



Université de Montréal

L'étude du rôle immunomodulateur des IVIG dans un modèle murin humanisé de réaction  
du greffon contre l'hôte

par

Joëlle Gregoire-Gauthier

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

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

Juin 2009

© Joëlle Gregoire-Gauthier, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
L'étude du rôle immunomodulateur des IVIG dans un modèle murin humanisé de réaction  
du greffon contre l'hôte

présenté par :  
Joëlle Gregoire-Gauthier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Hugo Soudeyns  
président-rapporteur

Elie Haddad  
directeur de recherche

Christian Beauséjour  
membre du jury

## RÉSUMÉ

La maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) est une complication majeure des greffes de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) qui survient dans 30 à 70% des cas et peut causer la mort, malgré un traitement prophylactique bien conduit. Il existe donc une réelle demande clinique pour améliorer ces traitements prophylactiques. Parce que ces traitements prophylactiques reposent en général sur des agents immunosuppresseurs, ceux-ci contribuent à diminuer la reconstitution immunitaire du patient, ce qui a un impact défavorable sur les infections et les taux de rechute d'hémopathie maligne, et donc limite leur utilisation. Les immunoglobulines (IVIG) pourraient représenter une alternative intéressante puisqu'elles ont des propriétés immunomodulatrices et qu'elles sont de plus couramment utilisées en clinique pour traiter des patients ayant un déficit immunitaire. Leur capacité à réduire l'apparition et la sévérité de la GvHD, sans toutefois inhiber ou nuire à la reconstitution immunitaire chez le patient n'a néanmoins jamais été clairement démontrée. Les objectifs de ce projet sont donc d'évaluer l'efficacité des IVIG à réduire l'incidence et la sévérité de la GvHD dans un modèle murin humanisé de GvHD, ainsi que de déterminer le mécanisme d'action des IVIG. Ce modèle consiste à injecter des huPBMCs à des souris immunodéprimées ne pouvant les rejeter. Les résultats obtenus suggèrent que les IVIG possèdent un effet immunomodulateur permettant de réduire les signes cliniques et de retarder l'apparition de la GvHD, tout en permettant l'apparition de cellules NK. Les IVIG agiraient de façon indirecte sur les huPBMCs afin d'induire l'apparition des cellules NK.

## Mots clés

GvHD, souris humanisées, IVIG, HSCT, reconstitution immunitaire, cellules NK

**ABSTRACT**

Graft-versus-host disease (GvHD) is a major complication following hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), occurring in 30 to 70% of HSCT despite proper prophylactic treatment, and can result in death. It is therefore primordial to improve the prophylactic treatments in order to reduce the frequency and severity of GvHD. Since these prophylactic treatments are based on the use of immunosuppressive agents, they inhibit the immune reconstitution and thus increase the risk of infections and relapse. Because of their immunomodulating properties, immunoglobulins (IVIG) represent a promising alternative. Furthermore, IVIG are already widely used in patients with immune deficits. Since no study has yet clearly shown that IVIG can reduce GvHD without inhibiting the immune reconstitution in the patient, the scientific community is still debating their usefulness in GvHD prevention. Should their efficacy to reduce the incidence and severity of GvHD without impairment to the immune reconstitution be demonstrated, the use of IVIG could change the clinical outcome for HSCT patients, improving their remission and quality of life. The objectives of this project are to evaluate IVIG efficacy in GvHD prevention and to define the mechanism of action of IVIG. To fulfill these objectives, we will use a GvHD humanized mouse model, which consists of injecting huPBMCs in immunodeficient mice who can not reject them. Our results demonstrate an immunomodulatory effect of IVIG, allowing for reduced clinical signs and a slightly increased survival in GvHD. A population of NK cells also appeared upon IVIG treatment and is believed to be indirectly induced by IVIG.

**Keywords**

GvHD, humanized mouse, IVIG, HSCT, immune reconstitution, NK cells

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
Mots clés .....	iii
ABSTRACT .....	iv
Keywords .....	iv
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
REMERCIEMENTS .....	xii
AVANT-PROPOS .....	xiii
1. INTRODUCTION .....	15
1.1 Les origines de la GvHD.....	15
1.1.1 Les transplantations de cellules souches hématopoïétiques (HSCT).....	15
1.1.2 Les facteurs de risque de la GvHD .....	15
1.1.2.1 La disparité HLA .....	16
1.1.2.2 Source du greffon.....	18
1.1.3 La GvHD.....	18
1.1.3.1 Conditionnement pré-greffe .....	20
1.1.3.2 Phase d'activation des cellules T .....	20
1.1.3.3 Phase effectrice inflammatoire.....	21
1.1.4 Le diagnostic de la GvHD aiguë.....	22
1.1.5 La GvHD chronique.....	24
1.1.6 Les conséquences d'une GvHD aiguë.....	25
1.1.6.1 L'effet Graft-verus-Leukemia (GvL).....	25
1.1.6.2 La qualité de vie pour le patient.....	25
1.2 Comment traiter les GvHD ? .....	26
1.2.1 Traitements prophylactiques et traitements curatifs actuels .....	26
1.2.2 Manipulation du greffon .....	27
1.2.3 Manipulation de l'environnement post-greffe .....	28
1.2.3.1 Corticostéroïdes .....	28
1.2.3.2 Inhibiteurs de calcineurine (CNI).....	29
1.2.3.3 Agents chimiothérapeutiques antiprolifératifs.....	29

1.2.3.4	Inhibiteur de mTOR .....	29
1.2.3.5	Anticorps monoclonaux ou polyclonaux .....	30
1.2.3.6	Inhibiteur de NF- $\kappa$ B .....	30
1.2.3.7	Inhibiteur de TNF- $\alpha$ .....	30
1.3	IVIG .....	31
1.3.1	Notions de base .....	31
1.3.2	Les modes d'action présumés des IVIG.....	34
1.3.3	Utilisation des IVIG dans le contexte de la GvHD .....	34
1.3.4	Activité anti-inflammatoire des IVIG .....	35
1.3.5	Mode d'action prophylactique des IVIG lors de la GvHD .....	37
1.4	Souris humanisées.....	39
2.	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	41
2.1	Souris .....	41
2.2	Obtention des huPBMCs.....	41
2.3	Induction et suivi de la GvHD .....	41
2.4	Sacrifices des souris .....	42
2.5	Prises de sang .....	43
2.6	Cytométrie de flux .....	43
2.7	ELISA IgG humaine .....	44
2.8	Culture cellulaire.....	44
2.9	Tempête de cytokines.....	44
2.10	Statistiques .....	45
3.	RÉSULTATS .....	46
3.1	Induction de la GvHD .....	46
3.2	Traitement aux IVIG .....	51
3.3	Tempête de cytokines.....	55
3.4	Étude de la population cellulaire NK .....	57
3.5	Dosage des IgG humaines dans le plasma de souris GvHD-IVIG.....	60
4.	DISCUSSION .....	62
4.1	Induction de GvHD .....	62
4.2	Traitement aux IVIG .....	63
4.3	Tempête de cytokines.....	65
4.4	Étude de la population cellulaire NK .....	67

	vii
4.5 Culture cellulaire.....	68
5. PERSPECTIVES .....	70
6. CONCLUSION.....	71
RÉFÉRENCES.....	72



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Région du HLA.....	17
Figure 2 - L'immunopathologie de la GvHD.....	19
Figure 3 - Immunoglobulines humaines .....	32
Figure 4 - Région Fc de l'IgG.....	36
Figure 5 - Modèles de mécanismes de l'action anti-inflammatoire des IVIG .....	36
Figure 6 - Nombre absolu de cellules humaines circulantes dans le sang périphérique de souris. ....	47
Figure 7 - Variation de poids des souris GvHD.....	47
Figure 8 - Apparition et évolution des signes cliniques de GvHD.. .....	48
Figure 9 - Survie des souris GvHD. Pourcentage de survie des souris GvHD.. .....	48
Figure 10 - Étude pathologique de la GvHD.. .....	49
Figure 11 - Symptômes de GvHD selon le traitement.. .....	51
Figure 12 - Survie des souris GvHD selon le traitement.. .....	52
Figure 13 - Populations cellulaires humaines dans le sang périphérique murin de souris GvHD.....	53
Figure 14 - Cytométrie de flux.....	54
Figure 15 - Concentration de cytokines humaines.....	56
Figure 16 - Sous-populations de cellules NK humaines dans le sang périphérique des souris GvHD-IVIG.....	58
Figure 17 - Apparition des cellules NK.....	58
Figure 18 - Besoin du conditionnement préalable du microenvironnement d'injection avec les IVIG.....	59
Figure 19 - Populations cellulaires dans une culture <i>in vitro</i> de huPBMCs.....	61

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I - Nombre d'allèles HLA .....	17
Tableau II – Étendue de l'implication des organes dans la gradation de la GvHD .....	24
Tableau III - Propriétés des immunoglobulines humaines.....	33
Tableau IV - Effets des IVIG sur différents types cellulaires.....	38

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

7-AAD:	7-Amino-Actinomycin D
ADCC :	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
APC :	Antigen-presenting cell
APC :	Allophycocyanin (cytométrie en flux)
APC-Cy7:	Allophycocyanin-cyanine dye 7
ATG :	Anti-thymocyte globulin
BM :	Bone marrow
BSA :	Bovine serum albumin
CD45 :	Cluster of differentiation 45
CIBPAR :	Comité institutionnel des bonnes pratiques animales en recherche
CNI :	Calcineurin inhibitor
CTL :	Cytotoxic T lymphocyte
D-PBS :	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DC :	Dendritic cell
DC-SIGN :	Dendritic cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DMSO :	Dimethyl sulfoxide
EGR :	Early growth response
ELISA:	Enzyme linked immunosorbent assay
F(ab') <sub>2</sub> :	Antigen-binding fragment of IgG
FasL :	Fas ligand
Fc :	"Crystallizable" fragment of IgG
FcγR :	"Crystallizable" fragment of IgG gamma receptor
FBS:	Fetal bovine serum
FDA :	Food and Drug Administration
FITC:	Fluorescein isothiocyanate
GvHD :	Graft-versus-Host Disease
GvL :	Graft-versus-Leukemia
huPBMCs :	Human peripheral blood mononuclear cells
HES :	Hématoxyline-éosine safran

HLA :	Human leukocyte antigen
HSA :	Human serum albumin
HSC :	Hematopoietic stem cell
HSCT :	Hematopoietic stem cell transplantation
IgG :	Immunoglobulin G
IFN:	Interferon
IL:	Interleukine
IL-2Rg :	Chaîne gamma du récepteur à l'interleukine-2
ITP :	Idiopathic thrombocytopenic purpura
IVIG:	Intravenous immunoglobulins
KGF:	Keratinocyte growth factor
LPS :	Lipopolysaccharide
mTOR :	Mammalian Target of Rapamycin
MHC :	Major histocompatibility complex
MSC :	Mesenchymal stromal cell
NF-κB :	Nuclear factor-κB
NK :	Natural killer
NOD :	Non-obese diabetic
OCT :	Optimal cutting temperature
PE:	Phycoerythrin
PHSC :	Peripheral hematopoietic stem cell
<i>Rag</i> :	Recombination activating gene
Région V :	Région variable
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
<i>scid</i> :	Severe combined immunodeficiency
Th1 :	T helper cell subtype 1
Treg :	T regulatory cell
TCR :	T cell receptor
TNF:	Tumor necrosis factor
UCB :	Umbilical cord blood
VOD :	Veno-occlusive disease
xGvHD :	xéno-GvHD

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier le Dr. Elie Haddad qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a permis d'y réaliser mes travaux de maîtrise. Je suis également très reconnaissante envers tous les membres du laboratoire et des laboratoires collaborateurs qui m'ont conseillée et aidée dans l'élaboration et la réalisation de mes travaux.

Je tiens également à remercier la Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine et la Fondation des Étoiles pour le support financier qu'elles m'ont accordé lors de ma maîtrise.

## AVANT-PROPOS

Les maladies de nature hématopoïétique sont fréquentes dans la population pédiatrique. Parmi celles-ci, une des plus connue est sans contredit la leucémie, qui affecte environ 30% de la population pédiatrique atteinte d'un cancer. La greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) est un traitement efficace contre les leucémies, mais les traitements immunosuppresseurs qui doivent être prodigués aux patients lors des ces greffes peuvent être lourds de conséquences en affaiblissant leur système immunitaire. Cet état immunodéprimé peut laisser ces jeunes patients plus susceptibles de contracter des infections ou d'être victime de la rechute de leur maladie. Grâce aux améliorations apportées aux traitements anti-leucémiques, la proportion de patients pouvant être guéris de leur leucémie a basculé depuis trente ans, passant de 20% de chances de survie au début des années 1980 à 80% de chances de survie aujourd'hui. Bien que ces traitements soient très efficaces, il est primordial de s'attarder au développement de nouveaux traitements qui permettront aux patients de conserver leurs fonctions immunitaires et ainsi leur laisser une meilleure qualité de vie.

La réaction du greffon contre l'hôte (GvHD) est une complication majeure qui se développe dans 30 à 70% des cas suite aux HSCT et peut causer la mort des patients qui en sont atteints. Le recours aux traitements prophylactiques immunosuppresseurs suite aux HSCT permet de réduire l'intensité et la sévérité de la GvHD, mais retarde toutefois considérablement la reconstitution immunitaire qui est de première importance chez ces patients. C'est donc principalement dans cette optique qu'il est nécessaire de développer des traitements prophylactiques pour la GvHD qui n'affecteront pas la reconstitution immunitaire et permettront aux patients de conserver leur immunité pour contrer infections et rechute de maladie.

Les immunoglobulines (IVIG) sont couramment utilisées dans le traitement d'immunodéficiences et de maladies auto-immunes, leur conférant un aspect immunomodulateur. Plusieurs équipes ont tenté en vain de déterminer hors de tout doute si les IVIG pouvaient avoir un effet immunomodulateur dans la prévention de la GvHD. Puisque le mécanisme d'action précis des IVIG est toujours inconnu, il est difficile d'évaluer la contribution des IVIG chez les patients lors d'essais cliniques.

On fait donc appel à un modèle murin humanisé de GvHD développé au laboratoire afin d'évaluer l'effet immunomodulateur des IVIG. Ce modèle murin humanisé permet d'induire une xéno-GvHD (xGvHD) chez les souris humanisées NOD/LtSz-*scid*IL2rgc<sup>-/-</sup> et ainsi permet l'étude de l'efficacité des IVIG dans la prévention de la GvHD, ainsi que leur mode d'action *in vivo*. Qui plus est, ce modèle murin humanisé de GvHD permet d'étudier l'efficacité des IVIG dans la prévention de la GvHD sans qu'aucun autre traitement prophylactique ne vienne interférer, ce qui n'aurait pu être possible sans le recours à ce modèle expérimental.

## **1. INTRODUCTION**

### **1.1 Les origines de la GvHD**

#### **1.1.1 Les transplantations de cellules souches hématopoïétiques (HSCT)**

Depuis les années 1950, les HSCT sont devenues des interventions courantes pour traiter certaines pathologies impliquant le système hématopoïétique. Depuis leurs débuts, les HSCT allogéniques ont connu plusieurs modifications et améliorations. L'une des plus importantes, l'amélioration des techniques de typage des antigènes leucocytaires humains (HLA), a permis d'élargir la population de donneurs potentiels. L'atténuation du conditionnement pré-greffe a par ailleurs permis d'augmenter la diversité de patients éligibles à recevoir ces transplantations<sup>1</sup>. Aujourd'hui, ce sont plus de 20 000 de ces procédures qui sont désormais effectuées annuellement, et ce malgré la réaction dévastatrice du greffon contre l'hôte (GvHD). La GvHD, une complication majeure de la HSCT pouvant aller jusqu'à causer la mort, se développera inévitablement si aucun traitement immunosuppresseur n'est administré au patient suite à la transplantation. Cette réaction demeure l'élément limitant au recours plus fréquent de cette intervention<sup>2, 3</sup>. Il devient donc primordial de trouver des traitements prophylactiques et thérapeutiques efficaces afin de réduire l'incidence et la sévérité de la GvHD, d'autant plus qu'aucun traitement existant à ce jour n'est efficace à 100%<sup>4</sup>. Il existe deux types distincts de GvHD : la GvHD aiguë, dont il sera question dans ce mémoire, et la GvHD chronique.

#### **1.1.2 Les facteurs de risque de la GvHD**

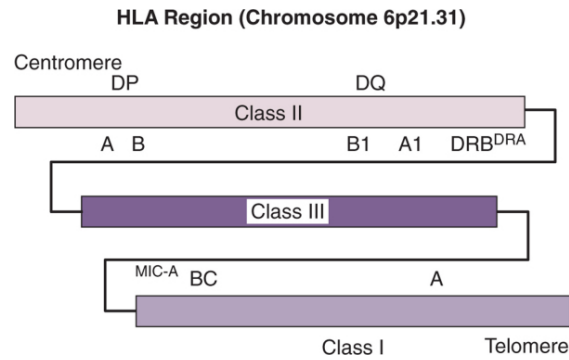
La GvHD demeure un défi clinique et la principale cause de mortalité et de morbidité chez les patients ayant reçu une HSCT<sup>5, 6</sup>. Environ 35-50% des receveurs de HSCT développeront une GvHD aiguë et seulement un tiers de ces patients répondent favorablement au traitement stéroïde de première ligne<sup>7</sup>. Afin de pouvoir améliorer l'efficacité des traitements pour ces patients, on doit d'abord bien comprendre cette réaction dévastatrice. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'incidence et la sévérité de la GvHD. Il est bien décrit dans la littérature que la disparité HLA et les différences d'âge et de sexe entre donneur et receveur constituent des facteurs de risque de GvHD. À ceux-ci s'ajoutent les donneurs non apparentés, un donneur femme ayant eu plusieurs grossesses, la source des cellules souches (sang de cordon ombilical (UCB), cellules souches



hématopoïétiques de sang périphérique (PHSC) et moelle osseuse (BM), du plus au moins permissif, respectivement), le type de conditionnement pré-greffe et la prophylaxie contre la GvHD utilisée<sup>1, 2, 6, 8-13</sup>.

### 1.1.2.1 La disparité HLA

Les HLA sont des protéines immunogènes hautement polymorphes encodées par les gènes du système majeur d'histocompatibilité (MHC) (Figure 1). Les molécules HLA de classe I (HLA-A, -B et -C) sont exprimées sur toutes les cellules nucléées, tandis que les HLA de classe II (HLA-DP, -DQ et -DR) sont surtout exprimés sur les cellules hématopoïétiques<sup>14, 15</sup>, bien que leur expression puisse être induite sur d'autres types de cellules suivant de l'inflammation ou toute autre lésion. Au cours de la dernière décennie, des analyses moléculaires et des bases de données consacrées exclusivement aux séquences HLA ont permis d'élargir de façon significative les connaissances à leur sujet. On compte désormais plus de 3200 séquences d'allèles pour les gènes HLA, dont 2215 pour les HLA de classe I et 986 pour les HLA de classe II<sup>16</sup> (Tableau I). Depuis 20 ans, on reconnaît que les disparités HLA entre donneurs et receveurs sont la cause de l'activation des cellules T du greffon, initiant la GvHD<sup>2, 13</sup>. Le récepteur des cellules T (TCR) du greffon reconnaît le HLA allogénique ou des antigènes non-polymorphes des cellules présentatrices d'antigène (APC) du receveur, ce qui active les cellules T<sup>3</sup>. Puisque chaque parent fournit un haplotype au phénotype HLA, on retrouve deux ensembles de six antigènes majeurs. Depuis 2002, le typage HLA est effectué sur dix allèles : HLA-A, -B, -C, -DRB1 et -DQB1, où il a été démontré que les disparités chez les HLA de classe I influencent l'acceptation du greffon par le receveur et les disparités de HLA de classe II jouent sur le déclenchement de la GvHD<sup>17</sup>. Ces dernières données illustrent très bien le besoin qu'il existe de procéder minutieusement au typage HLA du donneur potentiel et du receveur, afin de maximiser l'approximation de la compatibilité et ainsi éviter le rejet de greffe et le développement de la GvHD.



**Figure 1 - Région du HLA.** Les gènes de la région HLA (MHC) sont illustrés, avec les régions HLA classe I, classe II et classe III. Chaque molécule de classe II est composée de deux chaînes. Les allèles DRB sont polymorphiques; alors que DRA ne varient pas. Les molécules DQA et DQB sont toutes deux polymorphiques, tout comme le sont également DPA et DPB. La région classe III contient des gènes importants, tels que des composants du complément et le gène du TNF- $\alpha$ . La région classe I inclut les gènes MIC-A et MIC-B, en plus des gènes d'histocompatibilité classiques, HLA-A, -B et -C (Kronenberg *et al.*, 2008<sup>14</sup>).

**Tableau I - Nombre d'allèles HLA**

<b>Catégorie</b>	<b>Locus</b>	<b>Nombre d'allèles</b>
Classe I	<b>HLA-A</b>	<b>673</b>
	<b>HLA-B</b>	<b>1077</b>
	<b>HLA-C</b>	<b>360</b>
	HLA-E	9
	HLA-F	21
	HLA-G	36
	Pseudogènes	29
	Total	2215
Classe II	<b>HLA-DRA</b>	<b>3</b>
	<b>HLA-DRB</b>	<b>669</b>
	<b>HLA-DQA1</b>	<b>34</b>
	<b>HLA-DQB1</b>	<b>93</b>
	<b>HLA-DPA1</b>	<b>27</b>
	<b>HLA-DPB1</b>	<b>128</b>
	HLA-DMA	4
	HLA-DMB	7
	HLA-DOA	12
	HLA-DOB	9
	Total	986
MHC-like	MICA	64
	MICB	30
	Total	94

Ces informations ont été obtenues de la banque de données IMGT/HLA version 2.22. Les gènes HLA de fonction classique sont identifiés en caractère gras. (Adapté de Shiina *et al.*, 2009<sup>16</sup>)

Bien que les avancées technologiques des dernières décennies dans le typage des HLA aient contribuées à améliorer la qualité de l'appariement, elles n'arrivent toutefois pas à éliminer complètement les disparités HLA entre donneur et receveur<sup>12</sup>. Puisque l'incidence de la GvHD augmente avec le niveau de disparité HLA entre le donneur et le receveur<sup>2</sup>, cette amélioration de l'appariement HLA a bien évidemment contribué à diminuer la mortalité suite aux HSCT. De façon générale, lors d'une greffe provenant d'un donneur HLA identique, le risque de développer une GvHD est néanmoins de 40% et cette proportion augmente à 60-80% lorsque le donneur présente une ou plusieurs disparités au niveau du HLA avec le receveur<sup>3, 18</sup>. Depuis les années 1990, les molécules non-HLA, qui n'appartiennent donc pas au MHC, sont également à l'étude pour leur contribution dans l'incidence et la sévérité de la GvHD, la mortalité reliée à la greffe, les infections et la survie générale<sup>19</sup>.

#### **1.1.2.2 Source du greffon**

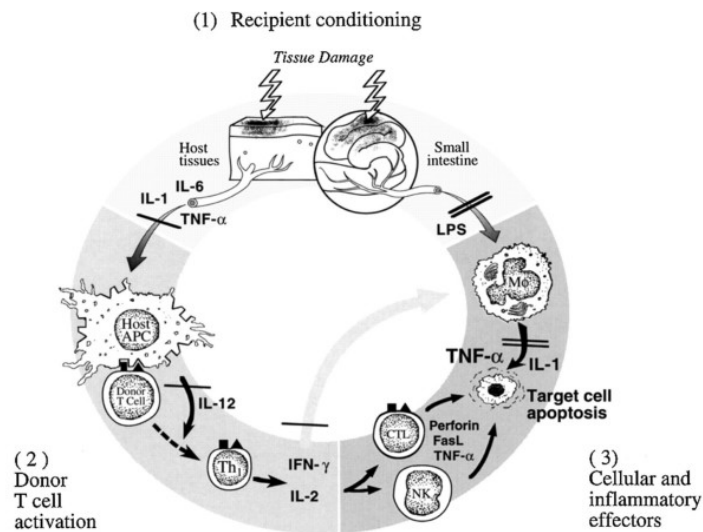
La source du greffon utilisé lors de la HSCT peut grandement influencer la sévérité de la GvHD. Grâce à l'amélioration des techniques de purification des cellules souches hématopoïétiques (HSC), celles-ci peuvent désormais provenir de multiples sources : BM, PHSC ou UCB. Les HSC de BM sont celles qui étaient traditionnellement utilisées pour les HSCT. Les PHSC sont plus utilisées pour les receveurs de plus de 20 ans, en partie à cause de leur capacité à rétablir le système hématopoïétique plus rapidement; par contre elles induisent plus de GvHD<sup>20, 21</sup>. Les HSC purifiées de UCB causent moins de GvHD, à cause de la « naïveté » présumée du système immunitaire du greffon et donc de la plus haute permissivité dans la disparité HLA. La déficience des cellules dendritiques (DC)<sup>22, 23</sup> et la production réduite des cytokines pro-inflammatoires et immunorégulatrices<sup>24, 25</sup> peuvent également contribuer à l'incidence réduite de GvHD avec les UCB, ce qui en fait un candidat idéal pour les HSCT chez les patients pédiatriques, d'autant que leur accessibilité est plus grande<sup>26</sup>.

#### **1.1.3 La GvHD**

Contrairement aux greffes d'organes solides, qui comportent très peu de cellules immunologiquement actives, les greffes de cellules souches permettent de reconstituer chez le receveur un système immunitaire actif dérivé des cellules du donneur. Bien que le rejet

de la greffe demeure un souci dans les greffes de cellules souches, elle l'est moins que pour les organes solides et c'est plutôt l'immunité dérivée du donneur qui est source de problème, puisqu'elle est justement responsable de la GvHD<sup>27</sup>. De façon générale, trois conditions doivent être atteintes afin que le développement d'une GvHD soit possible : le greffon doit contenir suffisamment de cellules immunocompétentes, le receveur doit être incapable de rejeter le greffon et le receveur doit exprimer des antigènes qui sont absents chez le donneur<sup>28, 29</sup>.

La GvHD se développe au terme d'une réaction en trois temps (voir Figure 2) : 1- le dommage tissulaire et la fuite du contenu bactérien suite au conditionnement pré-greffe; 2- la phase d'activation des cellules T du donneur; 3- la phase effectrice inflammatoire de dommage tissulaire aux organes cibles par les cellules effectrices et les cytokines<sup>8, 19, 30, 31</sup>. Des études récentes démontrent l'importance des chemokines et des cellules T régulatrices (Treg) dans la GvHD aiguë, ce qui rend d'autant plus complexe son traitement<sup>6</sup>.



**Figure 2 - L'immunopathologie de la GvHD.** Représentation schématique du rôle central des lésions du tractus gastro-intestinal lors de la GvHD. Durant la première phase, le conditionnement pré-greffe (irradiation et/ou chimiothérapie) mène au dommage et à l'activation des tissus hôtes, particulièrement la muqueuse intestinale. L'activation des cellules T du donneur dans la deuxième phase est caractérisée par la prolifération des cellules T de type Th1 en présence d'IL-12 et de la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ . Durant la troisième phase, les fonctions effectrices des phagocytes mononucléaires activés sont déclenchées par les signaux secondaires fournis par les lipopolysaccharides (LPS) et les autres molécules immuno-stimulatrices qui fuient de la muqueuse intestinale endommagée durant les phases 1 et 2.

Les lignes doubles indiquent les étapes auxquelles le keratinocyte growth factor (KGF) et l'IL-11 peuvent interrompre le processus, tandis que les lignes simples reflètent l'interruption par l'IL-11 seulement. (Adapté de Hill et Ferrara, 2000<sup>32</sup>)

### 1.1.3.1 Conditionnement pré-greffe

On administre au patient le conditionnement pré-greffe afin de détruire ses cellules souches hématopoïétiques, d'éradiquer la maladie en cas d'hémopathie maligne sous-jacente, et de l'immunosupprimer afin qu'il ne rejette pas le greffon<sup>2</sup>. Ce conditionnement immunosuppresseur crée toutefois un important milieu pro-inflammatoire suite à la sécrétion de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 et d'IL-6, et cause des lésions épithéliales directes au tractus gastro-intestinal. Ces lésions induisent une augmentation de la translocation de produits bactériens immunostimulants (LPS) et d'autres glycolipides d'origine bactérienne à travers la muqueuse intestinale. Ces produits bactériens agissent en tant que signal de danger et amplifient l'activation des APC du receveur dans le tractus gastro-intestinal et les autres organes cibles de la GvHD, déclenchant la cascade de cytokines inflammatoires qui est un important facteur d'amplification de la GvHD<sup>3, 28, 31</sup>. L'environnement immunitaire post-transplantation représente donc une période unique où la GvHD est facilitée par la tempête de cytokine engendrée par le conditionnement pré-greffe qui stimulent l'activation et la prolifération rapide des lymphocytes greffés<sup>33</sup>.

La sévérité de la GvHD aiguë est donc étroitement associée à l'intensité et à la toxicité du conditionnement pré-greffe<sup>34, 35</sup>. En vue de réduire la toxicité liée au conditionnement pré-greffe, des conditionnements moins agressifs ont été développés. Ceux-ci ont causé moins de cas de GvHD, sans toutefois améliorer la survie<sup>12, 31</sup>.

### 1.1.3.2 Phase d'activation des cellules T

Lors de la deuxième phase de la GvHD, les cellules T du greffon sont activées suite à leur interaction avec les alloantigènes, les antigènes viraux et les antigènes tumoraux présentés par les APCs du receveur<sup>3, 19</sup>. Ces cellules activées peuvent ensuite migrer vers les organes cibles de la GvHD, soit le foie, le tractus gastro-intestinal et la peau, sous le contrôle des récepteurs sélectine spécifiques<sup>9, 11, 19</sup>. Les APC du receveur sont également activées par les lésions tissulaires et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires de type Th1, particulièrement l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$ <sup>2, 11, 19</sup>. Ces cytokines pro-inflammatoires auront un fort pouvoir d'activation sur les lymphocytes T du donneur, augmentant donc leur prolifération et leur cytotoxicité<sup>33</sup>.

### 1.1.3.3 Phase effectrice inflammatoire

Les lymphocytes T activés vont éliminer par cytotoxicité les APC, via des protéines cytolytiques telles que la perforine, la granzyme et Fas/FasL. La régulation à la hausse des chemokines au sein des organes cibles permet aux cellules effectrices cytotoxiques qui expriment les récepteurs appropriés de s'y infiltrer et de causer de graves dommages pour le receveur<sup>36-38</sup>. La fuite de LPS engendrée par le conditionnement pré-greffe et l'IFN- $\gamma$  pourrait stimuler les macrophages, lesquels induiront ensuite l'activation des cellules NK et la sécrétion de TNF soluble<sup>19</sup> qui peuvent également causer du dommage tissulaire<sup>3</sup>. Le TNF- $\alpha$  stimulerait également la production additionnelle de cytokines inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-12, ce qui exacerbe la réaction<sup>8</sup>.

Plusieurs cytokines inflammatoires de types Th1, notamment l'IL-6, l'IL-8, le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12 sont relâchées lors de la phase inflammatoire et ont une part importante dans l'amplification de GvHD<sup>3, 6, 39</sup> par les cellules T CD4<sup>+</sup> du greffon. Certaines études semblent suggérer que la polarisation Th2 des cellules T pourrait réduire l'incidence de GvHD<sup>3, 19</sup>, alors que les cytokines de type Th1 auraient une influence sur sa sévérité<sup>3</sup>.

Des études suggèrent que de hauts niveaux de TNF- $\alpha$  et bas niveaux d'IL-10 chez les patients avant la greffe se soldent par plus de GvHD. L'augmentation du niveau de nombreuses cytokines inflammatoires dans les organes cibles de la GvHD a par ailleurs été démontrée dans plusieurs modèles murins<sup>29</sup>.

#### 1.1.3.3.1 La polarisation Th1

Les cytokines de type Th1 (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) ont été impliquées dans la GvHD. L'IL-1 et l'IL-6 sont sécrétées suite au conditionnement pré-greffe et ont un rôle actif dans le dommage cellulaire : l'IL-1 par l'activation de l'inflammasome caspase-1 et l'IL-6 par la différenciation des cellules T en cellules T cytotoxiques en présence d'IL-2. L'IL-6 est produite par les cellules mononucléaires, les cellules B et également en abondance par les kératocytes de la peau. Cette production d'IL-6 par les kératocytes de la peau pourrait contribuer à son ciblage lors de la GvHD<sup>19, 40</sup>. L'augmentation de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 et d'IL-6 dans le sérum des patients est corrélée avec un plus haut risque de GvHD et une survie diminuée. L'IFN- $\gamma$  joue un rôle important dans l'immunité adaptative et innée<sup>19</sup> et est critique dans la régulation à la hausse des chemokines et leurs récepteurs<sup>38</sup>, de

l'expression Fas/FasL *in vivo*, et donc joue un rôle primordial dans l'activité anti-receveur des lymphocytes T cytotoxiques du donneur qui inclut les mécanismes perforine/granzyme et Fas/FasL<sup>41-43</sup>. L'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  contribuent à réguler la boucle de production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 et induisent la production des chemokines qui mobilisent les cellules effectrices vers les organes cibles de la GvHD<sup>44, 45</sup>.

Le TNF- $\alpha$  sécrété suite au conditionnement pré-greffe est un joueur clé dans la pathogenèse, en induisant l'apoptose des cellules cibles, en activant les macrophages, les granulocytes et les lymphocytes, et en contribuant également à l'augmentation de l'expression des molécules HLA, tout ceci aboutissant à l'augmentation de la cytolysé des cellules cibles du receveur induite par les lymphocytes T du donneur<sup>46-53</sup>.

#### **1.1.3.3.2 La polarisation Th2**

Certaines cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13) ont aussi été décrites comme étant capables de moduler ou d'aggraver la GvHD. L'IL-10 semble avoir un rôle protecteur contre la GvHD en inhibant les réponses prolifératives des cellules T et la production des cytokines pro-inflammatoires, tandis que l'IL-13 supprimerait la fonction macrophage et inhiberait la production de cytokines pro-inflammatoires<sup>19</sup>.

#### **1.1.3.3.3 La polarisation Th17**

Une cytokine nouvellement étudiée, l'IL-17, semble impliquée dans le contrôle de l'inflammation locale via la régulation à la hausse de cytokines et chemokines pro-inflammatoires. Il a toutefois également été suggéré que l'IL-17 pourrait avoir un effet régulateur dans l'inflammation des tissus, en inhibant l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup>. Les cellules Th17, qui sécrètent l'IL-17, peuvent réguler à la baisse la différenciation Th1 (évaluée par la concentration d'IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  dans le sérum) des cellules du donneur, ce qui pourrait améliorer la GvHD aiguë<sup>38</sup>.

### **1.1.4 Le diagnostic de la GvHD aiguë**

La distinction à faire entre la réaction et le dommage joue un rôle critique dans l'évaluation de la GvHD : l'activité de la réaction cause des manifestations qui devraient se résorber suite au contrôle des mécanismes immunopathologiques. Parmi ces manifestations, on

compte l'inflammation et les éruptions érythémateuses, l'érythème orale, les changements lichenoïdes, la diarrhée, l'hyperbilirubinémie, l'élévation des transaminases et l'éosinophilie, lesquelles sont supposées se résorber après quelques semaines<sup>54</sup>. La première manifestation clinique d'une GvHD est habituellement d'ordre dermatologique et le début de l'éruption cutanée corrèle habituellement avec la prise des cellules du greffon<sup>8</sup>. Le diagnostic d'une GvHD aiguë est posé lorsque les symptômes suivants apparaissent : dermatite, ampoules cutanées, crampes abdominales avec ou sans diarrhée, nausées persistantes et vomissements et hépatite (avec élévation de la bilirubine et/ou des enzymes hépatiques). La GvHD peut être la cause directe de la mort par défaillance viscérale, ou encore par le biais d'infections pouvant entraîner la mort<sup>12</sup>. De plus, bien que l'absence de GvHD fournisse des conditions plus propices à la rechute de la maladie hématologique sous-jacente (leucémie), une GvHD sévère entraîne des complications pouvant être fatales<sup>55</sup>. Les HLA de classe II étant exprimés abondamment dans la peau et le tractus gastro-intestinal, ceux-ci pourraient contribuer au ciblage de ces organes lors de la GvHD<sup>8, 29</sup>.

Afin de classifier et résumer les manifestations cliniques et la sévérité de la GvHD, le système de gradation de Glucksberg a été établi il y a de cela plus de trente ans (voir Tableau II). Ce système sépare les manifestations organes-spécifiques (peau, tractus gastro-intestinal et foie) en différents niveaux d'intensité, de 0 à 4<sup>12</sup>. Plus la gradation est élevée, plus la GvHD est sévère et les risques sont élevés pour le patient.

Le développement d'une GvHD se solde par quatre conséquences spécifiques : lésions tissulaires organiques nécessitant une thérapie immunosuppressive; risque secondaire d'infections; risque plus élevé de développer une GvHD chronique; et pour certaines hémopathies malignes, un effet Graft-versus-Leukemia (GvL) amélioré (voir ci-dessous)<sup>10</sup>.



**Tableau II – Étendue de l'implication des organes dans la gradation de la GvHD (Przepiorka *et al.*, 1995<sup>56</sup>)**

Étape	Peau	Foie (bilirubine)	Intestins
0	Pas d'éruption de GvHD	< 2 mg/dL	< 500 mL/jour ou nausée persistante
1	Éruption maculopapulaire < 25 % BSA	2 – 3 mg/dL	500 – 999 mL/jour
2	Éruption maculopapulaire 25 - 50 % BSA	3,1 – 6 mg/dL	1 000 – 1 500 mL/jour
3	Éruption maculopapulaire > 50 % BSA	6,1 – 15 mg/dL	Adulte : > 1 500 mL/jour
4	Érythroderme généralisé et formation bulleuse	> 15 mg/dL	Douleur abdominale sévère avec ou sans iléus
Grade			
I	Étape 1-2	Aucun	Aucun
II	Étape 3 ou	Étape 1 ou	Étape 1
III	-	Étape 2 – 3 ou	Étape 2 – 4
IV	Étape 4 ou	Étape 4	-

BSA : Body surface area (aire de surface du corps)

### 1.1.5 La GvHD chronique

La GvHD chronique est une complication majeure découlant des HSCT, dont la pathogenèse est toujours très mal comprise<sup>57</sup> et qui survient dans 6 à 80 % des interventions tout dépendant de plusieurs facteurs, notamment l'âge du receveur, le donneur, la source des HSC et la manipulation du greffon<sup>58-60</sup>. La GvHD chronique présente des signes rappelant l'autoimmunité et d'autres troubles immunologiques, tels la sclérodermie, le syndrome de Sjögren, la cirrhose biliaire primitive, la bronchiolitis oblitérantes, la cytopénie auto-immune et les immunodéficiences chroniques<sup>57</sup>. Les symptômes apparaissent habituellement dans les trois premières années suivant l'HSCT et peuvent être isolés et toucher un seul organe ou tissu, ou encore être étendus à tout l'organisme du receveur<sup>61</sup>. Les organes touchés par la GvHD chronique peuvent inclure la peau, la bouche, les yeux, le tractus gastro-intestinal, le foie, les organes génitaux chez la femme, l'œsophage, les poumons, les articulations et le tissu conjonctif<sup>62</sup>. La GvHD chronique peut avoir des conséquences cliniques très handicapantes, parmi lesquelles la raideur des articulations, la perte de la vue, des maladies respiratoires terminales et finalement la

mortalité découlant d'une immunodéficience chronique sévère qui mène à des infections récurrentes et pouvant être fatales<sup>61</sup>.

### **1.1.6 Les conséquences d'une GvHD aiguë**

#### **1.1.6.1 L'effet Graft-verus-Leukemia (GvL)**

L'effet GvL se définit par une activation des cellules du donneur à l'encontre des cellules leucémiques du receveur, qui induit leur destruction et diminue le risque de rechute leucémique. L'effet GvL est modulé principalement par les mécanismes cytotoxiques des cellules T cytolytiques et des cellules NK du donneur<sup>63</sup>. Ce phénomène étant très proche de la GvHD, la modulation de la GvHD pourrait être une méthode permettant de réduire le risque de rechute suite à la transplantation, grâce à l'effet GvL. Étant donné la toxicité associée avec la GvHD, il est primordial pour le succès de la transplantation de déterminer la limite entre la GvHD et la GvL. Plusieurs cibles de la GvL sont, tout comme pour la GvHD, les alloantigènes<sup>64</sup>. Bien que la GvHD soit une complication grave résultant des HSCT, elle semble toutefois corrélée avec un taux de rechute de leucémie moins élevé, pouvant donc du coup contribuer à améliorer le résultat post-greffe<sup>12, 65</sup>. Les cytokines, grâce à leurs pouvoirs immunostimulants, pourraient devenir une cible d'immunomodulation visant à amplifier l'effet GvL tout en diminuant l'effet GvHD<sup>64</sup>.

#### **1.1.6.2 La qualité de vie pour le patient**

La rechute de la maladie demeure la première cause de mortalité suite à la HSCT, et les causes de mortalité sans rechute dépendent du temps écoulé depuis l'infusion de cellules souches. La mortalité sans rechute dans la période suivant la greffe est généralement causée par la toxicité liée au conditionnement pré-greffe avec lésions organiques, l'échec de la greffe avec risque d'infections, ou la GvHD aiguë. La GvHD survient habituellement très tôt suite à la HSCT, à un temps médian de trois semaines, et se développe et progresse rapidement<sup>12</sup>. Après une période de deux ans suivant la greffe, la GvHD chronique est la cause de mortalité non reliée à la rechute la plus commune. Malgré le fait que la GvHD cause des dommages aux organes, la GvHD et ses traitements se résument à une suppression immunitaire significative, ce qui augmente le risque de complications infectieuses fatales.

## 1.2 Comment traiter les GvHD ?

Tel que mentionné précédemment, un traitement immunosuppresseur est absolument nécessaire suite à la HSCT, sans quoi une GvHD fatale se développera dans 100% des cas. La modulation de l'intensité du traitement administré est très importante, mais délicate. En effet, un traitement insuffisant risque de se traduire par une faible survie des patients, à cause des lésions multi-viscérales reliées à la GvHD, alors qu'un traitement excessif risque de se traduire par des infections potentiellement fatales. On cherche donc à atteindre la dose qui permettra de contrôler la GvHD, tout en préservant assez de fonction immunitaire pour contrôler les risques d'infections<sup>54</sup>. Actuellement, la durée générale de ce traitement immunosuppresseur prophylactique est d'environ six mois; en l'absence de GvHD, il est alors arrêté.

Dans les années 1980 et 1990, des HSCT provenant de donneur sans lien de parenté donnaient lieu à des GvHD de grade IV dans approximativement 10% des cas, et pour ces patients, le risque de mortalité sans rechute approchait les 100%. La fréquence de GvHD de grade III était approximativement de 30%, avec un risque de mortalité sans rechute d'environ 50% et la fréquence de GvHD de grade 0-II était de 60%, avec une mortalité sans rechute après deux ans pour ces patients d'environ 25%. Afin d'améliorer les résultats post-greffe et de réduire le développement de la GvHD, on vise désormais à éviter les manifestations cliniques de la maladie et à éviter l'emploi d'un traitement immunosuppresseur une fois le traitement prophylactique terminé<sup>54</sup>.

### 1.2.1 Traitements prophylactiques et traitements curatifs actuels

De nombreux paramètres et modalités de la greffe ont une influence sur la survenue et la sévérité de la GvHD, et représentent autant d'outils thérapeutiques. Ainsi, pour prévenir ou traiter la GvHD, on peut jouer sur le conditionnement, sur la manipulation du greffon, ou bien sur la manipulation de l'environnement post-greffe via l'utilisation d'agents immunosuppresseurs ou immunomodulateurs.

L'atténuation du conditionnement pré-greffe permet de limiter les dommages tissulaires infligés aux tissus du receveur et du même coup la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, certains auteurs préconisent un conditionnement réduit pour

diminuer le risque de GvHD. Le conditionnement réduit conserve son efficacité et permet la prise de greffe de la HSCT, mais il n'est toutefois pas assez réduit pour éviter complètement le développement de la GvHD et la mortalité post-greffe. Ainsi, avec un conditionnement réduit, environ 50% des patients développeront une GvHD et devront recevoir un traitement immunosuppresseur additionnel<sup>2</sup>.

### 1.2.2 Manipulation du greffon

L'objectif de la manipulation du greffon est d'éliminer les cellules responsables de la GvHD. Depuis plus de 25 ans, la déplétion des cellules T est l'exemple classique de manipulation du greffon. Bien sûr, cette déplétion réduit les risques de développer une GvHD, mais ceci au détriment de la reconstitution immunitaire, ce qui peut être fatal pour le patient immunosupprimé. Ces patients sont à risque de contracter des infections et de faire une rechute de la maladie ou un rejet de greffe. Le taux de mortalité sans rechute de ces patients peut atteindre de 29 à 55%<sup>1, 8, 33</sup>. Ce type de manipulation a donc le potentiel de réduire la GvHD, mais augmente d'autre part les risques pour le patient de contracter des infections bactériennes, virales et fongiques, puisque la reconstitution immunitaire rapide est ralentie par l'absence de lymphocytes T dans le greffon. Alors qu'une greffe de HSCT complète (c'est-à-dire sans déplétion des cellules T) permet une reconstitution immunitaire partielle mais rapide grâce à l'expansion périphérique de cellules T matures<sup>66</sup>, un greffon déplété de ces cellules T ne la permet pas. Le patient étant immunosupprimé et le greffon ne contenant pas de cellules T, seule la différenciation des cellules souches du greffon en cellules T, via la thymopoïèse, permettra de reconstituer l'immunité cellulaire du patient. De surcroît, le thymus s'atrophie avec l'âge, la fonction thymique est directement affectée<sup>66, 67</sup>, ce qui augmentera le temps nécessaire à l'obtention de la reconstitution immunitaire chez un patient plus âgé<sup>67</sup>. L'amélioration de la prévention de la GvHD se fait donc au détriment de l'immunité du patient, ce qui fait en sorte que la survie générale des patients n'est pas améliorée. Ceci fait de la déplétion des cellules T une méthode globalement inefficace pour améliorer la qualité de vie et la survie des patients.

Une déplétion partielle des cellules T ou une sélection positive de certaines populations cellulaires (progéniteurs CD34<sup>+</sup>, Treg, NK et MSC) permettrait d'utiliser un conditionnement pré-greffe atténué, tout en permettant au greffon de demeurer

immunocompétent. Cette approche permettrait donc au greffon de conserver son potentiel GvL, tout en évitant de créer une GvHD<sup>33</sup>. Ces méthodes en développement n'ont pas encore strictement démontré leur efficacité en clinique, mais elles sont prometteuses. En effet, la capacité des Treg à supprimer les réponses immunitaires<sup>68</sup>, la capacité des cellules NK à détruire les APC résiduels du receveur<sup>33</sup>, l'action immunosuppressive et la capacité des MSC à migrer vers les lésions tissulaires et à contribuer à la guérison des blessures<sup>36</sup> permettraient toutes de réduire les risques de développer une GvHD. De plus, la possibilité de contrôler le nombre de cellules CD34<sup>+</sup> greffées afin de permettre une prise de greffe optimale avec un risque de GvHD réduit serait également une option de traitement intéressante<sup>33</sup>.

### **1.2.3 Manipulation de l'environnement post-greffe**

Afin de contrôler l'environnement post-greffe, on a surtout recours à un traitement immunosuppresseur afin de prévenir la GvHD. Différentes classes d'immunosuppresseurs existent et peuvent être utilisés seuls ou en combinaison.

#### **1.2.3.1 Corticostéroïdes**

Les corticostéroïdes représentent la classe thérapeutique majeure utilisée massivement en clinique. La prednisolone appartient à cette classe d'immunosuppresseurs lympholytiques qui préviennent la synthèse de l'IL-1 chez les APC, empêchant ainsi la présentation d'antigènes<sup>18</sup>. Ils inhibent également la cascade de cytokines inflammatoires. Les corticostéroïdes sont souvent utilisés à faible dose (2 mg/kg/jour)<sup>55, 69</sup> en association aux inhibiteurs de calcineurine (CNI) et aux agents antiprolifératifs en tant que traitement prophylactique. Les corticostéroïdes représentent surtout un outil thérapeutique majeur de première ligne dans le traitement curatif, c'est-à-dire en cas de survenue de GvHD. Par contre, tous les patients ne répondent pas favorablement au traitement corticostéroïde et la réponse à ce type de traitement est rarement maintenue. Trois critères définissent l'inefficacité du traitement corticostéroïde contre la GvHD : la progression de la GvHD plus de trois jours après l'administration des corticostéroïdes, l'absence de changements clinique ou biochimique après une semaine de traitement et une réponse incomplète après deux semaines de traitement aux corticostéroïdes<sup>55</sup>. De plus, il n'existe toujours pas de protocole standard lorsque ceux-ci ne font pas effet<sup>6, 64</sup>. La réponse au traitement

corticostéroïde peut servir d'indice de survie à la GvHD, puisque 80% des patients n'y répondant pas mourront des suites de la GvHD<sup>70, 71</sup>.

### **1.2.3.2 Inhibiteurs de calcineurine (CNI)**

Parmi les CNI, on retrouve principalement la cyclosporine A et le tacrolimus. Ceux-ci bloquent la synthèse de l'IL-2, ce qui prévient l'activation des cellules T<sup>18, 39</sup>. La prévention de l'activation des cellules T est utile dans la prévention de la GvHD, mais peut être potentiellement fatale pour les patients si ceux-ci contractent des infections. Les CNI demeurent un outil majeur et sont présentement utilisés dans toutes les HSCT qui n'ont pas au préalable été manipulées avec déplétion de lymphocytes T du greffon.

### **1.2.3.3 Agents chimiothérapeutiques antiprolifératifs**

Le méthotrexate et le mycophenylate mofetil sont des agents chimiothérapeutiques antiprolifératifs. Ils préviennent la division et l'expansion clonale des cellules T<sup>6, 18</sup>.

Bien que les CNI et les agents chimiothérapeutiques antiprolifératifs soient de bons traitements individuellement pour la prévention de la GvHD, ils sont d'autant plus efficaces lorsqu'ils sont jumelés. En effet, la combinaison de ces deux types de traitements permet une réduction significative de l'incidence et de la sévérité de la GvHD, tout en améliorant la survie des patients. De façon générale, on remarque que les thérapies combinées sont plus efficaces que les monothérapies<sup>18</sup>. Généralement, ces agents sont utilisés en combinaison avec les CNI dans toutes les greffes.

### **1.2.3.4 Inhibiteur de mTOR**

La protéine mTOR est importante dans le mécanisme complexe de signalisation intracellulaire, qui est impliqué dans la croissance cellulaire, la prolifération, l'angiogénèse et le métabolisme. Le sirolimus est un inhibiteur de mTOR et contrairement aux CNI, celui-ci pourrait non seulement interférer avec la prolifération des cellules T, mais également permettre l'amplification sélective des Treg et inhiber l'activité des DC<sup>2, 6, 12, 33</sup>. L'inhibition des DC est bien évidemment utile dans la prévention de la GvHD, mais a encore une fois un potentiel fatal si le patient contracte une infection, en affectant la présentation des antigènes aux cellules T. Des essais cliniques sont en cours pour évaluer

l'intérêt de jumeler les inhibiteurs de mTOR et les CNI dans le traitement de la GvHD<sup>6, 7, 10, 18</sup>.

### **1.2.3.5 Anticorps monoclonaux ou polyclonaux**

Des anticorps monoclonaux sont souvent utilisés en parallèle avec les traitements immunosuppresseurs mentionnés ci-dessus. Le sérum anti-lymphocytaire (ATG) ou l'anticorps monoclonal anti-CD52 (alemtuzumab) sont souvent administrés dans les jours précédant la greffe. Leur propriété biologique est de détruire de façon plus ou moins intense et spécifique les lymphocytes T circulants. Le moment de l'administration de ces anticorps peut être critique : une administration précoce permet la suppression de l'immunité du receveur et facilite la prise de greffe, tandis que l'administration suite à la transplantation de cellules souches cause une immunosuppression persistante<sup>33</sup>. Ces anticorps sont très efficaces dans la prophylaxie de la GvHD, mais l'immunosuppression persistante qu'ils induisent fait qu'ils ne sont utilisés que dans des circonstances où les risques de GvHD sont jugés importants, ou lorsqu'une GvHD sévère apparaît, particulièrement en cas de résistance aux corticostéroïdes.

### **1.2.3.6 Inhibiteur de NF-κB**

L'activation de NF-κB est essentielle lors de la réponse immunogène des cellules T. Des études préliminaires auraient démontré que le bortezomib, un inhibiteur de NF-κB, affecte différemment la GvHD et la GvL en démontrant une plus grande affinité envers les cellules T actives, comparativement aux cellules T au repos. Le bortezomib permet également l'induction de l'apoptose des cellules T activées et réduit la production des cytokines Th1 pro-inflammatoires des cellules T alloréactives, donc celles qui sont impliquées dans le déclenchement de la GvHD. Le bortezomib est également en mesure de sensibiliser les cellules tumorales aux effets lytiques des cellules immunitaires effectrices par les DC<sup>72</sup>. Ces effets potentiels semblent très favorables et des essais cliniques sont en cours pour tester l'efficacité et la tolérance du bortezomib dans ce contexte.

### **1.2.3.7 Inhibiteur de TNF-α**

Puisque les patients ayant une GvHD ont un taux élevé de TNF-α dans leur plasma, les anti-TNF-α ont été proposés dans le traitement de la GvHD. Ainsi le traitement combiné de stéroïdes et d'etanercept, un inhibiteur de TNF-α, a démontré un meilleur taux de rémission

complète chez les patients, comparativement à ceux recevant un simple traitement aux stéroïdes<sup>63</sup>.

Globalement, plusieurs produits existent déjà afin de prévenir l'apparition de la GvHD, mais ceux-ci sont rarement efficace à 100% lorsqu'utilisés seuls. Lorsque l'on combine plusieurs de ces traitements, leur efficacité est augmentée, mais souvent au détriment de la reconstitution immunitaire du patient<sup>73</sup>. En effet, en combinant plusieurs classes d'immunosuppresseurs, on affaiblit tellement le peu d'immunité restant au patient qu'on le soumet à de plus grands risques de contraction d'infections bactérienne, fongique ou virale. Il est donc nécessaire de tenter de développer un traitement prophylactique permettant de réduire les risques et la sévérité de la GvHD, tout en permettant au patient de conserver une certaine immunité, lui permettant donc de pouvoir se protéger contre les infections et ainsi contribuer à la reconstruction rapide du système immunitaire. Les IVIG possèdent certaines caractéristiques qui pourraient les rendre utiles dans ce contexte.

## **1.3 IVIG**

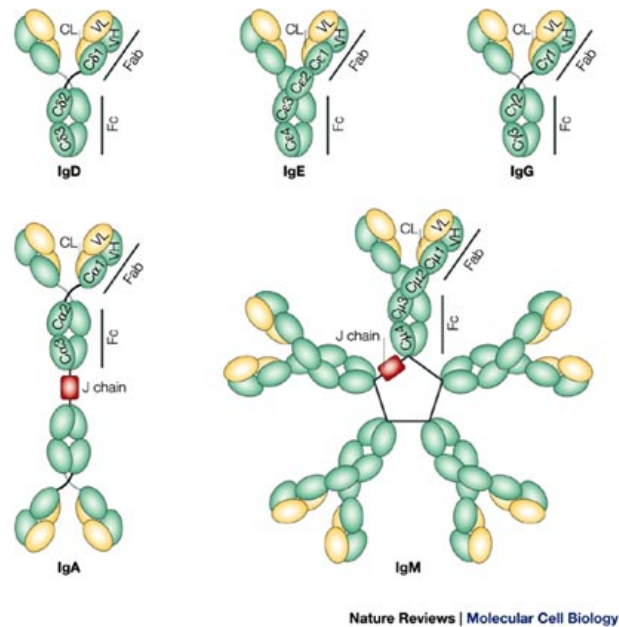
### **1.3.1 Notions de base**

Les IVIG consistent en une préparation pharmaceutique de molécules d'IgG humaines, isolées de pools de milliers de plasmas provenant de donneurs de sang. Le produit final est constitué principalement d'IgG, pour lesquels la distribution des sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) est similaire à celle retrouvée dans le sérum normal humain. Des traces d'IgA et d'IgM persistent toutefois dans la préparation finale<sup>74-76</sup>, ainsi que des quantités variables de monomères et de dimères (5-15%) et de petites quantités d'agrégats d'IgG<sup>76</sup>. Ces dimères et agrégats d'IgG seraient attribuables à la formation de complexes idiotype-anti-idiotypes entre les IgG des différents individus<sup>77, 78</sup>. Le large spectre d'anticorps anti-idiotypique retrouvé dans les IVIG pourrait constituer la base du mécanisme d'action bénéfique de cette thérapie. Ces anticorps peuvent se lier aux auto-anticorps pathogéniques, les empêchant ainsi de cibler les auto-antigènes et la formation de complexes immuns<sup>79</sup>.

Puisque des traces d'IgA et d'IgM persistent dans les préparations d'IgG purifiées, il est intéressant de s'attarder à ces classes d'immunoglobulines. La Figure 3 représente



schématiquement les cinq classes d'immunoglobulines humaines, tandis que le Tableau III résume leurs propriétés.



**Figure 3 - Immunoglobulines humaines.** Les immunoglobulines sont des protéines hétéromères en forme de « Y ». Elles sont composées de chaînes lourdes et chaînes légères et sont sécrétées par les cellules plasmatiques. Les chaînes légères interagissent avec le terminal amino des chaînes lourdes afin de former deux bras – la portion Fab – qui contiennent à leurs extrémités les sites de liaison aux antigènes. Les terminaux carboxyles des chaînes lourdes s’associent pour former la région du domaine Fc, qui permet les interactions avec des molécules, comme le complément et les récepteurs Fc. Les mammifères ont cinq différentes classes d’immunoglobulines : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM. Celles-ci varient selon le type de chaîne lourde et leur habileté à former des multimères. (Rojas et Apodaca, 2002<sup>80</sup>)

**Tableau III - Propriétés des immunoglobulines humaines (Adapté de Goldsby *et al.*, 2001<sup>15</sup>)**

Propriétés/Activité	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgM*	IgE	IgD
Abondance sérique des immunoglobulines totales			80 %		10-15 %	5-10 %	?	0,2 %
Demi-vie dans le sérum <i>in vivo</i> (jours)	23	23	8	23	6	5	2,5	3
Active la voie classique du complément	+	+/-	++	-	-	+++	-	-
Passe à travers le placenta	+	+/-	+	+	-	-	-	-
Présent sur la membrane des cellules B matures	-	-	-	-	-	+	-	+
Se lie aux récepteurs du Fc des phagocytes	++	+/-	++	+	-	?	-	-
Transport à travers la muqueuse	-	-	-	-	++	+	-	-
Induit la dégranulation des mastocytes	-	-	-	-	-	-	+	-

Les niveaux d'activité sont indiqués comme suit : ++ = élevée; + = modérée; +/- = faible; - = aucune; ? = douteuse

\* L'IgG, l'IgE et l'IgD existent toujours sous forme de monomères; l'IgA peut exister sous forme de monomère, de dimère, de trimère ou de tétramère. L'IgM membranaire est un monomère, mais l'IgM sécrétée dans le sérum est un pentamère.

On retient donc que le rôle principal des IgG est d'activer le complément et de se lier aux récepteurs Fc des cellules phagocytaires. La forme pentamère des IgM est plus efficace que l'IgG à activer le complément, par contre la grande taille du pentamère réduit sa capacité de diffusion dans les liquides tissulaires intercellulaires. La forme monomère des IgM se retrouve sous forme d'anticorps membranaire sur les cellules B matures, tandis que les IgA constituent pour leur part l'isotype d'immunoglobuline prédominant dans les sécrétions externes. Les IgA peuvent se lier aux antigènes de surface bactériens et viraux, ce qui empêche la fixation de ces antigènes aux cellules muqueuses de l'hôte<sup>15</sup>.

Cliniquement, les IVIG démontrent des propriétés immunomodulatrices et sont de plus en plus utilisées pour le traitement de maladies auto-immunes et inflammatoires systémiques<sup>81-86</sup>. Puisque personne n'a encore réussi à précisément démontrer le ou les mécanisme(s) d'action des IVIG, celles-ci sont présentement évaluées pour la prophylaxie ou le traitement de plus d'une centaine de conditions auto-immunes ou inflammatoires<sup>87</sup>. L'utilisation des IVIG est néanmoins approuvée par le FDA pour six conditions, l'une d'elles étant le traitement prophylactique de la GvHD<sup>87, 88</sup>.

### 1.3.2 Les modes d'action présumés des IVIG

Le mode d'action des IVIG est complexe et comprend probablement plusieurs facettes, puisque les IVIG interfèrent avec différents composants du système immunitaire<sup>89</sup>. Les mécanismes d'action potentiels des IVIG incluent l'expression modulée et la fonctionnalité du FcγR, l'interférence avec le mécanisme d'activation du complément, l'impact sur le réseau de cytokines et la fonction anticorps anti-idiotypique<sup>76, 79, 86</sup>.

De nombreuses données suggèrent que l'efficacité thérapeutique des IVIG dépend de leur capacité à former des dimères<sup>76</sup>. En effet, bien que les IgG normales exercent principalement des fonctions pro-inflammatoires, l'administration de hautes doses d'IVIG thérapeutiques est nécessaire afin d'induire un effet anti-inflammatoire, présumément grâce à la présence d'agrégats dans la solution<sup>89</sup>.

Les IVIG peuvent également moduler la sécrétion de cytokines et induire le blocage fonctionnel de certains gènes, dont ceux codant pour certaines protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, la transduction du signal, la transcription, l'inflammation, les interactions cellule-cellule et l'apoptose<sup>86</sup>. Les IVIG pourraient être utilisés également pour bloquer le CD95 (Fas) et réguler à la baisse le facteur de transcription EGR2, lequel semble impliqué dans le contrôle transcriptionnel de l'expression de FasL chez les cellules T activées<sup>86, 90</sup>.

### 1.3.3 Utilisation des IVIG dans le contexte de la GvHD

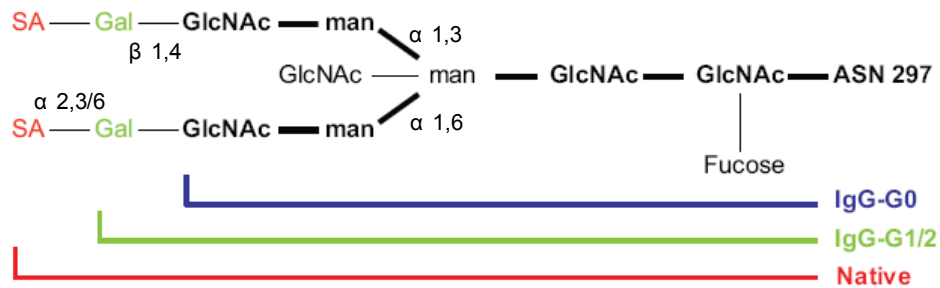
Les traitements immunosuppresseurs utilisés afin de prévenir la GvHD permettent d'améliorer la survie des patients, mais peuvent également induire un déficit de l'immunité cellulaire et une hypogammaglobulinémie. Les IVIG peuvent donc être utilisées en post-greffe, en tant que traitement substitutif, comme elles le sont dans le cas des patients ayant un déficit immunitaire primitif. Dans ces cas, et lorsque le niveau d'IVIG sérique est faible (<400mg/dL), le remplacement par IVIG est tout indiqué<sup>88</sup>. Néanmoins, un remplacement régulier (de routine) par des IVIG alors que ceci n'est pas nécessaire est une solution très coûteuse, qui selon certains auteurs, pourrait de plus affecter la reconstitution des cellules B<sup>4, 10, 88, 91, 92</sup>.

Certaines études suggèrent néanmoins que l'utilisation prophylactique des IVIG contribuerait à diminuer l'incidence et la sévérité de la GvHD. Depuis plus de 20 ans, les IVIG font partie des protocoles de transplantation de nombreuses équipes à travers le monde. Plusieurs études contrôlées ont démontré que les IVIG préviennent les infections, surtout chez les patients âgés de plus de 20 ans. Cependant, aucune étude n'a encore réussi à démontrer de façon claire et précise le rôle prophylactique ou thérapeutique des IVIG dans la GvHD, ce qui laisse toujours ouvert le débat tant qu'à l'efficacité réelle des IVIG<sup>18, 74, 87, 88, 92</sup>. La protection serait associée à la capacité réduite des lymphocytes de proliférer spontanément et de produire de l'IFN- $\gamma$ , ainsi qu'à l'amplification de l'apoptose des cellules T CD4<sup>+</sup> allogéniques<sup>43</sup>.

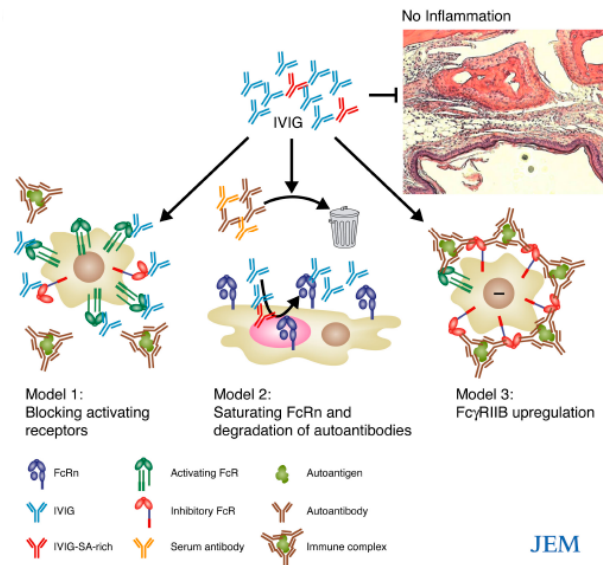
En tenant compte du fait que des traitements très efficaces contre les infections existent aujourd'hui<sup>87, 88</sup>, et qu'une étude récente démontre une augmentation du risque de développer une maladie véno-occlusive (VOD) suite à un traitement prolongé aux IVIG, le tout sans amélioration de la survie et sans réduction d'infections<sup>93</sup>, il pourrait sembler inutile et très coûteux d'avoir recours aux IVIG, du moins jusqu'à ce que leur utilité soit clairement démontrée.

### 1.3.4 Activité anti-inflammatoire des IVIG

L'activité anti-inflammatoire des IVIG résulte d'une population mineure des molécules d'IgG mises en commun qui contiennent des liens acides terminaux  $\alpha$ 2,6-sialiques sur leurs glycanes liés au Fc (Figure 4), ce qui représente environ 1-3% des IgG de la préparation d'IVIG<sup>81</sup>. Cette faible proportion explique donc les hautes doses d'IVIG requises afin d'exercer l'activité anti-inflammatoire (Figure 5). Il est intéressant de noter que cette activité peut être reproduite avec des fragments Fc d'IgG contenant une liaison  $\alpha$ 2,6-acide sialique de façon appropriée. Ces Fc doivent interagir avec une lectine type-C spécifique, DC-SIGN chez l'humain et SIGN-R1 chez les souris<sup>81, 94</sup>. Les molécules d'IgG sont capables d'initier des réponses pro-inflammatoires, telles la phagocytose et la mort des cellules tumorales à travers l'engagement et le *cross-linking* des récepteurs Fc apparentés à IgG (Fc $\gamma$ RIIBs). Les IVIG n'ont pas besoin d'une interaction directe avec les Fc $\gamma$ RIIBs sur les cellules initiatrices, mais celles-ci sont nécessaires plus tardivement dans la réponse anti-inflammatoire<sup>81, 95, 96</sup>.



**Figure 4 - Région Fc de l'IgG.** La plupart des glycoformes des IgG se distinguent par l'absence de résidus terminaux acide sialique (SA) ou galactose (Gal) et sont identifiés IgG-G0. La présence d'un ou deux résidus galactose forment le glycoforme IgG-G1/2 et la présence d'un ou deux résidus terminaux SA forment le glycoforme de forme native. Les liaisons  $\alpha 2,6$  sont les liaisons d'acide sialique prédominantes sur les glycans du Fc des IVIG. GlcNAc : N-actelyglucosamine; man : mannose (Adapté de Anthony *et al.*, 2008<sup>95</sup> et Nimmerjahn and Ravetch, 2008<sup>97</sup>)



**Figure 5 - Modèles de mécanismes de l'action anti-inflammatoire des IVIG.** Trois modèles ont été suggérés afin d'expliquer l'activité anti-inflammatoire des IVIG. Dans le premier modèle, le mélange d'IVIG (en bleu, les IVIG pauvres en anticorps acide sialique et en rouge, les IVIG riches en anticorps acide sialique) se lie sur les Fc $\gamma$ R activateurs des cellules immunitaires effectrices, bloquant ainsi l'accès des complexes immuns à ces récepteurs, ce qui inhibe l'activation cellulaire. Le deuxième modèle suggère que les IVIG fassent compétition aux IgG sériques (incluant les anticorps auto-réactifs) dans le recyclage arbitré par les FcRn. Les anticorps sériques et auto-réactifs sont dégagés plus rapidement, empêchant l'atteinte du seuil nécessaire à l'initiation de la destruction tissulaire. Dans le troisième modèle, les IVIG causent la régulation à la hausse du Fc $\gamma$ RIIB inhibiteur sur les cellules immunitaires effectrices, augmentant le seuil pour l'activation des cellules par les complexes immuns. FcRn : Fc récepteur néo-natal (Nimmerjahn et Ravetch, 2007<sup>97</sup>)

### 1.3.5 Mode d'action prophylactique des IVIG lors de la GvHD

Les Fc $\gamma$ Rs sont exprimés sur une variété de cellules immunitaires et peuvent générer des signaux intracellulaires activateur ou inhibiteur, ce qui permet de moduler la fonction des cellules. Ces cellules sont donc en mesure de reconnaître les IgG par leur fraction Fc, lesquelles peuvent par la suite contribuer à modifier la fonction des cellules<sup>75</sup>. D'autres études suggèrent cependant que c'est la région V des immunoglobulines qui est responsable de la prévention de la GvHD. De fait, les fragments F(ab')<sub>2</sub> d'IVIG induiraient l'apoptose des cellules T par un mécanisme dépendant de Fas<sup>43</sup>.

L'administration de hautes doses d'IVIG permet notamment l'inhibition de la différenciation et de la maturation des DC humaines<sup>74, 79, 89</sup>. Les DC matures sont également affectées : les IVIG empêchent la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-12 et réduisent les niveaux de TNF- $\alpha$ <sup>79</sup>, tout en augmentant simultanément la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. La régulation à la hausse de CD80 et CD86, lesquels sont cruciaux pour le *cross-talk* entre les DC et les cellules T, est également inhibée par les hautes doses d'IVIG<sup>74, 98, 99</sup>. En conséquence, les DC sont incapables d'activer les cellules T<sup>74, 89</sup>, et les cellules T auto- et allo-réactives présentes ne peuvent ni proliférer, ni produire de cytokines (IL-2). La capacité des IVIG à interférer avec l'accumulation des lésions inflammatoires dans les organes cibles<sup>100</sup> pourrait également contribuer à réduire la GvHD.

Tel que mentionné précédemment, les CNI inhibent la prolifération des cellules T et constituent un agent thérapeutique immunosuppresseur de choix, malgré les quelques effets secondaires qui peuvent découler de leur utilisation : hypertension, diabète, hypercholestérolémie, néphrotoxicité, infections et malignité. Une étude a permis de démontrer que les IVIG peuvent inhiber la prolifération des cellules T de façon similaire à ce qui est obtenu avec les CNI, tout en demeurant dans un spectre de concentration cliniquement atteignable. Par contre, l'utilisation des IVIG permet une augmentation de la mortalité des DC, effet qui ne peut être atteint lorsqu'on utilise les CNI<sup>74, 89</sup>.

Globalement, selon la littérature consultée, les IVIG permettraient de réduire la sévérité de la GvHD en interférant avec l'activation et la prolifération des cellules T, tout en permettant leur apoptose par un mécanisme dépendant Fas<sup>43, 74, 79, 89, 98-100</sup>. Les IVIG affecteraient également les DC à plusieurs niveaux, ce qui viendrait d'autant plus interférer

dans le *cross talk* nécessaire à l'activation des cellules T entre celles-ci et les DC. Finalement, la sécrétion des cytokines serait également influencée par la présence d'IVIG. Le Tableau IV réunit tous ces facteurs qui pourraient permettre une diminution de l'incidence et de la sévérité de la GvHD

**Tableau IV - Effets des IVIG sur différents types cellulaires**

Type cellulaire affecté	Réduction	Augmentation
Cellules dendritiques humaines	Différentiation et maturation <sup>74, 79, 89</sup>	Mortalité <sup>74, 89</sup>
Cellules dendritiques humaines matures	Sécrétion d'IL-12 <sup>79</sup> Sécrétion de TNF- $\alpha$ <sup>79</sup> Production de CD80 et de CD86 (inhibe donc le <i>cross talk</i> avec les cellules T) <sup>74, 98, 99</sup>	Production d'IL-10 <sup>79</sup>
Cellules T humaines	Activation <sup>74, 89</sup> Prolifération <sup>100</sup> Production d'IL-2 <sup>100</sup>	Apoptose par le mécanisme Fas <sup>43, 74, 79, 89, 98-100</sup>
Organes du receveur	Accumulation des lésions inflammatoires <sup>100</sup>	

À la lumière de ces informations, et puisque qu'aucune étude n'a à ce jour réussi à démontrer clairement et hors de tout doute l'efficacité des IVIG dans la prophylaxie de la GvHD, nous avons décidé d'investiguer le rôle immunomodulateur des IVIG dans la GvHD. Nous croyons que les IVIG peuvent réduire l'intensité et la sévérité de la GvHD. Toutefois, puisqu'il n'est pas éthiquement acceptable de procéder à des expériences chez des sujets humains permettant de tester les IVIG seules en dehors de toute autre immunosuppression, nous avons élaboré un modèle murin humanisé de GvHD. Ce modèle murin consiste à injecter des huPBMCs à des souris fortement immunodéprimées, créant ainsi une xGvHD tout à fait comparable à la pathologie humaine. Nos objectifs de travail seront donc premièrement de démontrer que les IVIG peuvent réduire l'intensité et la sévérité de la GvHD, et ensuite d'élucider le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les IVIG agissent. Les prochaines sections serviront donc à démontrer comment nous comptons atteindre nos objectifs.

#### 1.4 Souris humanisées

Les souris humanisées pourraient se définir par les modifications transgéniques qui leur permettent d'exprimer des gènes humains<sup>101</sup>. Dans notre modèle ce n'est pas le cas, et on définit les souris humanisées par leur capacité, grâce à leur immunodéficiência, d'accepter les greffes de cellules hématopoïétiques humaines ou de huPBMCs. Un tel modèle de souris permet d'étudier des processus biologiques humains *in vivo*, ce qui serait autrement impossible à réaliser.

Le développement des souris humanisées est le résultat d'un travail de longue date et demeure en constante évolution. En effet, les modèles connus et utilisés à ce jour sont le fruit de plus de 20 ans de travail, depuis la description de la souris *scid* en 1983<sup>102</sup>. L'évolution du modèle de souris humanisées repose sur des progressions de modifications génétiques afin de développer le meilleur modèle possible de souris hôtes immunodéficientes.

Trois percées technologiques majeures ont permis l'élaboration des souris humanisées telles qu'on les connaît aujourd'hui. La découverte de la mutation *Prkdc<sup>scid</sup>* chez la souris CB17 (souris *scid*), ainsi que la découverte cinq ans plus tard que les huPBMCs, les tissus fœtaux hématopoïétiques et les HSCs pouvaient se greffer avec succès dans ces souris ont permis d'élaborer le premier modèle<sup>102-105</sup>. Celui-ci n'était toutefois pas sans ses défauts. En effet, ces souris qui étaient supposées n'avoir ni lymphocytes T ni lymphocytes B finissaient, avec le temps, par pouvoir générer spontanément des lymphocytes T et B murins, en plus de produire de hauts niveaux de cellules NK et démontrer des signes d'activité immunitaire innée<sup>106</sup>. Quelques années plus tard, en 1992, les souris possédant des mutations ciblées sur les gènes *Rag1* et *Rag2* ont été décrites (souris *Rag<sup>-/-</sup>*)<sup>107, 108</sup>. Ces souris n'ont définitivement pas de cellules T et B murines, mais elles conservent toutefois une forte présence d'activité NK<sup>106-108</sup>.

La deuxième percée importante dans le développement des souris humanisées s'est produite en 1995. L'élaboration des souris NOD-*scid* a permis une meilleure prise de greffe que dans le modèle *scid* précédent, probablement à cause de l'activité moindre des cellules NK des souris NOD et de leurs défauts additionnels de l'immunité innée<sup>109</sup>. Ces



souris ont toutefois une courte espérance de vie, ce qui limite la durée des expériences pouvant être menées à terme avec ce modèle animal<sup>109</sup>.

La troisième grande percée technologique ayant grandement amélioré les modèles murins humanisés a été la mutation ciblée du locus de la chaîne  $\gamma$  du récepteur de l'IL-2 (IL-2R $\gamma$ ) en 1995<sup>110-113</sup>. L'IL-2R $\gamma$  est un composant crucial des récepteurs à haute affinité pour l'IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 et elle est absolument nécessaire pour la signalisation à l'aide de ces récepteurs. L'absence de cette chaîne mène donc à une détérioration sévère dans le développement et la fonction des cellules T, mais surtout prévient complètement le développement des cellules NK<sup>110-112, 114-116</sup>.

À l'aide de tous ces outils, un modèle de souris NOD/LtSzscidIL2rg<sup>-/-</sup> a été décrit dès 2002. Ces souris n'ont ni cellules T, B ou NK<sup>101, 115, 116</sup>, une fonction réduite des macrophages, l'absence de complément hémolytique, leur chaîne  $\gamma$  est complètement absente<sup>109, 117-119</sup> et leurs DC sont non-fonctionnelles, rendant ces souris incapables de produire de l'IL-12p40, l'IFN- $\gamma$  et ne produisant que de faibles niveaux de TNF- $\alpha$ <sup>116</sup>. Ces souris doivent toutefois être irradiées avant de pouvoir leur injecter des huPBMCs. En effet, les travaux de Ballen *et al* ont permis de déterminer qu'une irradiation à faible dose (350 cGy) permettait une meilleure prise de greffe des cellules HSC chez les souris NOD-scid<sup>120</sup>. De plus, ces souris ne développent pas de lymphomes thymiques, même suite à l'irradiation, un problème qui affectait les modèles murins humanisés NOD précédents<sup>115, 116</sup> et leur espérance de vie est plus longue que pour les modèles précédents, au-delà de 90 semaines<sup>116</sup>. Par contre, le problème caractéristique de ces souris est l'absence de prise de greffe des cellules B suite à l'injection de huPBMCs : la majorité des cellules T greffées acquièrent un phénotype activé à cause de la xéno-réactivité, ce qui mène souvent à la xGvHD létale<sup>121, 122</sup>. Ce dernier point, qui pourrait être considéré à tort comme un défaut du modèle animal, est tout au contraire sa plus grande force dans le contexte de ce projet de recherche. En effet, les souris NOD/LtSzscidIL2rg<sup>-/-</sup> permettent aisément d'établir un modèle murin humanisé de xGvHD.

## **2. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **2.1 Souris**

Les souris immunodéficientes NOD/LtSz-*scid*IL2rg<sup>-/-</sup> (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) sont gardées dans des cages sur support ventilé (Sealsafe PLUS Mouse, Tecniplast, Italy), dans une salle à pression positive. Elles reçoivent la nourriture LabDiet Specially Formulated Autoclavable Laboratory Animal Diet (PMI Nutrition LLC, Brentwood, USA) et de l'eau de boisson préalablement stérilisées à l'autoclave. De la ciprofloxacine (Sandoz, Boucherville, Canada) est ajoutée à une concentration de 0,08 mg/mL dans l'eau de boisson suite à l'irradiation des souris et est changée à tous les trois jours pour la durée de l'expérience. Toutes les manipulations ont lieu dans une hotte à flux laminaire (NuAire, Plymouth, USA). Le protocole de recherche a été préalablement approuvé par le comité institutionnel des bonnes pratiques animales en recherche (CIBPAR) du CHU Sainte-Justine.

### **2.2 Obtention des huPBMCs**

Une leucaphérèse de 100 mL a été obtenue d'un donneur sain ayant signé un formulaire de consentement écrit. Le prélèvement est dilué 1:3 dans du D-PBS-citrate 0,6% et le tout est déposé sur Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden). Après centrifugation à 1800 rpm pendant 30 minutes sans frein, l'interface de huPBMCs est récoltée et lavée dans du D-PBS (ci-après PBS). La viabilité et le décompte cellulaire sont évalués par coloration au bleu de trypan. Les huPBMCs sont divisées en aliquots de 10<sup>8</sup> cellules viables et ensuite congelés en milieu DMSO 10% - FBS 50%. Ces aliquots seront conservés en cuve d'azote liquide jusqu'à utilisation ultérieure.

### **2.3 Induction et suivi de la GvHD**

Les souris sont divisées en deux groupes expérimentaux traités de façon hebdomadaire respectivement par des IVIG ou du PBS. Les souris reçoivent leur traitement initial de PBS ou d'IVIG (Talecris Biotherapeutics, Mississauga, Canada) à une dose de 50 mg<sup>96</sup> dans un volume de 500 µL, injecté à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille 28G½ (Becton Dickinson, Franklin Lanes, USA) par voie intra-péritonéale. Les souris sont par la suite irradiées de façon sublétales à une dose de 3 Gy dans un irradiateur Cesium EACL (Nordion

Gammacell 1000, MDS Nordion, Ottawa, Canada) et la ciprofloxacine est ajoutée à leur eau de boisson, tel que décrit précédemment. Les huPBMCs sont décongelées et lavées dans un milieu RPMI-FBS 10%. La viabilité et le décompte cellulaire sont évalués par coloration au bleu de trypan. Les cellules sont ensuite suspendues dans du PBS à raison de  $10^7$  cellules dans un volume de 100  $\mu$ L. Ces cellules sont par la suite injectées aux souris par voie intra-péritonéale en utilisant une seringue munie d'une aiguille 28G $\frac{1}{2}$ , dans une période de six à 24 heures post-irradiation. Les souris reçoivent de façon hebdomadaire le traitement de PBS ou d'IVIG, tel que décrit précédemment. Les signes cliniques de la GvHD, ainsi que le poids des souris sont évalués tout au long de l'expérience. Les signes cliniques de la GvHD sont gradés selon les critères suivants : le poids, la mobilité (0, mobile; 1, mobilité limitée; 2, à peine mobile), ainsi que l'apparence générale (0, poil normal; 1, poil ébouriffé; 2, poil ébouriffé et peau rouge enflée; 3, poil ébouriffé, peau rouge enflée et alopecie en plaque). Le diagnostic de GvHD est posé lorsque la perte de poids excède 10% du poids initial et que les grades de mobilité et d'apparence générale sont d'au moins 1 chacun.

#### **2.4 Sacrifices des souris**

En accord avec les résolutions du CIBPAR du CHU Sainte-Justine, les souris sont sacrifiées suite au diagnostic des points limites de la GvHD. Les souris sont alors anesthésiées sous 1-2% d'isoflurane (<sup>Pr</sup>AErrane, Baxter Corporation, Mississauga, Canada) au masque inducteur afin de procéder à la prise de sang par voie intra-cardiaque avec une aiguille 25G<sup>5/8</sup>, avant d'être tuées par dislocation cervicale. Le foie, la rate, les intestins et la peau sont ensuite prélevés du cadavre pour fins d'analyse plus complète. Une partie de la rate est broyée avec du PBS sur tamis cellulaire de 70  $\mu$ m pour procéder à l'analyse par cytométrie de flux des populations lymphocytaires s'y retrouvant. Le foie, la rate, les intestins et la peau sont par la suite séparés en deux : une partie est congelée en bloc d'OCT (Tissue Freezing Medium, Fischer Scientific Company, Ottawa, Canada) et l'autre est fixée au paraformaldéhyde et enrobée en paraffine afin de pouvoir procéder à des études pathologiques des tissus. L'immunohistochimie est performée au département de pathologie de l'Hôpital Sainte-Justine sur un automatisé (NextES IHC, Ventana, Tucson, AZ). Les échantillons de peau sont colorés afin de détecter l'infiltration lymphocytaire de cellules CD3<sup>+</sup> (lymphocytes T). Une coloration indirecte à l'immunoperoxidase est

performée avec l'automatisé sans aide technique, en utilisant l'anticorps primaire lapin anti-humain CD3 (polyclonal, A0452, Dako, Mississauga, Ontario). L'ajout de l'anticorps primaire est suivi d'une incubation avec l'anticorps secondaire biotinylé approprié, la peroxidase streptavidine et le 3,3-diaminobenzidine (DAB)-tetrachloride (ChemMate detection Kit, Dako, Mississauga, Ontario). Les lames sont contre-colorées avec l'hématoxyline-éosine safran (HES) (Dako, Mississauga, Ontario). Les échantillons de peau et de foie sont également analysés au niveau morphologique afin de détecter la présence de corps apoptotiques et d'infiltrations lymphocytaires. Un marquage HES est ainsi effectué.

### **2.5 Prises de sang**

Des prises de sang d'un volume de 100 µL sont prélevées à partir de la veine saphène de façon hebdomadaire, le lendemain de l'injection de PBS ou d'IVIG. Le sang est récolté dans des microvettes héparinisées (Sarstedt Inc., Allemagne). Le plasma est récolté et entreposé en aliquots de 100 µL ou 40 µL au congélateur à -20°C en vue du dosage d'IgG humaine et de cytokines humaines, respectivement. Les globules rouges sont lysés grâce à une solution de chlorure d'ammonium et les leucocytes récupérés sont lavés une fois avec du PBS avant d'être suspendus dans du PBS-FBS 2%, puis sont analysés en cytométrie de flux.

### **2.6 Cytométrie de flux**

Les anticorps couplés aux fluorochromes suivants sont utilisés afin d'évaluer les populations lymphocytaires : anti-CD45 murin-FITC, anti-CD45 humain-APC, anti-CD16 humain-FITC, anti-CD56 humain-PE, anti-CD3 humain-APC-Cy7, anti-CD4 humain-FITC, anti-CD8 humain-PE (BD Pharmingen, Franklin Lanes, USA). On utilise également du 7-AAD afin de discriminer les cellules mortes (BD Pharmingen, Franklin Lanes, USA). Les cellules sont alors incubées pendant 30 minutes à une température de 4°C à l'obscurité. Elles sont ensuite lavées et suspendues dans un volume de 200 µL de PBS-FBS 2%. Les billes CountBright™ (Molecular Probes Inc, Invitrogen, Eugene, USA) sont ajoutées afin de pouvoir effectuer un compte absolu du nombre de cellules dans chacun des échantillons. Les échantillons sont lus au cytomètre de flux BD FACSAria™ et analysés avec le logiciel BD FACSDiva™ (BD Biosciences, USA).

## 2.7 ELISA IgG humaine

Un essai ELISA IgG humaine, en suivant les directives du fabricant (Bethyl Laboratories, Inc, Montgomery, USA), est effectué sur des échantillons de plasma de souris afin de déterminer la concentration d'IgG humaine circulant dans le sang des souris.

## 2.8 Culture cellulaire

Pour effectuer des tests *in vitro* de l'effet des IVIG sur les huPBMCs, les huPBMCs sont cultivées dans un milieu RPMI1640-glutamine additionné de 10% FBS à une concentration de  $2,5 \times 10^5$  cellules/mL dans des plaques 24 puits à fond plat (Sarstedt, Allemagne). Les quatre conditions expérimentales testées en triplicata sont huPBMCs seules, huPBMCs+PBS, huPBMCs+BSA et huPBMCs+IVIG. On ajoutera la même concentration d'IVIG que celle déterminée par l'ELISA IgG humaine sur les échantillons de plasma de souris. Le traitement au BSA se fera à la même concentration afin de conserver la concentration de protéines dans les différentes conditions de culture. Le milieu de culture et les conditions expérimentales (PBS, BSA et IVIG) sont changés à tous les trois jours.

## 2.9 Tempête de cytokines

La concentration d'un groupe de cytokines humaines de type Th1, Th2 et Th17 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-15, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) est évaluée dans des échantillons de plasma des souris, grâce à la technologie de Bioplex System and Suspension Array Technology (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Cette technologie permet d'évaluer la concentration de toutes ces cytokines simultanément sur un seul échantillon de plasma. Le principe de la technologie Luminex repose sur les microsphères, séparées en 100 populations spécifiques possédant chacune leur adresse colorimétrique spécifique. Chaque population de microsphères peut être couplée à un récepteur de cytokines, permettant ainsi de capturer et détecter les cytokines désirées. Une fois à l'intérieur du lecteur Luminex, des lasers excitent les colorants internes des microsphères, ce qui permet de les identifier. Ces mêmes lasers peuvent également exciter les colorants rapporteurs utilisés, permettant ainsi de déterminer au terme de la lecture de plusieurs microsphères appartenant à chacune des populations, la concentration des cytokines. Les directives du manufacturier ont été respectées. Les

plaques ont été lues sur lecteur CS 1000 Autoplex Analyzer (Perkin Elmer Inc., Waltham, USA).

### **2.10 Statistiques**

Les statistiques sont déterminées avec le test  $t$  de Student et le test de Mantel-Cox (log-rank) a été utilisé pour l'étude de la survie. Ces tests sont effectués avec le logiciel GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Softwares Inc, La Jolla, USA).

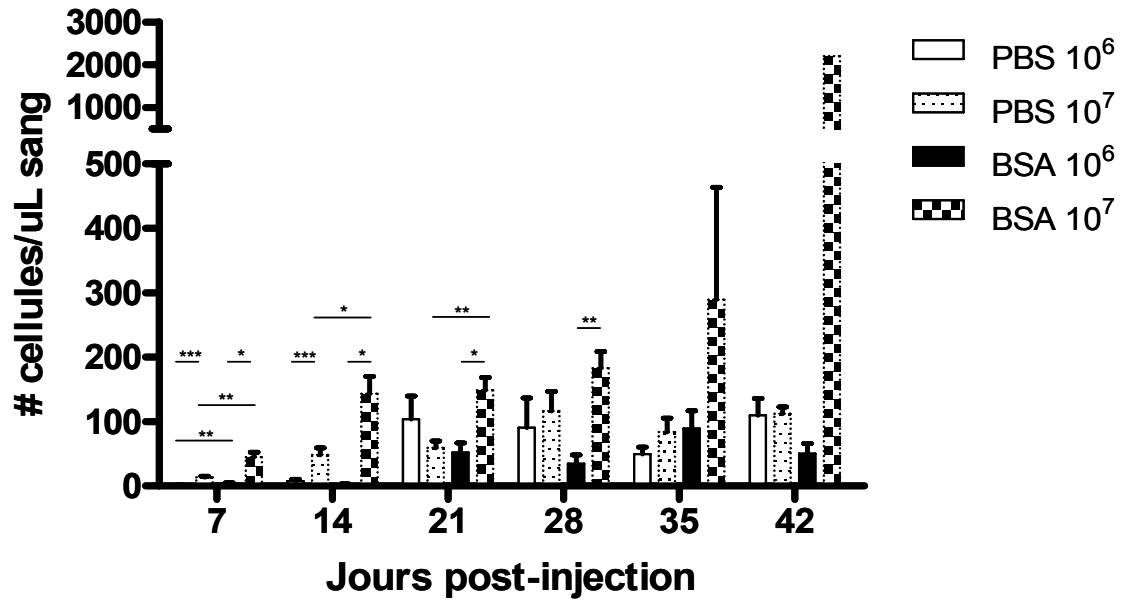
### 3. RÉSULTATS

#### 3.1 Induction de la GvHD

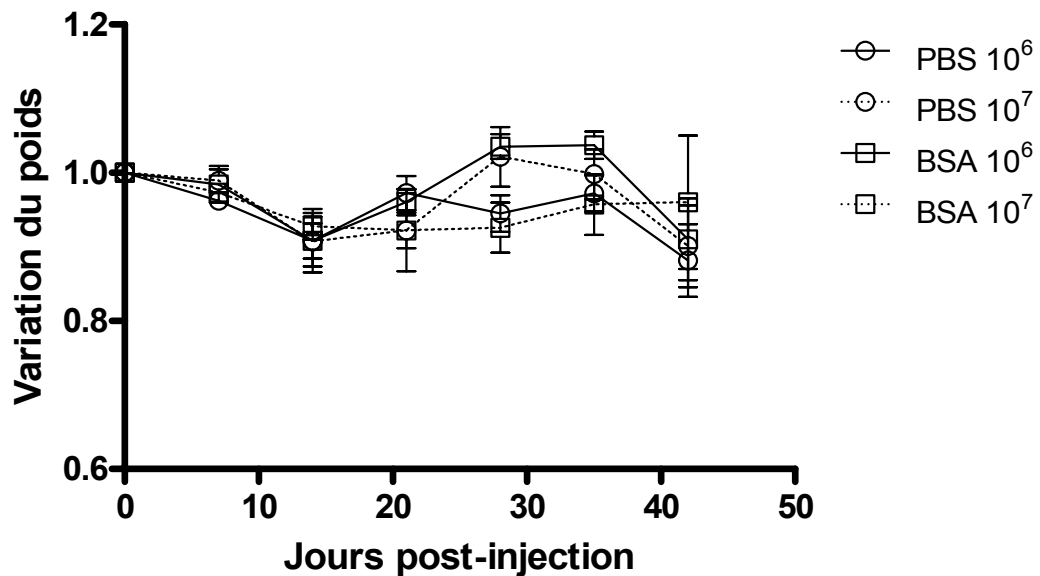
Les souris immunodéficientes NOD/LtSzscidIL2rgc<sup>-/-</sup> sont utilisées afin de développer le modèle murin humanisé de GvHD. En raison de leur forte immunodéficiences, ces souris peuvent recevoir des huPBMCs qui pourront survivre et proliférer *in vivo* une fois injectées. Afin de faciliter l'intégration des cellules humaines dans le système murin, les souris sont irradiées de façon sub létale à 3Gy avant de recevoir les huPBMCs par voie intrapéritonéale, le tout dans une période de six à 24 heures suivant l'irradiation.

Afin de mettre au point le protocole du modèle murin humanisé de GvHD, quatre doses d'injection des huPBMCs ont été testées ( $10^6$ ,  $2,5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  et  $10^7$  huPBMCs). Seules les doses  $10^6$  et  $10^7$  huPBMCs seront présentées dans ce mémoire.

De plus, nous avons cherché à déterminer quel pouvait être le meilleur contrôle vis-à-vis des IVIG. Les différentes études publiées à ce jour utilisent principalement l'albumine, que ce soit sous forme de BSA<sup>96</sup> ou d'HSA<sup>43, 89</sup>. Nous avons tenu cependant à essayer également un contrôle constitué de PBS, puisque les protéines de l'albumine pourraient devenir un biais dans l'évaluation de la GvHD, par leur pouvoir de rétention des fluides. Nous avons donc développé deux modèles murins de GvHD: GvHD-PBS et GvHD-BSA. Brièvement, ces modèles consistent à traiter antérieurement à l'induction de la GvHD par l'injection des huPBMCs, les souris avec l'agent désiré, et de façon hebdomadaire par la suite pour la durée de l'expérience. Les modèles GvHD-PBS et GvHD-BSA ont donc été testés en parallèle avec les différentes doses de huPBMCs à injecter, afin de pouvoir établir le meilleur modèle expérimental sur lequel baser notre projet de recherche.

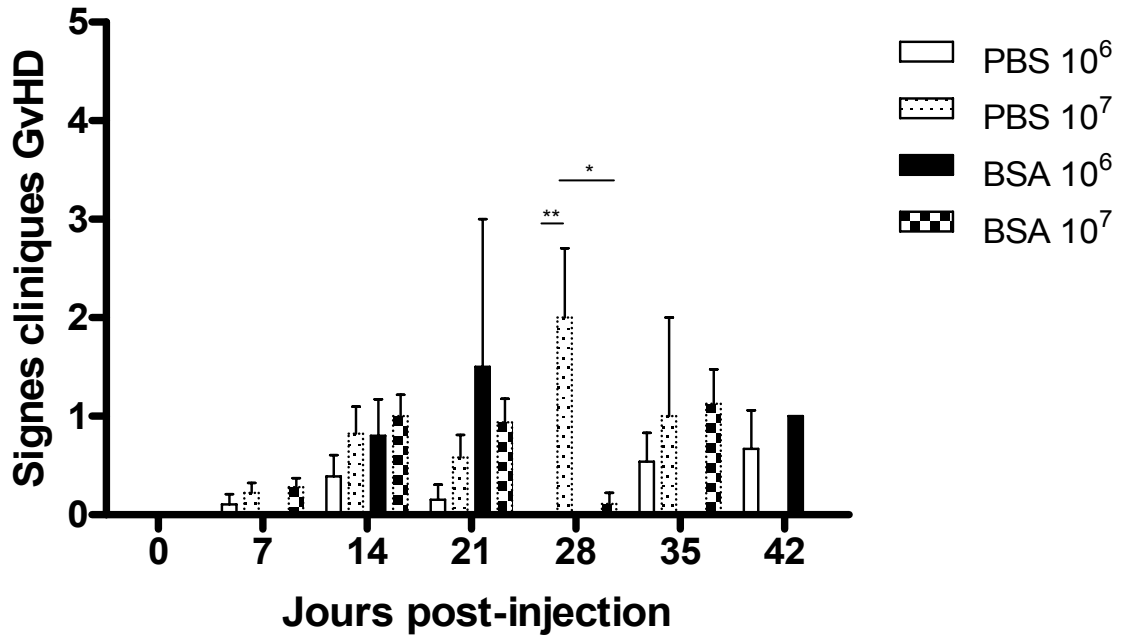


**Figure 6 - Nombre absolu de cellules humaines circulantes dans le sang périphérique de souris.** Le nombre de cellules humaines CD45<sup>+</sup>/μL de sang murin a été déterminé lors des prises de sang hebdomadaires sur les souris survivantes contrôles GvHD. PBS 10<sup>6</sup>, n = 16; PBS 10<sup>7</sup>, n = 17; BSA 10<sup>6</sup>, n = 17 et BSA 10<sup>7</sup>, n = 25. *Test t de Student*, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

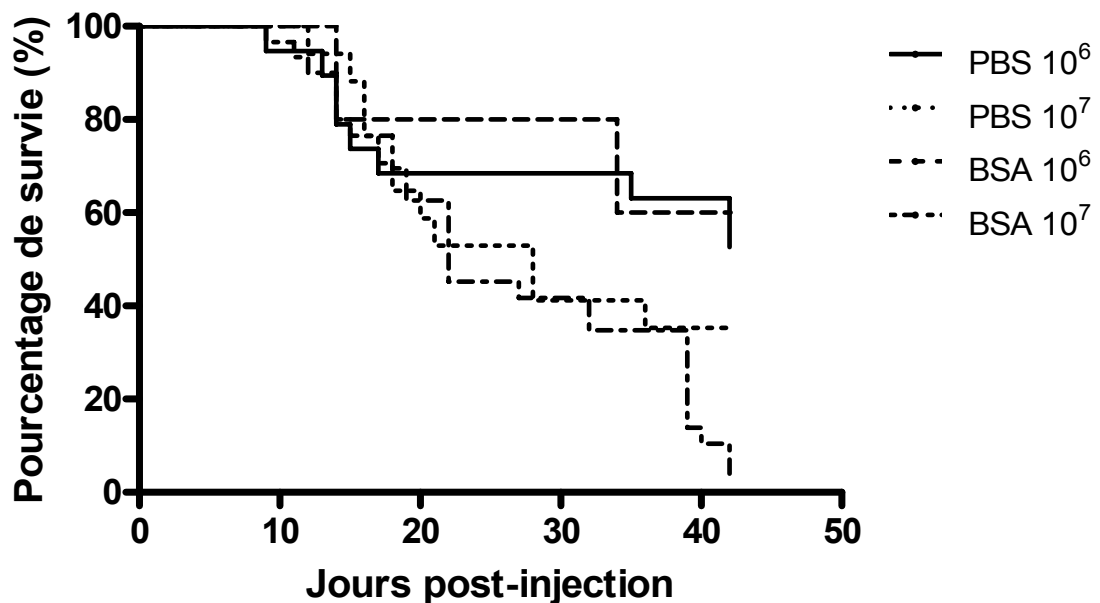


**Figure 7 - Variation de poids des souris GvHD.** Les souris GvHD sont pesées à toutes les semaines afin d'établir la variation en comparaison au poids initial. PBS 10<sup>6</sup>, n = 19; PBS 10<sup>7</sup>, n = 18; BSA 10<sup>6</sup>, n = 5 et BSA 10<sup>7</sup>, n = 25. *Le Test t de Student n'a donné aucune statistique significative.*

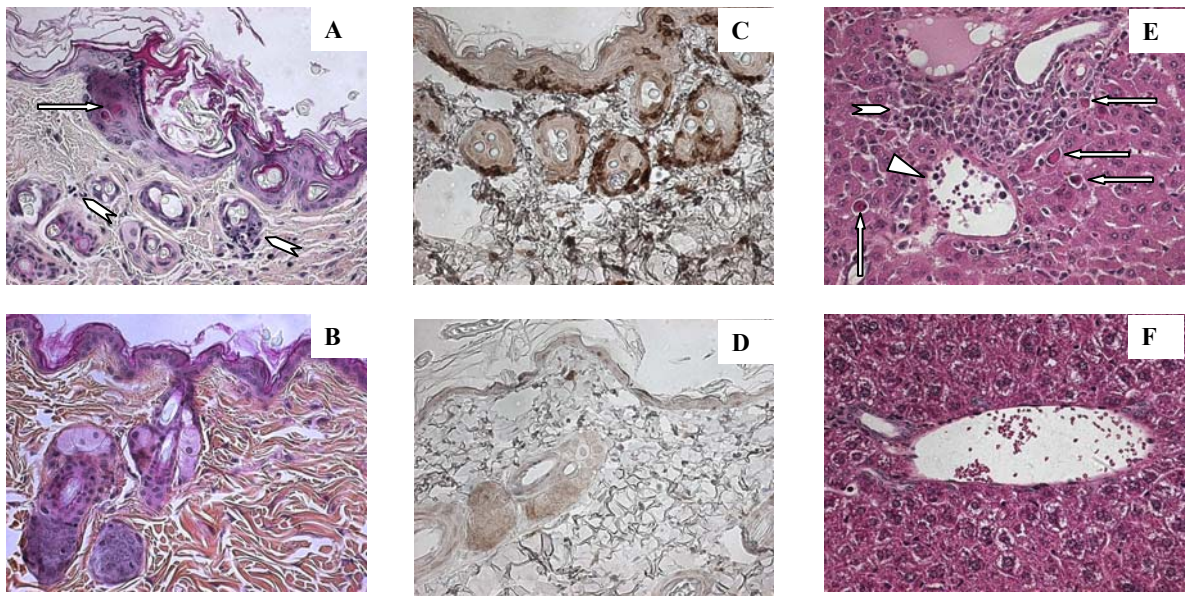




**Figure 8 - Apparition et évolution des signes cliniques de GvHD.** Les souris GvHD sont sous observation pour la durée entière de l'expérience afin de déceler l'apparition des signes cliniques de GvHD, selon la gradation fournie dans la section matériel et méthode. PBS 10<sup>6</sup>, n = 19; PBS 10<sup>7</sup>, n = 18; BSA 10<sup>6</sup>, n = 5 et BSA 10<sup>7</sup>, n = 25. *Test t de Student*, \*  $p < 0,005$  et \*\*  $p < 0,001$ .



**Figure 9 - Survie des souris GvHD.** Pourcentage de survie des souris GvHD. PBS 10<sup>6</sup>, n = 19; PBS 10<sup>7</sup>, n = 18; BSA 10<sup>6</sup>, n = 5 et BSA 10<sup>7</sup>, n = 25. *Test de Mantel-Cox* : PBS 10<sup>6</sup> vs PBS 10<sup>7</sup>  $p = 0,3603$ ; BSA 10<sup>6</sup> vs BSA 10<sup>7</sup>  $p = 0,0231$ , PBS 10<sup>6</sup> vs BSA 10<sup>6</sup>,  $p = 0,7855$  et PBS 10<sup>7</sup> vs BSA 10<sup>7</sup>,  $p = 0,1268$ .



**Figure 10 - Étude pathologique de la GvHD.** Étude pathologique en microscopie optique chez une souris GvHD et une souris contrôle. Les coupes de peau et foie de la souris GvHD colorés à l'hématoxyline-éosine (A et E) présentent des corps apoptotiques (flèches) et des infiltrations lymphocytaires (têtes de flèches), tandis que la peau et le foie de la souris contrôle (B et F) en sont exempts. La coloration des cellules humaines CD3<sup>+</sup> (anti-CD3 polyclonal) par immuno-histochimie sur les coupes de peau démontre une infiltration lymphocytaire pour la souris GvHD (C), mais pas dans la souris contrôle (D).

Comme il est possible de le constater, toutes les souris injectées ont développé des signes évidents de GvHD. La première évidence repose dans la présence importante de cellules leucocytaires humaines dans le sang périphérique des souris (Figure 6), tel qu'évalué par la présence de cellules humaines CD45<sup>+</sup>, et par l'infiltration de lymphocytes humains et la présence de corps apoptotiques dans la peau et le foie (Figure 10). Les lymphocytes humains s'infiltrèrent dans les organes cibles de la GvHD (Figure 10A, C et E) par le gradient de chemokines induits suite à l'irradiation pré-injection des souris<sup>123</sup>. Une fois infiltrés dans les organes, les lymphocytes humains, grâce à leur activité cytotoxique et à l'aide de la tempête de cytokines engendrée par l'irradiation, peuvent induire l'apoptose des tissus murins (Figure 10A et E). Tel qu'attendu, l'injection d'un plus grand nombre de huPBMCs a permis la prolifération d'un plus haut nombre de cellules CD45<sup>+</sup> humaines *in vivo*, donnant un effet de dose-réponse (Figure 6 et résultats non-publiés). Dans le groupe GvHD-PBS, il y a significativement plus de cellules humaines en circulation lors des deux premières semaines post-induction chez les souris ayant reçu 10<sup>7</sup> huPBMCs, comparativement aux souris en ayant reçues 10<sup>6</sup> (p<0,001). Le même phénomène est également observé chez les souris GvHD-BSA injectées avec 10<sup>7</sup> huPBMCs lorsque l'on compare aux souris injectées avec 10<sup>6</sup> huPBMCs. Cette différence significative est maintenue pendant les quatre premières semaines post-induction (p<0,05 lors des trois

premières semaines et  $p < 0,01$  lors de la quatrième semaine). À noter que le nombre de cellules hCD45<sup>+</sup> à 42 jours post-induction de GvHD pour le groupe GvHD-BSA injecté à  $10^7$  huPBMCs est obtenu de la seule souris survivante à ce point de l'expérience. En effet, cette souris avait démontré une prolifération des huPBMCs plus lente comparativement aux autres souris du groupe, lui permettant de vivre plus longtemps, succombant finalement à une GvHD suite à la prolifération explosive de huPBMCs. Une telle prolifération n'était pas inhabituelle, mais étant la seule souris survivante, le résultat ne se trouve pas dilué par d'autres souris ayant une prolifération moindre de huPBMCs.

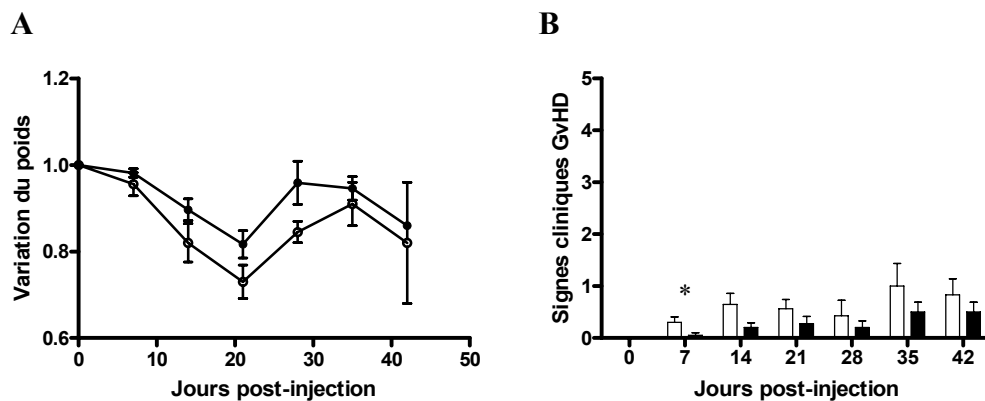
Les autres critères importants de GvHD, à savoir la perte de poids (Figure 7) et l'apparition de signes cliniques caractéristiques d'une GvHD (Figure 8), ont également été observés pour les souris injectées avec des huPBMCs. Évidemment, le dénouement final d'une GvHD, tel qu'attendu dans l'élaboration de ce modèle murin, est la mortalité des souris injectées (Figure 9). En effet, puisqu'aucun traitement n'est administré aux souris, on s'attend à les voir mourir relativement rapidement des suites d'une xGvHD induite par les cellules T des huPBMCs injectées. Pour ces paramètres (poids et signes de GvHD), l'effet dose-réponse du nombre de cellules injectées n'est pas toujours observable, mais on remarque par contre que la mortalité des souris reflète l'effet de la dose-réponse (Figure 9). L'injection de  $10^7$  huPBMCs provoque significativement plus de mortalité que l'injection de  $10^6$  huPBMCs dans le groupe GvHD-BSA ( $p = 0,0231$ ), mais pas dans le groupe GvHD-PBS ( $p = 0,3603$ ). Il est intéressant de noter qu'on ne remarque pas de différence de mortalité pour une même dose d'injection de huPBMCs dépendant du traitement contrôle administré. En effet, pour une dose de  $10^6$  huPBMCs, la mortalité entre les souris GvHD-PBS et GvHD-BSA est similaire ( $p = 0,7855$ ), ce que l'on remarque également à la dose de  $10^7$  huPBMCs ( $p = 0,1268$ ). On détermine donc que l'administration d'une dose de  $10^7$  huPBMCs est préférable dans le contexte d'un modèle murin de GvHD, puisque le nombre de cellules humaines CD45<sup>+</sup> circulantes dans le sang périphérique des souris est plus élevé, les signes cliniques sont plus importants sans pour autant être significatifs dans la majorité des cas et la mortalité est plus rapide, permettant d'effectuer les études sur un laps de temps plus court.

Ces groupes servaient non-seulement à déterminer la dose de huPBMCs à injecter aux souris afin d'induire une xGvHD, mais également à déterminer quel contrôle utiliser dans le

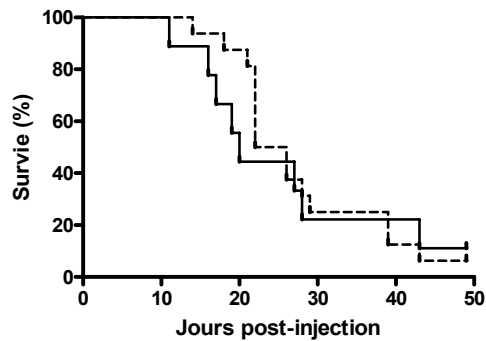
cadre des prochaines étapes du projet de recherche. Bien que les souris GvHD-BSA aient permis la prolifération d'un plus grand nombre de cellules humaines CD45<sup>+</sup> comparativement aux souris GvHD-PBS (Figure 6), la perte de poids corporel (Figure 7), le développement des signes cliniques (Figure 8) et la mortalité (Figure 9) ont été semblables entre les deux groupes. Étant donné que la perte de poids est un facteur important dans le développement et le diagnostic de la GvHD et que la BSA possède des propriétés de rétention des fluides, on en conclue que le modèle GvHD-PBS est préférable en tant que contrôle dans le contexte de l'élaboration d'un modèle murin de GvHD.

### 3.2 Traitement aux IVIG

Puisque le modèle expérimental de GvHD-PBS était convaincant dans 100% des cas, on a pu entamer la portion expérimentale de ce projet de recherche. Les souris GvHD ont donc été séparées en deux groupes expérimentaux : un groupe contrôle GvHD-PBS et un groupe expérimental GvHD-IVIG. Dans ce dernier groupe, les souris ont été traitées avec 50 mg d'IVIG la veille de l'induction de la xGvHD et de manière hebdomadaire par la suite, et ce pour la durée de la GvHD, afin de déterminer si les IVIG pouvaient contribuer à réduire l'apparition des signes cliniques, la perte de poids et la mortalité attribuées à la GvHD.



**Figure 11 - Symptômes de GvHD selon le traitement.** Les souris survivantes GvHD-PBS (○, n=9) démontrent une perte de poids (A) légèrement plus importante que les souris GvHD-IVIG (●, n=16) tout au long de leur GvHD, sans pour autant que cette perte de poids soit significative. Les signes cliniques caractéristiques de GvHD (B) sont également plus élevés chez les souris survivantes GvHD-PBS (barres blanches, n=20) que chez les souris GvHD-IVIG (barres noires, n=20). *Test t de Student, \* p<0,05.*



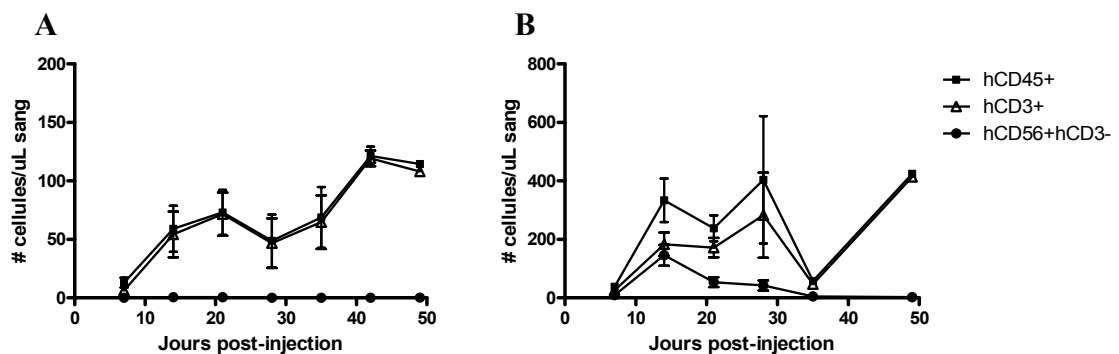
**Figure 12 - Survie des souris GvHD selon le traitement.** Pourcentage de survie des souris GvHD-PBS (ligne pleine, n=9) et GvHD-IVIG (ligne pointillée, n=16). La mortalité est retardée d'environ une semaine chez les souris GvHD-IVIG. *Test de Mantel-Cox,  $p = 0,37$ .*

Il est très difficile d'établir un rôle protecteur aux IVIG avec les résultats obtenus à ce jour. En effet, la perte de poids est légèrement moins importante pour les souris GvHD-IVIG (Figure 11A) que pour les souris GvHD-PBS, sans toutefois que cette différence ne soit significative. De façon similaire, l'apparition des signes cliniques a été réduite chez les souris GvHD-IVIG par rapport aux souris GvHD-PBS (Figure 11B). La première semaine de traitement est la seule qui a démontré une diminution significative de l'apparition de signes cliniques de GvHD ( $p < 0,05$ ) dans le groupe de souris GvHD-IVIG, ce qui ne permet pas d'attribuer un effet bénéfique des IVIG à ce stade du développement de la GvHD.

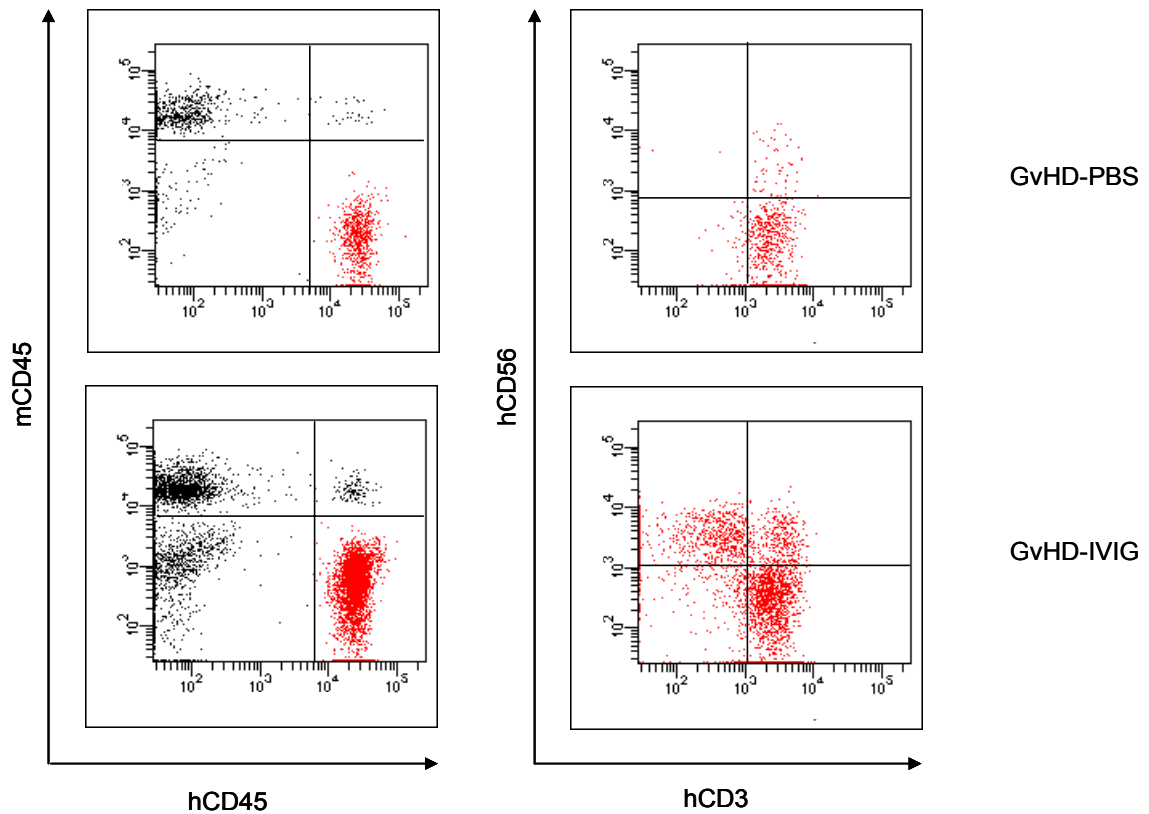
En ce qui touche la mortalité des souris GvHD, celles recevant le traitement aux IVIG ont eu une mortalité légèrement retardée par rapport à celles recevant le traitement contrôle de PBS ( $p = 0,37$ ) (Figure 12). Ce délai de mortalité est surtout remarqué dans les 20 premiers jours de traitement de la GvHD, après quoi il s'estompe et la survie devient identique, peu importe le traitement utilisé. À ce stade, on peut donc supposer que les IVIG pourraient être en mesure de prolonger la survie des souris GvHD. Il faudra cependant déterminer à quoi est attribuable ce délai de mortalité dans les premiers jours de traitement.

Il est important de noter, bien que la xGvHD se développe dans 100 % des souris injectées, elle ne se produit pas au même rythme chez toutes les souris. Prenons les souris contrôles GvHD-PBS afin d'expliquer ce phénomène. Chez la majorité des souris, les huPBMCs prolifèrent rapidement et les premiers signes cliniques apparaissent dès la première semaine post-induction de GvHD (Figure 11). Ces souris seront les premières à décéder de GvHD. Il

existe néanmoins quelques cas où les huPBMCs injectées prolifèrent à un rythme plus lent, et donc où les signes cliniques se manifestent plus tardivement. Par conséquent, la GvHD se développe plus lentement chez ces souris, ce qui retarde leur mortalité (observations notées de façon constante lors des expérimentations). Le rythme de prolifération des huPBMCs une fois injectées chez les souris peut donc expliquer la différence entre la mortalité précoce et tardive chez un même groupe de souris xGvHD.



**Figure 13 - Populations cellulaires humaines dans le sang périphérique murin de souris GvHD.** Les populations cellulaires humaines sont évaluées lors des prises de sang hebdomadaires des souris GvHD-PBS (A, n=8) et GvHD-IVIG (B, n=15).



**Figure 14 - Cytométrie de flux.** Cytométrie de flux des échantillons sanguins de souris GvHD-PBS et GvHD-IVIG. Dans le panneau gauche, les cellules leucocytaires humaines (hCD45<sup>+</sup>mCD45<sup>-</sup>) et murines (mCD45<sup>+</sup>hCD45<sup>-</sup>). Dans le panneau de droite, les cellules T (hCD3<sup>+</sup>) et NK (hCD56<sup>+</sup>hCD3<sup>-</sup>) humaines.

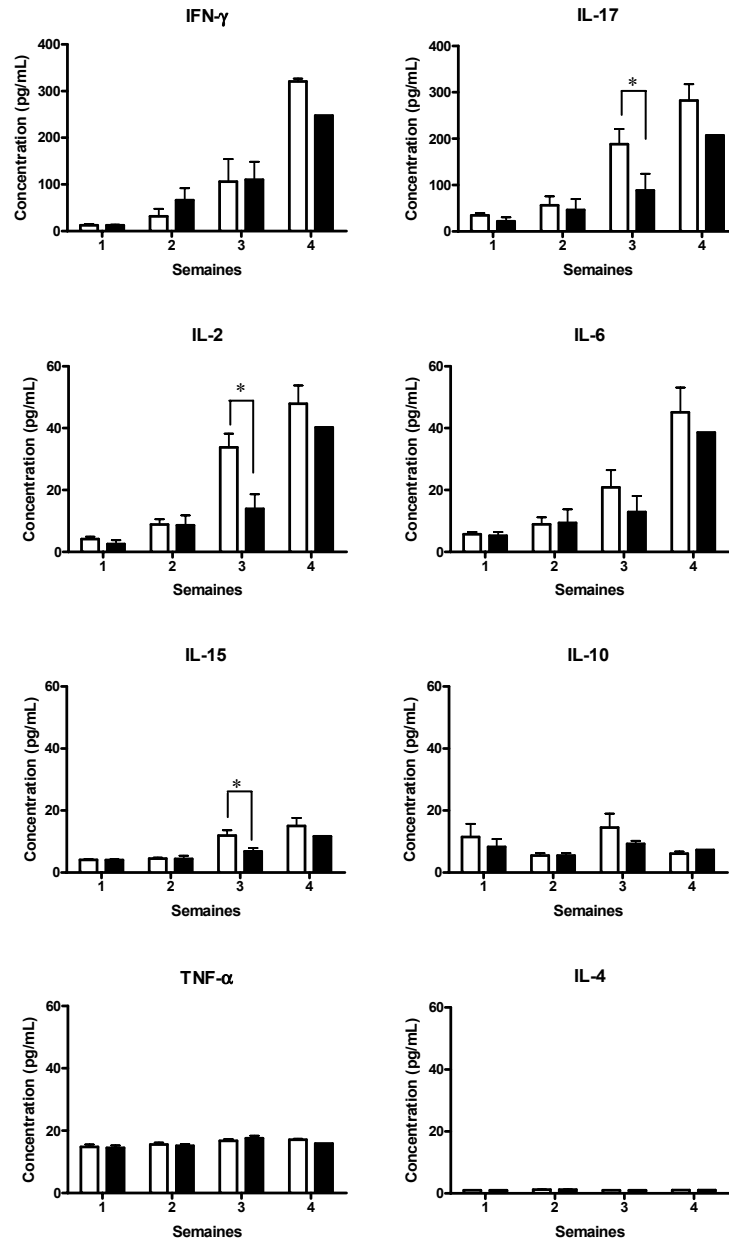
Tel qu'attendu, la totalité des cellules leucocytaires humaines (hCD45<sup>+</sup>) retrouvées dans le sang périphérique des souris GvHD-PBS sont des lymphocytes T (hCD3<sup>+</sup>) et on n'y retrouve aucune trace de cellules NK (hCD56<sup>+</sup>hCD3<sup>-</sup>) (Figure 13A et Figure 14), de lymphocytes B ou de Treg (résultats non montrés). Bien qu'elles ne soient pas représentées dans les figures, il est important de noter que les Treg ne sont pas présentes dans le groupe GvHD-IVIG. Il est par contre intéressant de noter la présence importante de cellules NK lors des 20 premiers jours de traitements chez les souris GvHD-IVIG (Figure 13B et Figure 14). Les cellules leucocytaires humaines dans ces souris sont donc composées de lymphocytes T et de cellules NK lors des trois premières semaines de traitement, après quoi la population cellulaire NK se résorbe, laissant la place aux lymphocytes T. Notons également que malgré une concentration de cellules leucocytaires humaines beaucoup plus élevée dans le sang périphérique chez les souris GvHD-IVIG sur toute la durée de la GvHD (en moyenne 250 cellules humaines/ $\mu$ L de sang murin) ces souris se portent en général

mieux que les souris GvHD-PBS (en moyenne 70 cellules humaines/ $\mu$ L de sang murin) et survivent légèrement plus longtemps. Ce phénomène n'est toutefois pas observé dans la rate au sacrifice des souris, lorsque celles-ci atteignent les points limites de la GvHD (résultats non-montrés).

### **3.3 Tempête de cytokines**

La GvHD se développe en trois étapes distinctes : premièrement, le conditionnement pré-greffe qui immunodéprime le patient et crée des lésions dans le tractus gastro-intestinal, ce qui engendre la production de cytokines pro-inflammatoires; deuxièmement, l'activation des cellules T du greffon par la présentation des APC du patient et troisièmement, la tempête de cytokines, qui amplifie les dégâts causés par les cellules T du greffon. Afin de valider notre modèle murin de GvHD, ainsi que d'évaluer l'effet des IVIG sur la production de cytokines humaines, on a procédé au dosage de huit cytokines humaines dans le plasma de souris GvHD-PBS et GvHD-IVIG. On a décidé de tester des échantillons représentant les quatre premières semaines de GvHD, puisque c'est dans cette période que les effets dévastateurs de la GvHD sont les plus évidents. C'est également lors du premier mois d'administration que les IVIG ont le plus d'effet protecteur contre la GvHD.





**Figure 15 - Concentration de cytokines humaines.** La concentration de huit cytokines humaines de type Th1 a été évaluée dans le plasma de sang de souris GvHD-PBS (bandes blanches) et GvHD-IVIG (bandes noires) (n=5). *Test de Student*, \*  $p < 0.05$

Globalement, on remarque que les cytokines de types Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 et IL-15) et Th17 (IL-17) sont augmentées lors du développement de la GvHD, alors que les niveaux de cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-10) ne sont pas modifiés (Figure 15), ce qui correspond au profil de cytokines d'une GvHD, tel que décrit dans la littérature<sup>3, 6, 39</sup>. Ce profil de cytokines de types Th1 et Th17 contribue donc à solidifier la validation de notre modèle murin humanisé de GvHD.

À première vue, on remarque déjà que la production de certaines cytokines peut être influencée par les IVIG, tandis que d'autres ne sont pas affectées. Il est important de mentionner que dans aucun des cas on n'a retrouvé d'IL-4 dans le sang périphérique. D'autre part, les niveaux de TNF- $\alpha$  ne semblent pas être modifiés suite à l'administration d'IVIG, ainsi que les cytokines IFN- $\gamma$ , IL-6 et IL-10 qui ne semblent pas être influencées par la présence d'IVIG, tandis que l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-17 sont significativement moins présentes dans le plasma des souris GvHD-IVIG (Figure 15). Cette modulation partielle des cytokines de type Th1 pro-inflammatoires pourrait donc contribuer à réduire les risques et la sévérité de la GvHD.

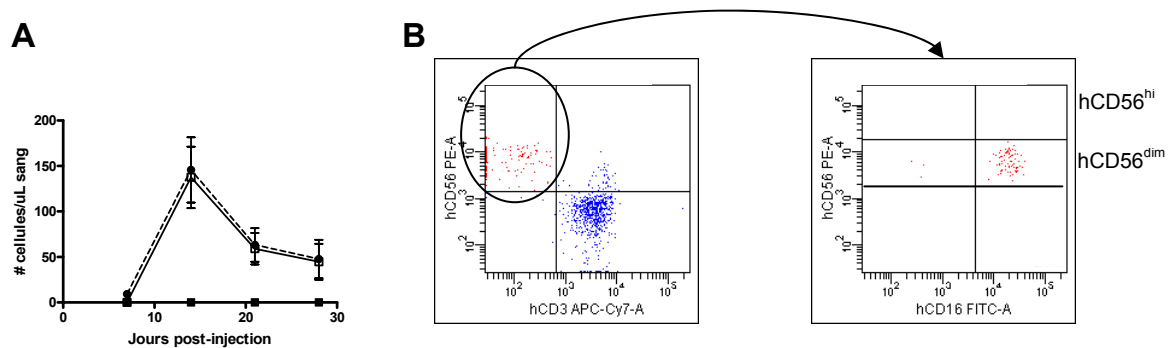
### 3.4 Étude de la population cellulaire NK

Puisqu'il est connu dans la littérature que les cellules NK sont divisées en deux sous-populations ayant des propriétés distinctes<sup>124-128</sup>, nous avons cherché à étudier, grâce aux marqueurs de surface CD56 et CD16, la nature des cellules NK retrouvées dans les prélèvements sanguins des souris GvHD-IVIG.

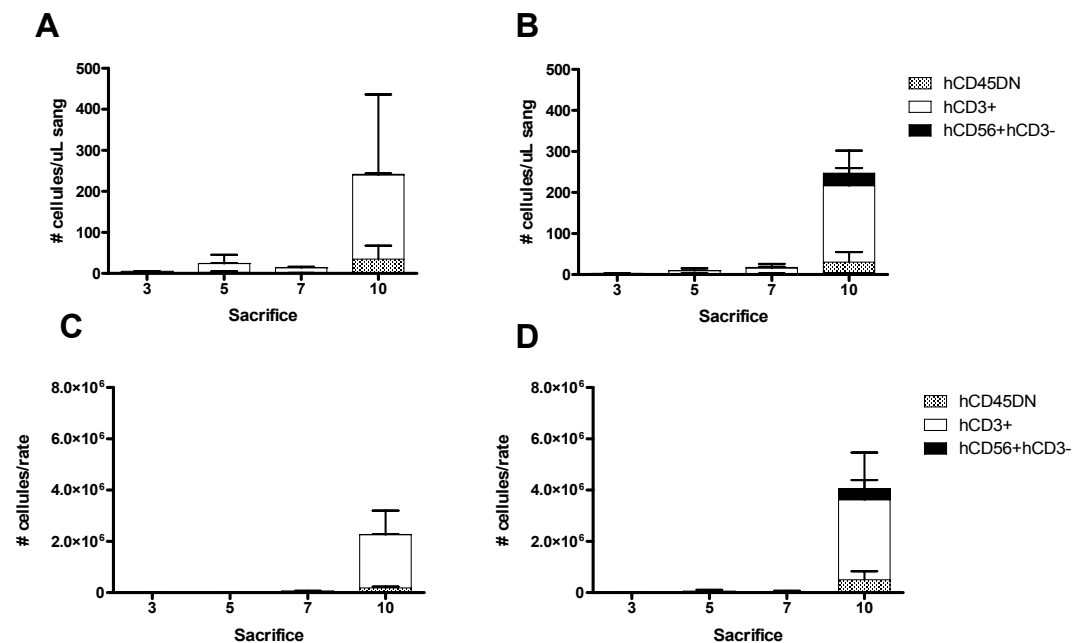
Les cellules NK du phénotype hCD56<sup>hi</sup>hCD16<sup>-</sup> se caractérisent par la capacité de production d'IFN- $\gamma$ , tandis que les cellules NK du phénotype hCD56<sup>dim</sup>hCD16<sup>+</sup> se distinguent par leur activité cytotoxique<sup>125-127</sup>. Les cellules NK retrouvées chez les souris GvHD-IVIG sont donc strictement de phénotype cytotoxique hCD56<sup>dim</sup>hCD16<sup>+</sup> (Figure 16).

Afin de mieux comprendre l'apparition de la population de cellules NK chez les souris GvHD-IVIG, nous avons tenté d'en déterminer la chronologie précise. Pour ce faire, nous avons effectué le sacrifice séquentiel de souris GvHD-IVIG à des temps stratégiques de

trois, cinq, sept et dix jours post-induction de la GvHD, puisque l'apparition des NK dans le sang se produit entre la première et la deuxième semaine (Figure 13B).



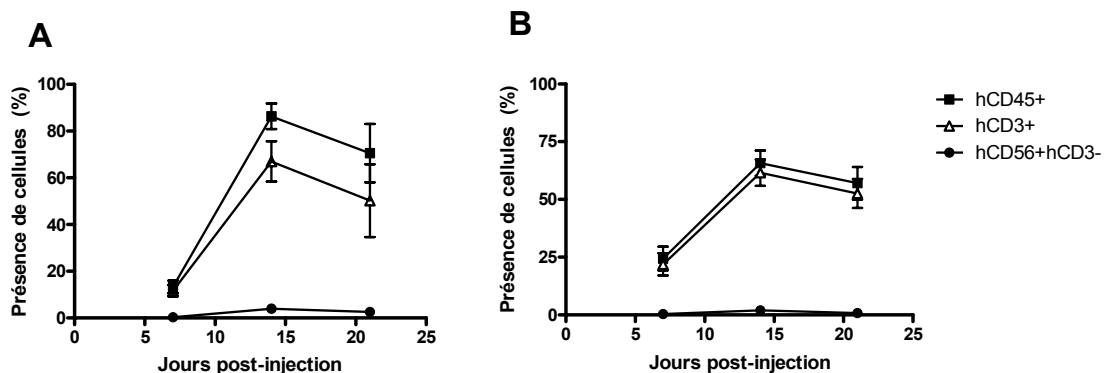
**Figure 16 - Sous-populations de cellules NK humaines dans le sang périphérique des souris GvHD-IVIG.** En A, les sous-populations de cellules NK humaines (●) sont évaluées dans le sang périphérique des souris GvHD-IVIG. La totalité des cellules NK humaines retrouvées dans le sang périphérique est de phénotype cytotoxique hCD56<sup>dim</sup>hCD16<sup>+</sup> (□), alors que les cellules NK de phénotype producteur d'IFN- $\gamma$  hCD56<sup>hi</sup>hCD16<sup>-</sup> (■) sont complètement absentes (n=12). En B, les marquages effectués en cytométrie de flux pour caractériser cette sous-population cellulaire.



**Figure 17 - Apparition des cellules NK.** Série de sacrifices planifiés de façon séquentielle afin de déterminer le moment d'apparition des cellules NK dans la circulation périphérique (A et B) et dans la rate (C et D) de souris GvHD-PBS (A et C) et GvHD-IVIG (B et D) (n=2).

Comme le montre la Figure 17, les cellules NK humaines se retrouvent en circulation dans le sang périphérique et dans la rate aux environs du dixième jour de la GvHD. Nous avons ensuite tenté de déterminer quel mécanisme induisait l'apparition de cette population, en investiguant les interactions entre les huPBMCs et les IVIG. Puisque dans le modèle expérimental les huPBMCs et les IVIG sont tous deux injectés par voie intra-péritonéale et au même site, un groupe expérimental a été établi afin de déterminer si la proximité entre les huPBMCs et les IVIG est nécessaire à l'apparition des cellules NK. Pour ce groupe expérimental GvHD-IVIG, les huPBMCs ont été injectés par voie intraveineuse et les IVIG par voie intra-péritonéale. Bien que toutes les souris aient développé une xGvHD, elles ont échoué à démontrer la présence de la population de cellules NK humaines dans le sang périphérique de ces souris (résultats non montrés). Ceci suggère qu'une proximité entre les IVIG et les huPBMCs est nécessaire, qu'il s'agisse d'une interaction directe ou via un intermédiaire, afin de permettre l'apparition de cette population de cellules NK humaines.

Afin de tester si le microenvironnement dans lequel sont injectées les huPBMCs devait préalablement être traité aux IVIG, nous avons testé différents temps d'injection du traitement d'IVIG. Puisque les souris reçoivent habituellement les IVIG la veille de l'injection des huPBMCs, nous avons testé premièrement l'administration du traitement IVIG le jour même, et au même site d'injection que les huPBMCs, et montré que ceci permettait l'apparition de la population de cellules NK humaines (résultats non montrés). Nous avons alors, par la suite, évalué des temps d'administration du traitement IVIG à trois et sept jours post-induction de la GvHD.



**Figure 18 - Besoin du conditionnement préalable du microenvironnement d'injection avec les IVIG.** Le microenvironnement qui accueillera les huPBMCs doit préalablement être conditionné aux IVIG afin de permettre l'apparition de la population de cellules NK humaines. Un délai de conditionnement de trois (A) et sept (B) jours suite à l'induction de la GvHD (n=3).

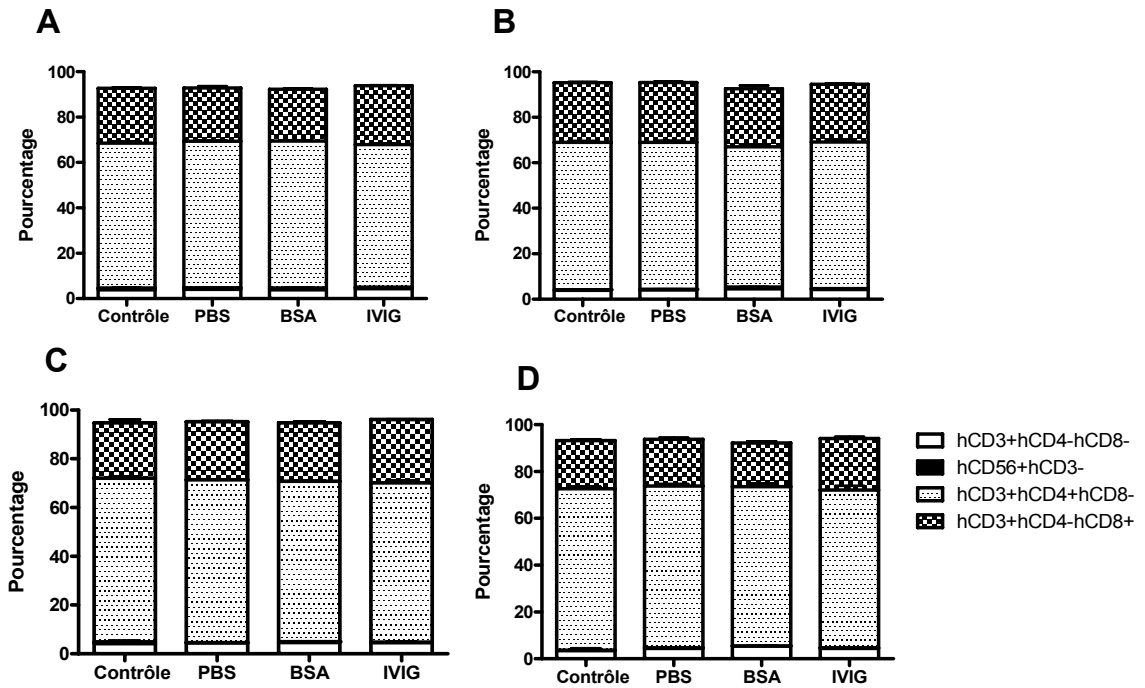
La Figure 18 montre que les cellules NK humaines ne sont plus détectables dans le sang périphérique de souris GvHD-IVIG lorsque les IVIG sont administrées après l'induction de la GvHD. Ceci mène donc à croire que le microenvironnement recevant les huPBMCs doit préalablement être conditionné aux IVIG afin de permettre la différenciation et la prolifération de la population cellulaire NK.

### **3.5 Dosage des IgG humaines dans le plasma de souris GvHD-IVIG**

Puisque le microenvironnement semble de grande importance dans l'apparition de la population de cellules NK, nous avons tenté d'élucider le mécanisme d'action des IVIG sur les huPBMCs. Afin de tester l'hypothèse selon laquelle les IVIG agiraient directement sur les huPBMCs, une culture cellulaire de huPBMCs a été traitée avec la dose d'IVIG retrouvée physiologiquement chez les souris GvHD-IVIG (Figure 19). Pour ce faire, nous avons dû déterminer quelle était la concentration d'IgG humaines circulant dans le sang périphérique des souris GvHD-IVIG. Les échantillons de plasma prélevés lors des prises de sang ont donc été testés par ELISA IgG humaine. On a ainsi déterminé que la concentration d'IgG humaines circulant dans le sang des souris était de 1,8 g/L (résultat non montré), ce qui concorde avec d'autres études publiées précédemment qui utilisaient aussi un modèle d'injection d'IVIG humaines à des souris<sup>96</sup>. Grâce aux résultats de l'ELISA IgG humaine, on connaît désormais la concentration d'IgG humaine circulant dans le sang périphérique des souris GvHD-IVIG. Nous avons pu mettre en culture cellulaire les huPBMCs provenant de la même leucaphérèse que celles utilisées pour l'induction de la GvHD dans le modèle murin et les soumettre à la dose d'IVIG déterminée lors de l'ELISA. Cette culture cellulaire a permis d'évaluer si les IVIG agissent directement sur les huPBMCs afin de faire apparaître les cellules NK humaines. Les huPBMCs et les IVIG ont été gardées en culture pour des périodes de trois, sept, dix et quatorze jours, tel que dans l'essai de sacrifices séquentiels ayant servi à déterminer à quel délai post-induction de GvHD les NK apparaissaient. Les cellules récoltées ont été analysées en cytométrie de flux afin de caractériser les populations cellulaires humaines présentes.

Étant donné l'absence totale de cellules NK (hCD56<sup>+</sup>hCD3<sup>-</sup>) dans la culture cellulaire (Figure 19), ceci suggère que l'interaction entre les IVIG et les huPBMC n'est pas suffisante pour induire l'apparition de cellules NK. Il est donc très probable que les IVIG

doivent interagir de façon indirecte avec les huPBMCs afin de permettre la prolifération des cellules NK. De plus, ceci suggère aussi que l'environnement murin est propice à l'apparition et la prolifération de cellules NK humaines lorsque les souris reçoivent des IVIG.



**Figure 19 - Populations cellulaires dans une culture *in vitro* de huPBMCs.** Les huPBMCs sont laissées en culture dans différentes conditions expérimentales pour des périodes de trois (A), sept (B), dix (C) et quatorze (D) jours.

## 4. DISCUSSION

### 4.1 Induction de GvHD

La première étape de ce projet de recherche, et la plus cruciale, était de démontrer la validité du modèle murin humanisé de GvHD. Le modèle utilisé repose sur le principe de l'humanisation des souris. Les souris NOD/LtSzscid/IL2Rgc<sup>-/-</sup> peuvent recevoir des injections de cellules huPBMCs sans les rejeter. Les huPBMCs peuvent donc proliférer dans les souris une fois injectées et celles-ci étant en mesure de reconnaître comme étrangères les molécules du système MHC de la souris, tenteront de les éliminer, causant du coup une GvHD. Afin de développer un modèle efficace dans lequel la GvHD se développe assez rapidement, avec infiltration de lymphocytes T dans les organes cibles, apparition de signes cliniques caractéristiques d'une GvHD, perte de poids et mortalité, quatre doses d'injection de huPBMCs ont été évaluées. De façon générale, l'injection d'un plus haut nombre de huPBMCs mène à une plus haute concentration de huPBMCs en circulation dans le sang périphérique des souris GvHD (Figure 6). Bien que la perte de poids n'ait pas démontré de différence entre les différentes doses d'injection de huPBMCs (Figure 7), les scores de signes cliniques de GvHD ont par contre été plus élevés chez les souris injectées de 10<sup>7</sup> huPBMCs (Figure 8). Le score de signes cliniques est établi selon deux variables : la mobilité et l'apparence générale des souris. Plus le score de signes cliniques est élevé, plus la GvHD est sévère. Puisque les lymphocytes T humains sont plus importants dans la circulation, ceux-ci s'infiltrèrent plus dans les organes cibles de la GvHD, notamment la peau qui est généralement le premier organe atteint et le foie (Figure 10), et contribuent à détériorer l'apparence générale des souris, avec une perte de poils et l'apparition de rougeurs et d'alopécie. Logiquement, la mortalité est également plus importante et rapide dans les souris GvHD induites à partir de 10<sup>7</sup> huPBMCs (Figure 9). Dans l'ensemble, tous ces signes semblent désigner l'injection de 10<sup>7</sup> huPBMCs dans le cadre de l'induction de la GvHD comme le meilleur choix, par rapport à nos objectifs.

Puisque ce modèle a servi également à évaluer l'efficacité des IVIG dans la prévention de la GvHD, il nous a fallu aussi déterminer quel traitement contrôle serait utilisé. Deux traitements contrôles, le PBS et le BSA ont donc été testés en parallèle dans le modèle murin humanisé de GvHD. Bien que les souris GvHD-BSA démontrent une plus grande concentration de huPBMCs en circulation périphérique que les souris GvHD-PBS, autant pour les souris injectées de 10<sup>6</sup> huPBMCs (p<0,01 une semaine après l'induction de la

GvHD) que celles injectées avec  $10^7$  huPBMCs ( $p < 0,01$  à la première et troisième semaines et  $p < 0,05$  à la deuxième semaine post-induction de la GvHD) (Figure 6), celles-ci ne perdent pratiquement pas de poids tout au long de la GvHD (Figure 7). On croit que l'absence de perte de poids est attribuable à la nature même de la BSA. L'albumine est une protéine utilisée de routine en clinique afin de permettre l'expansion du volume plasmatique, améliorant ainsi la circulation sanguine et empêchant la déshydratation des patients<sup>129, 130</sup>. Son utilisation dans le groupe contrôle contribuerait alors à la rétention de fluides chez les souris GvHD-BSA, les empêchant ainsi de se déshydrater lors du déclenchement de la GvHD, ce qui permettrait également une plus forte prolifération des cellules avant le développement de la GvHD sévère menant à la mort. La perte de poids étant tout de même un symptôme important de la GvHD, ceci pourrait gêner l'intégrité du modèle animal. Les souris GvHD-BSA sont toutefois en mesure de développer les signes cliniques de GvHD (Figure 8) et la survie de ces souris est semblable à celle des souris GvHD-PBS (Figure 9). Afin d'avoir un modèle plus propre, nous avons opté pour un contrôle GvHD-PBS, qui permet d'observer tous les symptômes de la GvHD chez les souris.

Au terme de la période de mise au point, nous avons déterminé que le modèle murin humanisé de GvHD serait induit chez les souris NOD/LtSzscidIL2Rgc<sup>-/-</sup> en injectant  $10^7$  huPBMCs. Le traitement contrôle serait pour sa part constitué de PBS, plutôt que de BSA, afin de conserver l'intégrité de la perte de poids et des signes cliniques caractéristiques de la GvHD. Puisque ce modèle expérimental vise à évaluer la capacité immunorégulatrice des IVIG lors de la GvHD humaine, le groupe contrôle doit absolument développer une xGvHD humaine. C'est donc pour cette raison que l'induction de la xGvHD se fait en utilisant des huPBMCs.

#### **4.2 Traitement aux IVIG**

Les IVIG sont approuvées et utilisées dans de nombreuses pathologies auto-immunes et inflammatoires<sup>87</sup>, ce qui démontre leurs effets immunomodulateurs. C'est pour cette raison qu'on a pensé les utiliser dans le contexte d'une HSCT, afin de réduire l'incidence et la sévérité de la GvHD. De plus, leur utilisation chez les patients ayant un déficit immunitaire



en tant que traitement substitutif les rend particulièrement intéressants dans le contexte de la GvHD, puisqu'on sait qu'il existe un déficit immunitaire acquis prolongé après HSCT.

Dans notre modèle, les souris GvHD-IVIG développent moins de signes cliniques caractéristiques de GvHD (Figure 11B), ce qui semble confirmer l'hypothèse selon laquelle les IVIG ont des propriétés immunomodulatrices dans la prévention de la GvHD. La perte de poids, qui constitue également un signe clinique de GvHD, est légèrement moins importante chez les souris GvHD-IVIG (Figure 11A), sans toutefois être significative. L'intensité moindre de la tempête de cytokines lors de la GvHD (Figure 15) contribue certainement à réduire les lésions tissulaires et donc probablement également l'infiltration lymphocytaire dans les tissus. En réduisant la production et sécrétion des cytokines humaines, on réduit également l'activation et la prolifération des cellules T du greffon, réduisant ainsi les cellules qui peuvent infiltrer les organes cibles et causer l'apoptose des cellules.

De façon inattendue, nous avons montré que l'administration d'IVIG induit l'apparition d'une population de cellules NK humaines chez les souris GvHD. Tel qu'observé dans les Figure 13 et Figure 14, les souris GvHD-IVIG développent une population NK dans les trois premières semaines de traitement, après quoi ces cellules NK se résorbent et se retrouvent à leur niveau basal, qui est similaire à celui observé dans le groupe de souris GvHD-PBS. C'est lors de ces mêmes trois premières semaines de traitement que la survie est améliorée (Figure 12), ce qui peut suggérer que les IVIG ont un effet dans l'amélioration de la GvHD via l'augmentation des cellules NK. Néanmoins, la validation de cette hypothèse n'a pas encore été abordée durant mes travaux de maîtrise. Il est toutefois intéressant de discuter ici cette hypothèse.

Il est aussi intéressant de constater que les souris GvHD-IVIG ont au total une plus grande concentration de cellules humaines circulantes dans le sang périphérique, comparativement aux souris GvHD-PBS (Figure 13), mais malgré cela, elles présentent moins de signes de GvHD (Figure 11). Ce taux de cellules humaines plus élevé serait attribuable au fait que les souris semblent être protégées par les cellules NK induites par le traitement aux IVIG (Figure 16). Un plus haut nombre de cellules humaines peuvent donc proliférer, sans que celles-ci ne tuent les souris GvHD-IVIG, ce qui n'est pas possible chez les souris

GvHD-PBS, puisqu'elles n'ont aucune protection envers la prolifération massive de cellules T, qui représentent la totalité des cellules humaines chez ses souris. Les cellules T prolifèrent donc en masse et tuent la souris avant de pouvoir atteindre un taux de prolifération plus élevé.

Il devient de plus en plus fréquent dans la littérature d'attribuer un rôle protecteur aux cellules Treg face au développement de GvHD sévère<sup>68, 131-133</sup>. Une étude menée par Kessel *et al*<sup>79</sup> attribue même une augmentation de la fonction suppressive des Treg lorsque celles-ci sont traitées aux IVIG. Néanmoins, dans notre modèle, aucune cellule Treg n'a pu être décelée lors des prises de sang hebdomadaires, que ce soit dans le groupe GvHD-PBS ou GvHD-IVIG (résultats non-montrés). De futures expériences au laboratoire auront pour but d'investiguer plus en détail cette population cellulaire et leur rôle dans le développement et la modulation de la GvHD.

#### 4.3 Tempête de cytokines

Puisque les cytokines pro-inflammatoires ont une grande importance dans le déclenchement de la GvHD, leur modulation à la baisse dans les souris GvHD-IVIG pourrait expliquer la réduction de la sévérité de la GvHD dans ces souris, et du même coup un potentiel effet immunomodulateur des IVIG. Nous avons pu montrer qu'il y avait une baisse significative dans la concentration plasmatique des cytokines IL-2, IL-15 et IL-17 lors de la troisième semaine de traitement de la GvHD chez les souris recevant des IVIG comparativement aux souris recevant du PBS (Figure 15).

L'IL-2 et l'IL-15, deux cytokines partageant la chaîne  $\gamma$  commune et de type Th1, comptent parmi les régulateurs primaires de l'homéostasie des cellules T et sont impliquées dans les réactions d'inflammation, tandis que la cytokine IL-17, dérivée des cellules T, assure l'activation des cellules épithéliales lors des réactions d'inflammation<sup>134, 135</sup>. De plus, l'IL-15 étant impliquée dans l'homéostasie des cellules NK<sup>136, 137</sup>, on peut croire que les IVIG agissent via ces cytokines afin de stimuler les cellules NK en début de traitement. La réduction significative de concentration plasmatique de l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-17 chez les souris GvHD-IVIG pourrait donc réduire l'inflammation et l'activation des cellules T du donneur. La production réduite de cytokines inflammatoires minimise alors la tempête de

cytokines, ce qui se résulte en moins de dommages infligés aux organes cibles de GvHD et un niveau d'apoptose moindre des cellules du receveur.

L'IL-6 a un pouvoir d'activation des cellules T et de promotion de la différenciation Th17, menant à la production d'IL-17, en plus d'agir en synergie avec l'IL-2 afin de différencier les cellules T naïves en CTL<sup>138</sup>, mais ne semble toutefois pas affectée par les IVIG (Figure 15).

L'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  sont deux cytokines répertoriées comme étant de grande importance pour le déclenchement de la GvHD. Le TNF- $\alpha$ , par son rôle central dans l'augmentation de la maturation des APC, de la réponse cellulaire T et de sa capacité d'induction directe de dommages tissulaires peut contribuer à la première phase du déclenchement de la GvHD. L'IFN- $\gamma$ , par l'augmentation de la fonction et la différenciation des CTL et la promotion de la production des cytokines pro-inflammatoires Th1<sup>8, 31, 36, 138</sup> permet par ailleurs d'amplifier la tempête de cytokines, distinctive de la GvHD. Étant donné leur grande contribution aux nombreux mécanismes impliqués dans le déclenchement de la GvHD, on aurait pu s'attendre à ce que la baisse de la concentration plasmatique de ces cytokines soit nécessaire afin de réduire la GvHD. Les concentrations d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  ne sont toutefois pas affectées par le traitement aux IVIG (Figure 15). Cette absence de modulation des IVIG sur ces deux cytokines pro-inflammatoires, de pair avec la réduction de la sévérité de la GvHD, ne pourrait être un meilleur exemple de la complexité du déclenchement et du maintien de la GvHD. L'absence de modulation de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  par les IVIG permet également d'expliquer pourquoi les différences observées sont subtiles entre les souris des groupes GvHD-PBS et GvHD-IVIG.

L'IL-4, cytokine anti-inflammatoire de type Th2<sup>135</sup>, est complètement absente des plasmas de souris GvHD (Figure 15). La GvHD étant une succession d'événements inflammatoires impliquant des cytokines de type Th1<sup>8, 31, 36</sup>, cette observation était attendue. L'IL-10 est une deuxième cytokine de type Th2 et possède des capacités de modulation de la GvHD<sup>8</sup>. Elle peut réguler à la baisse la sécrétion de TNF- $\alpha$  et de cytokines de type Th1, en plus d'inhiber la prolifération des cellules T<sup>138</sup>, mais l'absence de différence entre les concentrations plasmatiques des souris GvHD-PBS et GvHD-IVIG (Figure 15) ne peut en faire une cytokine influente sur l'amélioration de GvHD chez les souris traitées aux IVIG.

Les IVIG peuvent donc moduler la concentration plasmatique de trois cytokines pro-inflammatoires participant à l'homéostasie des cellules T, soit l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-17. Les concentrations plasmatiques des autres cytokines testées (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) ne sont pas perturbées par la présence d'IVIG et il n'y a pas d'IL-4 détectable dans les plasmas évalués.

#### 4.4 Étude de la population cellulaire NK

Puisque les cellules NK possèdent la capacité de détruire les cellules du receveur, elles peuvent améliorer le résultat de la greffe en éliminant les APC du receveur. Si les APC sont détruites, celles-ci ne peuvent plus présenter aux cellules T du greffon, ce qui réduit l'incidence et la sévérité de la GvHD<sup>3, 33, 139</sup>.

Afin de mieux comprendre le rôle potentiel des cellules NK chez les souris recevant des IVIG, nous les avons évaluées de façon plus spécifique. Les marqueurs de surface peuvent être utilisés afin de caractériser phénotypiquement les cellules NK. En effet, les cellules NK de phénotype CD56<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup> sont productrices d'IFN- $\gamma$ , alors que les cellules de phénotype CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> sont cytotoxiques, grâce à la perforine<sup>31, 137</sup>. Des études *in vitro* de Tha-In et al<sup>89</sup> ont démontré que cette cytotoxicité était assurée par le mécanisme *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC), où les cellules NK provoquent la lyse en reconnaissant l'anticorps lié aux cellules cibles. Les cellules NK circulant dans le sang périphérique des souris GvHD-IVIG sont exclusivement de phénotype CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, ce qui suggère qu'elles sont donc cytotoxiques (Figure 16). Néanmoins, cette fonction de cytotoxicité n'a pas été formellement démontrée, mais ceci est prévu dans de prochaines expériences. De même, nous chercherons à valider l'hypothèse selon laquelle les cellules NK détruiraient les APC des souris en présence d'IVIG, ce qui pourrait expliquer la diminution de la GvHD.

Sachant que les IVIG peuvent induire l'apparition d'une population cellulaire NK dans le sang périphérique des souris GvHD, il devient intéressant de déterminer quand et dans quelles circonstances ces cellules apparaissent. Afin de déterminer à quel moment ces cellules font leur apparition dans le sang périphérique, des sacrifices séquentiels de souris ont été effectués. L'analyse des populations cellulaires présentes dans le sang périphérique

à ce moment a permis de déterminer que les cellules NK sont présentes dans la circulation environ dix jours après l'induction de la GvHD et du début du traitement aux IVIG (Figure 17). Ces données pourraient être expliquées par trois hypothèses : soit le mécanisme d'action des IVIG sur les huPBMCs nécessite une dose cumulative suffisante d'IVIG afin d'être efficace (la demi-vie des IVIG chez les patients ayant reçu une HSCT est d'à peine six jours, comparativement à une demi-vie de 22 jours chez les sujets normaux<sup>88</sup>), soit le mécanisme d'action est immédiat et les cellules NK prolifèrent d'abord dans des organes puis atteignent la circulation périphérique par la suite, soit les IVIG agissent par un mécanisme indirect faisant intervenir une ou des populations cellulaires distinctes par réaction en chaîne avant d'aboutir à la stimulation de la prolifération des cellules NK. Afin d'évaluer ces hypothèses, on a d'abord retardé le moment d'administration des IVIG lors de la transplantation des huPBMCs. On a démontré qu'en retardant l'administration des IVIG du moment de l'induction de la GvHD, il était impossible d'obtenir la population de cellules NK. Un délai d'une semaine est trop long afin de permettre l'apparition de la population NK, et même trois jours sont suffisants afin de bloquer la prolifération de ces cellules (Figure 18). On en conclue donc que le microenvironnement péritonéal doit préalablement être traité aux IVIG afin de pouvoir induire l'apparition des cellules NK.

#### 4.5 Culture cellulaire

Puisque l'environnement doit absolument être traité aux IVIG avant l'induction de la GvHD, on pourrait croire que les IVIG agissent directement sur les huPBMCs et induisent la prolifération des cellules NK. Dans un souci de déterminer si l'interaction entre les huPBMCs et les IVIG est directe, on a effectué une culture cellulaire de huPBMCs pour laquelle plusieurs conditions expérimentales ont été évaluées. Afin de répliquer fidèlement *in vitro* les conditions expérimentales connues *in vivo*, on a d'abord effectué un dosage des IgG humaines dans les plasmas du sang périphérique de souris GvHD-PBS et GvHD-IVIG prélevés lors des prises de sang hebdomadaires, lesquelles ont lieu le lendemain du traitement hebdomadaire. La concentration d'IgG humaine a été évaluée à 1,8 g/L dans les plasmas de souris GvHD-IVIG, tandis que les IgG humaines étaient absentes des plasmas de souris GvHD-PBS. L'absence des IgG humaines est normale et attendue, puisque les huPBMCs à elles seules ne peuvent produire d'IgG et elles sont évidemment absentes du PBS qui est administré à ce groupe de souris. Les concentrations d'IgG humaines injectées

aux souris et retrouvées dans les plasmas sont par ailleurs les mêmes que celles utilisées et retrouvées préalablement par un groupe étudiant l'effet des IVIG dans un modèle murin de purpura thrombocytopénique idiopathique (ITP)<sup>96</sup>.

Une culture *in vitro* de huPBMCs a donc été planifiée, avec ajout d'IVIG au milieu de culture à la concentration retrouvée physiologiquement chez les souris GvHD-IVIG, telle que déterminée par ELISA. Des échantillons de culture cellulaire ont été prélevés à intervalles correspondants à ceux des sacrifices séquentiels de souris GvHD afin de déterminer si la présence soutenue d'IVIG dans la culture de huPBMCs pouvait induire l'apparition plus rapide des cellules NK humaines, ainsi que de déterminer si au bout des 14 jours de culture, les cellules NK étaient présentes, comme c'est le cas *in vivo* (Figure 13, Figure 16 et Figure 17). Nous avons montré que la culture *in vitro* de huPBMCs avec ajout d'IVIG au milieu de culture ne permet pas de répliquer la population de cellules NK et ne permet l'observation d'aucune différence avec les conditions contrôles de huPBMCs seules et additionnées de PBS et de BSA (Figure 19). En fait, on observe plutôt que la totalité des cellules survivantes sont des lymphocytes T et que la majorité est CD4<sup>+</sup>. Ces résultats vont donc contre l'hypothèse selon laquelle les IVIG peuvent agir directement sur les huPBMCs afin d'induire la prolifération et l'apparition de la population de cellules humaines NK, ce qui rejoint ce qui a été décrit dans d'autres études<sup>75, 81, 89, 94, 96</sup>. L'ensemble de ces résultats suggère que les IVIG doivent interagir de façon indirecte afin de stimuler les cellules NK des huPBMCs et le mécanisme d'action précis est présentement en cours d'étude. Il est intéressant de mentionner ici que des études *in vitro* ont montré que l'interaction des IVIG avec un récepteur des DC induisait l'activation de ces cellules et que celles-ci induisaient l'activation des cellules NK<sup>75, 81, 89, 94</sup>. Ces résultats extrêmement intéressants, ainsi que nos résultats mentionnés ci-dessus nous font formuler l'hypothèse que les IVIG stimuleraient les DC des souris et qu'en retour, celles-ci stimuleraient la prolifération des cellules NK. Nos futures expériences dans le laboratoire auront pour objet de valider cette hypothèse *in vitro et in vivo*.

## 5. PERSPECTIVES

Les résultats obtenus lors de mes travaux de maîtrise ont permis d'élargir les connaissances que nous avons au niveau de la capacité des IVIG à réduire la sévérité de GvHD dans notre modèle murin humanisé. Ces travaux ont également permis d'améliorer la compréhension que l'on avait sur les mécanismes d'action des IVIG. Évidemment, ces résultats ne sont que partiels, mais ils serviront de base pour les prochaines expériences. En effet, on tentera de mieux définir le mode d'action des IVIG. En premier lieu, on déterminera si l'absence de cellules NK dans les huPBMCs utilisées afin d'induire la GvHD empêchera l'apparition de la population cellulaire NK chez des souris GvHD traitées aux IVIG. On déterminera ensuite si les cellules NK produites lors du traitement aux IVIG peuvent, une fois transférées chez des souris GvHD, les protéger au même titre que le traitement IVIG. On testera ensuite si la présence de DC murines et d'IVIG dans une culture cellulaire de huPBMCs peut fournir les conditions nécessaires à l'apparition de la population cellulaire NK, telle qu'observée chez les souris GvHD-IVIG. En utilisant notre modèle murin humanisé de reconstitution immunitaire, on tentera finalement de déterminer si le traitement aux IVIG peut en affecter la qualité et la rapidité.

## 6. CONCLUSION

Les résultats obtenus démontrent que les IVIG peuvent avoir un certain effet immunomodulateur dans le modèle murin humanisé de GvHD établi au laboratoire. Il semble que les IVIG n'empêchent pas totalement le déclenchement de la GvHD, mais en retardent plutôt les effets dévastateurs aux organes et permettent un délai de la mortalité. Cet effet immunomodulateur pourrait être véhiculé par deux mécanismes distincts et pas forcément exclusifs l'un de l'autre: l'apparition d'une population cellulaire NK cytotoxique dans le sang périphérique lors des trois premières semaines de traitement, ainsi qu'une diminution de la concentration plasmatique des cytokines pro-inflammatoires IL-2, IL-15 et IL-17 lors de la troisième semaine de traitement. Les IVIG n'agissent pas directement sur les huPBMCs afin d'induire l'apparition de cellules NK, et le microenvironnement doit être préalablement traité aux IVIG. Des travaux plus approfondis devront être effectués afin de déterminer le(s) mécanisme(s) d'action par le(s)quel(s) les IVIG peuvent arriver à réduire la sévérité et l'intensité de la GvHD.



## RÉFÉRENCES

1. Johnston, L. Acute graft-versus-host disease: differing risk with differing graft sources and conditioning intensity. *Best Pract Res Clin Haematol* **21**, 177-192 (2008).
2. Riddell, S.R. & Appelbaum, F.R. Graft-versus-host disease: a surge of developments. *PLoS Med* **4**, e198 (2007).
3. Toubai, T., Sun, Y. & Reddy, P. GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? *Best Pract Res Clin Haematol* **21**, 101-117 (2008).
4. Thomson, B.G. *et al.* Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* **96**, 2703-2711 (2000).
5. Chung, B. *et al.* Prevention of graft-versus-host disease by anti IL-7Ralpha antibody. *Blood* **110**, 2803-2810 (2007).
6. Ho, V.T. & Cutler, C. Current and novel therapies in acute GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol* **21**, 223-237 (2008).
7. Auletta, J.J. & Cooke, K.R. Bone marrow transplantation: new approaches to immunosuppression and management of acute graft-versus-host disease. *Curr Opin Pediatr* **21**, 30-38 (2009).
8. Jacobsohn, D.A. & Vogelsang, G.B. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis* **2**, 35 (2007).
9. Hahn, T. *et al.* Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia. *J Clin Oncol* **26**, 5728-5734 (2008).
10. Weisdorf, D. GVHD the nuts and bolts. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2007**, 62-67 (2007).
11. Lau, J. *et al.* Activated circulating dendritic cells after hematopoietic stem cell transplantation predict acute graft-versus-host disease. *Transplantation* **83**, 839-846 (2007).
12. Pasquini, M.C. Impact of graft-versus-host disease on survival. *Best Pract Res Clin Haematol* **21**, 193-204 (2008).
13. Dutt, S. *et al.* Naive and memory T cells induce different types of graft-versus-host disease. *J Immunol* **179**, 6547-6554 (2007).

14. Kronenberg, H.M., Melmed, S., Polonsky, K.S. & Larsen, P.R. Williams Textbook of ENDOCRINOLOGY, in, Edn. Eleventh (SAUNDERS ELSEVIER, Philadelphia, PA; 2008).
15. Goldsby, R.A., Kindt, T.J. & Osborne, B.A. Complexe majeur d'histocompatibilité, in *Immunologie - Le cours de Janis Kuby* 660 pages (Dunod, Paris; 2001).
16. Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H. & Kulski, J.K. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *Journal of human genetics* **54**, 15-39 (2009).
17. Petersdorf, E.W. *et al.* Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood* **92**, 3515-3520 (1998).
18. Kapoor, N. Graft-versus-host disease and immunosuppression. *Immunol Res* (2008).
19. Dickinson, A.M. & Holler, E. Polymorphisms of cytokine and innate immunity genes and GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol* **21**, 149-164 (2008).
20. Pasquini, M., Wang, Z. & Schneider, L. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation *Part I - CIBMTR Summary Slides* **13**, 5-9 (2007).
21. Cutler, C. *et al.* Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J Clin Oncol* **19**, 3685-3691 (2001).
22. Morgado, J.M. *et al.* The phenotypical and functional characteristics of cord blood monocytes and CD14(-/low)/CD16(+) dendritic cells can be relevant to the development of cellular immune responses after transplantation. *Transplant immunology* **19**, 55-63 (2008).
23. Encabo, A., Solves, P., Carbonell-Uberos, F. & Minana, M.D. The functional immaturity of dendritic cells can be relevant to increased tolerance associated with cord blood transplantation. *Transfusion* **47**, 272-279 (2007).
24. Bradley, M.B. & Cairo, M.S. Cord blood immunology and stem cell transplantation. *Human immunology* **66**, 431-446 (2005).
25. Lin, S.J., Yu, J.C., Cheng, P.J., Hsiao, S.S. & Kuo, M.L. Effect of interleukin-15 on anti-CD3/anti-CD28 induced apoptosis of umbilical cord blood CD4<sup>+</sup> T cells. *European journal of haematology* **71**, 425-432 (2003).
26. Gluckman, E. & Rocha, V. Indications and results of cord blood transplant in children with leukemia. *Bone marrow transplantation* **41 Suppl 2**, S80-82 (2008).

27. Rezvani, A.R. & Storb, R.F. Separation of graft-vs.-tumor effects from graft-vs.-host disease in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Autoimmun* **30**, 172-179 (2008).
28. Duran-Struuck, R. & Reddy, P. Biological advances in acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* **85**, 303-308 (2008).
29. Ball, L.M. & Egeler, R.M. Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone marrow transplantation* **41 Suppl 2**, S58-64 (2008).
30. Holler, E. The role of innate immunity in graft-versus-host disease and complications following allogeneic stem cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant* **15**, 59-61 (2008).
31. Morris, E.S. & Hill, G.R. Advances in the understanding of acute graft-versus-host disease. *British journal of haematology* **137**, 3-19 (2007).
32. Hill, G.R. & Ferrara, J.L. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **95**, 2754-2759 (2000).
33. Barrett, A.J. & Le Blanc, K. Prophylaxis of acute GVHD: manipulate the graft or the environment? *Best Pract Res Clin Haematol* **21**, 165-176 (2008).
34. Mielcarek, M. & Storb, R. Graft-vs-host disease after non-myeloablative hematopoietic cell transplantation. *Leukemia & lymphoma* **46**, 1251-1260 (2005).
35. Nervi, B. *et al.* Factors affecting human T cell engraftment, trafficking, and associated xenogeneic graft-vs-host disease in NOD/SCID beta2mnull mice. *Exp Hematol* **35**, 1823-1838 (2007).
36. Holler, E. Progress in acute graft versus host disease. *Curr Opin Hematol* **14**, 625-631 (2007).
37. Hasegawa, H. *et al.* Therapeutic effect of CXCR3-expressing regulatory T cells on liver, lung and intestinal damages in a murine acute GVHD model. *Gene Ther* **15**, 171-182 (2008).
38. Yi, T. *et al.* Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood* **112**, 2101-2110 (2008).
39. Bryson, J.S. *et al.* Adoptive transfer of murine syngeneic graft-vs.-host disease by CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* **82**, 1393-1400 (2007).

40. Xun, C.Q., Thompson, J.S., Jennings, C.D., Brown, S.A. & Widmer, M.B. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* **83**, 2360-2367 (1994).
41. Via, C.S. Kinetics of T cell activation in acute and chronic forms of murine graft-versus-host disease. *J Immunol* **146**, 2603-2609 (1991).
42. Shustov, A., Nguyen, P., Finkelman, F., Elkon, K.B. & Via, C.S. Differential expression of Fas and Fas ligand in acute and chronic graft-versus-host disease: up-regulation of Fas and Fas ligand requires CD8+ T cell activation and IFN-gamma production. *J Immunol* **161**, 2848-2855 (1998).
43. Caccavelli, L. *et al.* Normal IgG protects against acute graft-versus-host disease by targeting CD4(+)CD134(+) donor alloreactive T cells. *European journal of immunology* **31**, 2781-2790 (2001).
44. Reddy, P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematological oncology* **21**, 149-161 (2003).
45. Reddy, P. & Ferrara, J.L. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood reviews* **17**, 187-194 (2003).
46. Hill, G.R. *et al.* The p55 TNF-alpha receptor plays a critical role in T cell alloreactivity. *J Immunol* **164**, 656-663 (2000).
47. Beutler, B. & Cerami, A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annual review of immunology* **7**, 625-655 (1989).
48. Laster, S.M., Wood, J.G. & Gooding, L.R. Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* **141**, 2629-2634 (1988).
49. Zheng, L. *et al.* Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* **377**, 348-351 (1995).
50. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine* **179**, 1109-1118 (1994).
51. Kagi, D. *et al.* Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science (New York, N.Y)* **265**, 528-530 (1994).

52. Shresta, S., Pham, C.T., Thomas, D.A., Graubert, T.A. & Ley, T.J. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Current opinion in immunology* **10**, 581-587 (1998).
53. Remberger, M., Ringden, O. & Markling, L. TNF alpha levels are increased during bone marrow transplantation conditioning in patients who develop acute GVHD. *Bone marrow transplantation* **15**, 99-104 (1995).
54. Martin, P.J. Study design and endpoints in graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol* **21**, 357-372 (2008).
55. Messina, C. *et al.* Prevention and treatment of acute GvHD. *Bone marrow transplantation* **41 Suppl 2**, S65-70 (2008).
56. Przepiorka, D. *et al.* 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone marrow transplantation* **15**, 825-828 (1995).
57. Sullivan, K. Graft vs. host disease, in *KG Blume, SJ Forman, FR Applebaum, eds. Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*, Edn. 3rd 635-664 (Blackwell Publishing, Malden, MA; 2004).
58. Rocha, V. *et al.* Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *The New England journal of medicine* **342**, 1846-1854 (2000).
59. Sullivan, K.M. *et al.* Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Seminars in hematology* **28**, 250-259 (1991).
60. Remberger, M. *et al.* An ethnic role for chronic, but not acute, graft-versus-host disease after HLA-identical sibling stem cell transplantation. *European journal of haematology* **66**, 50-56 (2001).
61. Shulman, H.M. *et al.* Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *The American journal of medicine* **69**, 204-217 (1980).
62. Filipovich, A.H. *et al.* National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* **11**, 945-956 (2005).
63. Ferrara, J.L. Advances in the clinical management of GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol* **21**, 677-682 (2008).

64. Alyea, E.P. Modulating graft-versus-host disease to enhance the graft-versus-leukemia effect. *Best Pract Res Clin Haematol* **21**, 239-250 (2008).
65. Gassas, A., Ishaqi, M.K., Afzal, S., Dupuis, A. & Doyle, J. Outcome of haematopoietic stem cell transplantation for paediatric acute lymphoblastic leukaemia in third complete remission: a vital role for graft-versus-host-disease/graft-versus-leukaemia effect in survival. *British journal of haematology* **140**, 86-89 (2008).
66. Maillard, I. *et al.* Notch-dependent T-lineage commitment occurs at extrathymic sites following bone marrow transplantation. *Blood* **107**, 3511-3519 (2006).
67. Mackall, C.L. *et al.* Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *The New England journal of medicine* **332**, 143-149 (1995).
68. Nguyen, V.H. *et al.* In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood* **109**, 2649-2656 (2007).
69. Lee, S.J. *et al.* Effect of up-front daclizumab when combined with steroids for the treatment of acute graft-versus-host disease: results of a randomized trial. *Blood* **104**, 1559-1564 (2004).
70. Tisato, V., Naresh, K., Girdlestone, J., Navarrete, C. & Dazzi, F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* **21**, 1992-1999 (2007).
71. Nogueira, M.C. *et al.* Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Braz J Med Biol Res* **40**, 1623-1629 (2007).
72. Zweegman, S., Janssen, J.J. & Lokhorst, H.M. Immune-modulatory effects of bortezomib in GVHD. *Leukemia & lymphoma* **48**, 853-854 (2007).
73. Wagner, J.E., Thompson, J.S., Carter, S.L. & Kernan, N.A. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial. *Lancet* **366**, 733-741 (2005).
74. Tha-In, T. *et al.* Superior immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulins on human T-cells and dendritic cells: comparison to calcineurin inhibitors. *Transplantation* **81**, 1725-1734 (2006).

75. Tha-In, T., Bayry, J., Metselaar, H.J., Kaveri, S.V. & Kwekkeboom, J. Modulation of the cellular immune system by intravenous immunoglobulin. *Trends Immunol* **29**, 608-615 (2008).
76. Seite, J.F., Shoenfeld, Y., Youinou, P. & Hillion, S. What is the contents of the magic draft IVIg? *Autoimmun Rev* **7**, 435-439 (2008).
77. Tankersley, D.L., Preston, M.S. & Finlayson, J.S. Immunoglobulin G dimer: an idiotype-anti-idiotype complex. *Molecular immunology* **25**, 41-48 (1988).
78. Teeling, J.L. *et al.* Therapeutic efficacy of intravenous immunoglobulin preparations depends on the immunoglobulin G dimers: studies in experimental immune thrombocytopenia. *Blood* **98**, 1095-1099 (2001).
79. Kessel, A. *et al.* Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function. *J Immunol* **179**, 5571-5575 (2007).
80. Rojas, R. & Apodaca, G. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nature reviews* **3**, 944-955 (2002).
81. Anthony, R.M., Wermeling, F., Karlsson, M.C. & Ravetch, J.V. Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 19571-19578 (2008).
82. Levy, Y. *et al.* Autoantibody level modification in adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura following intravenous immunoglobulin treatment. *Natural immunity* **16**, 207-214 (1998).
83. Hundt, M. *et al.* Treatment of acute exacerbation of systemic lupus erythematosus with high-dose intravenous immunoglobulin. *Rheumatology (Oxford, England)* **39**, 1301-1302 (2000).
84. Levy, Y. *et al.* Serologic and clinical response to treatment of systemic vasculitis and associated autoimmune disease with intravenous immunoglobulin. *International archives of allergy and immunology* **119**, 231-238 (1999).
85. Toubi, E., Kessel, A. & Shoenfeld, Y. High-dose intravenous immunoglobulins: an option in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Human immunology* **66**, 395-402 (2005).
86. Pigard, N. *et al.* Therapeutic activities of intravenous immunoglobulins in multiple sclerosis involve modulation of chemokine expression. *J Neuroimmunol* **209**, 114-120 (2009).

87. Darabi, K., Abdel-Wahab, O. & Dzik, W.H. Current usage of intravenous immune globulin and the rationale behind it: the Massachusetts General Hospital data and a review of the literature. *Transfusion* **46**, 741-753 (2006).
88. Sokos, D.R., Berger, M. & Lazarus, H.M. Intravenous immunoglobulin: appropriate indications and uses in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **8**, 117-130 (2002).
89. Tha-In, T. *et al.* Intravenous immunoglobulins suppress T-cell priming by modulating the bidirectional interaction between dendritic cells and natural killer cells. *Blood* **110**, 3253-3262 (2007).
90. Orlandi, C. *et al.* Treatment of acute post-transfusion- graft-versus-host disease (GVHD) with intravenous human immunoglobulins: a case report. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **20**, 760-761 (2006).
91. Young, J.A. Infectious complications of acute and chronic GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol* **21**, 343-356 (2008).
92. Cordonnier, C. *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* **139**, 8-18 (2003).
93. Raanani, P. *et al.* Immunoglobulin prophylaxis in hematopoietic stem cell transplantation: systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* **27**, 770-781 (2009).
94. Bayry, J., Bansal, K., Kazatchkine, M.D. & Kaveri, S.V. DC-SIGN and alpha2,6-sialylated IgG Fc interaction is dispensable for the anti-inflammatory activity of IVIg on human dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, E24; author reply E25 (2009).
95. Anthony, R.M. *et al.* Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science (New York, N.Y)* **320**, 373-376 (2008).
96. Siragam, V. *et al.* Intravenous immunoglobulin ameliorates ITP via activating Fc gamma receptors on dendritic cells. *Nat Med* **12**, 688-692 (2006).
97. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J.V. The antiinflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. *The Journal of experimental medicine* **204**, 11-15 (2007).
98. Bayry, J. *et al.* Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood* **101**, 758-765 (2003).



99. Bayry, J. *et al.* Intravenous immunoglobulin abrogates dendritic cell differentiation induced by interferon-alpha present in serum from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **48**, 3497-3502 (2003).
100. Hartung, H.P. Advances in the understanding of the mechanism of action of IVIg. *J Neurol* **255 Suppl 3**, 3-6 (2008).
101. Shultz, L.D., Ishikawa, F. & Greiner, D.L. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* **7**, 118-130 (2007).
102. Bosma, G.C., Custer, R.P. & Bosma, M.J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* **301**, 527-530 (1983).
103. Mosier, D.E., Gulizia, R.J., Baird, S.M. & Wilson, D.B. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* **335**, 256-259 (1988).
104. McCune, J.M. *et al.* The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science (New York, N.Y)* **241**, 1632-1639 (1988).
105. Lapidot, T. *et al.* Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science (New York, N.Y)* **255**, 1137-1141 (1992).
106. Greiner, D.L., Hesselton, R.A. & Shultz, L.D. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **16**, 166-177 (1998).
107. Mombaerts, P. *et al.* RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**, 869-877 (1992).
108. Shinkai, Y. *et al.* RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855-867 (1992).
109. Shultz, L.D. *et al.* Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* **154**, 180-191 (1995).
110. Cao, X. *et al.* Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* **2**, 223-238 (1995).
111. DiSanto, J.P., Muller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A. & Rajewsky, K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 377-381 (1995).

112. Ohbo, K. *et al.* Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Blood* **87**, 956-967 (1996).
113. Jacobs, H. *et al.* PIM1 reconstitutes thymus cellularity in interleukin 7- and common gamma chain-mutant mice and permits thymocyte maturation in Rag- but not CD3gamma-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* **190**, 1059-1068 (1999).
114. Sugamura, K. *et al.* The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annual review of immunology* **14**, 179-205 (1996).
115. Ishikawa, F. *et al.* Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* **106**, 1565-1573 (2005).
116. Shultz, L.D. *et al.* Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSzscid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* **174**, 6477-6489 (2005).
117. Serreze, D.V., Gaskins, H.R. & Leiter, E.H. Defects in the differentiation and function of antigen presenting cells in NOD/Lt mice. *J Immunol* **150**, 2534-2543 (1993).
118. Serreze, D.V., Gaedeke, J.W. & Leiter, E.H. Hematopoietic stem-cell defects underlying abnormal macrophage development and maturation in NOD/Lt mice: defective regulation of cytokine receptors and protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 9625-9629 (1993).
119. Langmuir, P.B., Bridgett, M.M., Bothwell, A.L. & Crispe, I.N. Bone marrow abnormalities in the non-obese diabetic mouse. *International immunology* **5**, 169-177 (1993).
120. Ballen, K.K. *et al.* Variables to predict engraftment of umbilical cord blood into immunodeficient mice: usefulness of the non-obese diabetic--severe combined immunodeficient assay. *British journal of haematology* **114**, 211-218 (2001).
121. Greiner, D.L. & Shultz, L.D. *NOD Mice and Related Strains: Research Applications in Diabetes, AIDS, Cancer and Other Diseases*. (Landes Bioscience, Austin; 1998).

122. Tary-Lehmann, M., Lehmann, P.V., Schols, D., Roncarolo, M.G. & Saxon, A. Anti-SCID mouse reactivity shapes the human CD4<sup>+</sup> T cell repertoire in hu-PBL-SCID chimeras. *The Journal of experimental medicine* **180**, 1817-1827 (1994).
123. Mapara, M.Y. *et al.* Expression of chemokines in GVHD target organs is influenced by conditioning and genetic factors and amplified by GVHR. *Biol Blood Marrow Transplant* **12**, 623-634 (2006).
124. Fehniger, T.A. *et al.* CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* **101**, 3052-3057 (2003).
125. Cooper, M.A. *et al.* Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* **97**, 3146-3151 (2001).
126. Walzer, T., Jaeger, S., Chaix, J. & Vivier, E. Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. *Current opinion in immunology* **19**, 365-372 (2007).
127. Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R. & Phillips, J.H. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* **136**, 4480-4486 (1986).
128. Jacobs, R. *et al.* CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *European journal of immunology* **31**, 3121-3127 (2001).
129. Gines, A. *et al.* Randomized trial comparing albumin, dextran 70, and polygeline in cirrhotic patients with ascites treated by paracentesis. *Gastroenterology* **111**, 1002-1010 (1996).
130. Fernandez, J. *et al.* A randomized unblinded pilot study comparing albumin versus hydroxyethyl starch in spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology (Baltimore, Md)* **42**, 627-634 (2005).
131. Zhai, Z. *et al.* Correlation of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-regulatory cells in recipients and their corresponding donors to acute GVHD. *Transpl Int* **20**, 440-446 (2007).
132. Wolf, D. *et al.* Regulatory T-cells in the graft and the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation* **83**, 1107-1113 (2007).
133. Pabst, C., Schirutschke, H., Ehninger, G., Bornhauser, M. & Platzbecker, U. The graft content of donor T cells expressing gamma delta TCR<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>foxp3<sup>+</sup>

- predicts the risk of acute graft versus host disease after transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells from unrelated donors. *Clin Cancer Res* **13**, 2916-2922 (2007).
134. Leone, A., Picker, L.J. & Sodora, D.L. IL-2, IL-7 and IL-15 as immuno-modulators during SIV/HIV vaccination and treatment. *Curr HIV Res* **7**, 83-90 (2009).
  135. Louten, J., Boniface, K. & de Waal Malefyt, R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* **123**, 1004-1011 (2009).
  136. Caligiuri, M.A. Human natural killer cells. *Blood* **112**, 461-469 (2008).
  137. Strowig, T., Brilot, F. & Munz, C. Noncytotoxic functions of NK cells: direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity. *J Immunol* **180**, 7785-7791 (2008).
  138. Markey, K.A., MacDonald, K.P. & Hill, G.R. Impact of cytokine gene polymorphisms on graft-vs-host disease. *Tissue Antigens* **72**, 507-516 (2008).
  139. Lin, S.J., Yan, D.C., Lee, Y.C. & Kuo, M.L. Role of interleukin-15 in umbilical cord blood transplantation. *Int Rev Immunol* **27**, 518-531 (2008).

