce qui prévient leur activation efficace (209), sans toutefois supprimer ces cellules. On peut donc suggérer que ce mécanisme soit impliqué dans l'immunomodulation par les IVIG, en prévenant l'activation des lymphocytes T, sans toutefois modifier leur nombre. Il faut cependant souligner que lorsqu'on a vérifié le niveau d'activation des lymphocytes T dans les deux groupes expérimentaux de souris, on n'a relevé aucune différence (Chapitre 3, p.79). Évidemment, cette différence pourrait simplement être attribuée au jour de prélèvement du sang qui a servi pour effectuer ce test. Dans leur article, Padet *et al* stimulent les cellules pendant une période de 24 heures avant d'effectuer leur lecture, tandis que notre premier prélèvement était effectué une semaine après l'injection initiale des huPBMCs et des IVIG.

Le rôle immunomodulateur des IVIG dans la prévention de la GvHD est par ailleurs soutenu par le profil de cytokines humaines plasmatiques retrouvé chez les souris (Figure 2.9.5, p.74). En effet, on observe clairement que l'utilisation d'immunosuppresseurs (CsA et OKT3) mène à la réduction de la sécrétion de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et l'IL-10, deux cytokines que l'on trouve à des niveaux comparables chez les souris traitées avec PBS ou IVIG. De plus, on observe une réduction significative

des cytokines IL-2, IL-15 et IL-17 chez les souris traitées avec IVIG, ce qui n'est pas observé dans les souris des autres groupes expérimentaux. Ceci suggère donc que les IVIG ont un mécanisme d'action immunomodulateur particulier, distinct de celui des immunosuppresseurs et qu'il affecte plus d'une population cellulaire, sachant que l'IL-2 et l'IL-17 sont produites par les lymphocytes T, tandis que l'IL-15 est sécrétée par les cellules mononucléées phagocytaires (265).

La différence au niveau de la concentration plasmatique d'IL-2 et d'IL-15 pourrait notamment être expliquée par la consommation de ces cytokines par les cellules NK afin d'assurer leur survie (266, 267) et leur maturation (42). Ainsi, l'IL-2 disponible serait consommée par les lymphocytes T pour leur activation dans les deux groupes expérimentaux, et de surcroît par les cellules NK chez les souris traitées avec les IVIG, ce qui expliquerait sa concentration plasmatique moindre dans ce dernier groupe. L'IL-15 est également nécessaire pour la différenciation des cellules NK, leur maturation fonctionnelle et leur survie (41). De façon similaire, l'IL-15 produit par les cellules mononucléées phagocytaires lors de la GvHD chez les souris NSG serait consommée par les cellules NK des souris traitées avec les IVIG, ce qui expliquerait sa concentration plasmatique diminuée dans ce groupe expérimental.

Enfin, l'IL-17 sécrétée par les lymphocytes Th17 a des propriétés pro-inflammatoires qui peuvent influencer une large gamme de types cellulaires (268), en amplifiant l'inflammation locale et en permettant la chimiotaxie des neutrophiles et des monocytes aux sites d'inflammation, augmentant ainsi l'induction de molécules co-stimulatoires nécessaires à l'activation des lymphocytes T (269). Tous ces phénomènes peuvent contribuer au développement de la GvHD. Le traitement aux IVIG a réduit la sécrétion de l'IL-17 dans des modèles de CIDP et de la maladie de Kawasaki, bien que le mécanisme et les implications qui en découlent ne soient toujours pas résolus (270). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que le traitement aux IVIG dans notre modèle murin permet une réduction semblable des lymphocytes Th17, réduisant ainsi la concentration plasmatique d'IL-17 sécrétée. Puisque l'IL-15 peut influencer la production de l'IL-17, on peut également supposer que la concentration moindre d'IL-15 chez les souris traitées aux IVIG contribue directement à réduire la sécrétion d'IL-17 (271). Ces deux effets pourraient également agir en synergie, ce qui expliquerait l'absence totale d'IL-17 dans le plasma des souris traitées aux IVIG dans les premières semaines post-injection (Figure 2.9.5, p.74). Puisque les lymphocytes Th17 sont impliqués dans l'expression de l'IL-6 (268), qui joue un rôle central dans l'activation des lymphocytes T (272), on peut également supposer que leur réduction suite au traitement aux IVIG soit corrélée à la concentration réduite d'IL-6, bien que



non-significative (Figure 2.9.5, p.74), ce qui contribuerait à la réduction de la sévérité de la GvHD dans notre modèle.

Il ne faut cependant pas sous-estimer l'effet que peut avoir une réduction de l'activation des lymphocytes T sur l'issue de la HSCT. Bien que celle-ci puisse effectivement réduire le développement de la GvHD, elle réduit également l'effet bénéfique de la GvL, laissant ainsi le patient à risque de subir une rechute de la maladie.

Le résultat le plus novateur fut certainement l'observation de l'expansion de cellules NK humaines activées dans les souris traitées hebdomadairement avec les IVIG, tel que démontré par l'incorporation de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) et le décompte de cellules en circulation (Figure 3.9.1, p.102, Figure 3.9.2, p.103 et Figure 3.9.3, p.104). Cependant, lorsque les IVIG ne sont pas administrées par la même voie que le greffon, ou que leur administration initiale est décalée de l'infusion du greffon, l'expansion des cellules NK, ainsi que l'effet bénéfique de prévention sur la GvHD disparaissent (Figure 3.9.5, p.106). Ces résultats suggèrent alors deux possibilités : soit l'expansion des cellules NK et l'effet protecteur contre la GvHD découlent directement de l'effet des IVIG sur les cellules NK du greffon, soit ils sont une conséquence de la modification de certaines cellules murines suite à leur interaction avec les IVIG. De plus, lorsque les lymphocytes T humains du greffon sont inactivés ou absents, il n'y a évidemment pas de développement de GvHD, mais malgré le traitement aux IVIG, il n'y a également aucune expansion des cellules NK (Figure 3.9.6, p.107). Ces conditions particulières rappellent l'étude de Tha-In *et al* (113) où le traitement des DC avec les dimères ou multimères d'IVIG nécessite la présence de lymphocytes T afin d'activer les cellules NK et ainsi induire leur activité cytotoxique. Ainsi, les lymphocytes T semblent également avoir un rôle central dans l'expansion par les IVIG des cellules NK, ce qui sera discuté plus en détail à la section 4.5.

Les DC humaines incubées *in vitro* avec les IVIG ont le pouvoir d'activer les cellules NK, qui peuvent ensuite lyser ces mêmes DC par ADCC et ainsi diminuer le nombre d'APC pouvant activer les lymphocytes T du greffon (113, 273-275), ce qui a le potentiel d'éliminer le développement de la GvHD à la source. Il est tentant de croire que ce même mécanisme peut être à l'origine de l'effet bénéfique des IVIG dans le modèle murin utilisé. Les IVIG, bien que d'origine humaine, peuvent efficacement se lier aux cellules d'origine murine (142). Bien que les DC matures soient habituellement résistantes à la lyse par les cellules NK, lorsque celles-ci sont recouvertes par les IVIG, elles sont reconnues par les Fc $\gamma$ RIII des cellules NK et peuvent ensuite être lysées par ADCC (113). Il y a donc possibilité que les IVIG puissent activer les cellules NK dans notre modèle murin xénogénique, soit en se liant aux DC humaines du greffon, ou sur les DC murines.

Afin de tester cette hypothèse, on a tout d'abord évalué la fonction cytotoxique des cellules NK induites par les IVIG. En effectuant un test de relargage de chrome avec les cellules NK récupérées des souris traitées aux IVIG, on a démontré que ces cellules pouvaient effectivement tuer les cellules cibles K562, bien qu'à un faible niveau (Figure 3.9.3, p.104). Cette faible réponse cytotoxique peut être expliquée par la fréquence de lyse des cellules NK. Effectivement, une seule cellule NK est capable de lyser en série plusieurs cellules cibles. Cette lyse des cellules cibles est assurée par le relâchement de perforine et de granzyme B par les cellules NK. Cependant, après la lyse en série de plusieurs cellules cibles par une même cellule NK, les réserves de perforine et de granzyme B baissent et les cellules NK souffrent d'épuisement (276). En supposant que les cellules NK induites par les IVIG peuvent lyser les DC dans notre modèle murin, le phénomène d'épuisement expliquerait pourquoi les cellules NK récoltées des souris traitées aux IVIG ne démontrent qu'un faible potentiel cytotoxique contre les cellules cibles K562. En effet, les cellules NK provenant des souris traitées aux IVIG pourraient souffrir d'épuisement au moment de leur récolte, ce qui expliquerait ainsi pourquoi la réponse cytotoxique observée est si faible. Il serait intéressant de valider cette hypothèse en stimulant les cellules NK récoltées des souris traitées aux IVIG avec de l'IL-2, et d'évaluer ensuite leur potentiel cytotoxique envers la lignée cible K562 (276). Assurément, la meilleure approche d'un point de vue expérimental serait de récolter les cellules NK des souris traitées aux IVIG pour le test de relargage de chrome avant qu'elles ne souffrent d'épuisement. Malheureusement, ceci est presque impossible, étant donné la proportion de cellules NK disponibles à un moment plus précoce du traitement et vu le nombre de cellules nécessaires pour effectuer ce test. Somme toute, on démontre la fonctionnalité des cellules NK induites par les IVIG. Leur rôle dans la prévention de la GvHD est discuté plus en détail à la section 4.4.

Un autre mécanisme connu des IVIG qui peut être corrélé à la prévention ou réduction de la GvHD est leur capacité à réguler la fonction des DC. Les IVIG peuvent effectivement inhiber l'apprêtement des antigènes par les DC (180, 198, 199), diminuer l'expression du CD80 (209) et inhiber la reconnaissance des DC par le TCR des lymphocytes T (232). Tous ces phénomènes peuvent réduire la stimulation des lymphocytes T (209) et ainsi contribuer à réduire la GvHD.

Un dernier mécanisme potentiel de réduction de la GvHD par les IVIG est l'augmentation de l'expression de PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) sur les monocytes (277), ce qui contribue à l'inhibition de la fonctionnalité des lymphocytes T dans un modèle de réaction lymphocytaire mixte. Ainsi, on peut concevoir d'évaluer dans notre modèle si le traitement hebdomadaire aux IVIG induit une augmentation de PD-L1 à la surface des monocytes, ce qui contribuerait à inhiber l'activation des

lymphocytes T. Bien qu'on n'observe pas de diminution de l'activation des lymphocytes T (Chapitre 3, p.79), les techniques utilisées à cette fin diffèrent entre notre étude et celle de Padet *et al* (277). Ainsi, on pourrait vérifier l'activation des lymphocytes T dans le modèle de GvHD en quantifiant l'ARNm de l'IL-2 produite, plutôt que d'effectuer des marquages de surface en cytométrie en flux. Cette approche permettrait également de déterminer si la plus faible concentration plasmatique d'IL-2 chez les souris traitées aux IVIG est due à une baisse de production par les lymphocytes T, ou plutôt à sa consommation par les cellules NK, tel qu'exposé précédemment dans cette section.

Tel que souligné dans l'introduction, les IVIG possèdent plusieurs mécanismes d'action distincts. Leur effet bénéfique dans la prévention de la GvHD découle sûrement de la synergie de plusieurs de ces mécanismes. On leur connaît déjà, suite à nos travaux, la capacité d'induire l'expansion de cellules NK fonctionnelles. Afin de cerner dans un projet futur clairement quelle est la totalité de la contribution des IVIG dans la réduction de la GvHD dans notre modèle, on pourrait évaluer la production des cytokines plutôt que leur concentration plasmatique, leur capacité à inhiber l'apprêtement et l'activation des APC et incidemment l'activation des lymphocytes T dans le modèle murin xénogénique.

#### **4.4 Le rôle des cellules NK dans la prévention de la GvHD**

---

On a démontré dans notre modèle que les cellules NK induites par les IVIG sont de phénotype activé, fonctionnelles (Figure 3.9.2, p.103) et essentielles à l'effet bénéfique des IVIG pour la prévention de la GvHD (Figure 3.9.4, p.105 et Figure 3.9.5, p.106). Celle-ci ne dure que durant les trois premières semaines post-injection, soit la période de survie des cellules NK du greffon (45-47), ce qui renforce définitivement l'hypothèse selon laquelle les cellules NK sont indispensables à la protection contre la GvHD. De plus, on se rappellera qu'une forte proportion de cellules NK au sein du greffon est corrélée à une moindre incidence de GvHD (88), ce que corroborent également les résultats obtenus dans notre modèle (Chapitre 3, p.79). Afin de confirmer que ces cellules NK sont bel et bien les cellules effectrices de la prévention de la GvHD, on a fait un essai de transfert adoptif de  $4 \times 10^6$  cellules NK humaines autologues activées *ex vivo* (278) chez des souris du modèle de GvHD, à partir de jour 0 et ensuite à intervalle de trois jours. Si les cellules NK activées sont seules responsables de l'effet protecteur contre le développement de la GvHD, on aurait dû observer une réduction de la mortalité chez ces souris. Malheureusement, cet essai s'est avéré non-concluant, les souris recevant les cellules NK activées décédant de GvHD au même rythme que les souris du groupe contrôle. Ainsi, on peut émettre deux hypothèses : soit les conditions expérimentales du transfert adoptif des cellules NK activées n'étaient pas optimales pour la prévention de la GvHD dans le modèle utilisé, ou encore les

IVIG ont un réel rôle dans la prévention de la GvHD et doivent absolument être présentes de pair avec les cellules NK afin de transmettre leur effet protecteur.

Afin de mieux discerner l'implication des cellules NK induites par les IVIG dans la prévention de la GvHD, on s'est inspiré d'une étude par Olson *et al*, qui ont décrit un effet régulateur des cellules NK, permettant l'inhibition de la prolifération et de l'activation des lymphocytes T (89). Cependant, les résultats obtenus de l'analyse hebdomadaire des populations lymphocytaires du sang périphérique (Figure 2.9.4, p.73), ainsi que les résultats d'incorporation du BrdU et de l'expression de l'Annexin V (Figure 3.9.7, p.108) ne démontrent pas d'effet régulateur des cellules NK sur le contrôle de la prolifération des lymphocytes T dans notre modèle murin xénogénique de GvHD. On a donc éliminé la possibilité que les IVIG puissent induire l'expansion et l'activation d'une population NK régulatrice.

On s'est alors rabattu sur l'hypothèse selon laquelle les cellules NK activées peuvent lyser les DC couvertes d'IVIG, et ainsi réduire la présentation aux lymphocytes T (113, 273-275), tel qu'expliqué à la section précédente. Étant donné le très faible nombre d'APC dans notre modèle, on a opté pour le dénombrement des APC murines et humaines, plutôt que de procéder par des tests de dégranulation, de cytotoxicité ou d'apoptose. La comparaison du nombre d'APC murines et humaines entre les souris du groupe contrôle et celles recevant les IVIG hebdomadairement n'a relevé aucune différence. De plus, la comparaison de ces populations cellulaires entre des souris injectées avec des huPBMCs totaux et des huPBMCs déplétées de cellules NK, toutes traitées avec les IVIG, a donné des résultats similaires (Chapitre 3, p.79). Ainsi, à la lumière de ces résultats, on a déterminé que les cellules NK induites par les IVIG ne semblaient pas lyser les APC murines ou humaines, ce qui aurait pu, incidemment, réduire la GvHD. Bien que les APC ne semblent pas être lysées par les cellules NK induites par les IVIG, il mérite toutefois de souligner la nature ponctuelle de ces résultats. En effet, les souris du groupe contrôle sont à l'article de la mort au jour +14 post-injection. Il n'est donc pas farfelu de penser que la comparaison de populations cellulaires entre les souris traitées aux IVIG et les souris du groupe contrôle dont la mort est imminente pourrait camoufler un effet réel des cellules NK sur l'apoptose des APC chez les souris traitées aux IVIG. Toutefois, la récolte des organes à un moment plus précoce (jour +7 post-injection) n'a pas permis d'obtenir de meilleurs résultats, les APC et les cellules NK étant trop peu nombreuses pour effectuer les expériences (Figure 3.9.1, p.102 et résultats non publiés). De plus, puisqu'on dénombre les APC humaines en tant qu'une seule population HLA-DR<sup>+</sup>, sans faire de distinction entre les DC, les macrophages et les lymphocytes B, il est possible qu'un effet sur une sous-population particulière soit camouflé par l'augmentation de l'expression de HLA-DR suite à l'activation des APC (279). Les APC murines se résument aux DC et macrophages, les souris NSG

n'ayant pas de lymphocytes B. Aucune de ces deux populations ne semblent toutefois être lysées par les cellules NK induites par les IVIG (résultats non publiés). Ainsi, on croit que si les cellules NK peuvent lyser les APC, à la lumière des résultats obtenus, il serait plus probable qu'elles agissent sur les APC d'origine humaine.

Rien n'exclut toutefois la possibilité que les APC murines et humaines soient modifiées par les IVIG sans nécessairement être lysées, ce qui pourrait affecter leur capacité à fournir les signaux cellulaires nécessaires à l'activation des lymphocytes T, tel que discuté précédemment.

#### **4.5 Mécanisme d'action des IVIG sur les cellules NK**

---

Le rôle des IVIG dans l'expansion des cellules NK n'a pas encore été élucidé. Peut-être les IVIG ne font-elles que garantir la survie des cellules NK suite à leur injection dans les souris, ou peut-être encore sont-elles nécessaires pour leur prolifération. On sait par ailleurs que ces lymphocytes T sont nécessaires *in vitro* pour la prolifération, mais pas l'activation des cellules NK (113). Dans le modèle murin xénogénique de GvHD, on croit que certaines cytokines sécrétées par les lymphocytes T soient utilisées par les cellules NK pour leur expansion et leur activation. On pense notamment à l'IL-2 et l'IL-15, deux cytokines essentielles à la survie et l'activation des cellules NK (266, 267) qui sont retrouvées en plus faible concentration dans les souris recevant les IVIG que chez les souris contrôles (Figure 2.9.5, p.74). Effectivement, en l'absence de lymphocytes T au sein du greffon, et ce malgré le traitement hebdomadaire avec les IVIG, on n'observe tout simplement pas de cellules NK, qui sont pourtant présentes au sein du greffon au moment de l'injection (Figure 3.9.6, p.107). En l'absence de lymphocytes T matures, les cellules NK maintiennent un statut immature (i.e. non-fonctionnel) (280), ce qui suggère que les cytokines produites par les lymphocytes T soient indispensables à leur activation, et qu'ainsi le traitement aux IVIG seul ne permettrait pas leur activation. La présence de lymphocytes T activés n'est cependant pas suffisante à l'expansion des cellules NK, comme on a pu le remarquer dans le groupe de souris contrôles (Figure 3.9.1, p.102), ce qui suggère également un rôle des IVIG.

Widiapradja *et al* ont démontré que le traitement à haute dose d'IVIG promeut la survie des cellules neuronales, en inhibant l'activation de l'inflammasome et de la signalisation apoptotique et en augmentant les niveaux de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique (281). On sait par ailleurs que Bcl-2 permet de restaurer les cellules NK en l'absence de signalisation via l'IL-15R $\beta$ , sans pour autant restaurer leur capacité cytotoxique (282). Ainsi, on croit que le maintien d'un haut niveau de Bcl-2,

grâce au traitement à haute dose d'IVIG, permet la survie initiale des cellules NK suite à la greffe, dans l'attente de la production par les huPBMCs des cytokines humaines nécessaires à leur activation, notamment les IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, les IFN de type I et II, ainsi que le TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$*  - facteur de croissance transformant  $\beta$ ) (41, 42, 44, 283-285). La faible activité cytotoxique des cellules NK dans les souris traitées aux IVIG pourrait être expliquée par la quantité insuffisante des cytokines nécessaires à leur activation. Ceci limiterait alors le renouvellement de la fonction cytotoxique, menant à l'épuisement précoce des cellules NK. Cette hypothèse est par ailleurs soutenue par plusieurs études cliniques où les IVIG sont administrées dans des conditions non-inflammatoires et où le nombre de cellules NK est plutôt diminué suite au traitement, confirmant l'importance des cytokines de profil inflammatoire dans la survie et l'activation des cellules NK (164, 216, 229).

On pourrait tester l'implication de Bcl-2 dans notre modèle en vérifiant son niveau d'expression dans les tissus de souris traitées aux IVIG en comparaison avec les souris du groupe contrôle. Également, tel que mentionné précédemment, plutôt que de s'en tenir à l'évaluation de la concentration plasmatique des cytokines humaines, il est possible d'envisager l'évaluation de leur production en mesurant leurs niveaux d'ARNm afin de déterminer si leur concentration plasmatique plus basse chez les souris traitées aux IVIG découle d'une production moindre suite au traitement, ou plutôt de leur consommation par les cellules NK.

Puisque l'injection des IVIG à l'extérieur du microenvironnement qui reçoit les huPBMCs, ou encore le simple décalage du traitement initial d'IVIG par rapport à l'injection des huPBMCs abroge toute expansion des cellules NK (Figure 3.9.5, p.106), on croit que les IVIG sont à tout le moins nécessaires pour la survie initiale des cellules NK suite à leur injection, ce qui rejoint les travaux de Widiapradja *et al* (281). L'absence d'effet positif des IVIG sur la prévention de la GvHD en l'absence des cellules NK au sein du greffon corrobore d'ailleurs élégamment cette hypothèse (Figure 3.9.4, p.105 et Figure 3.9.5, p.106).

Ainsi, on comprend aisément que les cellules NK ne puissent survivre lorsque les lymphocytes T du greffon, qui fournissent la majorité des cytokines humaines nécessaires à la survie des cellules NK, sont éliminés. Cependant, on se demande si l'élimination des lymphocytes T des patients, chez qui les populations cellulaires survivant aux traitements pré-HSCT peuvent toujours produire certaines cytokines (265), aura le même effet. Cela étant dit, le traitement à haute dose d'IVIG pourrait avoir deux dénouements distincts : 1) les IVIG permettent l'expansion et l'activation des cellules NK, malgré l'absence des lymphocytes T causée par les traitements immunosuppresseur, ou encore 2) les

lymphocytes T sont essentiels et indispensables chez les humains pour la survie et l'activation des cellules NK, et le traitement d'IVIG n'a aucun effet.

#### **4.6 L'effet des IVIG sur la reconstitution immunitaire**

---

Lors des années 1990, alors que régnait un doute quant à l'efficacité réelle des IVIG pour la réduction de la GvHD, on suggérait également que les IVIG pouvaient avoir un effet indésirable sur la qualité de la reconstitution immunitaire post-HSCT (243), notamment au niveau de la restriction de la différenciation lymphocytaire B (286). Ainsi, l'absence d'efficacité démontrée pour la prévention de la GvHD, jumelée à une crainte d'atteinte à la reconstitution immunitaire, en plus de la preuve de l'augmentation du risque de développer d'autres complications (131), se sont soldées en la discontinuation de l'usage des IVIG dans le protocole clinique post-HSCT. Personne n'a toutefois déterminé si les IVIG affectaient réellement la qualité et la rapidité de la reconstitution immunitaire, ce qui a été fait dans le cadre de ce projet de recherche, en utilisant un modèle murin humanisé. Brièvement, les souris NSG irradiées de façon sub-létale reçoivent une injection de  $10^5$  cellules souches hématopoïétiques  $CD34^+$  provenant de sang de cordon ombilical par la voie intraveineuse. Suite à la différenciation des cellules souches injectées, ces souris développent un système immunitaire humain. On a démontré que le traitement hebdomadaire aux IVIG entraîne une réduction transitoire de la différenciation des lymphocytes B (Figure 2.9.6, p.75), sans toutefois affecter la thymopoïèse (Figure 2.9.7, p.76).

Ces résultats proviennent toutefois d'un modèle murin d'humanisation, qui n'est pas complètement fidèle à la reconstitution immunitaire humaine post-HSCT. Chez les patients greffés, les neutrophiles et les monocytes/macrophages sont les premières populations cellulaires à être reconstituées, de pair avec les cellules NK, normalement lors du premier mois post-HSCT (287). Les cellules NK atteignent leurs niveaux normaux et expriment un répertoire KIR représentatif du donneur habituellement après une période de six mois (80, 288). Les lymphocytes T dominent rapidement le répertoire immunologique post-HSCT : les lymphocytes T  $CD8^+$  sont habituellement reconstitués dans les premiers trois mois, et retrouvent leurs niveaux normaux avant la fin de la première année post-greffe, alors que les lymphocytes T  $CD4^+$  mettent plusieurs années à se reconstituer (287). Finalement, les lymphocytes B sont habituellement complètement absents durant les premiers mois post-greffe et atteignent leurs niveaux normaux après un an (80, 287, 288).

Dans notre modèle murin humanisé, les monocytes et les cellules NK sont détectés dans le sang périphérique dès trois semaines post-HSCT (Figure 2.9.6, p.75). Bien que le modèle utilisé dans ce projet ne soit pas optimal pour le développement des lignées cellulaires myéloïdes, notamment les granulocytes (88, 289-292), on décèle des cellules myéloïdes dès six semaines post-HSCT dans la rate et la moelle osseuse (résultats non-publiés). Les lymphocytes B sont ensuite détectés après un mois dans le sang périphérique (Figure 2.9.6, p.75), et finalement, on détecte les lymphocytes T au bout d'environ trois mois (Figure 2.9.6, p.75).

On remarque donc une différence majeure dans la reconstitution des répertoires de lymphocytes B et T entre les patients de HSCT et notre modèle murin humanisé. Alors que les lymphocytes T dominent rapidement le répertoire immunologique chez les patients et que les lymphocytes B se manifestent en dernier lieu, c'est tout le contraire qui se produit dans notre modèle murin humanisé. De plus, il faut attendre plus de 22 semaines post-HSCT avant que les lymphocytes T soient plus nombreux que les lymphocytes B dans les souris (Figure 2.9.6, p.75) et ainsi refléter les proportions attendues qui sont observées chez les patients (288).

En outre, notre étude n'a fait que regarder le développement et l'apparition des différentes populations cellulaires dans le sang périphérique des souris, sans jamais tester leur fonctionnalité. Ainsi, il est possible que les cellules puissent se différencier, mais sans toutefois être fonctionnelles. On rapportait cependant à l'époque que les lymphocytes B issus de ce modèle pouvaient produire des anticorps suite à la stimulation par antigènes (293).

Bien qu'à l'époque de ces expériences, il s'agissait du meilleur modèle disponible pour étudier le développement du système immunitaire, on sait aujourd'hui que plusieurs sous-populations humaines ne survivent pas ou ne sont pas fonctionnelles dans les modèles murins humanisés (291, 294). De plus, on sait également aujourd'hui que l'administration d'IVIg mène à l'anergie des lymphocytes B, qui est causée par l'inhibition de l'expression des CD40, CD80 et CD86 à la surface de ces cellules, et de l'expression de plusieurs gènes responsables du contrôle de la prolifération lymphoïde (*myc*, *p53*, *fas*, *sp1*, *egr1*) (295). Ceci suggère fortement que le mécanisme d'action des IVIG ne soit pas simplement un effet passif (295), mais qu'il puisse effectivement altérer les cellules, ce qui explique que leurs effets dépassent la durée de la demie-vie (136).

Cependant, tant qu'il n'existera pas de modèles murins humanisés robustes permettant de tester la fonctionnalité des cellules issues de la reconstitution immunitaire, il sera plutôt difficile de déterminer avec certitude si les IVIG affectent la qualité de la reconstitution immunitaire post-HSCT. Certains



portent toutefois espoir qu'un tel modèle puisse bientôt voir le jour (296). Ainsi, bien que le modèle utilisé démontre que les lymphocytes B sont présents chez les souris traitées avec IVIG en nombre équivalent au groupe contrôle, leur fonctionnalité n'a pas été testée, si bien qu'il est possible que les IVIG causent l'anergie des lymphocytes B, les empêchant ainsi d'être fonctionnelles post-traitement. Évidemment, le silence fonctionnel de lymphocytes B se traduit par un défaut de l'immunité humorale, ce qui peut être corrigé par l'administration d'IVIG, lesquelles contiennent une multitude d'anticorps, permettant ainsi de fournir passivement une immunité humorale. L'administration d'IVIG post-HSCT ne porterait donc probablement pas directement atteinte au patient, mais il ne s'agit certainement pas d'un usage efficace des IVIG.

#### **4.7 Translation vers la pratique clinique**

---

Bien que toutes les informations acquises lors de la réalisation de ce projet de recherche soient très intéressantes dans une perspective de traitement clinique de la GvHD, on doit se rendre à l'évidence, à l'analyse de certains des résultats, que le contexte particulier du traitement de conditionnement pré-greffe et de prophylaxie rendrait l'ajout des IVIG à haute dose dans le protocole de prophylaxie de la GvHD probablement futile. Effectivement, la nécessité absolue sous IVIG d'avoir des lymphocytes T activés pour l'expansion et l'activation des cellules NK, qui sont responsables de l'effet bénéfique contre la GvHD, s'avère être l'obstacle majeur à l'application de ce traitement dans les protocoles cliniques. Il serait en effet impossible de retirer les immunosuppresseurs (CsA ou autre) du traitement de prophylaxie, ce qui mettrait inévitablement la vie des patients en danger. L'utilisation d'immunosuppresseurs pourrait en outre expliquer les résultats non concluants obtenus lors des années 1990 dans les études cliniques où les IVIG étaient administrées afin de prévenir le développement de la GvHD. Dans notre modèle, lorsque les lymphocytes T activés étaient absents du greffon, que ce soit par leur élimination du greffon pré-greffe, ou par leur inactivation *in vivo* post-greffe, aucune expansion des cellules NK, ni protection contre la GvHD n'étaient observées, malgré le traitement hebdomadaire d'IVIG. Puisque la CsA, ou un immunosuppresseur ciblant les lymphocytes T, fait partie de tous les protocoles de prophylaxie chez les patients qui reçoivent une HSCT, il est raisonnable de penser que l'administration d'IVIG ne donnera aucun effet bénéfique.

Puisqu'on semble toutefois avoir obtenu un certain succès avec les NK induits par les IVIG afin de prévenir la GvHD, on pourrait toutefois tenter de répliquer ces résultats avec des cellules NK activées. Puisque l'administration de CsA inhibe la dégranulation des cellules NK, ainsi que leur production de

cytokines (notamment l'IFN- $\gamma$  et la protéine inflammatoire des macrophages 1 $\beta$  (*macrophage inflammatory proteins* : MIP-1 $\beta$ )) (297, 298), il serait préférable de développer un traitement d'infusion de cellules NK activées *ex vivo*, plutôt que de cibler leur activation *in vivo*. Dans des études pré-cliniques où des cellules NK du donneur préalablement expansées *ex vivo* sont injectées dans des modèles murins de HSCT, la survie des souris est améliorée et la GvHD est diminuée, advenant que les cellules NK soient injectées au moment opportun, ce qui explique sûrement pourquoi on n'a pas obtenu de résultat lors de notre essai de transfert adoptif. En effet, le choix du moment de l'injection est crucial, une injection trop tardive ne faisant qu'exacerber la GvHD (299).

Également, dans des modèles plus complexes où les souris reçoivent la HSCT et les cellules NK dans un contexte leucémique ou d'adénocarcinome, les cellules NK peuvent éliminer les cellules malignes par l'effet GvL, et contribuent parallèlement à diminuer le taux de rechute (56, 299). De nombreuses études ont également démontré que le rétablissement de la population cellulaire NK suite à la HSCT pouvait contribuer à améliorer l'effet GvL (288, 300). Ainsi, l'expansion des cellules NK découlant des traitements aux IVIG ne risquerait pas de mettre en péril l'effet GvL chez les patients, mais plutôt contribuerait à l'améliorer, en plus de réduire la GvHD (55, 301). Notons par ailleurs que l'administration d'IVIG chez des patients de HSCT n'a pas de répercussion négative sur la qualité de l'effet GvL (302).

Ces résultats encourageants ont initié des études cliniques qui explorent la possibilité et la faisabilité d'utiliser des cellules NK haploidentiques dans le cadre d'un traitement d'immunothérapie adoptive pour les leucémies myéloïdes aiguës. Les résultats obtenus à date sont relativement encourageants, où plus de 25% des patients atteignent le stade de rémission de la maladie, sans développement de la GvHD (303-308). L'amélioration du traitement post-greffe des patients de HSCT pourrait donc être étroitement lié au développement d'un protocole optimisé de transfusion de cellules NK autologues activées et expansées *ex vivo*.

## **Chapitre 5    Conclusions et perspectives**

## 5.1 Conclusions

---

Les travaux de recherche effectués dans le cadre de cette thèse ont permis d'élucider en partie l'utilité des IVIG dans la gestion de la GvHD. En effet, on sait désormais que l'administration hebdomadaire d'IVIG à hautes doses permet de ralentir l'incidence de la GvHD et la mortalité qui y est reliée. Cette prévention de la GvHD est dépendante des cellules NK, sans lesquelles les IVIG perdent tout intérêt thérapeutique dans la prévention de la GvHD. Les IVIG à hautes doses ne semblent pas diminuer la rapidité et la qualité de la reconstitution immunitaire, bien que le modèle utilisé ne permette pas de tester l'efficacité fonctionnelle de la reconstitution observée. Qui plus est, nos travaux ont permis de confirmer que l'usage des IVIG dans les protocoles cliniques de prophylaxie de la GvHD, tels qu'ils existent aujourd'hui, ne serait pas un usage efficace de cette ressource clinique très prisée et malheureusement limitée. En effet, on a démontré très clairement que les lymphocytes T activés sont nécessaires et indispensables pour l'obtention de l'effet bénéfique des IVIG dans l'expansion des cellules NK du greffon, qui dispensent la protection contre le développement de la GvHD. Puisque le retrait des immunosuppresseurs dans la gestion post-HSCT des patients n'est pas envisageable, ceci invalide du coup la recommandation du retour des IVIG dans la prophylaxie de la GvHD. Par contre, le recours aux cellules NK pour la gestion du développement de la GvHD devrait être étudié, comme suggéré par nos résultats et plusieurs observations cliniques.

Malheureusement, nos travaux n'ont pas permis de déterminer le mécanisme d'action des IVIG dans la prévention de la GvHD. Par contre, on peut dire avec assurance qu'elles permettent la prolifération des cellules NK cytotoxiques. Les IVIG n'affectent ni la survie, ni la prolifération, ni l'activation des lymphocytes T. Elles ne semblent pas non plus avoir d'effet sur la survie des APC, d'origines murine ou humaine, bien qu'on n'ait pas évalué la fonctionnalité de ces cellules post-traitement aux IVIG. Bien que les IVIG n'affectent pas la présence des APC, elles pourraient être responsables de la perte de leur fonctionnalité, les empêchant ainsi d'apprêter et de présenter des antigènes aux lymphocytes T effecteurs, diminuant ainsi l'incidence de la GvHD. Par contre, les très faibles quantités d'APC au sein de notre modèle rendent très difficile la réalisation des tests permettant de valider cette hypothèse en demeurant fidèlement dans ce contexte expérimental particulier. Le besoin de développer un modèle *in vitro* permettant de tester un tel mécanisme sur les cellules humaines est donc pressant. Bien que les lymphocytes T semblent être activés autant dans le groupe contrôle que dans le groupe expérimental, le contexte expérimental particulier (cellules humaines dans organisme murin) peut embrouiller les résultats observés, en outre par l'activation xénogénique des lymphocytes T. Aussi, il ne faut pas

oublier que les lymphocytes T sont peut-être déjà même activés avant leur injection chez la souris, ce qui pourrait aussi influencer les résultats observés.

## 5.2 Perspectives

---

Comme plusieurs auparavant, on a décrit des effets bénéfiques découlant directement de l'utilisation des IVIG, sans toutefois pouvoir suggérer un mécanisme d'action précis. Il serait donc intéressant et pertinent d'évaluer précisément le rôle des fragments Fc et F(ab')<sub>2</sub> des IVIG dans la prévention du développement de la GvHD. Bien que de nombreuses équipes aient démontré que le fragment Fc des IVIG est responsable de leur effet anti-inflammatoire, notre laboratoire n'a rien démontré en ce sens. Une perspective de travail pour la complétion de ce projet serait de tester l'efficacité des fragments Fc et F(ab')<sub>2</sub> dans leur capacité à induire l'expansion et l'activation des cellules NK responsables de la prévention de la GvHD dans le modèle murin xénogénique. La digestion des IVIG avec la pepsine et la papaïne permet l'isolation des fragments F(ab')<sub>2</sub> et Fc respectivement (309), lesquels pourraient ensuite être utilisés pour la prophylaxie de la GvHD, tel que décrit précédemment et ainsi améliorer la compréhension de leur mécanisme d'action.

Tout comme plusieurs groupes de recherche qui concentrent leurs efforts à comprendre comment la glycosylation et la sialylation peuvent affecter l'effet des IVIG, on pourrait également entreprendre de traiter les IVIG à la PGNase F (peptide *N*-glycosidase F) (168) et à la neuraminidase (309), ce qui les déglycosyle et les désialyle, respectivement. Ainsi, on pourrait évaluer la contribution de la glycosylation et de la sialylation des IVIG sur leur effet préventif contre le développement de la GvHD dans le modèle murin xénogénique.

On pourrait également utiliser des IVIG biotinylées pour le traitement de la GvHD dans le modèle murin xénogénique, de façon à pouvoir tracer sur quelles cellules les IVIG se fixent et/ou sont internalisées (113), ce qui permettrait également d'élucider une partie de leur mécanisme d'action dans la prévention de la GvHD.

Les modèles murins de GvHD s'étant améliorés depuis l'époque du commencement de ce projet de recherche, on pourrait également envisager d'utiliser le modèle NSG-Ab<sup>0</sup>DR4 (257) qui permettrait le développement d'une GvHD humaine allogénique, plutôt que xénogénique, en choisissant un donneur de huPBMCs de profil HLA-DR4 négatif. L'utilisation de ce modèle permettrait de valider les résultats

déjà obtenus dans un contexte allogénique humain, et d'augmenter la pertinence pré-clinique des résultats qui pourraient ultérieurement être obtenus dans ce modèle.

Ces expériences relativement simples permettraient de cerner la portion active des IVIG, et aussi les récepteurs sur lesquels elles se fixent afin d'induire l'expansion et l'activation des cellules NK qui préviennent le développement de la GvHD, ce qui permettrait par la suite d'orienter les futures études sur l'élucidation précise de leur mécanisme d'action.

**Chapitre 6    Troisième article**  
**(projet connexe)**

## 6.1 Mise en contexte du troisième article

---

Au début de ma thèse, le laboratoire du Dr Haddad a commencé à s'intéresser au potentiel immunomodulateur des MSC. Ces cellules sont peu immunogènes et sont donc bien tolérées suite à leur injection chez des receveurs (310), tel que démontré par l'absence de toxicité, de réaction indésirable ou du développement de tissus extra-utérin (311). Ce qui les rend intéressantes du point de vue immunologique est leur propriété immunomodulatrice CMH-indépendante qui permet notamment l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T allogéniques (310).

Dans un modèle murin xénogénique de GvHD chez des souris NOD/*scid*, Tisato *et al* ont démontré l'efficacité des MSC dans la prévention de la GvHD, mais pas de sa guérison une fois celle-ci entamée (312). Ces résultats ont solidifié le potentiel immunomodulateur des MSC, ce qui a certainement pavé la voie vers leur utilisation en cas de dernier recours clinique.

Ce sont les caractéristiques immunomodulatrices des MSC, de pair avec l'absence d'effets secondaires néfastes suite à leur infusion et des résultats préliminaires encourageants dans les modèles murins, qui ont mené à leur utilisation pour le traitement de patients souffrant de GvHD réfractaire aux stéroïdes, pour lesquelles il n'existe aucun protocole clinique efficace. Chez certains de ces patients, l'infusion de MSC s'est avérée bénéfique et s'est soldée par le contrôle de la GvHD (311, 313).

Malgré ces premiers résultats somme toute encourageants pour l'utilisation des MSC dans la prévention ou le traitement de la GvHD, très peu d'information était disponible à l'époque sur la meilleure utilisation qu'il était possible d'en faire. Puisque nous possédons un modèle murin xénogénique de GvHD (314) plus performant que celui de Tisato *et al* (312), et qu'un chercheur collaborateur possède l'expertise pour la dérivation d'une lignée de MSC à partir de sang de cordon ombilical humain (315), nous avons entrepris d'étudier le potentiel immunomodulateur de ces cellules sur la prévention et le développement de la GvHD dans notre modèle murin xénogénique de GvHD. En cours de projet, celui-ci fut pris en charge par une stagiaire post-doctorale qui a complété les travaux en tentant de déterminer le mécanisme d'action des MSC sur la prévention du développement de la GvHD. Ces travaux de recherche ont mené à la publication d'un article où nous sommes toutes deux premières auteures *ex-aqueo*.

Ces travaux furent publiés dans la revue *Stem Cells and Development* en 2012 sous le titre "*Therapeutic Efficacy of Cord Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells for the Prevention of Acute Graft-versus-Host Disease in a Xenogenic Mouse Model*" par Joëlle Gregoire-Gauthier, Silvia Selleri,



François Fontaine, Mame Massar Dieng, Natalie Patey, Geneviève Despars, Christian M. Beauséjour et Elie Haddad.

Joëlle Gregoire-Gauthier, Silvia Selleri, Christian M. Beauséjour et Elie Haddad ont élaboré les plans expérimentaux. Joëlle Gregoire-Gauthier et Silvia Selleri ont effectué les expériences, aidées à l'occasion de François Fontaine et Mame Massar Dieng. Natalie Patey a effectuée les analyses histologiques et Geneviève Despars a fourni les lignées cellulaires pour les résultats présentés à la figure supplémentaire (S1, Figure 6.9.8, p.164). Joëlle Gregoire-Gauthier, Silvia Selleri et Elie Haddad ont analysé les résultats et rédigé l'article.

**"Therapeutic Efficacy of Cord Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells for the Prevention of Acute Graft-versus-Host Disease in a Xenogenic Mouse Model" Gregoire-Gauthier J, Selleri S, Fontaine F, et al. *Stem Cells Dev.* 2012, 21(10):1616-26.**

## **THERAPEUTIC EFFICACY OF CORD BLOOD-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS FOR THE PREVENTION OF ACUTE GVHD IN A XENOGENIC MOUSE MODEL**

\*Gregoire-Gauthier Joëlle<sup>1</sup>, \*Selleri Silvia<sup>1,2</sup>, Fontaine François<sup>1</sup>, Dieng Mame Massar<sup>1</sup>, Patey Natalie<sup>4</sup>, Geneviève Despars<sup>1,5</sup>, Beauséjour Christian M.<sup>1,5</sup>, Haddad Élie<sup>1,2,3</sup>.

\*Both authors contributed equally to this work

<sup>1</sup>CHU Sainte-Justine Research Center, <sup>2</sup>Department of Paediatrics, <sup>3</sup>Department of Microbiology and Immunology, <sup>4</sup>Department of Pathology, <sup>5</sup>Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

**Running head:** GvHD prevention by MSC infusion

Corresponding Author:

Élie Haddad

CHU Sainte-Justine Research Center,

Department of Pediatrics

Université de Montréal,

3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal, QC H3T1C5, Canada.

Phone: 514-345-4713

Fax: 514-345-4897



## 6.2 Abstract

---

Human Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) have been successfully utilized for the treatment of refractory graft-versus-host disease (GvHD). Despite the large number of *in vitro* and *in vivo* models developed for clarifying their immunomodulatory properties, the mechanism of action of MSCs remains elusive and their efficacy controversial.

Here, we tested the ability of cord blood-derived MSCs to alleviate the symptoms of GvHD induced by the injection of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) into NOD/SCID/ $\gamma c^{-}$  (NSG) mice. In this *in vivo* xeno-GvHD model we demonstrate that a single MSCs injection is able to inhibit GvHD in terms of clinical signs and related mortality. We also show that in this model MSCs act by both immunomodulating T-cells and by fostering recovery after irradiation.

The translational impact of these findings could provide a reliable preclinical model for studying the efficacy, dosage, and time of administration of human MSCs for the prevention of acute GvHD.

**Keywords:** NSG mouse, human mesenchymal stromal cells, GvHD

### 6.3 Introduction

---

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the treatment of choice for a large number of malignancies, hematopoietic diseases, and inborn errors of metabolism [1]. Despite the steady progress that has been made in patient survival and quality of life, Graft versus Host Disease (GvHD) remains the major complication of this treatment. Also, morbidity and mortality are still very high for patients with GvHD who are refractory to first line immunosuppressive therapy [2,3]. To date, all the immunosuppressive treatments used to prevent GvHD (i.e. Cyclosporin-A (CsA), mycophenolate mofetil (MMF), steroids, and T-cell depletion) have been shown to increase the risk of tumor relapse by inhibiting the graft versus tumor effect, reinforcing the need to develop new immunomodulatory tools [4]. In the last 10 years, the attention of many clinicians has been attracted to the possible use of mesenchymal stromal cells (MSCs) in the treatment of GvHD [5]. Indeed, MSC infusion has already been demonstrated to be safe and potentially efficacious in treating steroid-resistant GvHD in humans [6-11]. Despite these encouraging data and the demonstration both *in vitro* and *in vivo* that MSCs have strong immunomodulatory properties, their clinical benefit in terms of immune reconstitution and immunosuppression is still debated. Preclinical studies, mainly performed *in vitro*, have demonstrated that MSCs are able to engage in crosstalk with potentially all hematopoietic cells, inducing immune down modulation [12]. This effect seems to be mediated by both soluble factors and direct cell-cell contact [13], but a clear picture of the mechanism(s) involved is still missing, probably because of the large variability of the conditions tested and the source of MSCs, leading some authors to question the immunosuppressive properties of MSCs [14-17]. It has been shown by us and others that injection of human peripheral blood mononuclear cells (huPBMCs) in irradiated NOD/SCID/ $\gamma c^{-}$  (NSG) mice represents a good pre-clinical model of xeno-GvHD [18,19]. We took advantage of this model to test the efficacy of human cord blood-derived MSCs, infused without any additional immunosuppressive therapy, in preventing GvHD and to study their mechanism of action *in vivo*. We focused our attention on cell cycle analysis of human injected T-cells, tissue infiltration by human cells, identification of the cells involved in T-cell activation, and in therapeutic efficacy in terms of animal survival and modulation of clinical signs.

## 6.4 Methods

---

### Cord blood-derived Mesenchymal Stromal Cells

Cord blood samples were obtained from the CHU Sainte-Justine Research Cord Blood Bank following approval by the ethics committee. Human cord blood-derived MSCs were obtained as previously described [20,21], with the modification that by plating cord blood-derived PBMCs ( $10^6$  cells/75cm<sup>2</sup> flask) were initially plated in conditioned medium (alpha-MEM supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, all purchased from Invitrogen, Burlington, Ontario). Conditioned medium was collected after 24 hours incubation over an established bone marrow-derived MSC population and changed twice a week until cells adherent to plastic formed visible colony forming units. Cells were then trypsinized and expanded in regular alpha-MEM medium and characterized for the expression of common MSC markers by flow cytometry. As expected, MSCs were negative for CD45 and CD31 and positive for CD90, CD44 and CD105 (see Fig.S1 – Figure 6.9.8, p.164). No change in the expression of these markers was observed between early (see Benabdallah et al.[22]) and late passage populations (Fig.S1 – Figure 6.9.8, p.164). The expansion of cord blood-MSCs in quantities sufficient for *in vivo* experimentation was possible only following first passage. MSCs were immortalized using lentiviruses expressing both hTERT and a CDK4 mutant gene under the regulation of the CMV constitutive promoter as previously described [23]. In brief,  $2 \times 10^5$  MSCs were exposed to 50 ng each of concentrated p24 equivalent lentiviruses (as determined by ELISA) carrying hTERT and CDK4 mutant genes in presence of 6 µg/ml polybrene. Modified MSCs were expanded over 50 population doublings (PD) without any drug selection while mock transduced MSCs cease proliferation at 20-22 PD with signs of cellular senescence (flattened morphology and expression of the senescence-associated  $\beta$ -galactosidase – data not shown). Late passage and immortalized MSCs retain their ability to differentiate in the osteoblast-like lineage using Alizarin Red staining as previously described [24] (Fig. S1 – Figure 6.9.8, p.164). Of note, the MSCs used in this study could not differentiate in the adipocytic lineage at both early and late passages (data not shown).

### Mice

NOD/LtSz-scidIL2r $\gamma^{-/-}$  (NSG) mice were obtained from the Jackson Laboratory and housed in the animal care facility at the CHU Sainte-Justine Research Centre under specific pathogen-free conditions in sterile ventilated racks. All procedures were previously approved by the institutional

committee for Good Laboratory Practices for Animal Research (GLPAR), as per our research protocol (SST09-22). Irradiated mice were given 0.08 mg/mL ciprofloxacin (Sandoz, Boucherville, Québec) in their drinking water.

### **Xenogenic model of GvHD**

Leukocytes, collected by leukapheresis from healthy donors following informed written consent, were used in the isolation of huPBMCs by Ficoll-Hypaque separation. HuPBMCs were then frozen in FBS with 10% DMSO and stored in liquid nitrogen until needed. Following a 3 Gy irradiation, 6- to 8-week-old mice were injected intraperitoneally with  $10^7$  huPBMCs at day 0 and treated on the same day, with either 100  $\mu$ l of PBS or  $10^6$  MSCs, intravenously. CsA-treated mice (Sandimmune I.V.; Novartis Pharmaceutical, Dorval, Québec) were injected intraperitoneally daily (0.375 mg/mouse). Both the number of injected MSCs and the dose of CsA were decided based on data reported previously [25,26].

### **Assessment of GvHD**

Treated mice were evaluated every other day in a blinded fashion for clinical signs of GvHD and physical appearance. The GvHD assessment scale, inspired by the grading system established by Cooke *et al* [27], refers to weight loss, general appearance of the fur, and mobility to evaluate the development of GvHD. Mice were diagnosed with GvHD based upon a minimum of 10% weight loss, appearance of ruffled fur, and limited mobility [18]. Survival was also noted for each group. As requested by our GLPAR committee, mice were sacrificed when the clinical endpoints were reached (weight loss >20% and appearance of either limited mobility or disruption of general appearance of the mice).

### **Flow cytometry**

For immunophenotypic analysis of circulating lymphocytes, 100  $\mu$ L of peripheral blood was drawn weekly from the saphenous vein of xeno-GvHD mice, and human and murine cell populations were analyzed by flow cytometry. Anti-murine CD45-FITC, and anti-human-CD56-PE, -CD45-APC, and -CD3-APC-Cy7 antibodies (all purchased from BD Biosciences, Mississauga, Ontario) were used to

identify cell populations, along with 7-amino-actinomycin D (7-AAD) for exclusion of nonviable cells from the assay (BD Biosciences). CountBright beads (Invitrogen, Burlington, Ontario) were added prior to FACS acquisition to determine the absolute number of cells in each sample. Samples were acquired on a FACS Aria flow cytometer and analyzed using FACSDiva software (BD Biosciences).

### **Histology and immunohistochemistry**

Organs (liver, spleen, colon, and skin) were fixed in 3.7% formaldehyde immediately after collection and embedded in paraffin. Five  $\mu\text{m}$ -thick sections were obtained and stained for further analysis. Examination was performed after hematoxylin-eosin staining and evaluated for signs of GvHD by a trained pathologist blinded to the clinical data. For human T-cell identification, indirect immunoperoxidase staining was performed with an anti-CD3 antibody (Cellmarque, Rocklin, CA). Apoptotic cells were detected by morphological analysis and both CD3<sup>+</sup> cell and apoptotic cell numbers were quantitatively evaluated per 45 high power fields (x400).

### ***Ex vivo* human cell phenotype and cell cycle analysis**

We sacrificed animals injected with PBMCs and treated with either MSCs, CsA or PBS at day 14 and performed immunophenotype and cell cycling analysis on cells isolated from blood, spleen, and liver. For activation marker analysis, cells were stained with anti-human-CD3-PE-Cy7, -HLA-DR-FITC, -CD69-PerCp-Cy5.5 and -CD8-APC. Cell cycle analysis was performed by surface staining followed by intracellular staining for Ki67-FITC (marker for cells out of G<sub>0</sub> phase). Regulatory T cells (Tregs) were analyzed for cell surface markers (CD4, CD25, CD127) on blood samples, while for organ samples, intracellular staining for forkhead box P3 (FoxP3-APC) was added (fixation and permeabilization solution was used according to the manufacturer's instructions; eBioscience, San Diego, CA). All antibodies were from BD Biosciences.

### **Human dendritic cell differentiation**

In order to differentiate human dendritic cells (DCs) from monocytes, CD14<sup>+</sup> cells were isolated with magnetic beads by positive selection (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) and plated in 6 well plates (10<sup>6</sup> cells/well). Cells were cultivated for 5 days in the presence of human recombinant granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (50 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN) and IL-4 (10 ng/ml; eBioscience). The phenotype of both monocytes (at day 0) and immature DCs (at day 5) was tested by staining cells with the following antibodies: anti-CD14-FITC, -CD1a-APC, -CD80-PE, -CD83-PE, -CD86-PE and -HLA-DR-FITC.

In experiments requiring murine peptide loading into human DCs,  $2 \times 10^5$  splenocytes were isolated from NSG mice and resuspended in 50  $\mu$ l PBS, sonicated, freeze-thawed, and the immature human DCs were loaded for 2 hours at 37°C. Cells were then irradiated (5,400 Rad) and used as targets for T-cell stimulation.

### **Human T-cell isolation and stimulation**

T-cells were purified by magnetic bead negative selection (Miltenyi) and  $2 \times 10^5$  cells were cultivated for 6 days with autologous DCs pulsed or not with NSG antigens (ratio T:DC = 40:1) in 96 multiwell round bottom plates. Alternatively,  $2 \times 10^5$  huPBMCs were co-cultured with  $2 \times 10^5$  NSG-irradiated (5,400 Rad) splenocytes. To test the immunomodulatory effect of MSCs *in vitro*, each condition was also tested in the presence of  $2 \times 10^4$  irradiated MSCs (ratio effector cell:MSC = 10:1). Human cell proliferation was tracked by flow cytometry using the fluorescent dye, carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Invitrogen). Briefly, at day 0, effector cells were resuspended in PBS and stained with CFSE (final concentration 0.625  $\mu$ M) for 7 minutes at room temperature. CFSE incorporation was blocked by adding 1 mL of pure FBS and incubating for 1 minute on ice followed by 2 washes in complete culture medium (RPMI, 10% FBS, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 0.1 mM glutamine). All tested conditions were done in duplicate, one well with CFSE stained cells (in order to test for proliferation) and one with unstained cells (in order to stain for markers of T-cell activation). As read out for the mixed leukocyte reaction (MLR), cells were stained on day 6 with anti-CD3-PE-Cy7, -CD4-APC, -CD8-PE, -HLA-DR-FITC, -CD69-PerCp-Cy5.5, -CD25-PE, and 7-AAD (cell viability dye).

### **Statistics**

Results were analyzed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) and shown as the mean  $\pm$ SEM. Survival and incidence of GvHD statistics were determined using the Mantel-Cox (log-rank) test, which was stratified according to time as needed. Elsewhere, either the t-



test or Mann-Whitney test were used, as specified in each figure legend. Significance was set at  $p \leq 0.05$ .

## 6.5 Results

---

### **MSC treatment increases survival and reduces GvHD incidence upon PBMC injection**

We induced xeno-GvHD by injecting 2 groups of sub-lethally irradiated NSG mice (n=16 per group) with  $10^7$  huPBMCs. The control group was treated with PBS, the other with a single dose of  $10^6$  MSCs. As shown in Figure 6.9.1A (p.157), almost all control mice died within a period of 42 days, whereas mice treated with MSCs at day 0 demonstrated a significant increase in survival ( $p<0.01$ ). Furthermore, injection of MSCs was also associated with a significant reduction of GvHD in terms of clinical signs (weight loss, general appearance of the fur and mobility) when compared to PBS-treated mice ( $p<0.01$ ) (Figure 6.9.1B, p.157).

### **MSCs protect mice from radiation-induced weight loss *in vivo* and reduce human T-cell proliferation**

In different *in vivo* models, MSCs were able to inhibit T-cell activation and T-cell proliferation [28,29]. MSCs were also shown to foster the healing process [30-36] with a major regenerative effect on irradiation-induced tissue damage [37]. Since both these two properties could explain the inhibition of GvHD in our model, we tested the effect of MSCs on tissue following sub-lethal irradiation of NSG mice and treating or not treating them with a single dose of  $10^6$  MSCs. As shown in Figure 6.9.2 (p.158), MSCs significantly prevented radiation-induced weight loss at the early time points.

In order to evaluate a possible effect of MSCs on human T-cell proliferation, we initially compared in blood the proportion of human cells over the total number of circulating CD45+ cells (murine and human) at different time points in PBS- and MSC-treated groups. At every time point (range from 7 to 42 days post-injection) all human leukocytes (CD45+ cells) were T-lymphocytes (CD3+ cells) (data not shown). We observed a significant decrease in the proportion of human cells at day 7 and 14 in the MSC-treated group in comparison with the PBS-treated group (Figure 6.9.3A, p.159). Nevertheless, the absolute count of human CD45+ cells in the PBS-treated group was lower than in the MSC-treated group (Figure 6.9.3B, p.159). The apparent discrepancy between the results based on percentage compared to absolute number was due to the higher number of murine cells in the MSC-treated group (Figure 6.9.3C, p.159).

As immunomodulators, MSCs could either inhibit the effects of human T-cells, consequently allowing the circulation of a higher number of human T-cells, or they could actively inhibit T-cell proliferation.

According to the latter possibility, one would have expected the amount of human cells to be higher in the PBS-treated group than in the MSC-treated group. Yet, our results showed that the absolute number of human CD45<sup>+</sup> cells was not higher in the PBS-treated mice, suggesting that human MSCs do not inhibit T-cell proliferation in this context. Nevertheless, it is also possible that cord blood MSCs inhibit T-cell proliferation but that the effect is not detected because of the higher incidence of GvHD leading to early death in PBS-treated mice. In order to verify this hypothesis, we injected huPBMCs into non-irradiated NSG mice and tested the effect of MSCs compared to PBS. We observed that in absence of radiation-induced damage, MSCs were able to significantly decrease both the percentage and the absolute number of human cells in mice up to 42 days post injection (Figure 6.9.4, p.160). Moreover, we observed that in non-irradiated mice the absolute number of human cells in the peripheral blood of injected animals reached levels that were much higher (about 30-fold more) than these observed in irradiated mice, without killing mice. This indicates that without irradiation, animals are more readily able to tolerate the proliferation of human T-cells (Figure 6.9.4, p.160).

To test the anti-proliferative effect of MSCs in our xeno-GvHD model, mice were sacrificed 2 weeks after the injection of huPBMCs in order to analyze GvHD before mortality occurred. Using this strategy we measured the effect of MSCs compared to PBS or CsA on human T-cell proliferation and GvHD lesions in the liver, a major target organ in xenogenic GvHD [19,38]. CsA was used as control, since this drug is routinely used for GvHD prophylaxis in humans [39], and we have already demonstrated its efficacy in inhibiting GvHD and GvHD-related mortality in our xeno-GvHD model in NSG mice [18]. Liver sections were stained for morphological evaluation of the number of both human T-cells and apoptotic murine hepatocytes. The number of human CD3<sup>+</sup> cells was significantly reduced in both CsA- and MSC-treated mice as compared to PBS-treated mice, while no significant difference was observed between MSC- and CsA-treated mice (Figure 6.9.5A and B, p.161). We also observed a reduced number of apoptotic bodies in the liver sections obtained from MSC and CsA-treated mice as compared to PBS-treated mice (Figure 6.9.5C and D, p.161), although this decrease was not statistically significant. Consistent with the histopathology data, analysis of Ki67 expression revealed that MSC treatment decreased the percentage of cycling human CD4<sup>+</sup> cells in the liver in comparison to PBS treatment, although not to the same extent as CsA (Figure 6.9.5E, p.161). We also analyzed the expression of activation markers on the surface of human T-cells (HLA-DR, CD69 and CD25) in both blood and liver. We observed that MSC treatment did not induce a significant reduction of these markers, while CsA was able to significantly decrease HLA-DR expression in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells, and to induce a moderate although not significant increase of CD69 expression in CD4<sup>+</sup>

cells (Figure 6.9.6, p.162). Moreover, we did not find any increase of Tregs in MSC- and CsA-treated mice as compared to PBS treated mice (data not shown).

Taken together, these data suggest that MSCs ameliorate GvHD by protecting the animal from radiation-induced damage and inhibiting T-cell proliferation.

### **Acute human T-cell activation against NSG cells is mainly driven by human antigen-presenting cells**

We performed *in vitro* experiments aimed to determine if human T-cells were able to trigger xeno-GvHD by interacting with human or murine antigen-presenting cells (APCs). As shown in Figure 6.9.7 (A, B, C and D; p.163), NSG splenocytes failed to stimulate huPBMCs, suggesting that murine major histocompatibility complex could not trigger efficiently the activation of human cells. However, we observed that human DCs loaded with lysates from NSG mice splenocytes could induce autologous human CD4<sup>+</sup> T-cell activation and proliferation (Figure 6.9.7E, F, G and H, p.163). As expected, CD8<sup>+</sup> cells were not stimulated in this experimental setting, since the T-cell activation occurs as a result of HLA class-II presentation by autologous APCs (data not shown). These data indicate that human APCs are able to sample murine antigens and to efficiently present them in the context of human HLA molecules. In this *in vitro* model of xenogenic stimulation, MSCs strongly inhibited T-cell proliferation, and unlike our *in vivo* findings, we observed a significantly decreased expression of the activation marker HLA-DR in the presence of MSCs (Figure 6.9.7F, p.163). We also observed that MSCs induced a very moderate, although not significant, increase of CD69 expression (Figure 6.9.7H, p.163). Moreover, MSCs were unable to induce an immune response or to present NSG antigens to T-cells confirming their status as immuno-privileged cells despite their third-party donor origin (Figure 6.9.7 E, F, G and H, p.163). Taken together, and as already suggested by Wilson *et al* [40], these data suggest that the activation of human T-cells in our xenogenic model of GvHD is mainly due to the presentation of murine antigens by human APCs and that this process can be strongly inhibited by the presence of MSCs.

## 6.6 Discussion

---

Based on their immunomodulatory properties, MSCs have been proposed as a potential treatment for acute GvHD in humans. Several clinical trials have demonstrated their potential efficacy and lack of side effects in patients receiving third party donor MSC infusion [7,8,11]. In order to study the best dosage, administration strategy, and mechanism of action of MSCs, various murine models have been developed [41-43]. In the present study we show that human MSCs are able to inhibit the occurrence of GvHD induced by huPBMC injection in sublethally irradiated NSG mice.

Thus far, the immunomodulatory properties of MSCs *in vivo* have been studied mostly in immunocompetent mice transplanted with mismatched murine bone marrow cells and treated with either murine [42] or human [44] MSCs. The advantage of our model is that it allows one to study *in vivo* both effector cells (T-cells) and MSCs of human origin, and this is an important consideration given the known differences between human and murine MSCs in terms of immune modulation [45,46]. A possible drawback of the NSG xeno-GvHD model is that GvHD, although triggered by human cells, develops in a murine environment and cannot reflect exactly what occurs in the clinical setting after hematopoietic stem cell transplantation. Moreover, huPBMCs are injected without any previous bone marrow transplant. Nevertheless, this approach has the important advantage of modeling the effect of MSCs alone as GvHD treatment, which would be ethically impossible in humans, since for clinical reasons MSC infusion is always accompanied by other immunosuppressive therapies, rendering the interpretation of the clinical results difficult.

To our knowledge the only previous study using human MSCs in immune-deficient mice has been performed with NOD/*scid* animals [41]. These mice, although severely immunocompromised, still present circulating murine natural killer cells and indeed require double the number of PBMCs in order to induce GvHD. In addition, the disease develops considerably later with respect to our model. Moreover, in the aforementioned study, the authors considered the variation of human cells only in terms of percentage, while in the present study we demonstrate that it is possible to observe a discrepancy between the percentage and absolute number of human CD45+ cells, depending on the effect that MSCs have on murine hematopoietic cells.

Another advantage of our model is that one single MSC injection at day 0 was sufficient in order to observe clinical efficacy, while repeated injections were required in the NOD/*scid* model. Regarding the mechanism of GvHD occurrence in PBMC-injected NSG mice, human T-cells could be activated by both murine cells and human APCs present in the graft. Data reported in the literature underline the

necessity for the presence of a donor's DCs in the transplant in order to trigger acute GvHD [40]. Our *in vitro* data support this perspective since murine splenocytes were not able to induce human T-cell proliferation or activation in an MLR while human autologous DCs pulsed with NSG lysate were potent APCs.

MSCs can be derived from various adult and fetal tissues [47]. We performed our experiments using an immortalized cord blood-derived MSC line. Use of an immortalized cell line can be seen as a potential caveat since in the clinical setting only freshly derived and expanded MSCs have so far been accepted for cellular therapy. Nevertheless, our cell line has been tested repeatedly for quality control and has never given rise to a cellular mass (either *in vitro* or *in vivo*). Furthermore, in the context of setting up a humanized mouse model to study the mechanism of action of MSCs to prevent GvHD, the importance of standardizing the quality of the MSCs cannot be overstated. Moreover, it has been shown that although displaying a higher self-renewal and proliferative capacity [48], cord blood-derived MSCs appear to exhibit similar progenitor activity compared with bone marrow-derived MSCs.

In our NSG xeno-GvHD model, MSC-treated mice presented a better clinical picture in several respects; they displayed fewer clinical signs, had less weight loss, and had reduced human T-cell infiltration in the liver (the main GvHD target organ [19,38]). Such clinical improvement occurred despite a lack of downmodulation in the expression of activation markers in blood- and liver-derived human T-cells. Therefore, from these data, it is difficult to determine whether MSCs are acting as immunomodulators or as reparative agents. The importance of MSCs as protective agents has been already underscored in humans [49], but this aspect has so far not been taken into consideration in the proposed animal models. By using irradiated mice not injected with PBMCs, we have shown that MSCs can inhibit weight loss, thereby, demonstrating that MSCs could reduce side effects induced by irradiation. Also, we observed that in irradiated mice injected with PBMCs, MSC treatment was associated with a rise in murine CD45+ cell count that likely accounts for the observed inhibition of radiation-induced bone marrow damage.

In order to isolate the immunomodulatory component of MSC treatment on xeno-GvHD inhibition, we injected huPBMCs into non-irradiated mice. As expected, in this setting MSC treatment decreased both percentage and absolute number of human CD45+ cells. Another indication of the effect of MSCs on human cells is that in mice irradiated and injected with huPBMCs, MSCs lowered the human cell numbers in the liver and their Ki-67 expression. This suggests that the decreased hepatic damage could also be related to the inhibition of proliferation of human T-cells. Altogether, our data strongly

suggests that MSCs inhibited GvHD in our model by acting both as an immunomodulator and reparative agent.

Data reported in the literature suggest that an important component of MSC-induced inhibition of GvHD *in vivo* is mediated by Tregs in [42,44]. In our model we did not find the induction of a T-regulatory phenotype in the effector cell pool upon MSC infusion. This discrepancy can be explained by the different animal models used in the different studies. Indeed, the intriguing aspect of our study is that both MSCs and T-cells are of human origin. Notwithstanding a few case reports [50], very little *in vivo* data are available in humans that are statistically reliable since these studies report a highly variable increase in Tregs after MSC treatment [51,52]. Interestingly, *in vitro* we observed that MSCs induced a moderate although not significant increase of CD69 expression on CD4+ cells. We studied CD69 as an activation marker but also as a marker expressed by regulatory T-cells expressing or not CD25 and FoxP3 [53], and it was shown that MSC are able to promote the sustained expression of this marker [54]. Based on our *in vitro* results we cannot exclude that MSC induce tolerance by fostering the expansion of this particular T-cell regulatory subset.

Concerning the antiproliferative effect of MSCs on human lymphocytes, concomitant with a lack of effect on activation marker expression, this phenomenon, although surprising, has been noted previously [25]. It could be argued that despite their attenuated proliferation, T-cells that still express activation markers could trigger GvHD. Indeed GvHD is significantly delayed but not abolished in MSC-treated mice.

Unlike other studies [55,56], the decrease in human T-cell proliferation induced *in vivo* by MSC injection was not associated with a decreased Th1/Th2 ratio in comparison to the PBS-treated group. Indeed, the analysis of 9 circulating human cytokines (IL 2, IL 4, IL 6, IL 8, IL 10, IL 15, IL 17, TNF  $\alpha$ , and IFN  $\gamma$ ) performed using a customized Bio-Plex Pro Human Cytokine 9-plex Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) did not show any significant differences between PBS- and MSC-treated mice (data not shown). This finding could indicate that in our model MSCs can directly modulate T-cell proliferation in target organs without necessarily modifying the “cytokine storm” observed in the peripheral blood. Interestingly, Christensen et al. [56] showed a modulation of IFN $\gamma$  during the first week after GVHD induction, while our first time point analyzed was at day 6, so it is possible that an earlier test would have revealed some effect due to MSC injection. Nevertheless the difference between the models (we used an humanized NSG model injected with human MSC) could justify discrepancies and doesn't allow further comparisons.

The NSG mouse model is also suitable for comparing MSCs with different established immunosuppressor drugs, like CsA. In our xeno-GvHD model, CsA treatment resulted in the expected outcome by strongly reducing T-cell proliferation and activation marker expression. We have already shown that CsA is able to significantly reduce GvHD-related mortality and clinical signs [18]. Here we have confirmed our previous results and added information regarding the strong downregulation of Ki-67 in human cells in the liver. As compared to CsA, MSC treatment showed various differences, indicating a different modality of T-cell inhibition. Indeed, CsA inhibited both T-cell proliferation and activation while MSCs inhibited only T-cell proliferation. Interestingly, despite the absence of inhibition of T-cell activation and despite a lower inhibition of T-cell cycling, as suggested by the Ki67 test, the absolute T-cell counts in the liver of mice from the two treatment groups were not significantly different. This suggests that MSCs may inhibit the infiltration of human T-cells in GvHD target organs by another mechanism in addition to the inhibition of T-cell proliferation, however, the existence and the nature of such a potential other mechanism remains to be demonstrated.

Taken together our data confirm the NSG mouse as a suitable model for xeno-GvHD development and for testing human MSC infusion as a treatment for human cell-induced GvHD. We suggest that MSC infusion can inhibit GvHD through both reducing T-cell proliferation and fostering healing after irradiation. The translational impact of this animal model could help in determining the best treatment strategies to test in future clinical trials in humans undergoing allogeneic HSCT.



## **6.7 Acknowledgements**

---

This work was funded by La Fondation CHU Sainte-Justine and La Fondation Charles-Bruneau. JGG received a scholarship from La Fondation CHU Sainte-Justine and La Fondation des Étoiles. SS received a scholarship from La Fondation CHU Sainte-Justine.

### **AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT**

No competing financial interests exist.

## 6.8 References

---

1. Appelbaum FR (2007) Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med* 357: 1472-1475.
2. Deeg HJ (2007) How I treat refractory acute GVHD. *Blood* 109: 4119-4126.
3. Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, Martin PJ, Sandmaier BM, Marr KA, Appelbaum FR, Storb R, McDonald GB (2010) Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 363: 2091-2101.
4. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet* 373: 1550-1561.
5. Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R, Masoodi M, Nicolaou A, Baan C, Dahlke MH (2010) The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol* 10: 1496-1500.
6. Baron F, Lechanteur C, Willems E, Bruck F, Baudoux E, Seidel L, Vanbellinghen JF, Hafraoui K, Lejeune M, Gothot A, Fillet G, Beguin Y (2010) Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 16: 838-847.
7. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, Devetten M, Jansen J, Herzig R, Schuster M, Monroy R, Uberti J (2009) Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 15: 804-811.
8. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K (2006) Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 81: 1390-1397.
9. Tolar J, Villeneuve P, Keating A (2011) Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease. *Hum Gene Ther* 22: 257-262.
10. Weng JY, Du X, Geng SX, Peng YW, Wang Z, Lu ZS, Wu SJ, Luo CW, Guo R, Ling W, Deng CX, Liao PJ, Xiang AP (2010) Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 45: 1732-1740.

11. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringden O (2008) Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371: 1579-1586.
12. Zhao S, Wehner R, Bornhauser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M (2010) Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem Cells Dev* 19: 607-614.
13. Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE (2009) Mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci* 1176: 101-117.
14. Sudres M, Norol F, Trenado A, Gregoire S, Charlotte F, Levacher B, Lataillade JJ, Bourin P, Holy X, Vernant JP, Klatzmann D, Cohen JL (2006) Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 176: 7761-7767.
15. Francois M, Romieu-Mourez R, Stock-Martineau S, Boivin MN, Bramson JL, Galipeau J (2009) Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Blood* 114: 2632-2638.
16. Crop MJ, Baan CC, Korevaar SS, Ijzermans JN, Weimar W, Hoogduijn MJ (2010) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation. *Stem Cells Dev* 19: 1843-1853.
17. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE (2006) Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 108: 2114-2120.
18. Gregoire-Gauthier J, Durrieu L, Duval A, Fontaine F, Dieng MM, Bourgey M, Patey-Mariaud de Serre N, Louis I, Haddad E (2011) Use of immunoglobulins in the prevention of GvHD in a xenogeneic NOD/SCID/gammac- mouse model. *Bone Marrow Transplant*.
19. Ito R, Katano I, Kawai K, Hirata H, Ogura T, Kamisako T, Eto T, Ito M (2009) Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. *Transplantation* 87: 1654-1658.

20. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H (2004) Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*.22:625-34.
21. Sueblinvong V, Loi R, Eisenhauer PL, Bernstein IM, Suratt BT, Spees JL, Weiss DJ (2008) Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Respir Crit Care Med* 177:701-11.
22. Benabdallah BF, Allard E, Yao S, Friedman G, Gregory PD, Eliopoulos N, Fradette J, Spees JL, Haddad E, Holmes MC, Beausejour CM (2010) Targeted gene addition to human mesenchymal stromal cells as a cell-based plasma-soluble protein delivery platform. *Cytotherapy* 12: 394-399.
23. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22: 4212-4222.
24. Schilling T, Noth U, Klein-Hitpass L, Jakob F, Schutze N (2007) Plasticity in adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol*;271:1–17.
25. Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, Vidyadaran S, Dazzi F (2008) The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol* 251: 131-136.
26. Gan R, Yin Z, Liu T, Wang L, Tang Y, Song Y (2003) Cyclosporine A effectively inhibits graft-versus-host disease during development of Epstein-Barr virus-infected human B cell lymphoma in SCID mouse. *Cancer Sci* 94: 796-801.
27. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J, Jr., Crawford JM, Ferrara JL (1996) An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 88: 3230-3239.
28. Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Buscher D, Delgado M (2009) Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 136: 978-989.
29. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A (2005) Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 106: 1755-1761.

30. Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Muller-Newen G, Yu D, Floege J (2006) Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 17: 2202-2212.
31. Morigi M, Introna M, Imberti B, Corna D, Abbate M, Rota C, Rottoli D, Benigni A, Perico N, Zoja C, Rambaldi A, Remuzzi A, Remuzzi G (2008) Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells* 26: 2075-2082.
32. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L (2002) Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2199-2204.
33. Hayashi Y, Tsuji S, Tsujii M, Nishida T, Ishii S, Iijima H, Nakamura T, Eguchi H, Miyoshi E, Hayashi N, Kawano S (2008) Topical implantation of mesenchymal stem cells has beneficial effects on healing of experimental colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 326: 523-531.
34. Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA (2007) Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol* 179: 1855-1863.
35. van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, Yarmush ML (2008) Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology* 47: 1634-1643.
36. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD (2002) Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105: 93-98.
37. Lange C, Brunswig-Spickenheier B, Cappallo-Obermann H, Eggert K, Gehling UM, Rudolph C, Schlegelberger B, Cornils K, Zustin J, Spiess AN, Zander AR (2011) Radiation rescue: mesenchymal stromal cells protect from lethal irradiation. *PLoS One* 6: e14486.
38. van Dijken PJ, Wimperis J, Crawford JM, Ferrara JL (1991) Effect of graft-versus-host disease on hematopoiesis after bone marrow transplantation in mice. *Blood* 78: 2773-2779.
39. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, Buckner CD, Clift R, Doney K, Farewell V, et al. (1986) Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med* 314: 729-735.

40. Wilson J, Cullup H, Lourie R, Sheng Y, Palkova A, Radford KJ, Dickinson AM, Rice AM, Hart DN, Munster DJ (2009) Antibody to the dendritic cell surface activation antigen CD83 prevents acute graft-versus-host disease. *J Exp Med* 206: 387-398.
41. Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F (2007) Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* 21: 1992-1999.
42. Joo SY, Cho KA, Jung YJ, Kim HS, Park SY, Choi YB, Hong KM, Woo SY, Seoh JY, Cho SJ, Ryu KH (2010) Mesenchymal stromal cells inhibit graft-versus-host disease of mice in a dose-dependent manner. *Cytotherapy* 12: 361-370.
43. Li H, Guo Z, Jiang X, Zhu H, Li X, Mao N (2008) Mesenchymal stem cells alter migratory property of T and dendritic cells to delay the development of murine lethal acute graft-versus-host disease. *Stem Cells* 26: 2531-2541.
44. Hao L, Gao L, Chen XH, Zou ZM, Zhang X, Kong PY, Zhang C, Peng XG, Sun AH, Wang QY (2011) Human umbilical cord blood-derived stromal cells prevent graft-versus-host disease in mice following haplo-identical stem cell transplantation. *Cytotherapy* 13: 83-91.
45. Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'Huillie A, Zhang J, Lu Y, Roberts AI, Ji W, Zhang H, Rabson AB, Shi Y (2009) Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 27: 1954-1962.
46. Meisel R, Brockers S, Heseler K, Degistirici O, Bulle H, Woite C, Stuhlsatz S, Schwippert W, Jager M, Sorg R, Henschler R, Seissler J, Dilloo D, Daubener W (2011) Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia* 25: 648-654.
47. Bernardo ME, Pagliara D, Locatelli F (2011) Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in Regenerative Medicine? *Bone Marrow Transplant*.
48. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24: 1294-1301.
49. Ringden O, Uzunel M, Sundberg B, Lonnie L, Nava S, Gustafsson J, Henningsohn L, Le Blanc K (2007) Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon. *Leukemia* 21: 2271-2276.

50. Carrion F, Nova E, Ruiz C, Diaz F, Inostroza C, Rojo D, Monckeberg G, Figueroa FE (2010) Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 19: 317-322.
51. Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassis I, Bulte JW, Petrou P, Ben-Hur T, Abramsky O, Slavin S (2010) Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 67: 1187-1194.
52. Sundin M, Barrett AJ, Ringden O, Uzunel M, Lonnie H, Dackland AL, Christensson B, Blanc KL (2009) HSCT recipients have specific tolerance to MSC but not to the MSC donor. *J Immunother* 32: 755-764.
53. Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. (2005) CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 26:136-40.
54. Kronsteiner B, Wolbank S, Peterbauer A, Hackl C, Redl H, Griensven MV, Gabriel C.(2011) Human Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue and Amnion Influence T-Cells Depending on Stimulation Method and Presence of Other Immune Cells. *Stem Cells Dev.* Apr 19
55. Sato K, Ozaki K, Mori M, Muroi K, Ozawa K (2010) Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease : basic aspects and clinical outcomes. *J Clin Exp Hematop* 50: 79-89.
56. Christensen ME, Turner BE, Sinfield LJ, Kollar K, Cullup H, Waterhouse NJ, Hart DN, Atkinson K, Rice AM (2010) Mesenchymal stromal cells transiently alter the inflammatory milieu post-transplant to delay graft-versus-host disease. *Haematologica* 95:2102-2110.

## 6.9 Figure Legends

---

### FIGURE 6.9.1 (p.157).

**MSCs increase survival following induction of xeno-GvHD in NSG mice.** NSG mice were injected with  $10^7$  huPBMCs and treated intravenously with PBS (filled line, n=16) or with  $10^6$  MSCs (dotted line, n=16). In the MSC-treated group both the mortality (A) and the incidence (B) of GvHD in terms of clinical signs is significantly reduced ( $p < 0.01$ ).

### FIGURE 6.9.2 (p.158).

**MSCs have a protective effect against radiation-induced damages.** NSG mice were treated with MSCs (n=3, filled circles) or PBS (n=5, empty circles) upon irradiation (3 Gy). Animal weight was recorded every other day. \* $p \leq 0.05$ , Mann-Whitney one-tailed test.

### FIGURE 6.9.3 (p.159).

**MSCs reduce the percentage but not the absolute number of human cells after xeno-GvHD induction.** Upon injection with  $10^7$  huPBMCs, circulating human and murine CD45+ cells were counted by flow cytometry using counting beads. Results are expressed as a percentage of human CD45+ cells on total CD45+ cells (hCD45/hDC45+mCD45) (A) as well as absolute number of human (B) or murine (C) CD45+ cells. The number of surviving animals at different time points is indicated under the graphs. Black bars: PBS group; white bars: MSC group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ , Mann-Whitney two-tailed test.

### FIGURE 6.9.4 (p.160).

**MSCs reduce both the percentage and the absolute number of human cells in non-irradiated mice injected with PBMCs.** Non-irradiated NSG mice were injected with  $10^7$  huPBMCs and treated intravenously with MSCs (n=3, empty circles) or PBS (n=10, filled circles) \* $p \leq 0.05$  Mann-Whitney two-tailed test.



**FIGURE 6.9.5 (p.161).**

**MSC treatment affects human T-cell proliferation and infiltration and murine cell apoptosis in the liver of NSG mice upon xeno-GvHD induction.** Animals were injected with  $10^7$  huPBMCs, treated with CsA (n=5), PBS (n=5) or MSCs (n=4) and sacrificed 2 weeks later for histopathologic analysis. Infiltrating human CD3<sup>+</sup> cells were detected by immunohistochemistry and were counted in the different treatment groups (A). A representative slide of a PBS-treated mouse (B) shows infiltration of human T-cells (brown colouration by indirect immunoperoxidase staining). Apoptotic bodies were detected by histopathologic analysis and enumerated (C). In (D) apoptotic bodies are indicated (white arrows) in the liver of an animal treated with PBS.

Both human CD3<sup>+</sup> cells and apoptotic cells were counted in 45 different high power fields (400 x magnification). 6 slides per group were analyzed. Human cells were isolated from the liver at time of sacrifice and cell cycle was analyzed using Ki67 (E) \* $p \leq 0.05$ , Mann-Whitney two-tailed test.

**FIGURE 6.9.6 (p.162).**

**MSC injection does not modify the activation marker profile of human T-cells.** Activation marker expression in human CD4<sup>+</sup> (A,B,E,F) and CD8<sup>+</sup> (C,D,G,H) cells isolated from blood (A,C,E,G) and liver (B,D,F,H) of PBMC-injected mice treated with either CsA, PBS or MSCs. Data were collected at day 14 post-injection. \* $p \leq 0.05$ , Mann-Whitney two-tailed test.

**FIGURE 6.9.7 (p.163).**

**Human APCs are able to present murine antigens and trigger T-cell activation.** (A,B,C,D) *In vitro* proliferation and activation marker analysis of huPBMCs stimulated by allogeneic huPBMCs or by NSG splenocytes. E = effector; T = target; NSG = murine splenocytes. Target allogeneic PBMCs and splenocytes were irradiated at 5,400 Rad. (E,F,G,H) Proliferation and activation marker analysis of human CD4<sup>+</sup> T-cells stimulated by autologous dendritic cells (DC) alone or pulsed with NSG lysates (DC<sup>NSG</sup>) with or without 20,000 irradiated MSCs (ratio effector cells:MSC=10:1). \* $p \leq 0.05$ , Mann-Whitney one-tailed test.

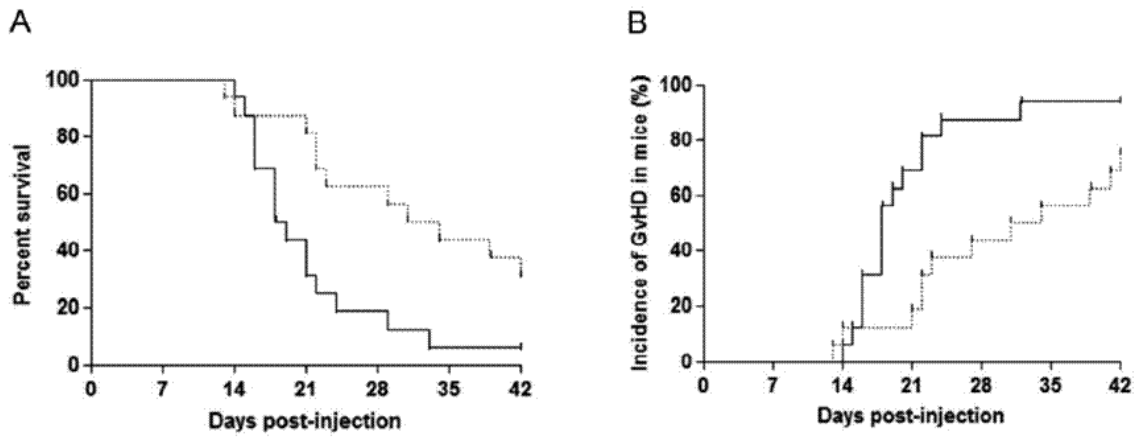


FIGURE 1

Figure 6.9.1 – MSCs increase survival following induction of xeno-GvHD in NSG mice.

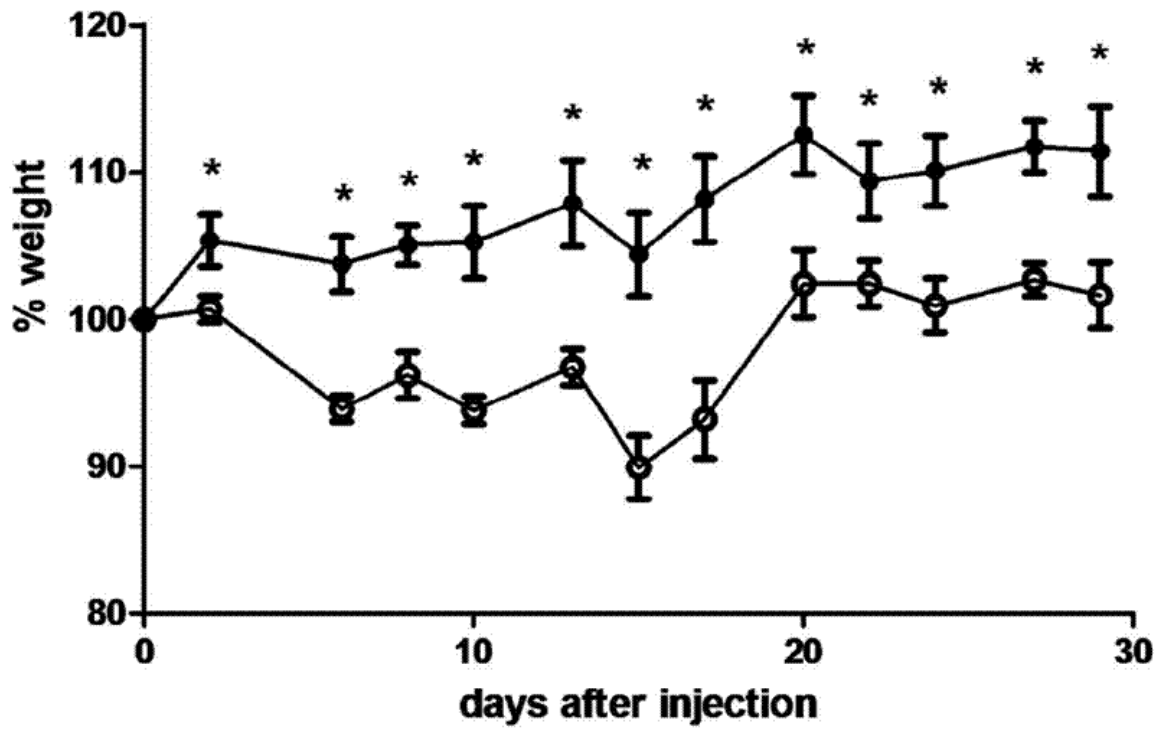


FIGURE 2

Figure 6.9.2 – MSCs have a protective effect against radiation-induced damages.

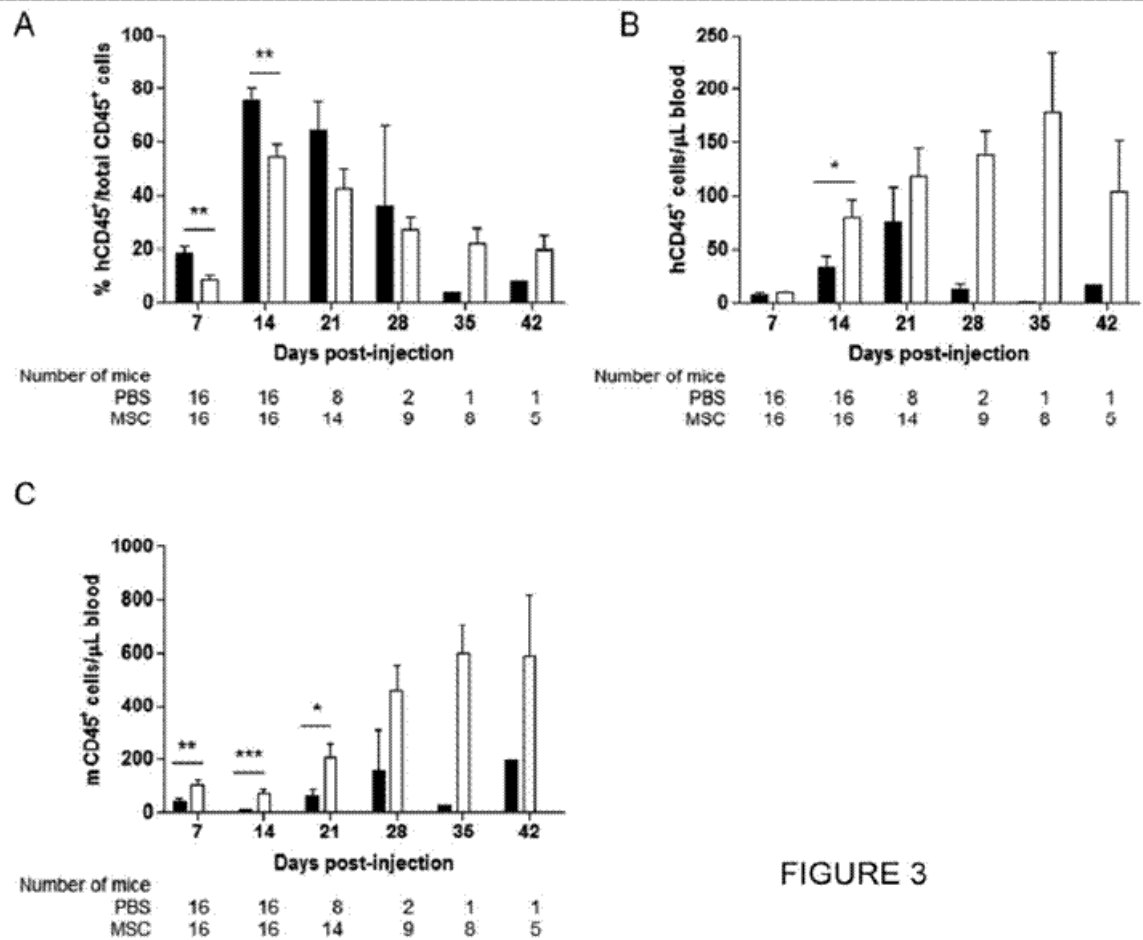
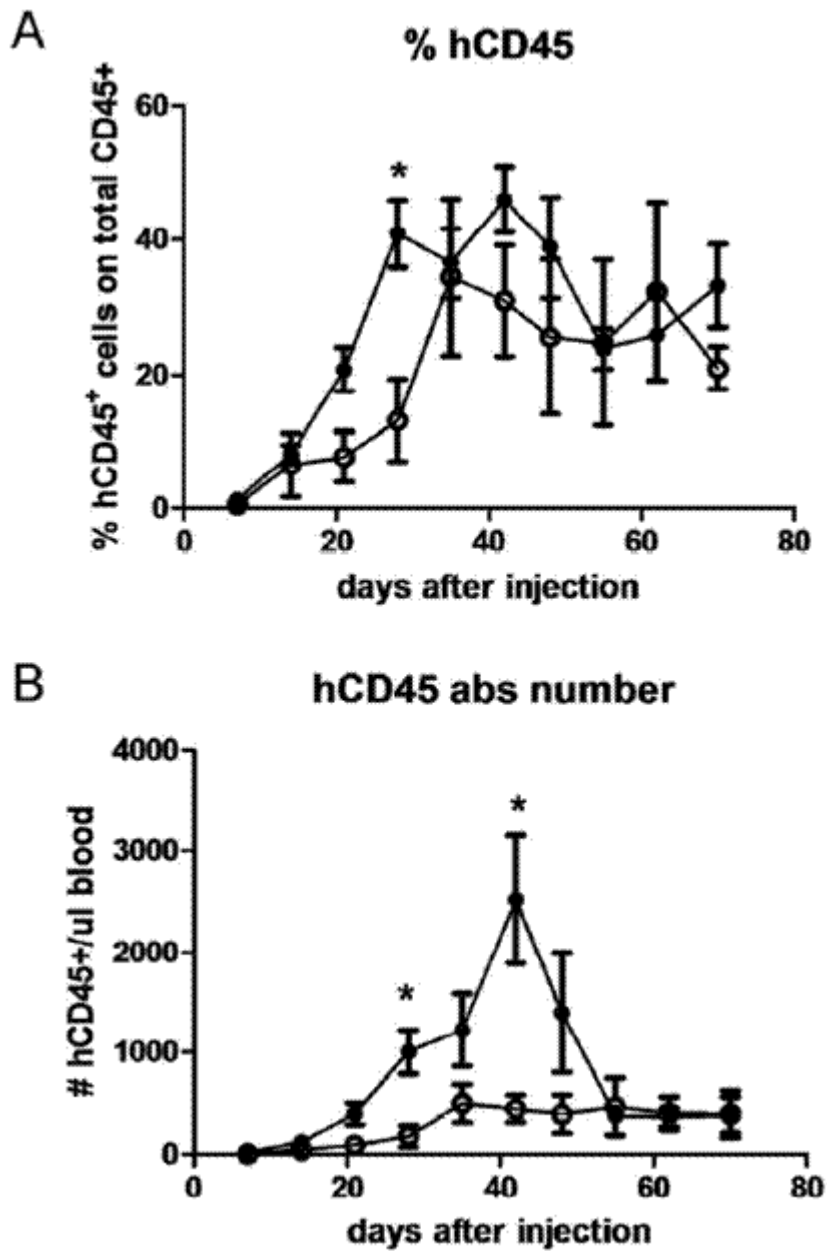


FIGURE 3

Figure 6.9.3 – MSCs reduce the percentage but not the absolute number of human cells after xeno-GvHD induction.



**FIGURE 4**

Figure 6.9.4 – MSCs reduce both the percentage and the absolute number of human cells in non-irradiated mice injected with PBMCs.

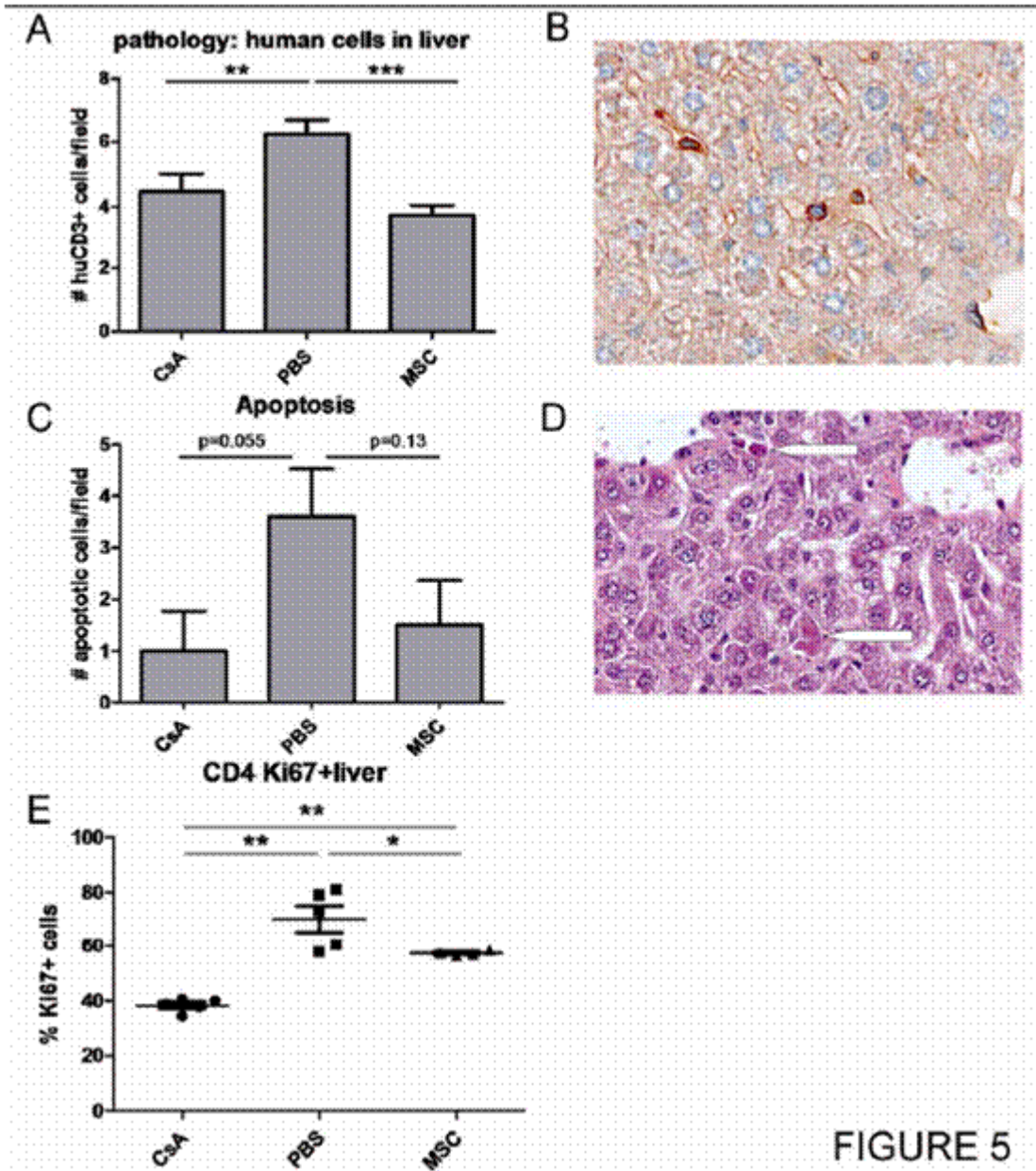


FIGURE 5

Figure 6.9.5 – MSC treatment affects human T-cell proliferation and infiltration and murine cell apoptosis in the liver of NSG mice upon xeno-GvHD induction.

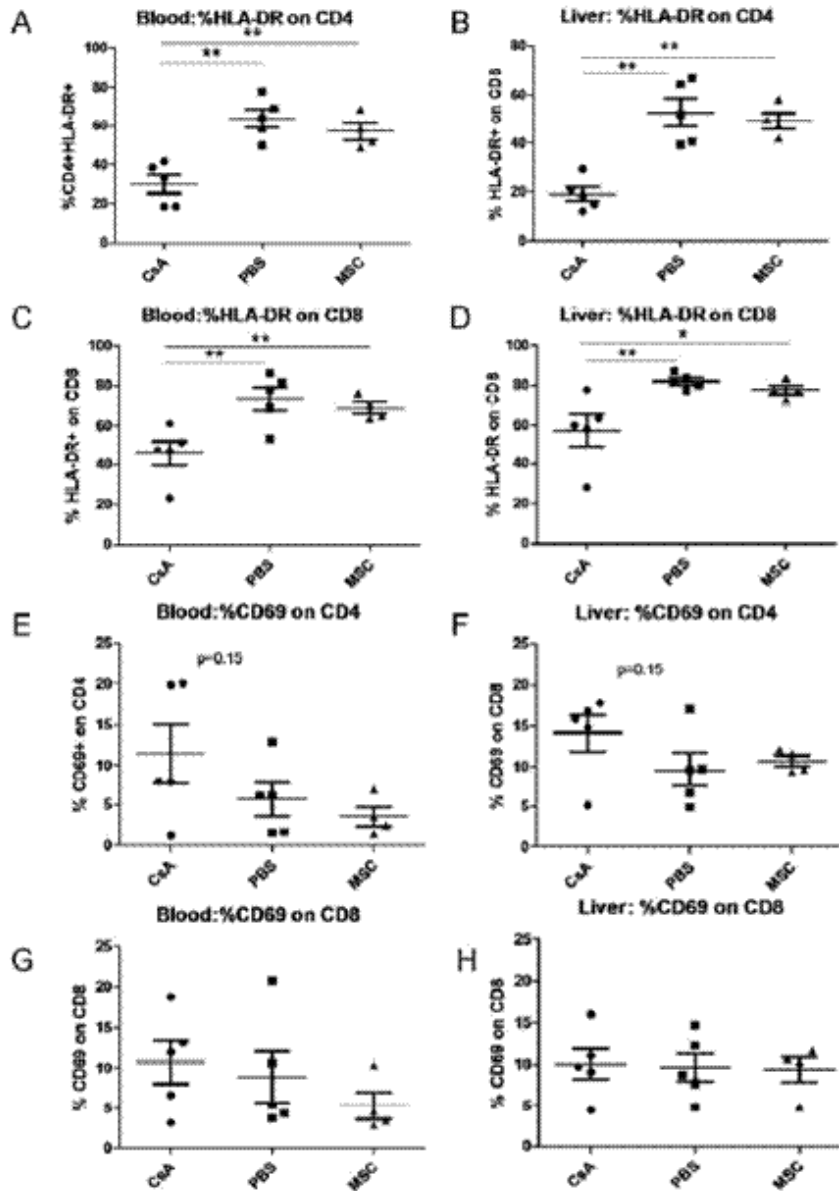


FIGURE 6

Figure 6.9.6 – MSC injection does not modify the activation marker profile of human T-cells.

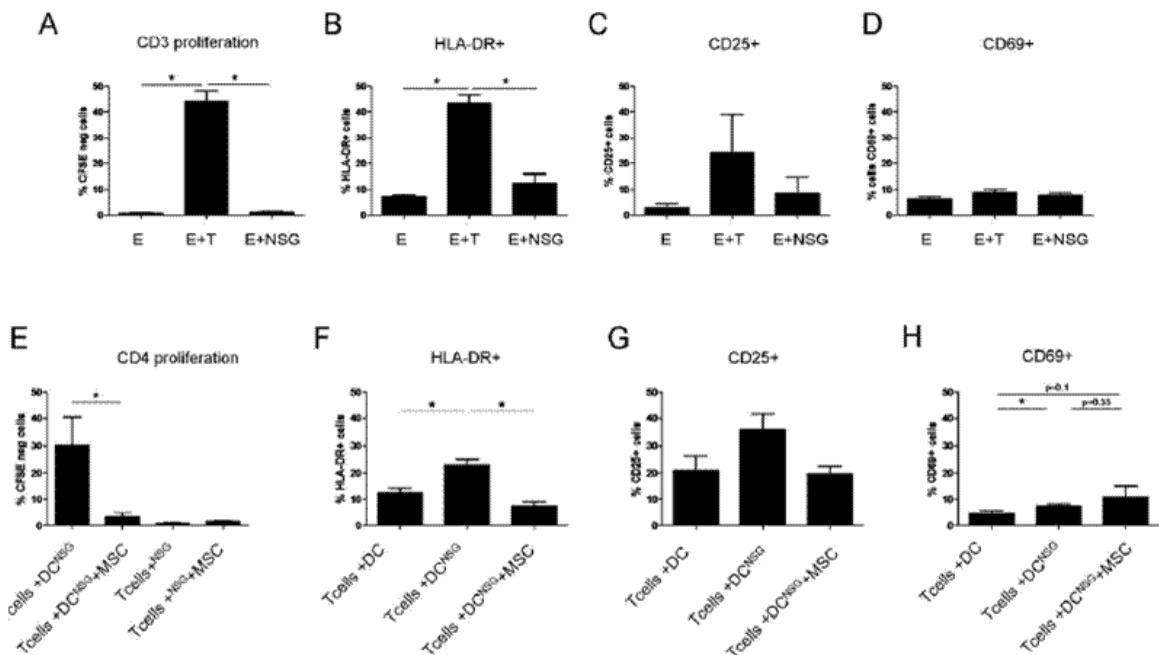
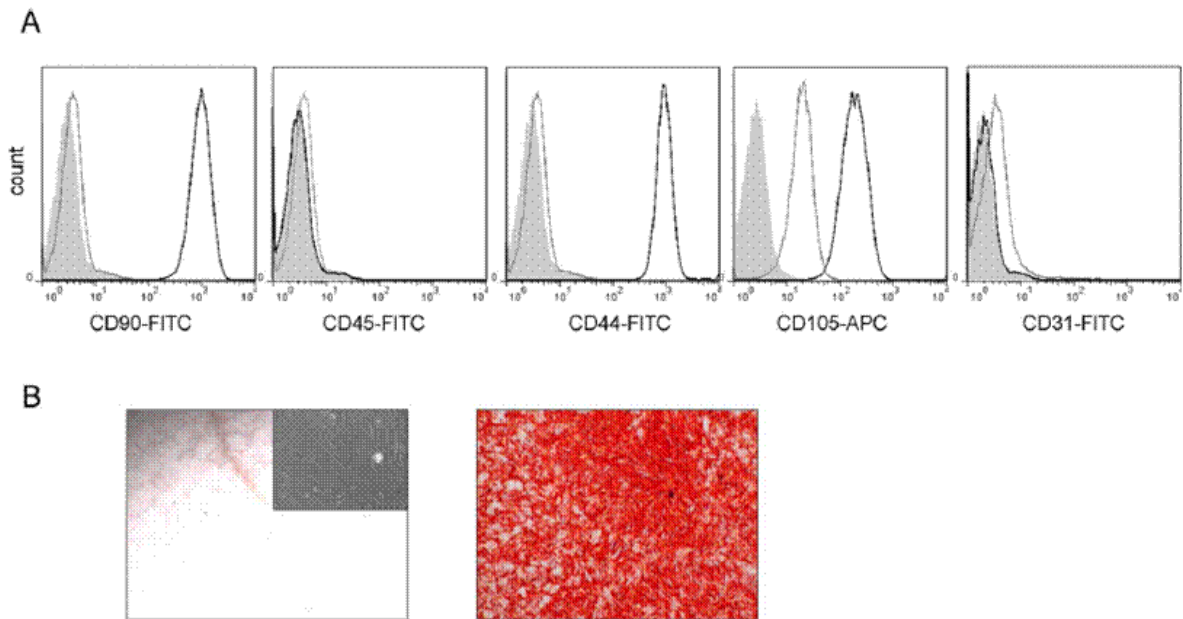


FIGURE 7

Figure 6.9.7 – Human APCs are able to present murine antigens and trigger T-cell activation.





**Figure S1:** Phenotypic profile and ability to mineralize in vitro of late passage (PD 53) cord blood-derived MSCs. In (A) black and gray lines correspond to cytofluorimetric analysis of MSCs stained with the specific antibody or with the isotypic control respectively. Filled in gray are the profiles of unstained MSCs. In (B) cells were cultured or not under osteogenic conditions for 2 weeks and stained with Alizarin Red. Shown in the upper right quadrant of the undifferentiated cells is the phase contrast picture of MSCs at PD 53.

**Figure 6.9.8 – Phenotypic profile and ability to mineralize in vitro of late passage (PD 53) cord blood-derived MSCs.**

## Sources documentaires

---

1. Pasquini MC, Wang Z, Horowitz MM, Gale RP. 2010 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. *Clin Transpl*. 2010:87-105.
2. Holowiecki J. Indications for hematopoietic stem cell transplantation. *Pol Arch Med Wewn*. 2008 Nov;118(11):658-63.
3. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009 May 2;373(9674):1550-61.
4. Riddell SR, Appelbaum FR. Graft-versus-host disease: a surge of developments. *PLoS Med*. 2007 Jul;4(7):e198.
5. Pavletic SZ, Fowler DH. Are we making progress in GVHD prophylaxis and treatment? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:251-64.
6. MacDonald KP, Shlomchik WD, Reddy P. Biology of graft-versus-host responses: recent insights. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Jan;19(1 Suppl):S10-4.
7. Barker JN, Wagner JE. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jul;3(7):526-32.
8. Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, Gagne K, et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Aug;13(8):965-74.
9. Passweg JR, Baldomero H, Gratwohl A, Bregni M, Cesaro S, Dreger P, et al. The EBMT activity survey: 1990-2010. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Jul;47(7):906-23.
10. Shaw PJ, Kan F, Woo Ahn K, Spellman SR, Aljurf M, Ayas M, et al. Outcomes of pediatric bone marrow transplantation for leukemia and myelodysplasia using matched sibling, mismatched related, or matched unrelated donors. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):4007-15.
11. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4576-83.
12. Petersdorf EW. Genetics of graft-versus-host disease: the major histocompatibility complex. *Blood Rev*. 2013 Jan;27(1):1-12.
13. Bray RA, Hurley CK, Kamani NR, Woolfrey A, Muller C, Spellman S, et al. National marrow donor program HLA matching guidelines for unrelated adult donor hematopoietic cell transplants. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Sep;14(9 Suppl):45-53.
14. Harris AC, Ferrara JL, Levine JE. Advances in predicting acute GVHD. *Br J Haematol*. 2013 Feb;160(3):288-302.

15. Cutler C, Ballen KK. Improving outcomes in umbilical cord blood transplantation: state of the art. *Blood Rev.* 2012 Nov;26(6):241-6.
16. Moretta L, Locatelli F, Pende D, Marcenaro E, Mingari MC, Moretta A. Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2011 Jan 20;117(3):764-71.
17. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol.* 2012 Jun;12(6):443-58.
18. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood.* 1997 Oct 15;90(8):3204-13.
19. Faraci M, Caviglia I, Biral E, Morreale G, Giardino S, Garbarino L, et al. Acute graft-versus-host disease in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Single-center experience during 10 yr. *Pediatr Transplant.* 2012 Dec;16(8):887-93.
20. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990 Feb 1;75(3):555-62.
21. Lin YF, Lairson DR, Chan W, Du XL, Leung KS, Kennedy-Nasser AA, et al. Children with acute leukemia: a comparison of outcomes from allogeneic blood stem cell and bone marrow transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* 2011 Jan;56(1):143-51.
22. Nagler A, Labopin M, Shimoni A, Niederwieser D, Mufti GJ, Zander AR, et al. Mobilized peripheral blood stem cells compared with bone marrow as the stem cell source for unrelated donor allogeneic transplantation with reduced-intensity conditioning in patients with acute myeloid leukemia in complete remission: an analysis from the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 Sep;18(9):1422-9.
23. Terszowski G, Passweg JR, Stern M. Natural killer cell immunity after transplantation. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:w13700.
24. Cornetta K, Laughlin M, Carter S, Wall D, Weinthal J, Delaney C, et al. Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Transplantation (COBLT). *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005 Feb;11(2):149-60.
25. Zhang H, Chen J, Que W. A meta-analysis of unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in acute leukemia patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 Aug;18(8):1164-73.
26. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. 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.* 2002 Sep 1;100(5):1611-8.
27. Rocha V, Kabbara N, Ionescu I, Ruggeri A, Purtill D, Gluckman E. Pediatric related and unrelated cord blood transplantation for malignant diseases. *Bone Marrow Transplant.* 2009 Nov;44(10):653-9.

28. Gennery AR, Cant AJ. Cord blood stem cell transplantation in primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007 Dec;7(6):528-34.
29. Kim HO, Oh HJ, Lee JW, Jang PS, Chung NG, Cho B, et al. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: a single institution study of 59 patients. *Korean J Pediatr*. 2013 Jan;56(1):26-31.
30. Oshrine BR, Li Y, Teachey DT, Heimall J, Barrett DM, Bunin N. Immunologic recovery in children after alternative donor allogeneic transplantation for hematologic malignancies: comparison of recipients of partially T cell-depleted peripheral blood stem cells and umbilical cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Nov;19(11):1581-9.
31. Freud AG, Yokohama A, Becknell B, Lee MT, Mao HC, Ferketich AK, et al. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med*. 2006 Apr 17;203(4):1033-43.
32. Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol*. 2003 May;3(5):413-25.
33. Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P, Thiel KS, Vivier E, Carson WE, et al. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood*. 1998 Nov 15;92(10):3647-57.
34. Carson WE, Haldar S, Baiocchi RA, Croce CM, Caligiuri MA. The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 2;91(16):7553-7.
35. Drexler HG, Quentmeier H. FLT3: receptor and ligand. *Growth Factors*. 2004 Jun;22(2):71-3.
36. Gibson FM, Scopes J, Daly S, Rizzo S, Ball SE, Gordon-Smith EC. IL-3 is produced by normal stroma in long-term bone marrow cultures. *Br J Haematol*. 1995 Jul;90(3):518-25.
37. Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*. 1998 Feb 15;91(4):1101-34.
38. Pillai M, Torok-Storb B, Iwata M. Expression and function of IL-7 receptors in marrow stromal cells. *Leuk Lymphoma*. 2004 Dec;45(12):2403-8.
39. Guimond M, Freud AG, Mao HC, Yu J, Blaser BW, Leong JW, et al. In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis. *J Immunol*. 2010 Mar 15;184(6):2769-75.
40. Boos MD, Ramirez K, Kee BL. Extrinsic and intrinsic regulation of early natural killer cell development. *Immunol Res*. 2008;40(3):193-207.
41. Becknell B, Caligiuri MA. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol*. 2005;86:209-39.
42. Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol*. 2013 Dec;34(12):573-82.

43. Grzywacz B, Kataria N, Sikora M, Oostendorp RA, Dzierzak EA, Blazar BR, et al. Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3824-33.
44. Perussia B, Chen Y, Loza MJ. Peripheral NK cell phenotypes: multiple changing of faces of an adapting, developing cell. *Mol Immunol*. 2005 Feb;42(4):385-95.
45. Zhang T, Scott JM, Hwang I, Kim S. Cutting edge: antibody-dependent memory-like NK cells distinguished by FcRgamma deficiency. *J Immunol*. 2013 Feb 15;190(4):1402-6.
46. Jamieson AM, Isnard P, Dorfman JR, Coles MC, Raulet DH. Turnover and proliferation of NK cells in steady state and lymphopenic conditions. *J Immunol*. 2004 Jan 15;172(2):864-70.
47. Zhang Y, Wallace DL, de Lara CM, Ghattas H, Asquith B, Worth A, et al. In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology*. 2007 Jun;121(2):258-65.
48. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):461-9.
49. Chan CJ, Smyth MJ, Martinet L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ*. 2013 Apr 12.
50. Brusilovsky M, Rosental B, Shemesh A, Appel MY, Porgador A. Human NK cell recognition of target cells in the prism of natural cytotoxicity receptors and their ligands. *J Immunotoxicol*. 2012 Jul-Sep;9(3):267-74.
51. Moretta A, Pende D, Locatelli F, Moretta L. Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell transplantation to cure high-risk leukaemias. *Clin Exp Immunol*. 2009 Sep;157(3):325-31.
52. Montaldo E, Del Zotto G, Della Chiesa M, Mingari MC, Moretta A, De Maria A, et al. Human NK cell receptors/markers: A tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A*. 2013 May 6.
53. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011 Jan 7;331(6013):44-9.
54. Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):3119-29.
55. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002 Mar 15;295(5562):2097-100.
56. Chen G, Wu D, Wang Y, Cen J, Feng Y, Sun A, et al. Expanded donor natural killer cell and IL-2, IL-15 treatment efficacy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. 2008 Sep;81(3):226-35.

57. Weisdorf D. GVHD the nuts and bolts. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007;62-7.
58. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2:35.
59. Mohty M. Dendritic cells and acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2007 Sep;48(9):1696-701.
60. Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise D, Antin JH, et al. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood*. 2005 Aug 15;106(4):1495-500.
61. Arora M. GVHD stage/grade interpretation. 2010 [updated 2010 10/14/2010; cited 07/28/2014]; Available from: <http://www.cibmtr.org>.
62. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*. 1966;62:21-78.
63. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2000 May 1;95(9):2754-9.
64. Mohty M, Gaugler B. Inflammatory cytokines and dendritic cells in acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008 Feb;19(1):53-63.
65. Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 1991 Mar 7;324(10):667-74.
66. Chan GW, Gorgun G, Miller KB, Foss FM. Persistence of host dendritic cells after transplantation is associated with graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003 Mar;9(3):170-6.
67. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*. 1999 Jul 16;285(5426):412-5.
68. Reddy P, Maeda Y, Liu C, Krijanovski OI, Korngold R, Ferrara JL. A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med*. 2005 Nov;11(11):1244-9.
69. Bryson JS, Flanagan DL. Role of natural killer cells in the development of graft-versus-host disease. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000 Jun;9(3):307-16.
70. Kotsiou E, Davies JK. New ways to separate graft-versus-host disease and graft-versus-tumour effects after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2013 Jan;160(2):133-45.
71. Morris ES, Hill GR. Advances in the understanding of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2007 Apr;137(1):3-19.

72. Li H, Demetris AJ, McNiff J, Matte-Martone C, Tan HS, Rothstein DM, et al. Profound depletion of host conventional dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, and B cells does not prevent graft-versus-host disease induction. *J Immunol.* 2012 Apr 15;188(8):3804-11.
73. Matte CC, Liu J, Cormier J, Anderson BE, Athanasiadis I, Jain D, et al. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):987-92.
74. Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, Reddy P, Ordemann R, Liu C, et al. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol.* 2004 Jun 15;172(12):7393-8.
75. Zhang Y, Louboutin JP, Zhu J, Rivera AJ, Emerson SG. Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T cell-mediated acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest.* 2002 May;109(10):1335-44.
76. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J.* 1956 Sep 15;2(4993):626-7.
77. Barrett AJ. Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol.* 2008 Sep;142(6):877-88.
78. Bacigalupo A, Van Lint MT, Occhini D, Gualandi F, Lamparelli T, Sogno G, et al. Increased risk of leukemia relapse with high-dose cyclosporine A after allogeneic marrow transplantation for acute leukemia. *Blood.* 1991 Apr 1;77(7):1423-8.
79. Qian L, Wu Z, Shen J. Advances in the treatment of acute graft-versus-host disease. *J Cell Mol Med.* 2013 Jun 26.
80. Mosaad YM. Immunology of hematopoietic stem cell transplant. *Immunol Invest.* 2014;43(8):858-87.
81. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:139-70.
82. Holtan SG, Pasquini M, Weisdorf DJ. Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update. *Blood.* 2014 Jul 17;124(3):363-73.
83. Toubai T, Sun Y, Luker G, Liu J, Luker KE, Tawara I, et al. Host-derived CD8+ dendritic cells are required for induction of optimal graft-versus-tumor responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 2013 May 16;121(20):4231-41.
84. Warren EH, Deeg HJ. Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies. *Tissue Antigens.* 2013 Apr;81(4):183-93.
85. Parmar S, Ritchie DS. Allogeneic transplantation as anticancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2014 Apr;27:38-45.
86. Verneris MR. Natural killer cells and regulatory T cells: how to manipulate a graft for optimal GVL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2013;2013:335-41.
87. Murphy WJ, Parham P, Miller JS. NK cells--from bench to clinic. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 Jan;18(1 Suppl):S2-7.

88. Tanaka M, Kobayashi S, Numata A, Tachibana T, Takasaki H, Maruta A, et al. The impact of the dose of natural killer cells in the graft on severe acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *Leuk Res.* 2012 Jun;36(6):699-703.
89. Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood.* 2010 May 27;115(21):4293-301.
90. Merad M, Hoffmann P, Ranheim E, Slaymaker S, Manz MG, Lira SA, et al. Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat Med.* 2004 May;10(5):510-7.
91. Chen W, Masterman KA, Basta S, Haeryfar SM, Dimopoulos N, Knowles B, et al. Cross-priming of CD8+ T cells by viral and tumor antigens is a robust phenomenon. *Eur J Immunol.* 2004 Jan;34(1):194-9.
92. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, Flournoy N, et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood.* 1977 Apr;49(4):511-33.
93. Storb R, Deeg HJ, Farewell V, Doney K, Appelbaum F, Beatty P, et al. Marrow transplantation for severe aplastic anemia: methotrexate alone compared with a combination of methotrexate and cyclosporine for prevention of acute graft-versus-host disease. *Blood.* 1986 Jul;68(1):119-25.
94. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med.* 1986 Mar 20;314(12):729-35.
95. Smith SL. Immunosuppressive Therapies in Organ Transplantation. *Medscape.* Jun 01, 2002.
96. Messina C, Faraci M, de Fazio V, Dini G, Calo MP, Calore E. Prevention and treatment of acute GvHD. *Bone Marrow Transplant.* 2008 Jun;41 Suppl 2:S65-70.
97. Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat Rev Immunol.* 2013 Mar;13(3):176-89.
98. Nimmerjahn F, Ravetch JV. The antiinflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. *J Exp Med.* 2007 Jan 22;204(1):11-5.
99. Imbach P, Lazarus AH, Kuhne T. Intravenous immunoglobulins induce potentially synergistic immunomodulations in autoimmune disorders. *Vox Sang.* 2010 Apr;98(3 Pt 2):385-94.
100. Rapport annuel 2013-2014 Héma-Québec: Héma-Québec; 2013-2014 Contract No.: Document Number|.
101. Canadian Blood Services. Canadian Blood Services Overall Ig Issues (IV and SC). Canadian Blood Services; 2014.
102. Manna M, Karim S, Brose K, Dallas KL. Are We Appropriately Using Intravenous Immunoglobulin In The Saskatoon Health Region? *Blood.* 2013 Nov 15;122(21):4825.



103. Dietrich G, Kazatchkine MD. Normal immunoglobulin G (IgG) for therapeutic use (intravenous Ig) contain antiidiotypic specificities against an immunodominant, disease-associated, cross-reactive idiotype of human anti-thyroglobulin autoantibodies. *J Clin Invest*. 1990 Mar;85(3):620-5.
104. Dwyer JM. Manipulating the immune system with immune globulin. *N Engl J Med*. 1992 Jan 9;326(2):107-16.
105. Talecris Biotherapeutics Inc. GAMUNEX®-C, [Immune Globulin Injection (Human) 10% Caprylate/Chromatography Purified]. [October 2010; cited October 16, 2012]; Available from: [http://www.grifols.com/Controller?\\_fb=pfch&pAction=\\_factory&file=gamunex.pdf&\\_fp=0&idPortlet=15341&idval=385303](http://www.grifols.com/Controller?_fb=pfch&pAction=_factory&file=gamunex.pdf&_fp=0&idPortlet=15341&idval=385303).
106. Nezlin R. Interactions between immunoglobulin G molecules. *Immunol Lett*. 2010 Aug 16;132(1-2):1-5.
107. Kazatchkine MD, Dietrich G, Hurez V, Ronda N, Bellon B, Rossi F, et al. V region-mediated selection of autoreactive repertoires by intravenous immunoglobulin (i.v.Ig). *Immunol Rev*. 1994 Jun;139:79-107.
108. Tankersley DL, Preston MS, Finlayson JS. Immunoglobulin G dimer: an idiotype-anti-idiotype complex. *Mol Immunol*. 1988 Jan;25(1):41-8.
109. Roux KH, Tankersley DL. A view of the human idiotypic repertoire. Electron microscopic and immunologic analyses of spontaneous idiotype-anti-idiotype dimers in pooled human IgG. *J Immunol*. 1990 Feb 15;144(4):1387-95.
110. Bleeker WK, Teeling JL, Verhoeven AJ, Rigter GM, Agterberg J, Tool AT, et al. Vasoactive side effects of intravenous immunoglobulin preparations in a rat model and their treatment with recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase. *Blood*. 2000 Mar 1;95(5):1856-61.
111. Tankersley DL. Dimer formation in immunoglobulin preparations and speculations on the mechanism of action of intravenous immune globulin in autoimmune diseases. *Immunol Rev*. 1994 Jun;139:159-72.
112. Bonilla FA. Intravenous immunoglobulin: adverse reactions and management. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Dec;122(6):1238-9.
113. Tha-In T, Metselaar HJ, Tilanus HW, Groothuismink ZM, Kuipers EJ, de Man RA, et al. Intravenous immunoglobulins suppress T-cell priming by modulating the bidirectional interaction between dendritic cells and natural killer cells. *Blood*. 2007 Nov 1;110(9):3253-62.
114. Dalakas MC. Intravenous immune globulin therapy for neurologic diseases. *Ann Intern Med*. 1997 May 1;126(9):721-30.
115. Blasczyk R, Westhoff U, Grosse-Wilde H. Soluble CD4, CD8, and HLA molecules in commercial immunoglobulin preparations. *Lancet*. 1993 Mar 27;341(8848):789-90.
116. Bendtzen K, Hansen MB, Ross C, Svenson M. High-avidity autoantibodies to cytokines. *Immunol Today*. 1998 May;19(5):209-11.

117. Svenson M, Hansen MB, Ross C, Diamant M, Rieneck K, Nielsen H, et al. Antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a dominant anti-cytokine activity in human IgG preparations. *Blood*. 1998 Mar 15;91(6):2054-61.
118. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):355-65.
119. Prasad NK, Papoff G, Zeuner A, Bonnin E, Kazatchkine MD, Ruberti G, et al. Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway. *J Immunol*. 1998 Oct 1;161(7):3781-90.
120. Ryan ME, Webster ML, Statler JD. Adverse effects of intravenous immunoglobulin therapy. *Clin Pediatr (Phila)*. 1996 Jan;35(1):23-31.
121. Stangel M, Hartung HP, Marx P, Gold R. Side effects of high-dose intravenous immunoglobulins. *Clin Neuropharmacol*. 1997 Oct;20(5):385-93.
122. NIH consensus conference. Intravenous immunoglobulin. Prevention and treatment of disease. *JAMA*. 1990 Dec 26;264(24):3189-93.
123. Bayry J, Thirion M, Misra N, Thorenoor N, Delignat S, Lacroix-Desmazes S, et al. Mechanisms of action of intravenous immunoglobulin in autoimmune and inflammatory diseases. *Neurol Sci*. 2003 Oct;24 Suppl 4:S217-21.
124. Gelfand EW. Intravenous immune globulin in autoimmune and inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 2013 Feb 21;368(8):777.
125. Negi VS, Elluru S, Siberil S, Graff-Dubois S, Mouthon L, Kazatchkine MD, et al. Intravenous immunoglobulin: an update on the clinical use and mechanisms of action. *J Clin Immunol*. 2007 May;27(3):233-45.
126. Sullivan KM, Kopecky KJ, Jocom J, Fisher L, Buckner CD, Meyers JD, et al. Immunomodulatory and antimicrobial efficacy of intravenous immunoglobulin in bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1990 Sep 13;323(11):705-12.
127. Darabi K, Abdel-Wahab O, Dzik WH. Current usage of intravenous immune globulin and the rationale behind it: the Massachusetts General Hospital data and a review of the literature. *Transfusion*. 2006 May;46(5):741-53.
128. Abdel-Mageed A, Graham-Pole J, Del Rosario ML, Longmate J, Ochoa S, Amylon M, et al. Comparison of two doses of intravenous immunoglobulin after allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant*. 1999 May;23(9):929-32.
129. Winston DJ, Antin JH, Wolff SN, Bierer BE, Small T, Miller KB, et al. A multicenter, randomized, double-blind comparison of different doses of intravenous immunoglobulin for prevention of graft-versus-host disease and infection after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Jul;28(2):187-96.
130. Kapoor N. Graft-versus-host disease and immunosuppression. *Immunol Res*. 2008;41(1):34-44.

131. Cordonnier C, Chevret S, Legrand M, Rafi H, Dhedin N, Lehmann B, et al. Should immunoglobulin therapy be used in allogeneic stem-cell transplantation? A randomized, double-blind, dose effect, placebo-controlled, multicenter trial. *Ann Intern Med.* 2003 Jul 1;139(1):8-18.
132. Sokos DR, Berger M, Lazarus HM. Intravenous immunoglobulin: appropriate indications and uses in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8(3):117-30.
133. Raanani P, Gafer-Gvili A, Paul M, Ben-Bassat I, Leibovici L, Shpilberg O. Immunoglobulin prophylaxis in hematopoietic stem cell transplantation: systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2009 Feb 10;27(5):770-81.
134. Schmidt-Hieber M, Schwarck S, Stroux A, Thiel E, Ganepola S, Uharek L, et al. Prophylactic i.v. Igs in patients with a high risk for CMV after allo-SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2009 Aug;44(3):185-92.
135. Durandy A, Kaveri SV, Kuijpers TW, Basta M, Miescher S, Ravetch JV, et al. Intravenous immunoglobulins--understanding properties and mechanisms. *Clin Exp Immunol.* 2009 Dec;158 Suppl 1:2-13.
136. Tha-In T, Bayry J, Metselaar HJ, Kaveri SV, Kwekkeboom J. Modulation of the cellular immune system by intravenous immunoglobulin. *Trends Immunol.* 2008 Dec;29(12):608-15.
137. Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med.* 2001 Sep 6;345(10):747-55.
138. Tha-In T, Metselaar HJ, Bushell AR, Kwekkeboom J, Wood KJ. Intravenous immunoglobulins promote skin allograft acceptance by triggering functional activation of CD4+Foxp3+ T cells. *Transplantation.* 2010 Jun 27;89(12):1446-55.
139. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:275-90.
140. Anthony RM, Ravetch JV. A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *J Clin Immunol.* 2010 May;30 Suppl 1:S9-14.
141. Willcocks LC, Smith KG, Clatworthy MR. Low-affinity Fcγ receptors, autoimmunity and infection. *Expert Rev Mol Med.* 2009;11:e24.
142. Siragam V, Crow AR, Brinc D, Song S, Freedman J, Lazarus AH. Intravenous immunoglobulin ameliorates ITP via activating Fc γ receptors on dendritic cells. *Nat Med.* 2006 Jun;12(6):688-92.
143. Aubin E, Lemieux R, Bazin R. Indirect inhibition of in vivo and in vitro T-cell responses by intravenous immunoglobulins due to impaired antigen presentation. *Blood.* 2010 Mar 4;115(9):1727-34.
144. Anthony RM, Wermeling F, Karlsson MC, Ravetch JV. Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 16;105(50):19571-8.
145. von Gunten S, Simon HU. Natural anti-Siglec autoantibodies mediate potential immunoregulatory mechanisms: implications for the clinical use of intravenous immunoglobulins (IVIg). *Autoimmun Rev.* 2008 Jun;7(6):453-6.

146. Anthony RM, Nimmerjahn F. The role of differential IgG glycosylation in the interaction of antibodies with FcγRs in vivo. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011 Feb;16(1):7-14.
147. Basta M. Ambivalent effect of immunoglobulins on the complement system: activation versus inhibition. *Mol Immunol*. 2008 Oct;45(16):4073-9.
148. Basta M, Dalakas MC. High-dose intravenous immunoglobulin exerts its beneficial effect in patients with dermatomyositis by blocking endomysial deposition of activated complement fragments. *J Clin Invest*. 1994 Nov;94(5):1729-35.
149. Lutz HU, Stammler P, Jelezarova E, Nater M, Spath PJ. High doses of immunoglobulin G attenuate immune aggregate-mediated complement activation by enhancing physiologic cleavage of C3b in C3bn-IgG complexes. *Blood*. 1996 Jul 1;88(1):184-93.
150. Maddur MS, Vani J, Hegde P, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J. Inhibition of differentiation, amplification, and function of human TH17 cells by intravenous immunoglobulin. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar;127(3):823-30 e1-7.
151. Carlson MJ, West ML, Coghill JM, Panoskaltis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood*. 2009 Feb 5;113(6):1365-74.
152. Iclozan C, Yu Y, Liu C, Liang Y, Yi T, Anasetti C, et al. T helper17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Feb;16(2):170-8.
153. Ballou M. The IgG molecule as a biological immune response modifier: mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Feb;127(2):315-23; quiz 24-5.
154. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Madaio MP, Ravetch JV. Pathology and protection in nephrotoxic nephritis is determined by selective engagement of specific Fc receptors. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):789-97.
155. Tackenberg B, Jelcic I, Baerenwaldt A, Oertel WH, Sommer N, Nimmerjahn F, et al. Impaired inhibitory Fcγ receptor IIB expression on B cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 24;106(12):4788-92.
156. Tackenberg B, Nimmerjahn F, Lunemann JD. Mechanisms of IVIG efficacy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Clin Immunol*. 2010 May;30 Suppl 1:S65-9.
157. Nikolova KA, Tchobanov AI, Djoumerska-Alexieva IK, Nikolova M, Vassilev TL. Intravenous immunoglobulin up-regulates the expression of the inhibitory FcγIIIB receptor on B cells. *Immunol Cell Biol*. 2009 Oct;87(7):529-33.
158. Anthony RM, Wermeling F, Ravetch JV. Novel roles for the IgG Fc glycan. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Apr;1253:170-80.

159. Bruhns P, Samuelsson A, Pollard JW, Ravetch JV. Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease. *Immunity*. 2003 Apr;18(4):573-81.
160. Samuelsson A, Towers TL, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science*. 2001 Jan 19;291(5503):484-6.
161. Siragam V, Brinc D, Crow AR, Song S, Freedman J, Lazarus AH. Can antibodies with specificity for soluble antigens mimic the therapeutic effects of intravenous IgG in the treatment of autoimmune disease? *J Clin Invest*. 2005 Jan;115(1):155-60.
162. Crow AR, Song S, Freedman J, Helgason CD, Humphries RK, Siminovitch KA, et al. IVIg-mediated amelioration of murine ITP via FcγRIIB is independent of SHIP1, SHP-1, and Btk activity. *Blood*. 2003 Jul 15;102(2):558-60.
163. Huang HS, Sun DS, Lien TS, Chang HH. Dendritic cells modulate platelet activity in IVIg-mediated amelioration of ITP in mice. *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):5002-9.
164. Jacobi C, Claus M, Wildemann B, Wingert S, Korporal M, Romisch J, et al. Exposure of NK cells to intravenous immunoglobulin induces IFN gamma release and degranulation but inhibits their cytotoxic activity. *Clin Immunol*. 2009 Dec;133(3):393-401.
165. Boruchov AM, Heller G, Veri MC, Bonvini E, Ravetch JV, Young JW. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest*. 2005 Oct;115(10):2914-23.
166. Abe J, Jibiki T, Noma S, Nakajima T, Saito H, Terai M. Gene expression profiling of the effect of high-dose intravenous Ig in patients with Kawasaki disease. *J Immunol*. 2005 May 1;174(9):5837-45.
167. Bayry J, Bansal K, Kazatchkine MD, Kaveri SV. DC-SIGN and alpha2,6-sialylated IgG Fc interaction is dispensable for the anti-inflammatory activity of IVIg on human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 3;106(9):E24; author reply E5.
168. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. 2006 Aug 4;313(5787):670-3.
169. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:21-50.
170. Anthony RM, Nimmerjahn F, Ashline DJ, Reinhold VN, Paulson JC, Ravetch JV. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science*. 2008 Apr 18;320(5874):373-6.
171. Schwab I, Biburger M, Kronke G, Schett G, Nimmerjahn F. IVIg-mediated amelioration of ITP in mice is dependent on sialic acid and SIGNR1. *Eur J Immunol*. 2012 Apr;42(4):826-30.
172. Leontyev D, Katsman Y, Ma XZ, Miescher S, Kasermann F, Branch DR. Sialylation-independent mechanism involved in the amelioration of murine immune thrombocytopenia using intravenous gammaglobulin. *Transfusion*. 2012 Aug;52(8):1799-805.

173. von Gunten S, Shoenfeld Y, Blank M, Branch DR, Vassilev T, Kasermann F, et al. IVIG pluripotency and the concept of Fc-sialylation: challenges to the scientist. *Nat Rev Immunol*. 2014 May;14(5):349.
174. Guhr T, Bloem J, Derksen NI, Wuhler M, Koenderman AH, Aalberse RC, et al. Enrichment of sialylated IgG by lectin fractionation does not enhance the efficacy of immunoglobulin G in a murine model of immune thrombocytopenia. *PLoS One*. 2011;6(6):e21246.
175. Nagelkerke SQ, Dekkers G, Kustiawan I, van de Bovenkamp FS, Geissler J, Plomp R, et al. Inhibition of FcγR-mediated phagocytosis by IVIg is independent of IgG-Fc sialylation and FcγRIIb in human macrophages. *Blood*. 2014 Oct 28.
176. Scallon BJ, Tam SH, McCarthy SG, Cai AN, Raju TS. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol Immunol*. 2007 Mar;44(7):1524-34.
177. Saphire EO, Parren PW, Pantophlet R, Zwick MB, Morris GM, Rudd PM, et al. Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1155-9.
178. Cantoni N, Weisser M, Buser A, Arber C, Stern M, Heim D, et al. Infection prevention strategies in a stem cell transplant unit: impact of change of care in isolation practice and routine use of high dose intravenous immunoglobulins on infectious complications and transplant related mortality. *Eur J Haematol*. 2009 Aug;83(2):130-8.
179. Teeling JL, Jansen-Hendriks T, Kuijpers TW, de Haas M, van de Winkel JG, Hack CE, et al. Therapeutic efficacy of intravenous immunoglobulin preparations depends on the immunoglobulin G dimers: studies in experimental immune thrombocytopenia. *Blood*. 2001 Aug 15;98(4):1095-9.
180. Trepanier P, Bazin R. Intravenous immunoglobulin (IVIg) inhibits CD8 cytotoxic T-cell activation. *Blood*. 2012 Sep 27;120(13):2769-70.
181. Tawfik DS, Cowan KR, Walsh AM, Hamilton WS, Goldman FD. Exogenous immunoglobulin downregulates T-cell receptor signaling and cytokine production. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012 Feb;23(1):88-95.
182. Tha-In T, Metselaar HJ, Tilanus HW, Boor PP, Mancham S, Kuipers EJ, et al. Superior immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulins on human T-cells and dendritic cells: comparison to calcineurin inhibitors. *Transplantation*. 2006 Jun 27;81(12):1725-34.
183. Andersson U, Bjork L, Skansen-Saphir U, Andersson J. Pooled human IgG modulates cytokine production in lymphocytes and monocytes. *Immunol Rev*. 1994 Jun;139:21-42.
184. Modiano JF, Amran D, Lack G, Bradley K, Ball C, Domenico J, et al. Posttranscriptional regulation of T-cell IL-2 production by human pooled immunoglobulin. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997 Apr;83(1):77-85.
185. van Schaik IN, Lundkvist I, Vermeulen M, Brand A. Polyvalent immunoglobulin for intravenous use interferes with cell proliferation in vitro. *J Clin Immunol*. 1992 Sep;12(5):325-34.

186. Vuist WM, Van Schaik IN, Van Lint M, Brand A. The growth arresting effect of human immunoglobulin for intravenous use is mediated by antibodies recognizing membrane glycolipids. *J Clin Immunol*. 1997 Jul;17(4):301-10.
187. Andersson UG, Bjork L, Skansen-Saphir U, Andersson JP. Down-regulation of cytokine production and interleukin-2 receptor expression by pooled human IgG. *Immunology*. 1993 Jun;79(2):211-6.
188. Arend WP, Smith MF, Jr., Janson RW, Joslin FG. IL-1 receptor antagonist and IL-1 beta production in human monocytes are regulated differently. *J Immunol*. 1991 Sep 1;147(5):1530-6.
189. Ruiz de Souza V, Carreno MP, Kaveri SV, Ledur A, Sadeghi H, Cavaillon JM, et al. Selective induction of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 in human monocytes by normal polyspecific IgG (intravenous immunoglobulin). *Eur J Immunol*. 1995 May;25(5):1267-73.
190. Amran D, Renz H, Lack G, Bradley K, Gelfand EW. Suppression of cytokine-dependent human T-cell proliferation by intravenous immunoglobulin. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994 Nov;73(2):180-6.
191. Toyoda M, Zhang XM, Petrosian A, Wachs K, Moudgil A, Jordan SC. Inhibition of allospecific responses in the mixed lymphocyte reaction by pooled human gamma-globulin. *Transpl Immunol*. 1994 Dec;2(4):337-41.
192. Gupta M, Noel GJ, Schaefer M, Friedman D, Bussel J, Johann-Liang R. Cytokine modulation with immune gamma-globulin in peripheral blood of normal children and its implications in Kawasaki disease treatment. *J Clin Immunol*. 2001 May;21(3):193-9.
193. MacMillan HF, Lee T, Issekutz AC. Intravenous immunoglobulin G-mediated inhibition of T-cell proliferation reflects an endogenous mechanism by which IgG modulates T-cell activation. *Clin Immunol*. 2009 Aug;132(2):222-33.
194. Caccavelli L, Field AC, Betin V, Dreillard L, Belair MF, Bloch MF, et al. Normal IgG protects against acute graft-versus-host disease by targeting CD4(+)CD134(+) donor alloreactive T cells. *Eur J Immunol*. 2001 Sep;31(9):2781-90.
195. Sooryanarayana, Prasad N, Bonnin E, Pashov A, Ben Jilani K, Ameisen JC, et al. Phosphorylation of Bcl-2 and mitochondrial changes are associated with apoptosis of lymphoblastoid cells induced by normal immunoglobulin G. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Nov 2;264(3):896-901.
196. Daniel PT, Scholz C, Essmann F, Westermann J, Pezzutto A, Dorken B. CD95/Fas-triggered apoptosis of activated T lymphocytes is prevented by dendritic cells through a CD58-dependent mechanism. *Exp Hematol*. 1999 Sep;27(9):1402-8.
197. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Carbonneil C, Misra N, Donkova V, Pashov A, et al. Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood*. 2003 Jan 15;101(2):758-65.

198. Aubin E, Proulx DP, Trepanier P, Lemieux R, Bazin R. Prevention of T cell activation by interference of internalized intravenous immunoglobulin (IVIg) with MHC II-dependent native antigen presentation. *Clin Immunol.* 2011 Dec;141(3):273-83.
199. Othy S, Bruneval P, Topcu S, Dugail I, Delers F, Lacroix-Desmazes S, et al. Effect of IVIg on human dendritic cell-mediated antigen uptake and presentation: Role of lipid accumulation. *J Autoimmun.* 2012 Sep;39(3):168-72.
200. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 1997 Feb;9(1):10-6.
201. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):245-52.
202. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:233-58.
203. Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity.* 1998 Jan;8(1):89-95.
204. Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol.* 1993 Sep 1;151(5):2390-8.
205. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Barthelemy C, Liu YJ, Banchereau J. Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *Int Immunol.* 1994 Aug;6(8):1177-85.
206. Van Parijs L, Perez VL, Biuckians A, Maki RG, London CA, Abbas AK. Role of interleukin 12 and costimulators in T cell anergy in vivo. *J Exp Med.* 1997 Oct 6;186(7):1119-28.
207. Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med.* 1990 Jan 1;171(1):307-14.
208. Saiki T, Ezaki T, Ogawa M, Matsuno K. Trafficking of host- and donor-derived dendritic cells in rat cardiac transplantation: allosensitization in the spleen and hepatic nodes. *Transplantation.* 2001 Jun 27;71(12):1806-15.
209. Padet L, Bazin R. IVIg prevents the in vitro activation of T cells by neutralizing the T cell activators. *Immunol Lett.* 2013 Feb;150(1-2):54-60.
210. Trepanier P, Chabot D, Bazin R. Intravenous immunoglobulin modulates the expansion and cytotoxicity of CD8+ T cells. *Immunology.* 2014 Feb;141(2):233-41.
211. Kessel A, Ammuri H, Peri R, Pavlotzky ER, Blank M, Shoenfeld Y, et al. Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function. *J Immunol.* 2007 Oct 15;179(8):5571-5.
212. Ephrem A, Chamat S, Miquel C, Fisson S, Mouthon L, Caligiuri G, et al. Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood.* 2008 Jan 15;111(2):715-22.



213. Bayry J, Mouthon L, Kaveri SV. Intravenous immunoglobulin expands regulatory T cells in autoimmune rheumatic disease. *J Rheumatol*. 2012 Feb;39(2):450-1.
214. Davis JE, Ritchie DS. B cells in GVHD: friend or foe? *Blood*. 2010 Mar 25;115(12):2558-9; author reply 9-60.
215. Bayry J, Siberil S, Triebel F, Tough DF, Kaveri SV. Rescuing CD4+CD25+ regulatory T-cell functions in rheumatoid arthritis by cytokine-targeted monoclonal antibody therapy. *Drug Discov Today*. 2007 Jul;12(13-14):548-52.
216. Clark DA, Coulam CB, Stricker RB. Is intravenous immunoglobulins (IVIG) efficacious in early pregnancy failure? A critical review and meta-analysis for patients who fail in vitro fertilization and embryo transfer (IVF). *J Assist Reprod Genet*. 2006 Jan;23(1):1-13.
217. Ruiz JE, Kwak JY, Baum L, Gilman-Sachs A, Beaman KD, Kim YB, et al. Effect of intravenous immunoglobulin G on natural killer cell cytotoxicity in vitro in women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol*. 1996 Aug;31(1-2):125-41.
218. Moraru M, Carbone J, Alecsandru D, Castillo-Rama M, Garcia-Segovia A, Gil J, et al. Intravenous immunoglobulin treatment increased live birth rate in a Spanish cohort of women with recurrent reproductive failure and expanded CD56(+) cells. *Am J Reprod Immunol*. 2012 Jul;68(1):75-84.
219. Heilmann L, Schorsch M, Hahn T. CD3-CD56+CD16+ natural killer cells and improvement of pregnancy outcome in IVF/ICSI failure after additional IVIG-treatment. *Am J Reprod Immunol*. 2010 Mar 1;63(3):263-5.
220. Thum MY, Bhaskaran S, Abdalla HI, Ford B, Sumar N, Bansal A. Prednisolone suppresses NK cell cytotoxicity in vitro in women with a history of infertility and elevated NK cell cytotoxicity. *Am J Reprod Immunol*. 2008 Mar;59(3):259-65.
221. Clark DA, Wong K, Banwatt D, Chen Z, Liu J, Lee L, et al. CD200-dependent and nonCD200-dependent pathways of NK cell suppression by human IVIG. *J Assist Reprod Genet*. 2008 Feb-Mar;25(2-3):67-72.
222. van den Heuvel MJ, Peralta CG, Hatta K, Han VK, Clark DA. Decline in number of elevated blood CD3(+) CD56(+) NKT cells in response to intravenous immunoglobulin treatment correlates with successful pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2007 Nov;58(5):447-59.
223. Roussev RG, Ng SC, Coulam CB. Natural killer cell functional activity suppression by intravenous immunoglobulin, intralipid and soluble human leukocyte antigen-G. *Am J Reprod Immunol*. 2007 Apr;57(4):262-9.
224. Kotlan B, Padanyi A, Batorfi J, Fulop V, Szigetvari I, Rajczy K, et al. Alloimmune and autoimmune background in recurrent pregnancy loss - successful immunotherapy by intravenous immunoglobulin. *Am J Reprod Immunol*. 2006 May;55(5):331-40.
225. Perricone R, Di Muzio G, Perricone C, Giacomelli R, De Nardo D, Fontana L, et al. High levels of peripheral blood NK cells in women suffering from recurrent spontaneous abortion are reverted from high-dose intravenous immunoglobulins. *Am J Reprod Immunol*. 2006 Mar;55(3):232-9.

226. Kwak JY, Kwak FM, Ainbinder SW, Ruiz AM, Beer AE. Elevated peripheral blood natural killer cells are effectively downregulated by immunoglobulin G infusion in women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol.* 1996 Apr;35(4):363-9.
227. Ruiz JE, Kwak JY, Baum L, Gilman-Sachs A, Beaman KD, Kim YB, et al. Intravenous immunoglobulin inhibits natural killer cell activity in vivo in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol.* 1996 Apr;35(4):370-5.
228. Rigal D, Vermot-Desroches C, Heitz S, Bernaud J, Alfonsi F, Monier JC. Effects of intravenous immunoglobulins (IVIg) on peripheral blood B, NK, and T cell subpopulations in women with recurrent spontaneous abortions: specific effects on LFA-1 and CD56 molecules. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994 Jun;71(3):309-14.
229. Engelhard D, Waner JL, Kapoor N, Good RA. Effect of intravenous immune globulin on natural killer cell activity: possible association with autoimmune neutropenia and idiopathic thrombocytopenia. *J Pediatr.* 1986 Jan;108(1):77-81.
230. Finberg RW, Newburger JW, Mikati MA, Heller AH, Burns JC. Effect of high doses of intravenously administered immune globulin on natural killer cell activity in peripheral blood. *J Pediatr.* 1992 Mar;120(3):376-80.
231. Aspalter RM, Sewell WA, Dolman K, Farrant J, Webster AD. Deficiency in circulating natural killer (NK) cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol.* 2000 Sep;121(3):506-14.
232. Ito R, Katano I, Kawai K, Hirata H, Ogura T, Kamisako T, et al. Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. *Transplantation.* 2009 Jun 15;87(11):1654-8.
233. Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature.* 1988 Sep 15;335(6187):256-9.
234. van Rijn RS, Simonetti ER, Hagenbeek A, Hogenes MC, de Weger RA, Canninga-van Dijk MR, et al. A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2<sup>-/-</sup> gammac<sup>-/-</sup> double-mutant mice. *Blood.* 2003 Oct 1;102(7):2522-31.
235. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol.* 1995 Jan 1;154(1):180-91.
236. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol.* 2005 May 15;174(10):6477-89.
237. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol.* 2007 Feb;7(2):118-30.
238. Legrand N, Huntington ND, Nagasawa M, Bakker AQ, Schotte R, Strick-Marchand H, et al. Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP(alpha)) interaction is required for optimal

human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 9;108(32):13224-9.

239. King M, Pearson T, Shultz LD, Leif J, Bottino R, Trucco M, et al. A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. *Clin Immunol*. 2008 Mar;126(3):303-14.

240. Ali N, Flutter B, Sanchez Rodriguez R, Sharif-Paghaleh E, Barber LD, Lombardi G, et al. Xenogeneic Graft-versus-Host-Disease in NOD-scid IL-2Rgamma(null) Mice Display a T-Effector Memory Phenotype. *PLoS One*. 2012;7(8):e44219.

241. King MA, Covassin L, Brehm MA, Racki W, Pearson T, Leif J, et al. Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clin Exp Immunol*. 2009 Jul;157(1):104-18.

242. Cottler-Fox M, Spitzer TR. Immunoglobulin preparations, acute graft-versus-host disease, and infection after marrow transplant. *Lancet*. 1993 Jun 19;341(8860):1592.

243. Sullivan KM, Storek J, Kopecky KJ, Jocom J, Longton G, Flowers M, et al. A controlled trial of long-term administration of intravenous immunoglobulin to prevent late infection and chronic graft-vs.-host disease after marrow transplantation: clinical outcome and effect on subsequent immune recovery. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1996 Feb;2(1):44-53.

244. Feinstein LC, Seidel K, Jocom J, Bowden RA, Anasetti C, Deeg HJ, et al. Reduced dose intravenous immunoglobulin does not decrease transplant-related complications in adults given related donor marrow allografts. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1999;5(6):369-78.

245. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Intravenous immunoglobulin for infectious diseases: back to the pre-antibiotic and passive prophylaxis era? *Trends Pharmacol Sci*. 2004 Jun;25(6):306-10.

246. Busse PJ, Razvi S, Cunningham-Rundles C. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the prevention of pneumonia in patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Jun;109(6):1001-4.

247. Ochs HD, Gupta S, Kiessling P, Nicolay U, Berger M. Safety and efficacy of self-administered subcutaneous immunoglobulin in patients with primary immunodeficiency diseases. *J Clin Immunol*. 2006 May;26(3):265-73.

248. Imbach P, Barandun S, d'Apuzzo V, Baumgartner C, Hirt A, Morell A, et al. High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet*. 1981 Jun 6;1(8232):1228-31.

249. Fehr J, Hofmann V, Kappeler U. Transient reversal of thrombocytopenia in idiopathic thrombocytopenic purpura by high-dose intravenous gamma globulin. *N Engl J Med*. 1982 May 27;306(21):1254-8.

250. Bierling P, Godeau B. Intravenous immunoglobulin and autoimmune thrombocytopenic purpura: 22 years on. *Vox Sang*. 2004 Jan;86(1):8-14.

251. Hughes R, Bensa S, Willison H, Van den Bergh P, Comi G, Illa I, et al. Randomized controlled trial of intravenous immunoglobulin versus oral prednisolone in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann Neurol*. 2001 Aug;50(2):195-201.
252. Mendell JR, Barohn RJ, Freimer ML, Kissel JT, King W, Nagaraja HN, et al. Randomized controlled trial of IVIg in untreated chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Neurology*. 2001 Feb 27;56(4):445-9.
253. Braun-Moscovici Y, Furst DE. Immunoglobulin for rheumatic diseases in the twenty-first century: take it or leave it? *Curr Opin Rheumatol*. 2003 May;15(3):237-45.
254. Asai O, Longo DL, Tian ZG, Hornung RL, Taub DD, Ruscetti FW, et al. 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*. 1998 May 1;101(9):1835-42.
255. Chakraverty R, Eom HS, Sachs J, Buchli J, Cotter P, Hsu R, et al. Host MHC class II+ antigen-presenting cells and CD4 cells are required for CD8-mediated graft-versus-leukemia responses following delayed donor leukocyte infusions. *Blood*. 2006 Sep 15;108(6):2106-13.
256. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*. 2012 Jun 14;119(24):5640-9.
257. Covassin L, Laning J, Abdi R, Langevin DL, Phillips NE, Shultz LD, et al. Human peripheral blood CD4 T cell-engrafted non-obese diabetic-scid IL2rgamma(null) H2-Ab1 (tm1Gru) Tg (human leucocyte antigen D-related 4) mice: a mouse model of human allogeneic graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol*. 2011 Nov;166(2):269-80.
258. Mancardi DA, Iannascoli B, Hoos S, England P, Daeron M, Bruhns P. FcgammaRIV is a mouse IgE receptor that resembles macrophage FcepsilonRI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *J Clin Invest*. 2008 Nov;118(11):3738-50.
259. Biburger M, Aschermann S, Schwab I, Lux A, Albert H, Danzer H, et al. Monocyte subsets responsible for immunoglobulin G-dependent effector functions in vivo. *Immunity*. 2011 Dec 23;35(6):932-44.
260. Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:457-92.
261. Zhang P, Chen BJ, Chao NJ. Prevention of GVHD without losing GVL effect: windows of opportunity. *Immunol Res*. 2011 Apr;49(1-3):49-55.
262. Covassin L, Jangalwe S, Jouvet N, Laning J, Burzenski L, Shultz LD, et al. Human immune system development and survival of non-obese diabetic (NOD)-scid IL2rgamma(null) (NSG) mice engrafted with human thymus and autologous haematopoietic stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2013 Dec;174(3):372-88.
263. Gregoire-Gauthier J, Selleri S, Fontaine F, Dieng MM, Patey N, Despars G, et al. Therapeutic efficacy of cord blood-derived mesenchymal stromal cells for the prevention of acute graft-versus-host disease in a xenogenic mouse model. *Stem Cells Dev*. 2012 Jul 1;21(10):1616-26.

264. Markey KA, Koyama M, Gartlan KH, Leveque L, Kuns RD, Lineburg KE, et al. Cross-dressing by donor dendritic cells after allogeneic bone marrow transplantation contributes to formation of the immunological synapse and maximizes responses to indirectly presented antigen. *J Immunol*. 2014 Jun 1;192(11):5426-33.
265. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S53-72.
266. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):503-10.
267. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*. 2007 Apr;26(4):503-17.
268. Jia S, Li C, Wang G, Yang J, Zu Y. The T helper type 17/regulatory T cell imbalance in patients with acute Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol*. 2010 Oct;162(1):131-7.
269. Chi LJ, Xu WH, Zhang ZW, Huang HT, Zhang LM, Zhou J. Distribution of Th17 cells and Th1 cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 2010 Dec;15(4):345-56.
270. Petta F, De Luca C, Triggiani M, Casolaro V. Fragments of truth: T-cell targets of polyclonal immunoglobulins in autoimmune diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2014 Aug;17:1-11.
271. Zhang C, Zhang J, Yang B, Wu C. Cyclosporin A inhibits the production of IL-17 by memory Th17 cells from healthy individuals and patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2008 Jun;42(3):345-52.
272. Finke J, Zeiser R. Harnessing GVHD by interleukin-6 receptor blockade. *Lancet Oncol*. 2014 Dec;15(13):1411-2.
273. Yu G, Xu X, Vu MD, Kilpatrick ED, Li XC. NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. *J Exp Med*. 2006 Aug 7;203(8):1851-8.
274. Garrod KR, Liu FC, Forrest LE, Parker I, Kang SM, Cahalan MD. NK cell patrolling and elimination of donor-derived dendritic cells favor indirect alloreactivity. *J Immunol*. 2010 Mar 1;184(5):2329-36.
275. Laffont S, Seillet C, Ortaldo J, Coudert JD, Guery JC. Natural killer cells recruited into lymph nodes inhibit alloreactive T-cell activation through perforin-mediated killing of donor allogeneic dendritic cells. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):661-71.
276. Bhat R, Watzl C. Serial killing of tumor cells by human natural killer cells--enhancement by therapeutic antibodies. *PLoS One*. 2007;2(3):e326.
277. Padet L, Loubaki L, Bazin R. Induction of PD-L1 on monocytes: a new mechanism by which IVIg inhibits mixed lymphocyte reactions. *Immunobiology*. 2014 Sep;219(9):687-94.
278. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Lockey T, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res*. 2009 May 1;69(9):4010-7.

279. Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science*. 1998 Oct 16;282(5388):480-3.
280. Nguyen S, Kuentz M, Vernant JP, Dhedin N, Bories D, Debre P, et al. Involvement of mature donor T cells in the NK cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Leukemia*. 2008 Feb;22(2):344-52.
281. Widiapradja A, Santro T, Basta M, Sobey CG, Manzanero S, Arumugam TV. Intravenous immunoglobulin (IVIg) provides protection against endothelial cell dysfunction and death in ischemic stroke. *Exp Transl Stroke Med*. 2014;6:7.
282. Minagawa M, Watanabe H, Miyaji C, Tomiyama K, Shimura H, Ito A, et al. Enforced expression of Bcl-2 restores the number of NK cells, but does not rescue the impaired development of NKT cells or intraepithelial lymphocytes, in IL-2/IL-15 receptor beta-chain-deficient mice. *J Immunol*. 2002 Oct 15;169(8):4153-60.
283. Loza MJ, Peters SP, Zangrilli JG, Perussia B. Distinction between IL-13+ and IFN-gamma+ natural killer cells and regulation of their pool size by IL-4. *Eur J Immunol*. 2002 Feb;32(2):413-23.
284. Loza MJ, Zamai L, Azzoni L, Rosati E, Perussia B. Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells. *Blood*. 2002 Feb 15;99(4):1273-81.
285. Brady J, Carotta S, Thong RP, Chan CJ, Hayakawa Y, Smyth MJ, et al. The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation. *J Immunol*. 2010 Dec 1;185(11):6679-88.
286. Stohl W. Cellular mechanisms in the in vitro inhibition of pokeweed mitogen-induced B cell differentiation by immunoglobulin for intravenous use. *J Immunol*. 1986 Jun 15;136(12):4407-13.
287. Geddes M, Storek J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007 Jun;20(2):329-48.
288. Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Apr;20(4):440-9.
289. Ito M, Kobayashi K, Nakahata T. NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;324:53-76.
290. Manz MG. Human-hemato-lymphoid-system mice: opportunities and challenges. *Immunity*. 2007 May;26(5):537-41.
291. Rongvaux A, Willinger T, Martinek J, Strowig T, Gearty SV, Teichmann LL, et al. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat Biotechnol*. 2014 Apr;32(4):364-72.
292. Ito R, Takahashi T, Katano I, Kawai K, Kamisako T, Ogura T, et al. Establishment of a human allergy model using human IL-3/GM-CSF-transgenic NOG mice. *J Immunol*. 2013 Sep 15;191(6):2890-9.

293. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor  $\{\gamma\}$  chain(null) mice. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1565-73.
294. Huntington ND, Legrand N, Alves NL, Jaron B, Weijer K, Plet A, et al. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med*. 2009 Jan 16;206(1):25-34.
295. Seite JF, Goutsmedt C, Youinou P, Pers JO, Hillion S. Intravenous immunoglobulin induces a functional silencing program similar to anergy in human B cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jan;133(1):181-8 e1-9.
296. Strowig T, Rongvaux A, Rathinam C, Takizawa H, Borsotti C, Philbrick W, et al. Transgenic expression of human signal regulatory protein alpha in Rag2<sup>-/-</sup>-gamma(c)<sup>-/-</sup> mice improves engraftment of human hematopoietic cells in humanized mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 9;108(32):13218-23.
297. Morteau O, Blundell S, Chakera A, Bennett S, Christou CM, Mason PD, et al. Renal transplant immunosuppression impairs natural killer cell function in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2010;5(10):e13294.
298. Theorell J, Gustavsson AL, Tesi B, Sigmundsson K, Ljunggren HG, Lundback T, et al. Immunomodulatory activity of commonly used drugs on Fc-receptor-mediated human natural killer cell activation. *Cancer Immunol Immunother*. 2014 Mar 30.
299. Murphy WJ, Longo DL. The potential role of NK cells in the separation of graft-versus-tumor effects from graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Immunol Rev*. 1997 Jun;157:167-76.
300. Jiang YZ, Barrett AJ, Goldman JM, Mavroudis DA. Association of natural killer cell immune recovery with a graft-versus-leukemia effect independent of graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol*. 1997 Jan;74(1):1-6.
301. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1999 Jul 1;94(1):333-9.
302. Klaesson S, Ringden O, Ljungman P, Aschan J, Hagglund H, Winiarski J. Does high-dose intravenous immune globulin treatment after bone marrow transplantation increase mortality in veno-occlusive disease of the liver? *Transplantation*. 1995 Dec 15;60(11):1225-30.
303. Locatelli F, Moretta F, Brescia L, Merli P. Natural killer cells in the treatment of high-risk acute leukaemia. *Semin Immunol*. 2014 Apr;26(2):173-9.
304. Curti A, Ruggeri L, D'Addio A, Bontadini A, Dan E, Motta MR, et al. Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 2011 Sep 22;118(12):3273-9.

305. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 2005 Apr 15;105(8):3051-7.
306. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, et al. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 20;28(6):955-9.
307. Stern M, Passweg JR, Meyer-Monard S, Esser R, Tonn T, Soerensen J, et al. Pre-emptive immunotherapy with purified natural killer cells after haploidentical SCT: a prospective phase II study in two centers. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Mar;48(3):433-8.
308. Yoon SR, Lee YS, Yang SH, Ahn KH, Lee JH, Kim DY, et al. Generation of donor natural killer cells from CD34(+) progenitor cells and subsequent infusion after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic cell transplantation: a feasibility study. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Jun;45(6):1038-46.
309. Campbell IK, Miescher S, Branch DR, Mott PJ, Lazarus AH, Han D, et al. Therapeutic Effect of IVIG on Inflammatory Arthritis in Mice Is Dependent on the Fc Portion and Independent of Sialylation or Basophils. *J Immunol*. 2014 Apr 23.
310. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004 May 1;363(9419):1439-41.
311. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, et al. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Jul;15(7):804-11.
312. Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2007 Sep;21(9):1992-9.
313. Ball L, Bredius R, Lankester A, Schweizer J, van den Heuvel-Eibrink M, Escher H, et al. Third party mesenchymal stromal cell infusions fail to induce tissue repair despite successful control of severe grade IV acute graft-versus-host disease in a child with juvenile myelo-monocytic leukemia. *Leukemia*. 2008 Jun;22(6):1256-7.
314. Gregoire-Gauthier J, Durrieu L, Duval A, Fontaine F, Dieng MM, Bourgey M, et al. Use of immunoglobulins in the prevention of GvHD in a xenogeneic NOD/SCID/gammac- mouse model. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Mar;47(3):439-50.
315. Benabdallah BF, Allard E, Yao S, Friedman G, Gregory PD, Eliopoulos N, et al. Targeted gene addition to human mesenchymal stromal cells as a cell-based plasma-soluble protein delivery platform. *Cytotherapy*. 2010 May;12(3):394-9.



## *Curriculum vitae*

---

### ÉTUDES UNIVERSITAIRES

---

2003-2006	Université de Montréal, Canada B.Sc. Sciences biologiques, Microbiologie et immunologie
2007-2009	Université de Montréal, Canada M.Sc. Microbiologie et immunologie, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine
2009-2014	Université de Montréal, Canada Ph.D. Microbiologie et immunologie, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine

### BOURSES ET PRIX

---

2007-2010	Bourse d'excellence Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine et Fondation des Étoiles
2009	Prix Justine – Implication dans la vie étudiante Centre de recherche du CHU Sainte-Justine
2011	Médaille du lieutenant-gouverneur du Québec
2012	Bourse départementale Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal
2012	Bourse de formation au doctorat Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ)

### PUBLICATIONS ET PRÉSENTATIONS

---

#### PUBLICATIONS

1. "Use of Immunoglobulins in the prevention of Graft versus Host Disease in a xenogenic NOD/scid gc- mouse model" Gregoire-Gauthier J, Durrieu L, Duval A, Fontaine F, Dieng MM, Bourgey M, Patey-Mariaud de Serre N, Louis I, Haddad E, *Bone Marrow Transplantation* 2012, Mar;47(3):439-50
2. "Therapeutic efficacy of cord blood-derived mesenchymal stromal cells for the prevention of acute GvHD in a xenogenic mouse model" Gregoire-Gauthier J, Selleri S, Fontaine F, Dieng MM, Patey N, Despars G, Beauséjour CM, and Haddad E, *Stem Cells and Development* 2012, Jul 1;21(10):1616-26

3. "Human IFN alpha increases the cytotoxic effect of Cord Blood-Derived Cytokine-Induced Killer (CIK) cells on human B-Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines" Durrieu L, Gregoire-Gauthier J, Dieng MM, Fontaine F, Le Deist F, Haddad E, *Cytotherapy* 2012 Nov;14(10):1245-57
4. "Role of NK cells in IVIG-Induced GvHD Inhibition in NSG Mice" Gregoire-Gauthier J, Fontaine F, Benchimol L, Dieng MM, and Haddad E. (article soumis - Blood/2014/580761)

**PRÉSENTATIONS ORALES LES PLUS SIGNIFICATIVES (SUR UN TOTAL DE 11)**

3. « Étude du rôle immunomodulateur des IVIG dans un modèle murin humanisé de GvHD » J Gregoire-Gauthier, F Fontaine, A Duval, E Haddad. XXIII<sup>e</sup> congrès annuel des étudiants gradués et post-gradués du Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, HEC Montréal, 12 juin 2008, Montréal (Qc) \* **Prix d'excellence, catégorie M.Sc.**
6. "Mesenchymal Stromal Cells Can Prevent Graft-versus-Host Disease in a NOD/SCID  $\gamma$ c-Xenogeneic Mouse Model" J Gregoire-Gauthier, S Selleri, F Fontaine, E Haddad. 6<sup>th</sup> Congress on Pediatric Transplantation (IPTA), June 25-28 2011, Montréal (Qc)
7. "Use of Immunoglobulins in the Prevention of Graft-versus-Host Disease in a Xenogeneic NOD/SCID  $\gamma$ c- Mouse Model" J Gregoire-Gauthier, L Durrieu, A Duval, F Fontaine, M M Dieng, E Haddad. 6<sup>th</sup> Congress on Pediatric Transplantation (IPTA), June 25-28 2011, Montréal (Qc)
11. "The Role of NK Cells in the Prevention of GvHD by IVIG in NSG Mice", J Gregoire-Gauthier, E Haddad. 7<sup>th</sup> International Immunoglobulin Conference, April 3-5, 2014, Interlaken, SUISSE

**PRÉSENTATIONS PAR AFFICHE LES PLUS SIGNIFICATIVES (SUR UN TOTAL DE 19)**

5. "Immunomodulatory effect of IVIG in a humanized mouse model of Graft-versus-Host Disease" J Gregoire-Gauthier, F Fontaine, A Duval, L Durrieu, MM Dieng, N Patey, F LeDeist, and E Haddad. 2<sup>nd</sup> International Workshop on Humanized Mice 2009, April 3-6 2009, Sint Olofskapel, Amsterdam (The Netherlands) \* **Young Investigator Award**
12. "Immunomodulatory Effect of IVIG in a Humanized Mouse Model of Graft-versus-Host Disease" Joëlle Gregoire-Gauthier, François Fontaine, Arnaud Duval, Ludovic Durrieu, Mame Massar Dieng, Natacha Patey, Françoise LeDeist, Elie Haddad, FOCIS 2010, June 24-27, 2010, Boston, MA (USA)
13. "Mesenchymal Stromal Cells Can Prevent Graft-versus-Host Disease in a NOD/SCID/ $\gamma$ c-Xenogeneic Mouse Model" Gregoire-Gauthier J, Selleri S, Fontaine F, Haddad E. FOCIS 2011, June 23-26 2011, Washington D.C. (USA) \* **Bourse de voyage d'Immunologie Montréal**
17. "The Prevention of GvHD by IVIG in a Xenogeneic Mouse Model : Role of NK Cells" Joëlle Gregoire-Gauthier, François Fontaine, Mame Massar Dieng, Elie Haddad. Canadian Student Health Research Forum, June 12-14, 2012, Winnipeg (Mb) \* **Représentante top 5% PhD Faculté de Médecine, Université de Montréal**
18. "The Role of NK Cells in the Prevention of GvHD by IVIG in NSG Mice" Joëlle Gregoire-Gauthier, François Fontaine, Lionel Benchimol, Mame Massar Dieng, Elie Haddad. 4<sup>th</sup> International Workshop on Humanized Mice, September 30 – October 2, 2013, Seoul, KOREA