

# Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 394 : Physiologie et physiopathologie

*Centre de recherche Saint Antoine / Equipe Mohty*

## **Rôle des lymphocytes Th17 et des cellules dendritiques plasmocytoïdes dans la réaction aiguë du greffon contre l'hôte après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques**

Par Florent Malard

Thèse de doctorat de biologie

Spécialité : Immunologie

Dirigée par Mohamad Mohty

Présentée et soutenue publiquement le 27 Octobre 2014

Devant un jury composé de :

LEGRAND Ollivier, PU-PH, Président du Jury

BLANCHO Gilles, PU-PH, Rapporteur

YAKOUB-AGHA Ibrahim, PU-PH, Rapporteur

GAUGLER Béatrice, Chargé de recherche, Examinateur

GREGOIRE Marc, Directeur de recherche, Examinateur

MOHTY Mohamad, PU-PH, Directeur de thèse



*A Stéphanie, l'amour de ma vie*

## **Remerciements**

Aux membres du Jury, Monsieur le Professeur Ollivier Legrand, Monsieur le Professeur Gilles Blancho, Monsieur le Professeur Ibrahim Yakoub-Agha, Monsieur le Docteur Marc Grégoire et Madame le Docteur Béatrice Gaugler pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

A Monsieur le Professeur Mohamad Mohty, pour avoir accepté de diriger ma thèse, pour votre confiance, vos conseils, votre motivation au quotidien, pour m'avoir initié à la recherche clinique et scientifique et m'avoir guidé dans mes projets depuis mes tous débuts en hématologie, en 2007 déjà !

A l'ensemble de l'équipe 4 de l'U892, qui m'a si bien accueilli en 2010 pour la réalisation de mon master 2 puis de ma thèse. Un grand merci en particulier à Virginie pour avoir eu la patience de d'initier, le néophyte que j'étais, aux différentes techniques de laboratoire, toujours dans la joie et la bonne humeur. Un grand merci à Jean-François pour avoir su partager ses connaissances en immunologie et à Marc pour m'avoir si bien intégré dans l'équipe et sa disponibilité. Merci David, pour m'avoir supporté pendant 2 ans avant de partir vers de nouveaux horizons, nos discussions ont toujours été enrichissantes.

A Béatrice, pour m'avoir initié à la cytométrie de flux à Besançon à Besançon, pour ta disponibilité, pour ta lecture critique de mes articles et tes corrections un grand merci.

A Céline, pour m'avoir appris tout ce que je connais sur l'immunohistochimie et la pathologie de la GVHD, pour le temps que tu m'as consacré, un grand merci.

A tous les médecins, pharmaciens, biologistes, infirmières, aides soignantes, kinésithérapeutes, psychologues, techniciennes, assistantes de recherche clinique, secrétaires... que j'ai pu rencontrer au cours de mes études avec lesquels mes rapports furent toujours enrichissants: bien entendu l'ensemble du service d'hématologie du CHU de Nantes, mais aussi ceux du service de réanimation médicale et d'hématologie biologique du CHU de Nantes, le laboratoire HLA de l'EFS de Nantes, ceux du service d'oncologie médicale du Centre René Gauduchau, ceux du service d'onco-hématologie du CHD de La Roche-sur-Yon et enfin ceux du service d'hématologie de l'hôpital Saint Antoine.

A mes amis.

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres de ma famille, je me construis chaque jour avec chacun de vous.

A mon frère Flavien et ma sœur Aurélie pour votre soutien, votre patience, et les bon moments passés ensemble et à venir.

A ma mamie, Renée, pour ta vitalité, ta franchise et ta présence.

A mes parents, sans eux rien n'aurait été possible, merci de m'avoir permis de faire des études, et de m'avoir soutenu tout le long, ce fut parfois difficile. Je vous aime.

A ma fiancée Stéphanie, merci de si bien m'aimer, d'être présente chaque jour à mes côtés dans les bons moments comme dans les difficiles, de me soutenir dans tous mes choix et mes projets. Merci de l'équilibre que tu m'as apporté. Je t'aime de tout mon cœur.

# Sommaire

<b>Remerciements .....</b>	<b>2</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>6</b>
<b>1-Introduction .....</b>	<b>8</b>
<b>1-1- L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques .....</b>	<b>9</b>
1-1-1- Définition .....	9
1-1-2- Historique de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques .....	9
1-1-3- Les étapes de l'allogreffe .....	13
1-1-4- Les indications.....	14
1-1-5- Le choix du donneur .....	15
1-1-6- Le conditionnement.....	17
1-1-7- Les complications.....	19
<b>1-2- La réaction du greffon contre l'hôte .....</b>	<b>23</b>
1-2-1- Définition .....	23
1-2-2- La GVHD aiguë .....	25
1-2-3- La GVHD chronique.....	33
<b>1-3-Physiopathologie de la GVHD .....</b>	<b>38</b>
1-3-1-Etape 1 : Induction de lésions tissulaires par le conditionnement.....	40
1-3-2-Etape 2 : Activation des cellules présentatrices d'antigène du receveur et des lymphocytes T du donneur .....	41
1-3-3-Etape 3 : Effecteurs cellulaires et inflammatoires .....	44
1-3-4-Physiopathologie de la GVHD chronique.....	47
<b>1-4-Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires de type 17 ou Th17 .....</b>	<b>48</b>
1-4-1- Différentes sous populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> auxiliaires .....	48
1-4-2- Découverte et différenciation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> auxiliaires de type 17 ou Th17 .....	50
1-4-3- Plasticité des lymphocytes Th17 .....	52
1-4-4-Phénotype des lymphocytes Th17 .....	53
1-4-5- Rôle des lymphocytes Th17 dans la défense de l'organisme contre les infections .....	54
1-4-6- Rôle pathogène des lymphocytes Th17 : les lymphocytes Th17 comme médiateurs des lésions tissulaires.....	55
1-4-7- Rôle des lymphocytes Th17 dans la GVHD aiguë .....	56
<b>1-5-Les cellules dendritiques plasmacytoides .....</b>	<b>60</b>
1-5-1-Découverte des PDC .....	61
1-5-2-Phénotype des PDC.....	61
1-5-3-Développement des PDC .....	62
1-5-4-Rôle physiologique et pathogène des PDC .....	64
1-5-5-Rôle des PDC dans la GVHD aiguë .....	67
<b>2- Résultats .....</b>	<b>69</b>
<b>2-1-Article n°1: « Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease » .....</b>	<b>69</b>
2-1-1-Résultats principaux .....	69
2-1-2-Article .....	69
2-1-3-Résultats supplémentaires.....	74
<b>2-2-Article n°2: « Increased plasmacytoid dendritic cells and RORyt-expressing immune effectors in cutaneous acute graft-versus-host disease ».....</b>	<b>75</b>
2-2-1-Résultats principaux .....	75
2-2-2-Article .....	75

<b>3-Discussion .....</b>	<b>83</b>
<b>4-Références bibliographiques.....</b>	<b>91</b>
<b>5-Annexes.....</b>	<b>114</b>
<b>5-1-Article n°3 : « Increased Th17/Treg ratio in chronic liver GVHD » .....</b>	<b>114</b>
5-1-1-Résultats principaux .....	114
5-2-1-Article .....	114
<b>5-2-Article n°4 : « IL-22 deficiency in donor T cells attenuate murine acute graft-versus-host-disease mortality while sparing the graft versus leukemia effect » .....</b>	<b>121</b>
5-2-1-Résultats principaux .....	121
5-2-2-Article .....	121
<b>Table des figures.....</b>	<b>133</b>
<b>Table des tableaux .....</b>	<b>135</b>

## Liste des abréviations.

Ac : anticorps  
Allo-CSH : allogreffe de cellules souches hématopoïétiques  
AMP : peptide anti-microbien, « antimicrobial peptides »  
ATRA : acide tout-trans-rétinoïque  
BDCA : antigène des cellules dendritiques du sang, « blood dendritic cell antigen »  
BMT-CTN : Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network  
CCL : «CC chemokine ligand »  
CCR : récepteur à C-C chimiokine, « CC chemokine receptor »  
CD : cluster de différenciation  
CDP : progéniteur commun des cellules dendritiques  
CIBMTR : « Center for International Blood and Marrow Transplant Research »  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CMV : *cytomégavirus*  
CPA : cellule présentatrice d'antigène  
CsA : ciclosporine A  
CSH : cellules souches hématopoïétiques  
CSP : cellules souches périphériques  
CTL : lymphocyte T cytotoxique, «cytotoxic T cell »  
CXCL : « CXC chemokine receptor »  
DC : cellule dendritique, « dendritic cell »  
EAE : encéphalite auto-immune expérimentale  
EBMT : European Society For Blood and Marrow Transplantation  
GM-CSF : facteur de croissance de la lignée granulomonocytaire « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor »  
GrB : Granzyme B  
GVHD : réaction du greffon contre l'hôte, « graft-versus-host disease »  
GVT : réaction du greffon contre la tumeur, « graft versus tumor »  
HLA : antigènes des leucocytes humains, « human leukocyte antigen »  
HSV : *herpes simplex virus*  
ICT : irradiation corporelle totale  
IDO : indoleamine 2,3-dioxygenase  
IFN : interferon  
IL : interleukine  
ILC : cellules lymphoïdes innées, « innate lymphoid cells »  
IPC : « interferon producing cells »  
IRF : « interferon-regulatory factor »  
iTreg : lymphocyte T régulateur induit  
IV : intra-veineux  
KO : invalidé, « knock-out »  
LAL : leucémie aiguë lymphoblastique  
LPS : lipopolysaccharide  
MAC : conditionnement myéloablatif, « myeloablative conditioning »  
MAPKs : « mitogen-activated protein kinases »  
MiHA : antigène mineur d'histocompatibilité, « minor histocompatibility antigen »  
MIP1 $\alpha$  : « macrophage inflammatory protein  $\alpha$ »

MMF : mycophenolate mofetil  
mTOR : « mammalian target of rapamycin »  
MTX : méthotrexate  
MyD88 : « myeloid differentiation primary-response gene 88 »  
Mx1, MxA : « Myxovirus resistance 1 »  
NF-κB : « nuclear factor-κB »  
NIH : Institut National de la Santé, « National Institutes of Health »  
NK : lymphocyte « natural killer »  
NO : monoxyde d'azote  
NRM : mortalité non liée à la rechute, « non relapse mortality »  
nTreg : lymphocyte T régulateur naturel  
PAMP : motif moléculaire associé aux pathogènes, « pathogen-associated molecular patterns »  
PI3K : phosphoinositide 3-kinase  
NRM : mortalité non liée à la rechute, « non relapse mortality »  
PNN : polynucléaire neutrophile  
PTLD : syndrome lymphoprolifératif post transplantation, « post-transplant lymphoproliferative disorder »  
po : per os  
RC : rémission complète  
RIC : conditionnement à intensité réduite, « reduced intensity conditioning »  
REG3γ : « regenerating islet-derived protein 3 γ »  
RORα : « Retinoid-related orphan receptor α »  
RORγt : « Retinoid-related orphan receptor γ thymus »  
SAL : sérum anti-lymphocytaire  
SNP : polymorphisme d'un seul nucléotide, « single nucleotide polymorphism »  
TAC : tacrolimus  
TAK1 : « transforming-growth-factor-β-activated kinase 1 »  
TGF : « transforming growth factor »  
Th : lymphocyte T auxiliaire ou « helper »  
TLR : récepteurs de type Toll, « tool like receptor »  
TNF : facteur de nécrose des tumeurs, « tumor necrosis factor »  
TNFR-I : récepteur du TNF de type I  
Treg : lymphocyte T régulateur

## 1-Introduction

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH) est une thérapie curatrice pour de nombreuses hémopathies malignes et non malignes. Dans le cadre des hémopathies malignes, l'efficacité antitumorale de l'allo-CSH repose à la fois sur un effet cytoréducteur lié au conditionnement (radiothérapie et/ou chimiothérapie) et sur un effet immunologique lié à la reconnaissance et à la destruction par les cellules immunitaires du donneur des cellules tumorales du receveur : la réaction du greffon contre la tumeur. Il s'agit d'une approche d'immunothérapie anti-tumorale. Cependant il existe un pendant à la réaction du greffon contre la tumeur : la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD, « graft-versus-host disease ») liée à la reconnaissance et à la destruction immunologique des tissus et organes du receveur. La GVHD est une source majeure de morbi-mortalité après la greffe et limite le développement de l'allo-CSH. Une meilleure compréhension des mécanismes immunologiques en jeu dans la GVHD semble donc indispensable afin d'améliorer sa prévention et sa prise en charge, et apparaît comme l'un des enjeux majeurs de l'allogreffe.

La physiopathologie de la GVHD est un processus complexe. Si le rôle des lymphocytes T du donneur et des cellules dendritiques (DC) est connu depuis longtemps, la place exacte des nouvelles sous populations lymphocytaires T (lymphocytes T auxiliaires Th17 notamment) et des cellules dendritiques plasmocytoïdes (PDC), récemment décrites, reste à préciser. L'objectif de ce travail de thèse est d'explorer la contribution des lymphocytes Th17 et des PDC dans la physiopathologie de la GVHD. Ce type d'approche systématique est probablement la clé qui permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, indispensables afin d'améliorer la prévention et le traitement de la GVHD.

## **1-1- L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques**

### **1-1-1- Définition**

L'allo-CSH est une thérapie efficace et curatrice pour de nombreuses hémopathies. Elle est basée sur l'administration au patient d'un conditionnement par irradiation corporelle totale et/ou chimiothérapie, suivi par l'injection d'un greffon de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogéniques. Dans une vision simpliste, le rôle du conditionnement est double : l'éradication des cellules tumorales de l'hémopathie sous-jacente, et un rôle immunosuppresseur afin de prévenir le rejet du greffon. Un troisième rôle avait été initialement imputé au conditionnement, la destruction des CSH du receveur (myéloablation) afin que les CSH du donneur puissent s'implanter, cependant il s'est avéré que cela n'était pas indispensable. Initialement le greffon était vu comme un traitement de support au conditionnement myéloablatif, nécessaire à la récupération hématopoïétique, l'efficacité anti tumorale de l'allogreffe reposant sur la cytotoxicité du conditionnement. En réalité il s'est avéré que l'allo-CSH est également une immunothérapie, liée à l'activité immunologique anti tumorale des cellules du donneur contre les cellules tumorales, ce que l'on appelle l'effet du greffon contre la tumeur (GVT, « graft-versus-tumor »). Cela a conduit au développement des conditionnements non myéloablats, où l'efficacité anti tumorale est principalement liée à cet effet GVT.

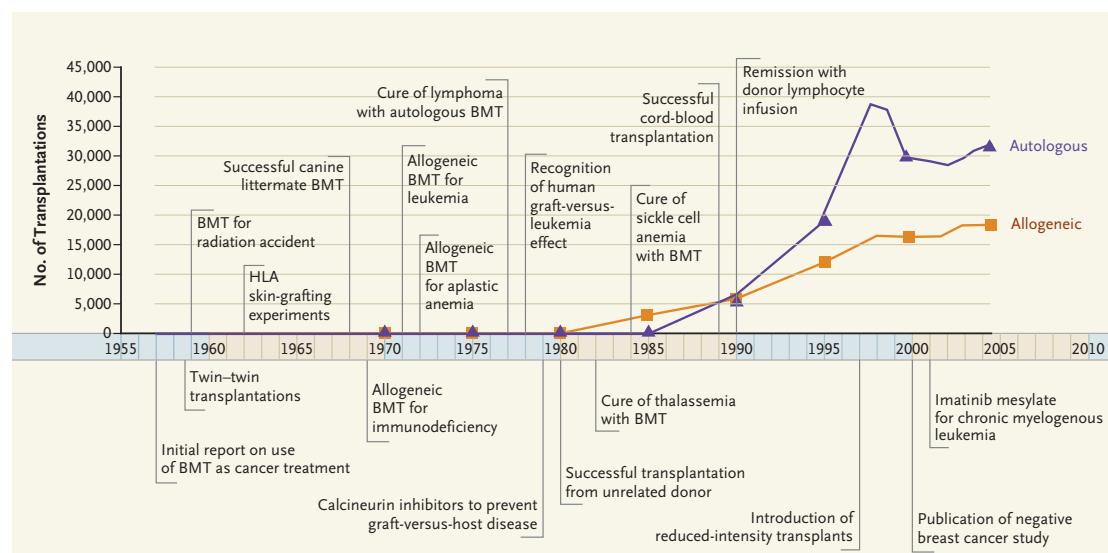
### **1-1-2- Historique de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques**

L'histoire de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques remonte à la première moitié du 20<sup>ème</sup> siècle avec, dès 1939, la publication par Osgood *et coll.* de la première tentative de transfusion de moelle osseuse pour traiter un cas d'aplasie médullaire<sup>1</sup>. Mais ce sont surtout les explosions atomiques au Japon à la fin de la seconde guerre mondiale et la crainte d'une guerre atomique qui ont stimulé les travaux sur les effets biologiques de l'irradiation, et permis les avancées indispensables au développement de l'allogreffe de moelle. Ainsi, en

1949 Jacobson *et coll.* ont montré chez la souris que la radio-protection du tissu hématopoïétique permettait de prévenir la myélosuppression induite par une irradiation corporelle totale (ICT)<sup>2</sup>. Lorentz *et coll.* ont ensuite montré que la transfusion de cellules de rate ou de moelle osseuse après l'ICT permettait d'obtenir le même effet<sup>3</sup>.

Dès 1956, l'idée que l'allogreffe de moelle osseuse pouvait présenter une efficacité thérapeutique pour traiter les hémopathies malignes a été avancée par Barnes *et coll.* Ils ont mis en évidence dans un modèle murin qu'une ICT suivie de l'administration intra-veineuse (IV) de moelle osseuse permettait de traiter une leucémie. Ce sont aussi les premières descriptions, lors de l'utilisation de moelle allogénique, d'une complication appelée à l'époque « seconde maladie », identifiée aujourd'hui comme étant la GVHD. ED Thomas réalise les premières transplantations de moelle osseuse chez le chien après ICT et pose les bases de la greffe de moelle osseuse<sup>4</sup>. En 1959, Thomas *et coll.* à Seattle rapportent la réalisation d'une greffe de moelle osseuse provenant d'un jumeau syngénique après une ICT supraléthale chez 2 patients avec une leucémie aiguë lymphoblastique (LAL)<sup>5</sup>. Cette publication apportait la preuve que la transfusion de moelle osseuse après ICT permet une reconstitution hématologique chez les patients avec une leucémie. Malheureusement les 2 patients ont rechuté et sont décédés quelques mois plus tard. La même année, en France, George Mathé rapporte que l'utilisation d'une greffe de moelle osseuse chez les patients victimes d'accidents d'irradiation a permis la survie de la plupart d'entre eux<sup>6</sup>. En 1965, G. Mathé est le premier à rapporter la possibilité d'une prise de greffe allogénique à long terme, se traduisant par un chimérisme, une tolérance et une efficacité anti-leucémique<sup>7</sup>. Malheureusement, le patient décèdera de varicelle et de GVHD chronique. Les tentatives d'allogreffe de moelle osseuse se multiplient en Europe et aux Etats Unis dans les années 1950 et 1960 et en 1970, Bortin *et coll.* rapportent une série de transplantations réalisées entre 1958 et 1968 : sur 203 patients, seulement 3 patients étaient toujours vivants lors de la publication<sup>8</sup>. Les patients mourraient principalement d'échec de prise de greffe, de GVHD et de rechute. Ces résultats décevant ont donné un coup d'arrêt à la greffe de moelle osseuse, le nombre de greffes réalisées diminuant brutalement.

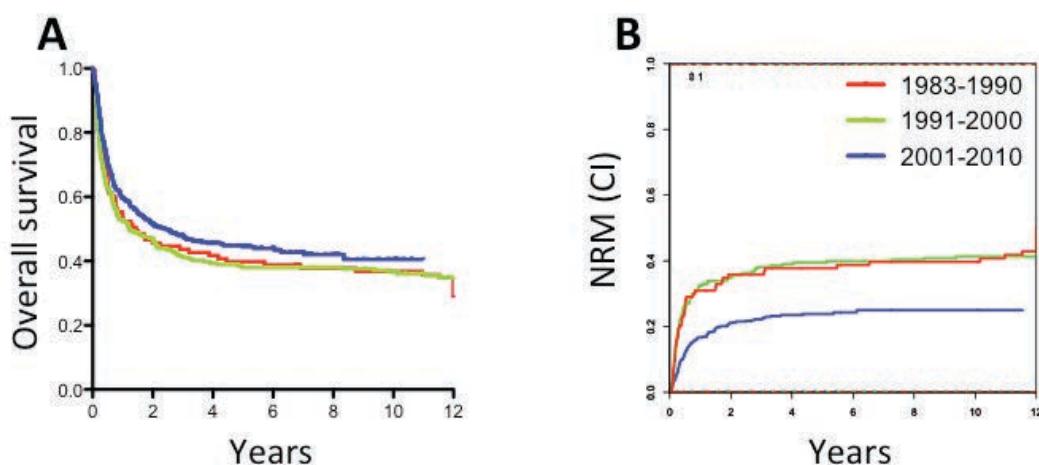
La découverte du système des antigènes des leucocytes humains (HLA, « human leucocyte antigen ») par J Dausset<sup>9</sup> et JJ Van Rood<sup>10</sup> a marqué une avancée majeure : l'utilisation de donneur apparenté HLA identique permettait de diminuer le risque de rejet et de GVHD, la poursuite des travaux dans les modèles animaux permettant en parallèle d'améliorer les stratégies d'allogreffe. R Storb et ED Thomas ont continué à travailler dans un modèle canin sur l'utilisation de l'ICT dans le conditionnement et l'utilisation du méthotrexate pour la prévention de la GVHD<sup>11</sup>. G Santos montrait dans un modèle murin que l'utilisation de cyclophosphamide dans le conditionnement permettait de renforcer l'immunosuppression en parallèle de la myélosuppression de l'ICT<sup>12</sup>, il a également été le premier à utiliser le busulfan en remplacement de l'ICT<sup>13</sup>.



**Figure 1 : Histoire et évolution de l'allo-CSH de 1957 à nos jours.**  
(Appelbaum *et coll.* N Engl J Med 2007<sup>14</sup>)

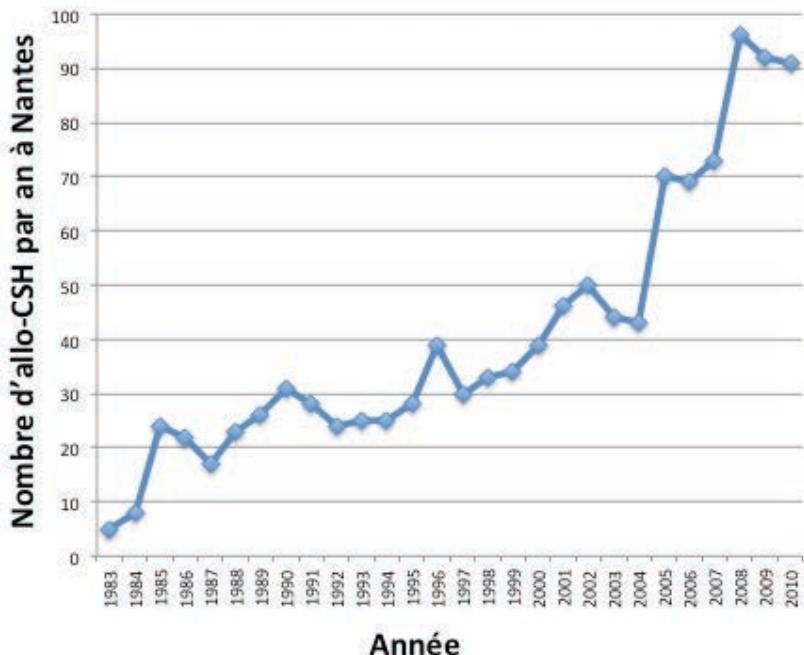
Ces travaux pionniers ont posé les principes de l'allogreffe de moelle osseuse. Par la suite des progrès majeurs ont encore été réalisés, avec le développement des conditionnements à intensité réduite, l'élargissement du type de greffon, l'amélioration de la prise en charge des complications infectieuses et des soins de support ou encore l'affinement des indications (**Figure 1**). Ces avancées ont permis de diminuer la mortalité après allo-CST. Ainsi une étude monocentrique réalisée à Seattle par Gooley *et coll.* a évalué le devenir des patients selon qu'ils aient reçu une première allogreffe en 1993-

1997 ou en 2003-2007 : la seconde période était associée à une diminution de la mortalité non liée à la rechute (NRM, « non relapse mortality ») de 52%, une diminution du risque de rechute/progression de 21% et une diminution de la mortalité globale de 41%<sup>15</sup>. Nous avons conduit une étude similaire au CHU de Nantes, évaluant le devenir des 827 patients ayant eu leur première allogreffe de CSH entre 1983 et 2010<sup>16</sup> : alors que les patients de la cohorte 2001-2010 étaient significativement plus âgés, avec davantage de maladies de haut risque, la NRM diminuait et la survie globale s'améliorait significativement dans la cohorte 2001-2010 par rapport aux cohortes 1983-2000<sup>16</sup> (Figure 2).



**Figure 2 : Devenir après allo-CSH selon la décennie de traitement de 1983 à 2010. (A) Survie globale, (B) Mortalité non liée à la rechute.** (Adapté de Malard *et coll.* Biol Blood Marrow Transplantation, 2014<sup>16</sup>)

Ces avancées ont contribué à faire de l'allo-CSH une thérapie largement utilisée dans le monde, le nombre d'allo-CSH ayant ainsi augmenté de plus de 37% depuis 2005. En 2011, l'association de l'EBMT (European Society for Blood and Marrow Transplantation) a rapporté la réalisation de 13470 allo-CSH en Europe<sup>17</sup>. La progression de l'activité d'allo-CSH à Nantes reflète cette évolution : d'une trentaine d'allo-CSH réalisées chaque année dans les années 1980 et 1990, l'activité du service est passé à près de 90 allo-CSH par an ces dernières années (**Figure 3**).

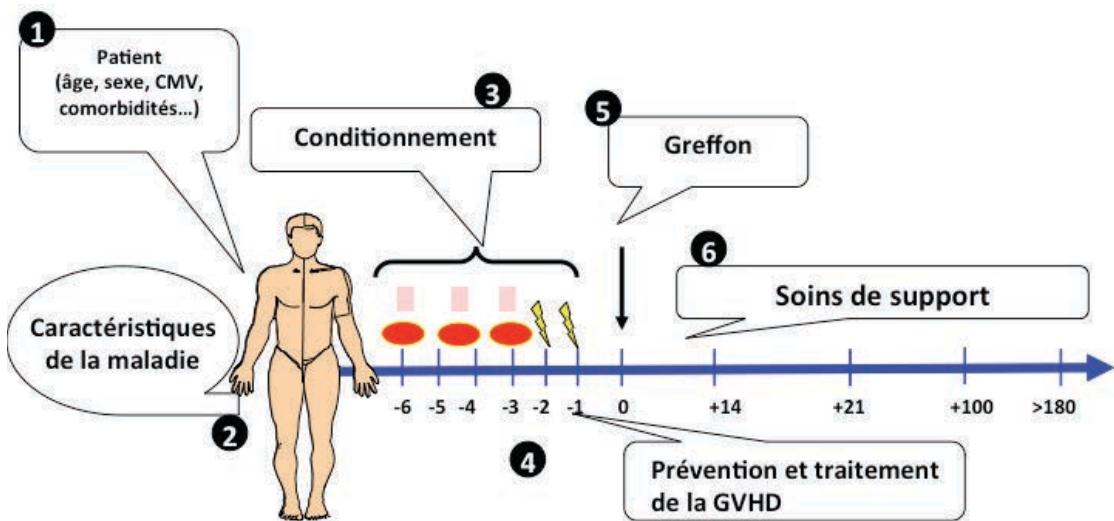


**Figure 3: Evolution du nombre d'allo-CSH par an au CHU de Nantes de 1983 à 2010.** (Malard *et coll.* Données non publiées)

### 1-1-3- Les étapes de l'allogreffe

Les grandes étapes de l'allo-CSH sont résumées Figure 4. L'indication d'allo-CSH posée, en fonction des caractéristiques du patient (1) et de la maladie (2), le prérequis indispensable pour pouvoir réaliser l'allo-CSH est l'identification d'un donneur compatible. Une fois identifié, on peut alors procéder à l'allo-CSH.

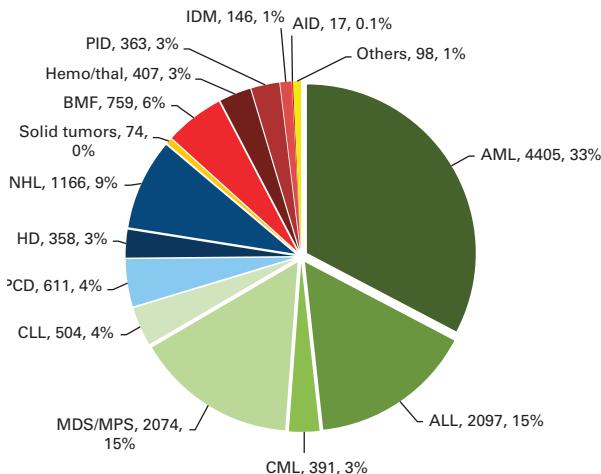
L'allo-CSH se déroule alors ainsi : le patient reçoit le conditionnement par ICT et /ou chimiothérapie (3), avant la réinjection du greffon (5). Il s'en suit une période d'aplasie plus ou moins prolongée selon l'intensité du conditionnement. En parallèle un traitement immunosuppresseur est initié (4) afin de prévenir le rejet du greffon et la survenue de la GVHD, ainsi que des soins de support (6) afin de prévenir ou traiter les complications infectieuses principalement et de palier aux cytopénies (support transfusionnel).



**Figure 4 : Les grandes étapes de l'allo-CSH.**

#### 1-1-4- Les indications

Il est très difficile de faire une synthèse des indications d'allo-CSH. L'étude de Passweg *et coll.* en est un reflet, ils ont repris l'activité d'allo-CSH au sein de l'EBMT en 2011<sup>17</sup> : 13470 allo-CSH ont été réalisées au sein de l'EBMT en 2011 (Figure 5). Les hémopathies myéloïdes : leucémies aiguës myéloïdes, les syndromes myélodysplasiques et les néoplasies myéloprolifératives représentent la majorité des indications (48%), la leucémie myéloïde chronique ne représentant plus que 3% des allo-CSH depuis l'avènement des inhibiteurs de tyrosine kinase. Les hémopathies lymphoïdes représentent elles 35% des allo-CSH, avec en premier lieu la leucémie aiguë lymphoïde (15%) et les lymphomes non hodgkiniens (9%), suivis par la leucémie lymphoïde chronique, le myélome multiple et la maladie de Hodgkin. Il n'y a presque plus d'allo-CSH réalisées dans les tumeurs solides (uniquement 74 allo-CSH en 2011). Les 14 % restants correspondent aux indications d'allo-CSH pour des maladies non malignes, en premier lieu l'aplasie médullaire (6%). Au-delà de l'hémopathie sous-jacente, l'indication est posée en fonction des caractéristiques de l'hémopathie (cytogénétique, biologie moléculaire...), de la réponse au traitement, du nombre de lignes de traitement reçues et du patient (âge et comorbidités) notamment.



**Figure 5 : Nombre absolu et proportion d'allo-CSH pour chaque indication en Europe en 2011.** (Passweeg *et coll.* Bone Marrow Transplant 2013<sup>17</sup>)

### 1-1-5- Le choix du donneur

#### 1-1-5-1- Le système HLA

La compatibilité donneur receveur est déterminée par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou système HLA chez l'homme<sup>18</sup>. Il regroupe un ensemble de plus de 200 gènes regroupés sur le bras court du chromosome 6. Cette région chromosomique est divisée en 3 parties, appelées HLA de classe I (contenant les gènes HLA-A, -B et -C), HLA de classe II (contenant les gènes HLA-DR, -DQ et -DP) et, situé entre les 2, le HLA de classe III, contenant entre autres les gènes codant pour des protéines du complément et le facteur de nécrose des tumeurs (TNF, « tumor necrosis factor »)<sup>18</sup>. Les gènes du système HLA sont très polymorphes, exprimés de façon codominante et sont transmis à la descendance par haplotype complet<sup>18</sup>.

Les molécules HLA de classe I sont exprimées sur la plupart des cellules nucléées de l'organisme et les plaquettes. Elles consistent en l'association d'une protéine invariante codée par le chromosome 15, la  $\beta 2$  microglobuline, et d'une chaîne polypeptidique  $\alpha$  très polymorphe avec. L'association de ces 2 protéines forme un hétérodimère transmembranaire, qui présente les peptides antigéniques aux lymphocytes T CD8+ afin de les activer. Les molécules HLA de classe II sont exprimées principalement par les cellules présentatrices d'antigène

(CPA) : macrophage et DC mais aussi les lymphocytes B et T activés. Elles sont constituées de 2 chaines polypeptidiques polymorphes  $\alpha$  et  $\beta$  qui s'associent en un hétérodimère transmembranaire, présentant des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4+.

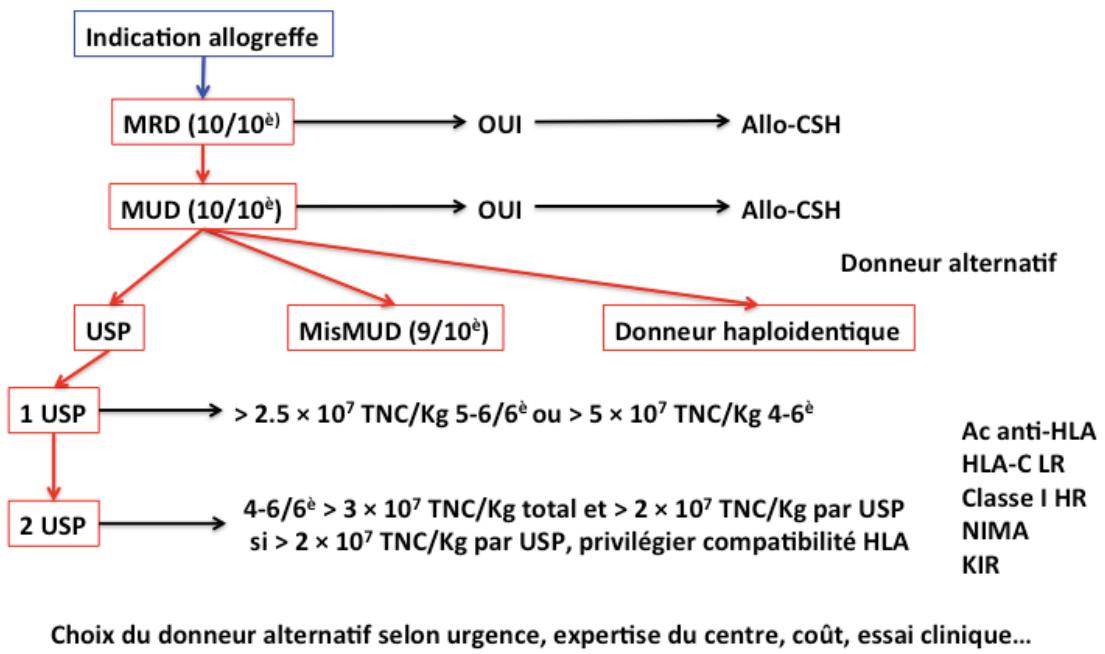
Le système HLA a un rôle crucial dans l'allo-CSH. En effet, les lymphocytes T du receveur peuvent reconnaître le HLA du donneur comme étranger et ainsi entraîner le rejet de greffe. Les lymphocytes T du donneur peuvent eux reconnaître le HLA du receveur comme étranger d'où un risque de GVHD.

### **1-1-5-2- Les différents types de donneurs**

Il existe plusieurs types de donneurs et de cellules souches. Le choix se portera en premier lieu sur un donneur familial, on parle alors de donneur génoidentique. Etant donné que chaque individu possède un haplotype du père et un de la mère, chaque frère et sœur a une chance sur 4 d'être compatible avec le patient.

Dans près de 70% des cas, il n'y a pas de donneur HLA identique apparenté disponible. Il est alors nécessaire de rechercher un donneur HLA identique sur les fichiers internationaux. Ces fichiers comptent actuellement plus de 22 millions de donneurs potentiels dans le monde ([www.bmdw.org](http://www.bmdw.org)) dont 200 000 en France ([www.agence-biomedecine.fr](http://www.agence-biomedecine.fr)). Les progrès du typage HLA ont permis d'améliorer le devenir des patients allogreffés à partir d'un donneur de fichier. En Europe, le gold standard pour le choix d'un donneur non apparenté est un donneur 10/10<sup>ème</sup>, ainsi le typage est réalisé au niveau allélique pour les gènes HLA-A, -B, -C, -DR et -DQ. On parle de donneur phénoidentique. Le devenir des patients après une greffe phénoidentique 10/10<sup>ème</sup> est comparable à celui des patients ayant un donneur génoidentique<sup>19</sup>. Malheureusement, comme il n'est pas toujours possible d'identifier un donneur de fichier 10/10<sup>ème</sup>, le choix se portera alors sur l'utilisation d'un donneur de fichier 9/10<sup>ème</sup> ou l'utilisation d'unités de sang placentaire (USP) en fonction de la disponibilité, de l'urgence de la greffe et de l'hémopathie sous-jacente<sup>20</sup>. Enfin, l'utilisation de donneurs familiaux haploidentiques, ne partageant qu'un seul haplotype avec le patient, représente une alternative extrêmement intéressante lorsqu'il n'y a pas de

donneur disponible<sup>21</sup>. Une proposition d'algorithme pour le choix d'un donneur est indiquée Figure 6.



**Figure 6 : Proposition d'algorithme de choix d'un donneur.**

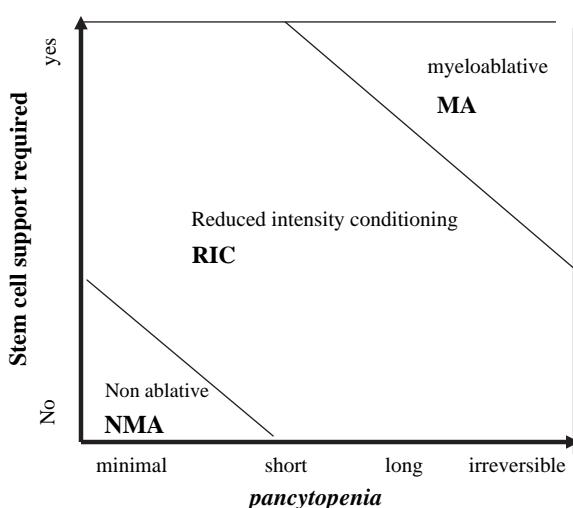
Dans le cadre du choix du donneur, la seconde question qui se pose, en dehors de la greffe de sang placentaire, est celle du choix entre l'utilisation de moelle osseuse ou de cellules souches périphériques (CSP) mobilisées par facteur de croissance granulocytaire. Une étude randomisée a récemment comparé ces 2 types de greffon dans le cadre des greffes non apparentées<sup>22</sup>. Il n'y avait pas de différence en terme de survie globale, par contre l'utilisation de CSP était associée à une diminution du risque d'échec de prise de greffe et à une augmentation de la GVHD chronique. En pratique, chez l'adulte on utilise en majorité des CSP, la moelle osseuse étant toujours privilégiée afin de réduire le risque de GVHD dans les maladies non malignes, notamment l'aplasie médullaire.

### 1-1-6- Le conditionnement

L'objectif du conditionnement par irradiation corporelle totale et/ou chimiothérapie est double, il a une fonction cytotoxique visant à réduire la masse tumorale et un rôle immunosuppresseur afin de prévenir le rejet et la survenue

d'une GVHD. Historiquement, on pensait que le conditionnement avait un 3ème rôle, celui de détruire les CSH du receveur afin que celles du donneur puissent coloniser la moelle osseuse, cependant le développement des conditionnements non myéloablatifs ont démontré que cela n'était pas nécessaire.

L'intensité du conditionnement varie considérablement. Les conditionnements myéloablatifs (MAC, « myeloablative conditioning »), ont été les premiers utilisés, ils reposent sur du cyclophosphamide 120 mg/Kg associé à une ICT (10-15 Gy) ou à du busulfan (16 mg/Kg po ou 12,8 mg/Kg IV). Malheureusement, la toxicité liée à l'intensité du conditionnement est importante et les MAC restent réservés aux patients jeunes en bon état général. Afin de diminuer la toxicité du conditionnement, des conditionnements à intensité réduite (RIC, « reduced intensity conditioning ») ont été développés, avec à l'extrême les conditionnements non myéloablatifs (Figure 7)<sup>23</sup>.



**Figure 7: Classification des conditionnements en 3 catégories selon la durée de la pancytopenie et la nécessité d'un support en CSH. (Bacigalupo *et coll.* Biol Blood Marrow Transplant, 2009<sup>23</sup>)**

L'utilisation d'un conditionnement RIC est réalisée chez les patients qui présentent l'un des critères suivants : (1) plus de 50 ans, (2) lourdement prétraité (autogreffe de CSH préalable ou plus de 2 lignes de chimiothérapies) ou (3) performance status altéré du fait de comorbidités significatives, comme cela a été décrit par Sorror *et coll*<sup>24</sup>. Dans les RIC, la dose d'alkylant et d'ICT est en général diminuée d'au moins 30%. La plupart de ces conditionnement combinent de la fludarabine avec un alkylant (busulfan, melphalan, thiotepe...) ou une ICT et

une T déplétion *in vivo* par du sérum anti lymphocytaire (SAL). L'un des conditionnements le plus utilisé repose sur l'association de fludarabine, de busulfan intra-veineux (IV) à 6,4 mg/Kg et de SAL. Certains conditionnements sont adaptés également en fonction du type de greffon utilisé, ainsi pour une greffe de sang placentaire à conditionnement RIC, le conditionnement de « Minneapolis » associant fludarabine, endoxan et ICT 2 Gy est largement utilisé. De même des conditionnements spécifiques existent pour les greffes à partir d'un donneur haploidentique. Enfin pour les greffes à conditionnements non myéloablatis, les doses de cytotoxiques sont encore réduites : conditionnement de « Seattle » fludarabine et ICT 2 Gy<sup>25</sup> ou fludarabine et busulfan IV 3,2 mg/Kg, notamment pour les hémopathies indolentes.

L'une des limites des RIC est que la diminution de toxicité, et donc de mortalité non liée à la rechute (NRM, « non relapse mortality »), se fait souvent au prix d'une augmentation du risque de rechute. Le diagnostic et le statut de la maladie à la greffe, doivent donc être considérés avec attention lors du choix de l'intensité du conditionnement. Il est ainsi apparu ces dernières années une nouvelle notion en terme de conditionnement, les conditionnements myéloablatis à toxicité réduite, qui visent à conserver un effet cytotoxique anti tumoral maximum tout en diminuant la toxicité, il s'agit notamment du conditionnement « FB4 », associant de la fludarabine, du busulfan IV 12,8 mg/Kg et du SAL.

### **1-1-7- Les complications**

L'allogreffe reste limitée par de nombreuses complications à l'origine d'une morbidité et d'une mortalité importantes<sup>18</sup>. A la phase précoce, elles sont dominées par les complications infectieuses et la GVHD. De nombreuses autres complications, en lien notamment avec la toxicité du conditionnement peuvent survenir à la phase précoce : maladie veino-occlusive, cystite hémorragique, syndrome d'hyperperméabilité capillaire, hémorragie alvéolaire diffuse, microangiopathie thrombotique... Si la majorité des complications surviennent à la phase précoce après l'allo-CSH, des complications tardives peuvent également

survenir. De nombreux progrès ont été faits dans la prévention et la prise en charge de ces complications depuis les débuts de l'allo-CSH, permettant de réduire la NRM. Nous allons revoir un peu plus en détail les complications infectieuses et les complications tardives après allo-CSH, la GVHD faisant l'objet d'un chapitre à part.

#### **1-1-7-1- Les complications infectieuses**

Les complications infectieuses sont liées à l'immunodépression consécutive à l'allo-CSH. Il existe 3 phases d'immunosuppression successives<sup>18</sup>.

La phase de neutropénie initiale débute lors du conditionnement et se termine lors de la sortie d'aplasie (autour de J +30 post allo-CSH). La neutropénie et des lésions des barrières anatomiques favorisant les translocations bactériennes sont les principaux facteurs de risque durant cette phase. Il existe également un déficit de l'immunité humorale et cellulaire, et une asplénie fonctionnelle chez les patients recevant une ICT. Les principaux pathogènes lors de cette phase sont les bactéries Gram positif et négatif, les *Candida spp.* et l'*Herpes simplex virus* (HSV).

La 2<sup>ème</sup> phase d'immunosuppression débute après la sortie d'aplasie aux environs de J +30, jusqu'à J +100 après allo-CSH. Lors de cette phase, si la neutropénie et les lésions muqueuses ont disparu, il persiste un risque infectieux en lien avec le maintien des voies veineuses centrales, du déficit immunitaire et de l'asplénie fonctionnelle qui peut être aggravée par la survenue d'une GVHD et son traitement. Cela favorise le risque d'infections virales et fongiques. Ainsi le *Cytomegalovirus* (CMV), l'*adenovirus*, le *BK virus*, le *virus respiratoire syncytial*, le *Pneumocystis jiroveci*, les *Candida spp.* et *Aspergillus spp.* sont les principaux agents responsables d'infections pendant cette phase.

La phase tardive débute au-delà de J + 100 après allo-CSH, et les infections survenant durant cette phase sont souvent liées à la présence d'une GVHD chronique. De plus l'asplénie fonctionnelle persiste chez les patients avec une GVHD ou ayant reçue une ICT. Les infections pendant cette phase sont souvent liées à des bactéries encapsulées (*Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*), *Aspergillus spp.*, *Varicella zoster virus* ou encore

l'*Epstein-Barr virus* responsable du syndrome lymphoprolifératif post transplantation (PTLD, « post-transplant lymphoproliferative disorder »).

### **1-1-7-2- Les complications à long terme**

Certaines complications peuvent survenir à plus long terme après allo-CSH<sup>18</sup>. Il peut s'agir de cancers secondaires, radio ou chimio induits par le conditionnement, mais également favorisés par l'immunodépression post allo-CSH et le traitement immunosuppresseur. Le plus fréquent est le carcinome basocellulaire, dont la prévention nécessite une surveillance dermatologique annuelle des patients allogreffés. Cependant tous les types de cancers (tumeurs solides et hémopathies) peuvent se rencontrer. Les atteintes oculaires (cataracte), cutanées et bucco-dentaires (GVHD chronique) sont fréquentes. Les patients présentent souvent une stérilité. Les troubles endocriniens sont également fréquents : dysthyroïdie, syndrome métabolique, hypogonadisme contribuant à l'ostéoporose... Des complications cardiaques peuvent également survenir après allo-CSH, liées à la toxicité des chimiothérapies. Il existe également un risque d'insuffisance rénale en lien avec l'utilisation de drogues néphrotoxiques lors de l'allo-CSH. Au niveau hépatique, des complications à type de cirrhose puis de carcinome hépatocellulaire peuvent se voir, en lien avec une GVHD hépatique ou la surcharge martiale. Enfin les complications respiratoires sont fréquentes et multifactorielles, liées au conditionnement et en particulier à l'ICT ou aux agents de chimiothérapie reçus préalablement par le patient, tel que la bléomycine qui entraîne une fibrose pulmonaire. La GVHD dans sa forme chronique peut également donner des atteintes respiratoires à type de bronchiolite oblitérante (BOS). Au vu de ces nombreuses complications à long terme, un suivi prolongé des patients après allo-CSH est indispensable afin de prévenir leur survenue ou de les prendre en charge le plus précocement possible.

De nombreux progrès ont été réalisés dans la prévention et la prise en charge de ces complications depuis les débuts de l'allo-CSH. Le développement des agents anti-infectieux (antifongiques, antibiotiques, antiviraux) ont permis

de réduire les complications infectieuses. Par ailleurs la mise au point des conditionnements à intensité réduite<sup>23</sup> puis des conditionnements à toxicité réduite ont permis de diminuer l'incidence de nombreuses complications aux phases précoce et tardive. Ces progrès ont permis une réduction de la NRM<sup>15, 16</sup>. Malheureusement la GVHD reste une source persistante de NRM, peu de progrès ayant été faits dans sa prévention et sa prise en charge. Ainsi il apparaît urgent de mieux comprendre la physiopathologie de la GVHD afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. C'est en effet par cette approche que l'on pourra mettre au point de nouveaux traitements immunosuppresseurs, indispensables pour une meilleure prévention ou traitement de la GVHD. Dans la suite de ce travail de thèse nous allons nous focaliser sur la physiopathologie de la GVHD et la mise en évidence du rôle de cellules immunitaires récemment décrites dans la physiopathologie de la GVHD.

## **1-2- La réaction du greffon contre l'hôte**

### **1-2-1- Définition**

La réaction aiguë du greffon contre l'hôte est liée à la reconnaissance et la destruction immunologique des tissus et organes du receveur par les lymphocytes T du donneur.

La GVHD a été décrite pour la première fois dans les modèles murins d'allo-CSH, alors que le système HLA et son équivalent murin le système H-2 n'étaient pas encore connus. Les souris présentaient un tableau clinique associant anorexie, perte de poids, diarrhées, une fourrure ébouriffée, pouvant conduire au décès de la souris. Ces signes cliniques, correspondant à ce que l'on appelle aujourd'hui GVHD, avaient alors été appelés seconde maladie ou « secondary disease ».

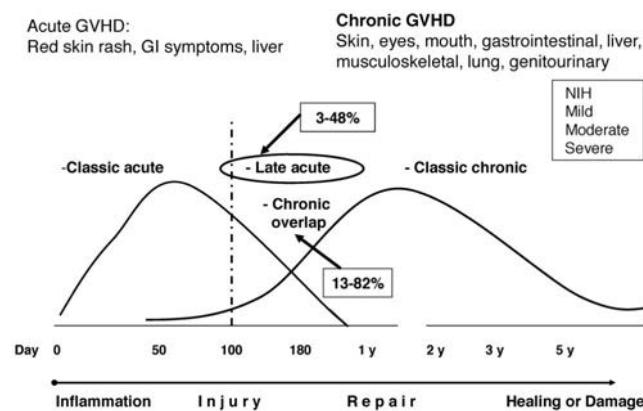
Historiquement la GVHD a été divisée entre aiguë et chronique en fonction du moment de survenue. La GVHD aiguë (aGVHD) survenant par convention dans les 100 jours suivant l'allo-CSH et la GVHD chronique (cGVHD) au-delà. Les cliniciens étaient alors confrontés à des situations où une GVHD survenant après 100 jours présentait les caractéristiques cliniques d'une GVHD aiguë, notamment dans le cadre des conditionnements RIC ou lors de la réinjection de lymphocytes du donneur. Cela n'était pas satisfaisant et a conduit l'Institut National de la santé aux Etats Unis (NIH, « National Institutes of Health ») à revoir cette classification. Deux nouvelles entités ont alors été incluses dans la classification du NIH<sup>26</sup> : la « late-onset » aGVHD, correspondant à une GVHD aiguë de survenue tardive, au-delà de 100 jours après la greffe et un « overlap syndrom » ou syndrome de chevauchement, lorsque les patients présentent une GVHD avec des caractéristiques cliniques correspondant à la fois à la forme aiguë et chronique (Tableau 1)<sup>26</sup>.

**Tableau 1 : Classification de la GVHD aiguë et chronique d'après Filipovich et coll. (Filipovich et coll. Biol Blood Marrow Transplant, 2005<sup>26</sup>)**

Category	Time of Symptoms after HCT or DLI	Presence of Acute GVHD Features*	Presence of Chronic GVHD Features*
<b>Acute GVHD</b>			
Classic acute GVHD	≤100 d	Yes	No
Persistent, recurrent, or late-onset acute GVHD	>100 d	Yes	No
<b>Chronic GVHD</b>			
Classic chronic GVHD	No time limit	No	Yes
Overlap syndrome	No time limit	Yes	Yes

GVHD indicates graft-versus-host disease; HCT, hematopoietic cell transplantation; DLI, donor lymphocyte infusion.

L'incidence de la GVHD aiguë cliniquement significative (grade II-IV) tourne autour de 40% tout type d'allo-CSH confondu<sup>18</sup>, cependant, l'incidence varie beaucoup, principalement en fonction du degré d'incompatibilité HLA et de la prophylaxie de la GVHD utilisée. De même pour la GVHD chronique, l'incidence tourne autour de 40% dans le cas des greffes à partir d'un donneur apparenté et peut atteindre 70% dans le cas d'un donneur non apparenté<sup>18</sup>. De plus la plupart des études ont évalué l'incidence de la GVHD dans le cadre des conditionnements myéloablatis et avant la conférence de consensus du NIH<sup>26</sup>. Ainsi la « late-onset aGVHD » et l'« overlap syndrom » ont été classés en GVHD chroniques dans ces études. Des données rétrospectives suggèrent que l'incidence de la « late-onset aGVHD » se situerait entre 3 et 48% et pour l'« overlap syndrom » entre 13 et 82% (Figure 8)<sup>27</sup>. Ces 2 nouvelles entités surviennent plus fréquemment après les conditionnements à intensité réduite. L'évaluation de l'incidence exacte de la GVHD aiguë et chronique ainsi que de ces 2 nouvelles entités dans des études prospectives est indispensable.



**Figure 8 : Classification de la GVH aiguë et chronique d'après Filipovich et coll. (Pavletic et Fowler, Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2012<sup>27</sup>)**

Dans la suite de ce chapitre, nous allons voir en détails les caractéristiques de la GVHD aiguë qui est le sujet principal de cette thèse, puis nous dirons un mot sur la GVHD chronique.

### **1-2-2- La GVHD aiguë**

#### **1-2-2-1- Diagnostic**

La GVHD aiguë touche 3 principaux organes : la peau, le tube digestif et le foie<sup>28</sup>.

La peau est l'organe le plus fréquemment touché et souvent en premier. Le patient présente un rash maculo-papuleux, il commence souvent au niveau palmo-plantaire et peut s'étendre à tout le corps, en épargnant le cuir chevelu (Figure 9). Cette éruption peut être prurigineuse voire douloureuse. A l'extrême le patient présente une épidermolyse bulleuse avec un décollement cutané.



**Figure 9 : Exemple de GVHD aiguë cutanée sévère (stade 3-4).**

L'atteinte digestive de la GVHD aiguë se présente en général sous la forme de diarrhées, cependant des vomissements, une anorexie ou des douleurs abdominales peuvent rentrer dans le tableau clinique. Il s'agit d'une diarrhée sécrétoire, souvent volumineuse (plus de 2 L par jour). Des saignements, de mauvais pronostic, peuvent survenir, liés à des ulcérations muqueuses.

L'atteinte hépatique de la GVHD aiguë se manifeste par une augmentation de la bilirubinémie, qui se voit d'abord sur le bilan biologique avant de devenir symptomatique (ictère).

La première classification de la GVHD aiguë a été proposée par Glucksberg *et coll.* dès 1974<sup>29</sup>. Un score de gravité est proposé pour chaque organe atteint (peau, foie et tube digestif) allant de 1 à 4 (Tableau 2). Pour la peau, la sévérité dépend de la surface cutanée atteinte, le grade 4 correspondant à la présence d'un décollement cutané. Pour le tube digestif, cela dépend du volume des diarrhées, de la présence de douleurs abdominales ou d'une hémorragie digestive correspondant au grade 4. Enfin pour le foie, le grade dépend du taux de bilirubine. Chacun de ces grades était alors combiné avec l'état général du patient pour définir un grade global allant de I à IV (Tableau 3). Cette classification a été révisée lors d'une conférence de consensus en 1994<sup>30</sup>, dont les apports ont été l'abandon de la prise en compte de l'état général dans le score global et l'inclusion des signes digestifs hauts dans le diagnostic de GVHD aiguë digestive. La présence de nausées persistantes associées à des signes histologiques de GVHD sur des biopsies duodénales ou de l'estomac correspondant à une GVHD digestive de stade 1.

**Tableau 2 : Score de sévérité clinique de l'atteinte des organes cibles au cours de la GVHD aiguë, classification de Glucksberg, révisée par Przepiorka *et coll.* (Glucksberg *et coll.* Transplantation, 1974<sup>29</sup> ; Przepiorka *et coll.* Bone Marrow Transplant, 1995<sup>30</sup>)**

Stade	Peau	Tube digestif	Foie
1	Eruption < 25% Surface Corporelle	Diarrhée > 500 ml/24h*	Bilirubine : 10-30 mg/l
2	Eruption 25-50% Surface Corporelle	Diarrhée > 1000 ml/24h	Bilirubine : 30-60 mg/l
3	Eruption généralisée	Diarrhée > 1500 ml/24h	Bilirubine : 60-150 mg/l
4	Epidermolyse bulleuse	Douleurs abdominales sévères ou hémorragies	Bilirubine : > 150 mg/l

\*Des nausées persistantes associées à des signes histologiques de GVH sur des biopsies de l'estomac ou du duodénum correspondent à une atteinte digestive de stade 1 dans la classification révisée par Przepiorka *et coll.*

**Tableau 3 : Grade de sévérité de la GVHD, classification de Glucksberg, révisée par Przepiorka et coll.** (Glucksberg et coll. Transplantation, 1974<sup>29</sup> ; Przepiorka et coll. Bone Marrow Transplant, 1995<sup>30</sup>)

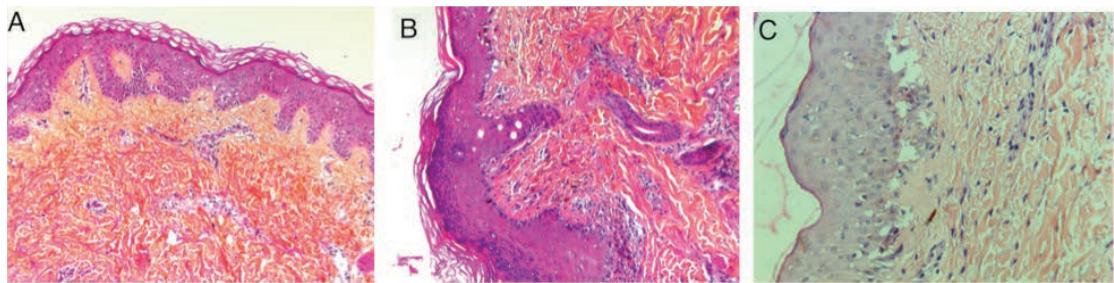
Grade	Peau	Tube digestif	Foie	Altération de l'état général*
I	1 à 2	0	0	0
II	1 à 3	1	1	Discrète
III	2 à 3	>2	>2	Marquée
IV	≥2	≥2	≥2	Sévère

\*L'état général n'est plus pris en compte pour déterminer la sévérité de la GVH dans la classification révisée par Przepiorka et coll.

L'IBMTR a proposé en 1997 un nouveau score de sévérité pour remplacer la classification de Glucksberg<sup>31</sup>. Cependant ce nouveau score n'apporte aucun avantage, d'autant plus que la classification de Glucksberg permet de mieux prédire la survie<sup>32</sup>. Ce score n'est donc pas utilisé et la version de Glucksberg modifiée reste utilisée en pratique quotidienne.

Les signes cliniques de la GVHD aiguë n'apparaissent pas spécifiques. Un faisceau d'arguments clinico-biologiques permet de poser le diagnostic et d'éliminer les diagnostics différentiels.

Pour la GVHD cutanée, le plus souvent l'éruption cutanée est assez typique. Cependant, il n'est parfois pas facile de faire la part des choses avec un rash lié à une toxidermie médicamenteuse ou à une réactivation virale par exemple. Il s'avère donc nécessaire de réaliser des examens complémentaires, notamment les PCR virales, et d'analyser la chronologie des prises médicamenteuses afin d'éliminer les diagnostics différentiels. L'examen anatomopathologique d'une biopsie cutanée permet d'apporter des arguments complémentaires pour le diagnostic de GVHD cutanée. Les cellules de la couche basale de l'épiderme présentent des images de vacuolisation, de dégénérescence et d'apoptose ; une disjonction dermo-épidermique partielle ou complète est observée dans les cas les plus sévères (**Figure 10**). Une classification avec une cotation de 1 à 4 a été proposée dès 1974 par Lerner et coll.<sup>33</sup> (Tableau 4). Cette classification n'a pas été revue depuis et est peu utilisée par les anatomopathologistes en routine.



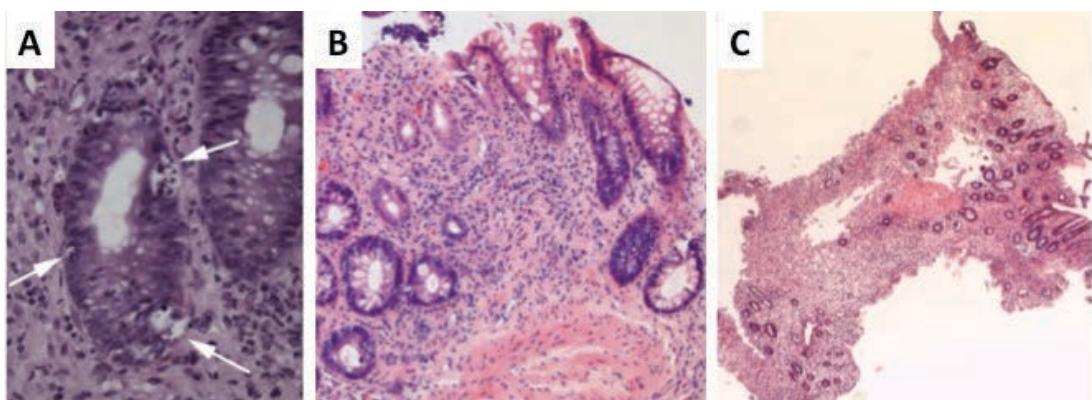
**Figure 10 : Biopsies cutanées après coloration HES : peau saine, grossissement × 100 (A) ; GVHD aiguë cutanée de stade 2, grossissement × 200 (B), GVHD aiguë cutanée de stade 3, grossissement × 200 (C).**

**Tableau 4 : Grade histologique de la GVH aiguë cutanée, classification de Lerner et coll.** (Lerner et coll. Transplant Proc, 1974<sup>33</sup>)

Grade	peau
0	peau normale
1	légère dégénérescence vacuolaire de la couche basale épidermique
2	dégénérescence vacuolaire diffuse des cellules basales avec présence de corps apoptotiques
3	disjonction dermo-épidermique partielle
4	disjonction dermo-épidermique complète

Pour la GVHD digestive, le problème du diagnostic différentiel est encore plus crucial<sup>34</sup>. En effet après allo-CSH, les étiologies des diarrhées sont nombreuses. Il est donc indispensable de réaliser des examens complémentaires, notamment des coprocultures, une recherche de toxine de *Clostridium difficile* dans les selles et une PCR CMV dans le sang afin d'éliminer ces diagnostics différentiels. L'examen complémentaire clé reste l'endoscopie digestive haute (fibroscopie oeso-gastro-duodénale) ou basse (rectosigmoïdoscopie), en fonction de la symptomatologie. L'analyse macroscopique de l'endoscopie permet d'éliminer certains diagnostics différentiels (colite pseudo membraneuse à *Clostridium difficile*...), et d'apprécier la sévérité de l'atteinte muqueuse en mettant en évidence des zones d'ulcération<sup>35</sup>, bien que le plus souvent l'aspect macroscopique soit normal<sup>36</sup>. Il est également indispensable de réaliser des biopsies lors de la réalisation de l'endoscopie digestive. Ces biopsies permettent de rechercher des signes anatomopathologiques de GVHD digestive depuis la présence de cellules épithéliales apoptotiques et la perte isolée de cryptes, jusqu'à une perte de cryptes étendue avec une mise à nue de l'épithélium (Figure 11). Une classification décrite par Sale et coll.<sup>37</sup> et Epstein et coll.<sup>38</sup> permet de

grader la sévérité des lésions histologiques de la GVHD aiguë digestive de 1 à 4 (Tableau 5).



**Figure 11 : Biopsies de muqueuse colique après coloration HES : GVHD aiguë digestive de grade 1, grossissement × 400 (A) ; GVHD aiguë digestive de grade 2, grossissement × 200 (B), GVHD aiguë digestive de grade 4, grossissement × 100 (C).**

**Tableau 5 : Grade histologique de la GVHD aiguë digestive, classification de Sale et coll. et Epstein et coll.** (Sale et coll. Am J Surg Pathol, 1979<sup>37</sup> ; Epstein et coll. Gastroenterology, 1980<sup>38</sup>)

grade	muqueuse digestive
0	muqueuse normale
1	cellules épithéliales apoptotiques isolées sans perte de crypte
2	perte isolée de crypte
3	perte de multiples cryptes contigüés
4	perte de cryptes étendue avec mise à nue de l'épithélium

Les biopsies permettent également d'éliminer certains diagnostics différentiels, ainsi on peut mettre en évidence des images d'inclusions cytoplasmiques liées au CMV, correspondant à une colite à CMV. Là aussi, cette classification histologique de la GVHD digestive est peu utilisée en pratique courante par les anatomopathologistes. Une étude récente a étudié l'intérêt des cellules de Paneth dans le diagnostic anatomopathologique de la GVHD digestive<sup>39</sup>. Ils ont mis en évidence qu'un faible nombre de cellules de Paneth corrélait mieux avec la sévérité clinique de la GVHD digestive que le score anatomopathologique classique. Les cellules de Paneth ne sont pas présentes dans la muqueuse colique, cette approche n'est donc valable que pour les formes hautes de GVHD aiguë digestive.

Enfin, en ce qui concerne la GVHD aiguë hépatique, elle est souvent difficile à distinguer des nombreuses autres causes de dysfonction hépatique après allo-CSH, telles que la maladie veino-occlusive, la surcharge martiale, la toxicité médicamenteuse, les infections virales ou encore le sepsis. L'examen anatomo-pathologique d'une biopsie hépatique mettra en évidence une inflammation de l'endothélium, une infiltration des espaces portes par des lymphocytes, une pericholangite et une destruction des canaux biliaires<sup>40</sup>. Cependant la biopsie hépatique est un geste invasif, particulièrement dans le contexte de l'allo-CSH où les patients sont souvent thrombopéniques. Le diagnostic de GVHD aiguë hépatique est donc un diagnostic d'exclusion après élimination des diagnostics différentiels sur les données clinico-biologiques.

### **1-2-2-2- Facteurs de risque**

De nombreuses études ont évalué les facteurs de risque de survenue de GVHD aiguë. Les facteurs de risque les plus importants et le plus fréquemment retrouvés sont le degré d'incompatibilité HLA<sup>41</sup>, l'alloimmunisation préalable du receveur<sup>42</sup>, l'utilisation d'un donneur de sexe féminin pour un receveur de sexe masculin<sup>42</sup>, l'âge avancé du patient<sup>43</sup> ou encore la prophylaxie de la GVHD utilisée. D'autres facteurs de risque ont été rapportés de façon moins systématiques : le statut CMV positif du patient<sup>43</sup>, l'âge avancé du donneur<sup>44</sup>, l'intensité du conditionnement et notamment l'utilisation d'une ICT<sup>43</sup> ou encore l'utilisation de CSP<sup>43</sup>.

Deux études récentes ont évalué les facteurs de risque de la GVHD. La première a analysé les facteurs de risque de GVHD chez 2941 patients ayant reçu une allo-CSH à Seattle<sup>45</sup>. Cette étude a confirmé que le degré d'incompatibilité HLA, l'utilisation d'un donneur non apparenté et l'utilisation d'une ICT dans le conditionnement étaient des facteurs de risque de survenue d'une GVHD aiguë. En revanche, l'âge élevé du patient, l'utilisation de CSP et l'utilisation d'un donneur de sexe féminin pour un receveur de sexe masculin n'avaient pas d'influence sur la survenue d'une GVHD aiguë. La seconde étude rapportée par le CIBMTR a porté sur une cohorte de 5561 patients<sup>46</sup>. 3191 recevaient une greffe

apparentée et 2370 une greffe non apparentée, ces 2 groupes de patients n'ont cependant pas été comparés entre eux. Il ressort de cette étude que l'incidence de GVHD aiguë diminuait avec l'utilisation d'un conditionnement myéloablatif ou à intensité réduite sans ICT par rapport à un conditionnement à intensité réduite avec une ICT. Dans le cadre des donneurs non apparentés l'incidence de GVHD aiguë augmentait avec le nombre d'incompatibilité HLA. Enfin là encore, l'utilisation de CSP n'avait pas d'incidence.

### **1-2-2-3- Prise en charge thérapeutique**

#### **Prise en charge préventive**

Initialement, dans les années 1970, la prévention de la GVHD aiguë reposait sur l'utilisation du méthotrexate (MTX) seul. L'utilisation d'une association de MTX ( $15 \text{ mg/m}^2$  à J +1 et  $10 \text{ mg/m}^2$  à J +3, +6 et +11) et d'un inhibiteur de calcineurine, la ciclosporine A (CsA) a présenté une réelle avancée au milieu des années 1980<sup>47</sup> et reste encore largement utilisée de nos jours. Des essais ont été réalisés pour ajouter des corticoïdes à l'association CsA MTX, sans bénéfice pour le patient<sup>48</sup>. Dans les années 1990, des essais ont également été réalisés pour évaluer dans le cadre des greffes à partir d'un donneur non apparenté l'utilisation d'un autre inhibiteur de calcineurine, le tacrolimus (TAC) à la place de la CsA. L'association TAC MTX permettait de réduire l'incidence de GVHD aiguë par rapport à l'association CsA MTX, par contre il n'y avait pas d'avantage sur la survie<sup>49</sup>.

Le mycophénolate mofétil (MMF) présente une action synergique avec les inhibiteurs de calcineurine pour prévenir la GVHD. De plus le MMF facilite la prise de greffe et est largement utilisé dans l'allo-CSH à conditionnement réduit. Si l'incidence de GVHD est la même avec les associations CsA MMF et CsA MTX, l'utilisation de CsA MMF présente un profil de toxicité plus acceptable avec une diminution de l'incidence et de la sévérité de la mucite<sup>50</sup>.

Une autre approche repose sur la réalisation d'une T déplétion *in vivo* grâce à l'utilisation d'anticorps polyclonaux : le sérum anti lymphocytaire (SAL). Le SAL permet de dépléter à la fois les lymphocytes T du donneur et du receveur et ainsi de diminuer l'incidence de la GVHD aiguë et chronique<sup>51, 52</sup>. L'utilisation

du SAL est controversée, il lui est en effet reproché d'augmenter le risque de complications infectieuses et de rechute<sup>53</sup>. Cela est probablement lié à l'utilisation de dose élevée, d'autant plus que l'utilisation de SAL à une dose plus réduite semble être suffisante pour réduire l'incidence de GVHD sans augmenter le risque de rechute<sup>54</sup>.

D'autres approches ont été développées pour prévenir la GVHD, notamment l'utilisation du sirolimus, un inhibiteur de mTOR (mammalian target of rapamycin) qui semblerait pouvoir remplacer avantageusement le MTX en association avec un inhibiteur de calcineurine<sup>55</sup>. L'utilisation de forte dose de cyclophosphamide à J + 3 et J + 4 de l'allogreffe, à la place de l'association CsA MTX, semble également donner des résultats intéressants<sup>56</sup>.

### **Prise en charge curative**

La GVHD aiguë de grade I, touchant par définition seulement la peau, peut le plus souvent être traitée par l'application de topiques locaux seuls. Pour la GVHD aiguë de grade II-IV, la mise en route d'une corticothérapie systémique à la dose de 2 mg/Kg/J d'équivalent prednisone en 2 prises par jour est indispensable<sup>27</sup>. En parallèle le plus souvent les patients poursuivent ou reprennent leur prise de CsA. La décroissance de la corticothérapie est initiée seulement lorsque la GVHD aiguë présente des signes d'amélioration franche, elle est alors très progressive, de l'ordre de 10% tous les 3-5 jours. Malheureusement, seulement 50% des patients environ répondent aux corticoïdes, ce taux de réponse étant d'autant plus faible que la GVHD est sévère. Différents agents ont été évalués en association avec les corticoïdes afin d'améliorer la réponse. Ainsi le Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT-CTN) a récemment mené une étude randomisée de phase II comparant 4 agents, l'etanercept, le MMF, le denileukin diftitox et la pentostatine, chacun en association avec les corticoïdes<sup>57</sup>. Le taux de rémission complète 28 jours après le début du traitement était de 26, 60, 53 et 38% respectivement. Malgré des biais, les résultats en faveur du MMF étaient prometteurs, et le BMT-CNT a réalisé une étude de phase III randomisant l'association corticoïdes + MMF versus corticoïdes + placebo dans la GVHD aiguë, qui n'a pas mis en évidence de bénéfice à l'ajout de MMF<sup>58</sup>.

La GVHD aiguë corticorésistante ou réfractaire est définie par la progression à 3 jours du début des corticoïdes ou l'absence d'amélioration 5 à 7 jours après le début des corticoïdes ; un traitement de seconde ligne est alors nécessaire. Peu d'études prospectives ont évalué les traitements de deuxième ligne de la GVHD aiguë, de plus l'absence de standardisation, de critères d'évaluation bien définis et le faible effectif de patients rend leur interprétation très difficile. De nombreux agents ont été évalués au cours des dernières années : MTX, MMF, photophorèse extracorporelle, anticorps (Ac) anti IL-2R (basiliximab, daclizumab et denileukin diftitox), alemtuzumab, SAL, etanercept, infliximab et sirolimus<sup>59</sup>. Les traitements de seconde ligne de la GVHD sont associés à une toxicité élevée et des taux d'échec importants ; une réponse (partielle ou complète) est observée chez seulement 50% des patients. Ainsi en cas de GVHD aiguë réfractaire, le pronostic des patients est sombre : la survie médiane est en moyenne de 6 mois et la survie globale à 1 an de 20-30%<sup>59</sup>. Il n'y a pas de preuve à l'heure actuelle pour penser que l'un de ces agents fasse particulièrement mieux ou moins bien que les autres. Ainsi, en l'absence d'étude comparative entre ces différents agents, le choix se fera en fonction des traitements préalablement reçus, du profil de toxicité, des interactions médicamenteuses, du coût et de l'expérience du clinicien.

### **1-2-3- La GVHD chronique**

La GVHD chronique présente des similarités cliniques avec des maladies auto-immunes telles que la sclérodermie, le Gougerot Sjögren ou encore la cirrhose biliaire primitive. La GVHD chronique est la principale cause de NRM tardive après allo-CSH<sup>60</sup>. Comme pour la GVHD aiguë, la GVHD chronique semble liée à la reconnaissance des tissus et organes du receveur par les cellules immunitaires du donneur. Les principaux facteurs de risque sont une GVHD aiguë préalable et l'âge élevé du patient, les autres facteurs de risque étant : un nombre élevé d'incompatibilité HLA, un antécédent de splénectomie, un patient

CMV positif, un donneur féminin lorsque le receveur est masculin et enfin l'utilisation de cellules souches périphériques<sup>45</sup>.

Dans la GVHD chronique tous les organes peuvent être atteints. Cependant les manifestations cliniques les plus souvent observées sont les atteintes cutanées, buccales, hépatiques et oculaires ; les signes cliniques sont résumés dans le **Tableau 6**<sup>26</sup>. La survenue de la GVHD chronique peut être progressive (une GVHD aiguë devenant chronique), quiescente (apparition à distance d'une GVHD aiguë complètement résolutive) ou de novo.

Le diagnostic de la GVHD chronique est essentiellement clinique. Une conférence de consensus a défini une liste de symptômes, classés en critères diagnostiques ou symptômes distinctifs, nécessitant une confirmation paraclinique, généralement histologique<sup>26</sup>.

L'autre élément important est d'apprécier la gravité de la GVHD chronique, ainsi, si la première classification de la GVHD proposée par Seattle dès 1980<sup>61</sup>, encore largement utilisée, classait la GVHD chronique en limitée et extensive (Tableau 7), les recommandations du NIH<sup>26</sup> proposent un score de sévérité plus précis, permettant de classer la GVHD chronique en 3 groupes : légère, modérée et sévère (Tableau 8).

L'incidence de la GVHD chronique peut atteindre 70% des patients<sup>18</sup>, elle varie en fonction du type de donneur apparenté ou non apparenté et du degré de d'incompatibilité HLA, du type de greffon (CSP ou moelle osseuse) et de l'utilisation d'une déplétion en lymphocyte T, réalisée le plus souvent *in vivo* avec du SAL. En général elle survient dans les 3 ans suivant l'allo-CSH.

**Tableau 6 : Signes cliniques de la GVHD chronique selon les critères du NIH**  
(Filipovich *et coll.* Biol Blood Marrow Transplant, 2005)<sup>26</sup>.

Organe atteint	Symptômes diagnostiques (suffisants à établir le diagnostic de cGVHD)	Symptômes distinctifs (insuffisants seuls à établir le diagnostic de cGVHD)	Autres signes (pouvant intégrer les symptômes de la cGVHD si le diagnostic est confirmé)	Symptômes communs à la GVHD aiguë et à la GVHD chronique
Peau	Poïkilodermie, Lichen plan, Aspect sclérotique, Lichen scléreux, Morphée	Dépigmentation	Troubles de la sudation, Ichtyose, Hypo/hyper pigmentation	Erythème, Rash maculopapuleux, Prurit
Ongles		Dystrophie, Onycholyse, Pterygium, Perte d'un ou plusieurs ongles		
Cuir chevelu et poils		Alopécie séquellaire, Lésions papulo-squameuses	Apparition prématuée de cheveux gris, Modifications de la nature des cheveux	
Bouches	Lichen, Limitation de l'ouverture de la bouche par atteinte sclérotique	Xérostomie, Mucocéle, Atrophie de la muqueuse, Pseudomembranes, Ulcères		Gingivite, Mucite, Erythème, Douleurs
Yeux		Syndrome sec, Conjonctivite cicatricielle, Kératoconjonctivite	Photophobie, Hyperpigmentation péri-orbitaire, Blépharite	
Organes génitaux	Lichen plan, Sténose vaginale	Erosion, Fissures, Lésions ulcéreuses		
Tractus digestif	Anneaux et membranes œsophagiens		Insuffisance pancréatique exocrine	Anorexie, Nausées, Vomissements, Diarrhées, Perte de poids, Atteinte de la croissance (enfant)
Foie				Bilirubine totale, PPA > 2 × limite sup normale, TGO ou TGP > 2 × limite sup normale
Poumons	Bronchiolite oblitérante (diagnostic histologique)	Bronchiolite oblitérante (diagnostic radiologique et EFR)		BOOP

Muscles, articulations et fascia	Fasciite, Raideur articulaire Contractures secondaires à la sclérose	Myosite et polymyosite	Crampes musculaires, Œdème, Arthralgie, Arthrite
Système hématopoïétique			Thrombopénie, Eosinophilie, Lymphopénie, Hypo ou hyper gammaglobulinémie, Auto-Ac (AHAI, PTI)
Autres			Epanchement pleural et péricardique, Neuropathie périphérique, Syndrome néphrotique, Myasthénie, Anomalies de la conduction cardiaque et cardiomyopathies

Abréviations : cGVHD, réaction du greffon contre l'hôte chronique ; PPA, phosphatase alcaline ; TGO, transaminase glutamate oxaloacétique ; TGP, transaminase glutamate pyruvate ; EFR, épreuve fonctionnelle respiratoire ; BOOP, bronchiolite oblitérante avec organisation pneumonique ; Ac, anticorps ; AHAI, anémie hémolytique auto-immune ; PTI, purpura thrombopénique idiopathique.

**Tableau 7 : Classification de la GVHD chronique selon Shulman *et coll.***  
*(Shulman *et coll.* Am J Med, 1980<sup>61</sup>)*

**Limited chronic GVHD**

Either or both:

1. Localized skin involvement
2. Hepatic dysfunction due to chronic GVHD

**Extensive chronic GVHD**

Either:

1. Generalized skin involvement; or
2. Localized skin involvement and/or hepatic dysfunction due to chronic GVSD, plus:
  - a. Liver histology showing chronic aggressive hepatitis, bridging necrosis or cirrhosis; or
  - b. Involvement of eye: Schirmer's test with less than 5 mm wetting; or
  - c. Involvement of minor salivary glands or oral mucosa demonstrated on labial biopsy; or
  - d. Involvement of any other target organ.

**Tableau 8 : Grade de la GVHD chronique selon les critères du NIH.**  
 (Filipovich *et coll.* Biol Blood Marrow Transplant, 2005<sup>26</sup>)

Nombre d'organes/sites atteints	Légère	Modérée	Sévère
1 site	Score 1	Score 2	Score 3
2 sites	Score 1	Score 2	Score 3
3 sites	-	Score 1	Score 3
Atteinte pulmonaire	-	Score 3	Score 2

Pour chaque organe/site atteint, un score de 1 à 3 est attribué selon la sévérité de l'atteinte

Les formes limitées de la GVHD chronique nécessitent uniquement un traitement local, ce qui permet de limiter l'immunosuppression et le risque de complications infectieuses. Le traitement de première ligne repose en général sur une corticothérapie à la dose de 1 mg/Kg d'équivalent prednisone, éventuellement associée à la reprise de la CsA. En raison de la morbidité liée à la prise de corticoïdes au long cours, une évaluation clinique rapprochée de la réponse doit être réalisée afin de surveiller la décroissance des corticoïdes au mieux. Cependant, en cas de GVHD chronique extensive, une corticothérapie prolongée est souvent nécessaire, la moitié des patients étant toujours sous corticoïdes au bout de 2 ans. En cas de GVHD chronique cortico réfractaire, de multiples traitements de seconde ligne ont été évalués dans de petits essais cliniques de phase II dont la comparaison est difficile ; il n'existe pas de traitement de seconde ligne standard.

La GVHD chronique reste une problématique majeure de l'allo-CSH, elle entraîne une altération significative de la qualité de vie des patients<sup>62</sup> et elle est la principale cause de mortalité non liée à la rechute tardive<sup>60</sup>, principalement en raison des complications infectieuses. Ainsi, comme pour la GVHD aiguë, de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces pour prévenir sa survenue et la prendre en charge sont nécessaires.

### **1-3-Physiopathologie de la GVHD**

Les conditions indispensables au développement de la GVHD aiguë ont été énoncées dès 1966 par Billingham<sup>63</sup> (Tableau 9). Premièrement le greffon doit contenir des cellules immunocompétentes. Deuxièmement le receveur doit être incapable de rejeter les cellules transplantées. Troisièmement le receveur doit exprimer des antigènes absents chez le donneur et qui sont ainsi reconnus comme étrangers. Plus récemment un quatrième critère a été ajouté : les cellules immunocompétentes du donneur doivent migrer dans les tissus cibles<sup>64</sup>.

**Tableau 9 : Version révisée des critères de Billingham pour le développement de la GVHD.** (Billingham *et coll.* Harvey Lect, 1966; Sackstein *et coll.* Bio Blood Marrow Transplant, 2006<sup>63, 64</sup>)

---

#### Version révisée des critères de Billingham pour le développement de la GVHD

---

- (1) Le greffon doit contenir des cellules immunocompétentes
  - (2) Le receveur doit être incapable de rejeter les cellules transplantées
  - (3) Il doit exister une incompatibilité antigénique entre donneur et receveur
  - (4) Les cellules effectrices doivent migrer dans les tissus cibles
- 

La première pré condition nécessaire au développement de la GVHD est la présence de cellules immunocompétentes dans le greffon : les lymphocytes T matures<sup>65</sup>. Ainsi, il a été montré que la sévérité de la GVHD est corrélée au nombre de lymphocytes T présents dans le greffon<sup>66</sup>.

La seconde pré condition stipule que le receveur doit être immunodéprimé ; en effet un système immunitaire « normal » rejette les lymphocytes T d'un donneur étranger. L'immunodépression du receveur est systématique du fait du conditionnement par radiothérapie et/ou chimiothérapie reçu par le patient avant l'allo-CSH, mais aussi du fait du traitement immunosuppresseur administré et de la maladie hématologique sous-jacente.

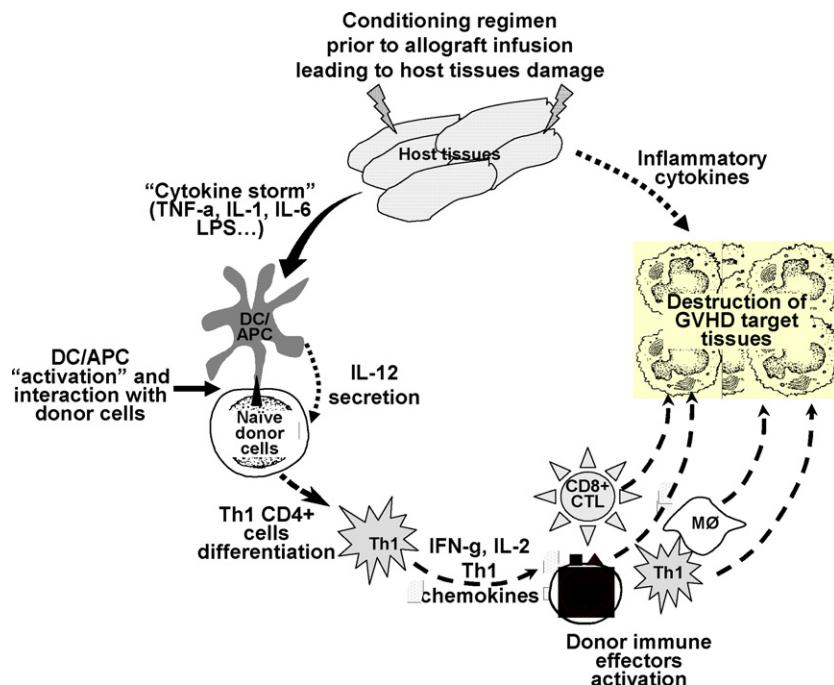
La troisième pré condition, l'expression d'antigènes tissulaires chez le receveur qui ne sont pas présents chez le donneur, a fait l'objet d'une recherche importante et de progrès majeurs avec la découverte du système HLA par J Dausset<sup>9</sup> et JJ Van Rood<sup>10</sup>. Les molécules HLA, exprimées à la surface de quasiment toutes les cellules nucléées de l'organisme, sont indispensables à

l'activation des lymphocytes T allogéniques<sup>67</sup>. Durant la lymphopoïèse thymique, les lymphocytes T subissent une double sélection, positive et négative, conduisant à la conservation des lymphocytes T qui reconnaissent le CMH du soi et à l'élimination des lymphocytes auto-réactifs qui reconnaissent les antigènes du soi<sup>68</sup>. Ainsi la rencontre des lymphocytes T avec des molécules du CMH allogéniques, reconnues comme du non soi, aboutit à la destruction des tissus cibles allogéniques et l'incompatibilité HLA entre donneur et receveur est le principal facteur de risque de GVHD<sup>41</sup>.

La quatrième et dernière pré condition, selon les critères de Billingham révisés en 2006, stipule que les cellules effectrices du donneur doivent migrer au niveau des tissus cibles, où elles sont responsables des dommages tissulaires de la GVHD<sup>64</sup>. En effet la migration des lymphocytes T alloréactifs du donneur au niveau des organes lymphoïdes où ils sont activés par les CPA, puis leur migration au niveau des organes cibles est indispensable à la survenue de la GVHD aiguë.

En se basant sur les travaux de Ferrara et Reddy<sup>69</sup> et Holler *et coll.*<sup>70, 71</sup> un nombre croissant de données suggère que la physiopathologie de la GVHD aiguë peut être résumée en un processus en 3 étapes, où immunité innée et adaptative interagissent (**Figure 12**) : (1) induction de lésions tissulaires du receveur par la radiothérapie et/ou la chimiothérapie du conditionnement de l'allo-CSH ; (2) activation des lymphocytes T du donneur et expansion clonale ; et (3) activation des effecteurs cellulaires et inflammatoires. Dans l'étape 1, le conditionnement conduit à des lésions tissulaires et à la production de cytokines inflammatoires. Dans l'étape 2, les CPA du receveur activées par les cytokines inflammatoires présentent les allo antigènes aux lymphocytes T qui sont à leur tour activés. L'activation des lymphocytes T est caractérisée par une prolifération cellulaire et la sécrétion de cytokines, notamment l'interleukine (IL)-2 et l'interferon (IFN)-γ. Dans l'étape 3, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (PNN) provoquent une inflammation des tissus cibles, stimulée par des médiateurs tels que les lipopolysaccharides (LPS) qui sont passés à travers la muqueuse intestinale lors de l'étape 1. L'inflammation est responsable du recrutement de cellules effectrices au niveau des organes cibles, amplifiant les lésions des

organes cibles et la sécrétion de cytokines inflammatoires, qui avec les lymphocytes T cytotoxiques conduisent à la destruction des tissus cibles<sup>72</sup>.



**Figure 12 : Représentation schématique de la physiopathologie de la GVHD.**  
(Mohty et Gaugler, Cytokine Growth Factor Rev, 2008<sup>73</sup>)

### 1-3-1-Etape 1 : Induction de lésions tissulaires par le conditionnement

Les premières étapes qui vont conduire à la GVHD surviennent avant même la transfusion du greffon allogénique. Avant l'allo-CSH, les organes du patient ont été lésés par de nombreux facteurs : la maladie hématologique sous-jacente et son traitement, les infections, la chimiothérapie et/ou la radiothérapie du conditionnement. Les lésions tissulaires sont responsables de la production de signaux de dangers avec la sécrétion de cytokines inflammatoires, tel que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 ou l'IL-6, de chimiokines, et l'augmentation de l'expression des molécules HLA et des molécules de costimulation sur les CPA du receveur, favorisant ainsi la reconnaissance du CMH et des antigènes mineurs d'histocompatibilité (MiHA, « minor histocompatibility antigen ») par les lymphocytes T du donneur. Les lésions de la muqueuse intestinale induites par le conditionnement revêtent une importance particulière. En effet elles sont

responsables de la translocation de molécules microbiennes telles que le LPS ou d'autres motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, « pathogen-associated molecular patterns ») depuis la lumière intestinale vers la circulation systémique, contribuant à l'activation des CPA, via des récepteurs aux signaux de danger, les récepteurs de type Toll (TLR, « toll like receptor »). Il ressort clairement de ce modèle pourquoi le risque de GVHD est plus important en cas de conditionnement myéloablatif, notamment lorsque les patients reçoivent une ICT<sup>46, 74</sup>.

### **1-3-2-Etape 2 : Activation des cellules présentatrices d'antigène du receveur et des lymphocytes T du donneur**

#### **1-3-2-1-Activation des cellules présentatrices de l'antigène du receveur**

Le rôle central des CPA du receveur dans l'induction de la GVHD a été établi dans des modèles murins. Shlomchik *et coll.* ont montré dans un modèle d'incompatibilité mineure que la reconnaissance par les lymphocytes T du donneur des alloantigènes présentés par les CPA du receveur était nécessaire à l'initiation d'une GVHD et d'une GVT médiée par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup><sup>75</sup>. De plus il a été montré que l'allogénéicité des CPA du donneur était plus importante chez les souris âgées, ce qui peut expliquer la plus grande sévérité de la GVHD chez les patients âgés<sup>76</sup>. Le rôle des CPA du donneur a également été exploré par Matte *et coll.* qui ont montré dans un modèle murin que si les CPA du receveur étaient nécessaires et suffisantes à la survenue de la GVHD, la GVHD était moins sévère chez les souris recevant un greffon invalidé (KO, « knock-out ») pour le CMH de classe I<sup>77</sup>. Ainsi les CPA du donneur sont probablement capables de présenter des antigènes du receveur (présentation croisée), majorant la GVHD<sup>77</sup>. En revanche, si des modèles murins ont clairement établi le rôle des CPA du receveur dans l'induction de la GVT<sup>78</sup>, le rôle des CPA du donneur est beaucoup plus controversé<sup>79, 80</sup>.

Le rôle des CPA dans l'induction de la GVHD apparaît comme central. Les lésions tissulaires survenant lors de l'étape 1, sont directement responsables de leur activation. En effet les CPA professionnelles, les DC, peuvent être activées par (1) les cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1, (2) des produits microbiens tels que le LPS et les ligands des TLR qui passent dans la circulation systémique à travers la muqueuse intestinale endommagée par le conditionnement et (3) les cellules nécrotiques induites par le conditionnement<sup>81</sup>. Les signaux de danger générés par les lésions tissulaires liées au conditionnement sont responsables de la maturation des DC et de l'activation des lymphocytes T du donneur à l'origine des lésions tissulaires de la GVHD. En effet la maturation des DC est indispensable à l'induction de la GVHD, les DC immatures étant considérées comme tolérogènes<sup>82</sup>, l'interaction entre les CPA activées du receveur et les lymphocytes T du donneur ayant lieu au niveau du tissu lymphoïde secondaire du tractus digestif notamment<sup>83</sup>.

### **1-3-2-2-Activation des lymphocytes T du donneur**

Les protéines CD4 et CD8 sont des co-récepteurs pour des portions constantes des molécules du CMH de classe II et I respectivement. Ainsi, le CMH de classe I stimule les lymphocytes T CD8 $^{+}$  et le CMH de classe II stimule les lymphocytes T CD4 $^{+}$ <sup>84</sup>. Chez l'homme, l'incidence de la GVHD aiguë est directement corrélée au degré d'incompatibilité HLA entre donneur et receveur. Après une allo-CSH à partir d'un donneur HLA-identique, la GVHD est liée aux MiHA des peptides présentés par le CMH à la surface des cellules<sup>85, 86</sup>. Etant donné que les gènes codant pour ces protéines se situent en dehors du CMH, deux enfants de mêmes parents auront souvent des peptides différents, présentés par le même CMH qui peuvent être reconnus par les lymphocytes T du donneur et ainsi conduire à la GVHD. Si des MiHA associés à la survenue de la GVHD ont bien été identifiés, leurs contributions relatives et l'existence de MiHA prédominant reste à établir. Par ailleurs, la présence de plusieurs MiHA sur le chromosome Y est en accord avec le risque accru de GVHD observé chez les patients de sexe masculin recevant une greffe à partir d'un donneur de sexe féminin<sup>46</sup>.

A la fois les lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont importants dans la survenue de la GVHD. Ainsi, des modèles murins ont établi que les lymphocytes T CD4+ étaient critiques pour l'induction d'une GVHD, leur production d'IL-2 entraînant une prolifération des lymphocytes T CD8+ allogéniques. 2 types de sous populations lymphocytaires T auxiliaires CD4+ ont été identifiés, les lymphocytes T de type 1 ou Th1 (sécrétant de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$ ) et les lymphocytes T de type 2 ou Th2 (sécrétant de l'IL-4, IL-5, IL-10 et de l'IL-13)<sup>87</sup>. Très tôt des études ont montré la présence d'IFN- $\gamma$  au niveau des tissus cibles de la GVHD suggérant que les lymphocytes Th1 étaient des médiateurs importants des lésions tissulaires<sup>88</sup>. Cependant, alors que l'on s'attendait à ce que le blocage de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes Th1 diminue la sévérité de la GVHD aiguë, ce n'était pas le cas. De plus, dans un modèle murin, la survie des souris recevant des cellules IFN- $\gamma$  KO était diminuée par rapport aux souris recevant des lymphocytes T sauvages<sup>89</sup>. D'autres études montraient quant à elles, que l'IFN- $\gamma$  produit par les lymphocytes T du donneur aggravait les lésions de GVHD digestives, mais diminuait les lésions pulmonaires<sup>90</sup>. Ainsi l'IFN- $\gamma$  semble présenter une dualité de fonction dans la physiopathologie de la GVHD en fonction des organes et des moments.

Le rôle majeur des lymphocytes Th1 par rapport aux lymphocytes Th2 dans la GVHD aiguë a été ensuite clairement établi par Nikolic *et coll.*<sup>91</sup>. Dans un modèle murin, ils ont évalué la survenue de la GVHD à partir de donneurs STAT 4 KO (absence de lymphocytes Th1) ou STAT 6 KO (absence de lymphocytes Th2). La GVHD survenait plus tardivement chez les souris recevant des lymphocytes T STAT 4 KO par rapport aux souris recevant des lymphocytes T STAT 6 KO ou sauvages. Les souris recevant des lymphocytes T STAT 6 KO présentaient une GVHD plus précoce et plus sévère, prédominant au niveau du colon. Ces données confirmaient le rôle majeur des lymphocytes Th1 dans la GVHD, notamment digestive. D'autres études ont exploré le rôle des lymphocytes Th2 dans la GVHD, notamment en utilisant des approches génétiques<sup>92, 93</sup>. Ils n'ont pas mis en évidence de GVHD dans les organes cibles en l'absence d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$ , confirmant que les lymphocytes Th2 ne jouent pas un rôle critique dans la survenue de la GVHD aiguë.

Les lymphocytes T alloréactifs activés vont ensuite migrer depuis les organes lymphoïdes secondaires, où ils ont été activés par les CPA, vers les tissus cibles de la GVHD, où ils sont indispensables à la survenue de la GVHD aiguë<sup>94</sup>. Bien que presque tous les tissus expriment des MiHA, la GVHD aiguë reste limitée à quelques organes : la peau, le foie et le tube digestif principalement, mais aussi les poumons, les organes lymphoïdes secondaires et le thymus. La capacité des lymphocytes T alloréactifs à infiltrer certains tissus est régulée par une combinaison unique de signaux et de récepteurs présents sur les lymphocytes T du donneur qui se lient avec les récepteurs correspondant sur les tissus du receveurs. Les chimiokines jouent un rôle important dans ce homing des lymphocytes T, et de nombreuses chimiokines telles que MIP1 $\alpha$ , CCL2-CCL5, CXCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL17 et CCL27 sont surexprimées lors de la GVHD aiguë et favorisent le guidage des effecteurs cellulaires vers les tissus cibles de la GVHD<sup>95-97</sup>.

Les lymphocytes T présents au niveau des tissus cibles vont entraîner les lésions tissulaires de la GVHD dans l'étape 3.

### **1-3-3-Etape 3 : Effecteurs cellulaires et inflammatoires**

Après migration au niveau des tissus cibles, les lymphocytes T alloréactifs sont responsables des lésions tissulaires de la GVHD aiguë par une activité cytotoxique directe et en recrutant d'autres leucocytes. La génération de multiples effecteurs cytotoxiques au niveau des tissus cibles représente alors le point culminant de la physiopathologie de la GVHD. Ainsi de multiples cytokines inflammatoires, les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques du donneur, les lymphocytes natural killer (NK) ... se retrouvent au niveau des tissus cibles et entraînent une destruction tissulaire à l'origine des lésions de la GVHD. Des données expérimentales et cliniques suggèrent que des médiateurs solubles de l'inflammation agissent en association avec la cytolysé à médiation cellulaire directe des CTL et des lymphocytes NK pour entraîner l'ensemble des dommages tissulaires observés dans la GVHD aiguë. Ainsi la phase effectrice de la GVHD implique des composants à la fois de l'immunité innée et adaptative et les

interactions synergiques des facteurs produits lors des deux premières étapes. Les systèmes Fas/Fas ligand (FasL) et perforine/granzyme sont les principaux mécanismes effecteurs utilisés par les CTL et les cellules NK pour détruire leurs cibles cellulaires<sup>98,99</sup>. Les CTL et les cellules NK stockent perforine et granzyme dans leurs granules cytotoxiques et lorsqu'une cellule est reconnue comme étrangère, les perforines insérées dans la membrane de la cellule cible forment les « pores perforines ». La création de ces pores entraîne un flux d'eau et d'électrolytes dans le cytoplasme aboutissant à une lyse osmotique et à la mort par nécrose de la cellule, mais cela permet aussi l'entrée de granzyme dans la cellule cible, conduisant à l'apoptose de la cellule. En ce qui concerne le système Fas/FasL, FasL se lie à Fas, ce qui aboutit à la formation du complexe de mort cellulaire et à l'activation en cascade de caspase, conduisant à la mort cellulaire<sup>100</sup>. Le facteur de nécrose des tumeurs (TNF ; « tumor necrosis factor »)- $\alpha$  peut également entraîner l'apoptose des cellules cibles en se liant à son récepteur TNFR-I<sup>101</sup>. Les lymphocytes T CD4 $^{+}$  utilisent préférentiellement le système Fas/FasL durant la GVHD aiguë, alors que les CTL CD8 $^{+}$  utilisent plutôt le système perforine/granzyme.

Il existe de nombreux arguments en faveur d'un rôle des cytokines pro-inflammatoires, en particulier le TNF- $\alpha$  et l'IL-1, dans la physiopathologie de la GVHD aiguë. Durant la phase effectrice de la GVHD aiguë, la synergie des cytokines inflammatoires avec les CTL aboutit à l'amplification des lésions tissulaires et, par conséquence, au dysfonctionnement des organes atteints. La survenue rapide de la GVHD aiguë pouvant être considérée comme une véritable tempête cytokinique. Les cytokines pro-inflammatoires, TNF- $\alpha$  et l'IL-1 sont habituellement produites par les monocytes, considérés comme le pool circulant des cellules dendritiques myéloïdes<sup>102</sup>, et les macrophages. Le stimulus responsable de cette sécrétion peut être apporté via les TLR par des molécules microbiennes, telles que le LPS, qui passent à travers la muqueuse intestinale ou la peau, endommagées par le conditionnement. Le rôle du LPS dans la GVHD aiguë a été démontré dans plusieurs modèles expérimentaux<sup>103</sup>. Ainsi il a été montré dans un modèle murin que la production de TNF- $\alpha$  par les cellules du donneur en réponse au LPS permettait de prédire la sévérité de la GVHD, de plus la GVHD diminuait lorsque l'on antagonise le LPS<sup>104</sup>. Au-delà du LPS, le TNF- $\alpha$

joue un rôle critique dans la physiopathologie de la GVHD aiguë aussi bien chez l'homme que dans les modèles murins<sup>105</sup>. Ainsi dans un modèle murin, l'injection d'anticorps monoclonaux anti-TNF $\alpha$  diminue la sévérité des lésions tissulaires de la GVHD<sup>106</sup>. Chez l'homme des études ont montré une augmentation du TNF- $\alpha$  dans le sérum des patients avec une GVHD aiguë, attestant de son rôle probable dans la GVHD<sup>70</sup>. Au vu de sa biologie, le TNF- $\alpha$  joue probablement un rôle à différentes étapes dans la physiopathologie de la GVHD : (1) le TNF- $\alpha$  active les DC et stimule la présentation antigénique<sup>107</sup>, (2) le TNF- $\alpha$  induit la sécrétion de chimiokines inflammatoires à l'origine de la migration d'effecteurs immuns<sup>108</sup>, (3) le TNF- $\alpha$  peut induire la mort cellulaire par apoptose et nécrose, contribuant ainsi directement aux lésions tissulaires<sup>109</sup>.

L'autre cytokine pro-inflammatoire, largement étudiée et jouant un rôle dans la GVHD, est l'IL-1. La sécrétion d'IL-1 survient principalement pendant la phase effectrice de la GVHD de la rate et la peau, 2 organes cibles de la GVHD chez la souris<sup>110</sup>. Les souris recevant de l'IL-1 après allo-CSH présentent une forme accélérée de GVHD<sup>111</sup> et l'administration d'un antagoniste du récepteur à l'IL-1 chez le receveur diminue la mortalité liée à la GVHD dans un modèle animal<sup>112</sup>. En revanche les études chez l'homme n'ont pas réussi à montrer un effet bénéfique à l'administration de cet antagoniste sur la GVHD aiguë<sup>113</sup>, suggérant que l'IL-1 a un rôle pléiotrope dans la GVHD, probablement en synergie avec le TNF- $\alpha$ . Une telle synergie a été suggérée dans un modèle murin où la neutralisation à la fois du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 permettait de diminuer la mortalité et les lésions tissulaires liées à la GVHD<sup>114</sup>. Cette neutralisation était particulièrement efficace sur la GVHD aiguë médiée par les lymphocytes T CD4 $^{+}$ , mais aussi en partie sur la GVHD médiée par les lymphocytes T CD8 $^{+}$ <sup>114</sup>. En plus du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1, la survenue de la GVHD est précédée par une augmentation des niveaux sériques des produits d'oxydation tels que le monoxyde d'azote (NO)<sup>115</sup>, qui contribuent aux effets délétères de la GVHD sur les tissus cibles<sup>116</sup>.

Si le rôle de la « tempête cytokinique » et en particulier du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 dans la physiopathologie de la GVHD aiguë est clairement établi après conditionnement myéloablatif, il existe moins de données dans le cadre des conditionnements à intensité réduite. Une étude a évalué l'impact des cytokines inflammatoires sur l'incidence et la sévérité de la GVHD aiguë après allo-CSH à

conditionnement réduit<sup>117</sup>. Parmi les différentes cytokines testées, dont le TNF-α et l'IL-1, seul l'IL-12p70 était associée à la survenue d'une GVHD aiguë sévère, probablement via l'activation de lymphocytes T Th1 et des cellules NK. De plus, les monocytes circulants, principal pool de DC sécrétrices d'IL-12p70, récupèrent plus rapidement chez les patients avec une GVHD aiguë sévère. Le fait que l'IL-12p70 soit produit principalement par les DC conventionnelles après stimulation de différents PRR, tels que les TLR ou par les interactions CD40-CD40L, apporte un argument supplémentaire en faveur du rôle central des DC dans la physiopathologie de la GVHD.

La « tempête cytokinique » qui survient lors de la phase effectrice contribue ainsi directement aux dommages tissulaires de la GVHD. Etant donné que le tractus digestif est particulièrement sensible aux effets délétères des cytokines<sup>104, 118</sup>, les lésions tissulaires survenant lors de la phase effectrice conduisent à une boucle de rétrocontrôle positif. En effet, les lésions tissulaires (tout particulièrement digestives) majorent la translocation de LPS qui stimule à nouveau la production de cytokines et donc contribue aux lésions tissulaires. Enfin il a été montré qu'un niveau sérique élevé de LPS corrèle directement avec la sévérité des lésions histologiques de GVHD<sup>104, 119</sup>. Le tractus digestif apparaît donc central dans la « tempête cytokinique » et l'amplification de la GVHD aiguë systémique.

#### **1-3-4-Physiopathologie de la GVHD chronique**

Du fait de la difficulté à trouver un modèle animal récapitulant à lui seul toutes les manifestations de la GVHD chronique humaine, peu d'études se sont consacrées spécifiquement à l'étude de la physiopathologie de la GVHD chronique et elle reste mal connue<sup>120</sup>. Le rôle des lymphocytes T auto-réactifs semble important : du fait de l'atteinte du thymus par la chimiothérapie et/ou l'irradiation, certains lymphocytes T du donneur échappent à la sélection négative, d'où une rupture de la tolérance au soi et la GVHD chronique<sup>121</sup>. Enfin les lymphocytes B semblent également jouer un rôle dans la physiopathologie de la GVHD chronique<sup>122</sup>.

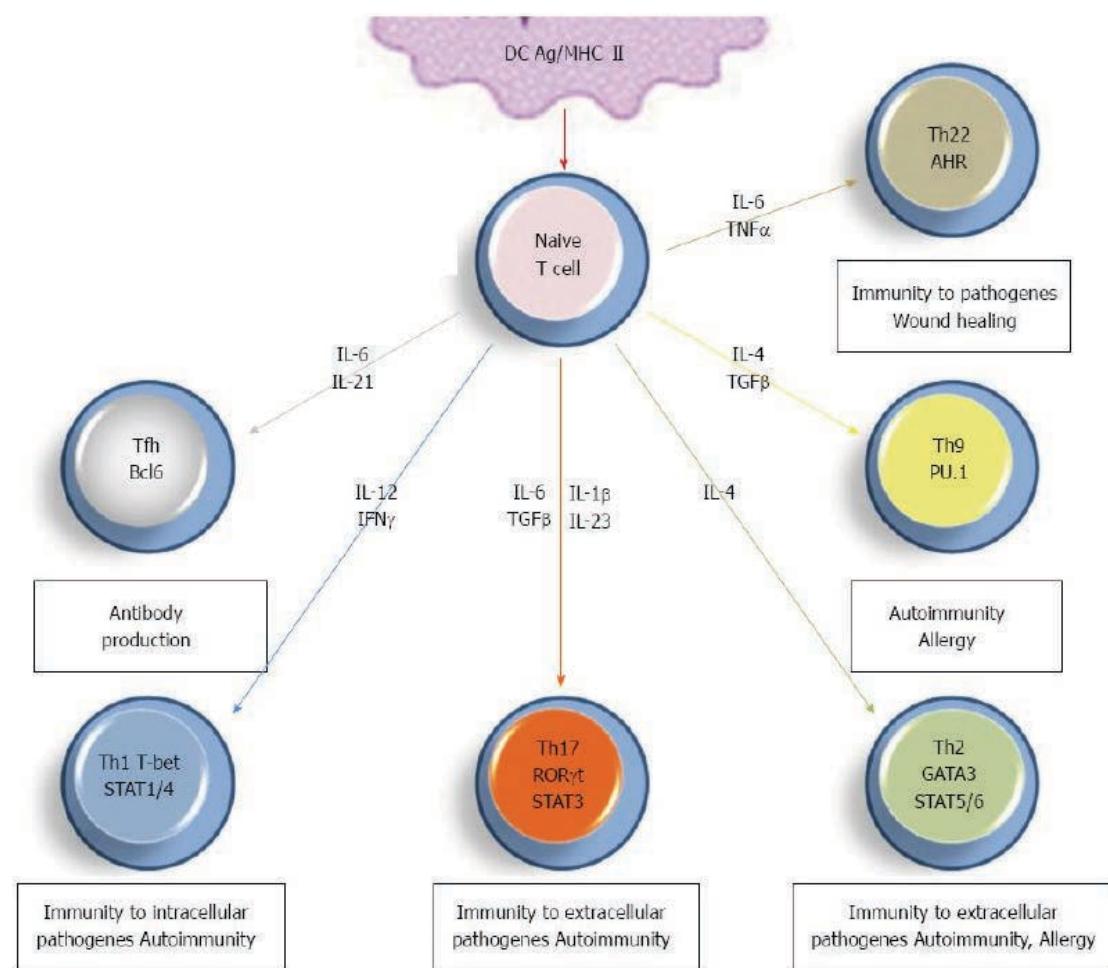
## **1-4-Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires de type 17 ou Th17**

### **1-4-1- Différentes sous populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires**

La mise en évidence de l'existence de différentes sous populations de lymphocytes T auxiliaires chez la souris remonte à 1986. Mosmann *et coll.* rapportent que les lymphocytes T auxiliaires peuvent être divisés en 2 groupes<sup>87</sup>. Les lymphocytes T auxiliaires de type 1 ou lymphocytes Th1 qui peuvent générer de l'IL-2, IL-3 et de l'IFN-γ et les lymphocytes T auxiliaires de type 2 ou lymphocytes Th2 qui sécrètent de l'IL-3, du facteur de croissance des lymphocytes Th2 et du facteur de croissance des mastocytes 2. Cherwinski *et coll.* montraient ensuite que les lymphocytes Th1 sécrètent de l'IL-2, du GM-CSF et de l'IFN-γ, alors que les lymphocytes Th2 sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-5<sup>123</sup>. De nombreuses équipes ont montré qu'il n'était pas possible de générer des lymphocytes Th1 à partir de lymphocytes Th2 et vice versa, établissant le paradigme des lignées Th1 et Th2 séparées<sup>124</sup>. L'existence de ces 2 sous-populations distinctes de lymphocytes auxiliaires Th1 et Th2 est établie chez l'homme en 1988<sup>125</sup>. Les travaux majeurs de Zheng et Flavell<sup>126</sup> et de Szabo *et coll.*<sup>127</sup> sont venus conforter ce paradigme des lignées distinctes en identifiant des facteurs de transcription distincts pour les lymphocytes Th1 et Th2. Ainsi, T-bet est le facteur de transcription clé des lymphocytes Th1<sup>127</sup>, alors que Gata-3 remplit ce rôle pour les lymphocytes Th2<sup>126</sup>. En accord avec le paradigme des lignées distinctes, des rôles distincts pour les lymphocytes Th1 et Th2 ont été identifiés. Si les lymphocytes Th1 et Th2 contribuent tous deux à l'immunité humorale en stimulant la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B, les lymphocytes Th1 sont responsables de l'élimination des pathogènes intracellulaires (virus, mycobactéries, Listeria...) mais aussi des bactéries extracellulaires, alors que les lymphocytes Th2 sont critiques dans la réponse contre les parasites helminthiques<sup>68</sup>.

Si jusqu'au début des années 2000, on considérait que les lymphocytes Th1 et Th2 étaient les seules lignées de lymphocytes T auxiliaires, de nouvelles sous-populations de lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup> ont été décrites depuis, les

lymphocytes auxiliaires folliculaires (Tfh, « T follicular helper cells ») et les lymphocytes T auxiliaires Th9, Th17 et Th22 (Figure 13). A côté des lymphocytes T auxiliaires, une autre population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> a été identifiée chez l'homme en 2001, les lymphocytes T régulateurs (Treg) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, dont la différenciation se fait sous le contrôle du facteur de transcription Foxp3<sup>128</sup>. On distingue les Treg naturel (nTreg) naturellement générés dans le thymus, des Treg induits (iTreg) issus de la différenciation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs présents en périphérie<sup>128</sup>. Ils sont indispensables à la tolérance immunitaire et sécrètent notamment du TGF-β et de l'IL-10<sup>68</sup>.



**Figure 13 : Caractéristiques et rôle majeur des principales populations Th, cytokines et facteurs de transcription impliqués dans leur différenciation.** (adaptée de Boniface et coll. World J Rheumatol, 2013<sup>129</sup>)

Les études portant sur le rôle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans la GVHD aiguë se sont focalisées sur les sous-populations Th1 et Th2 puis Treg. Plus

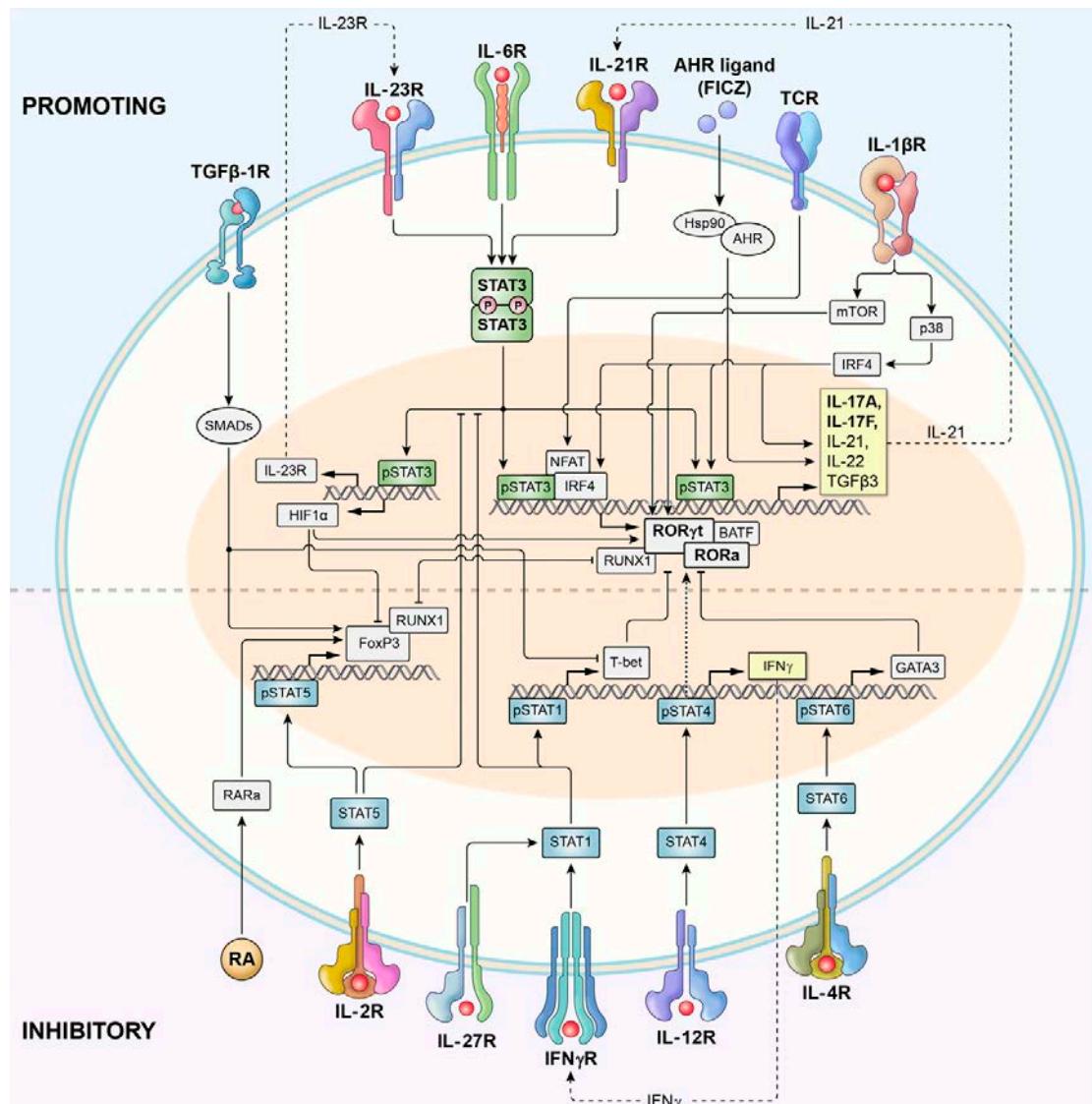
récemment, le rôle des lymphocytes Th17 dans la GVHD a été exploré dans des modèles murins de GVHD avec des résultats discordants. Dans cette partie nous allons revenir sur les caractéristiques des lymphocytes Th17 avant de voir l'état des connaissances sur leur rôle dans la GVHD dans les modèles murins et chez l'homme.

#### **1-4-2- Découverte et différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires de type 17 ou Th17**

En 2005, Harrington *et coll.*<sup>130</sup> et Park *et coll.*<sup>131</sup> ont établi que les lymphocytes Th17 étaient une sous population distincte de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires, dont la génération *in vitro* était favorisée lorsque l'IL-4 et l'IFN-γ étaient inhibés, et était indépendante des facteurs de transcription liés aux lymphocytes Th1 et Th2 (T-bet, Gata-3, Stat1, Stat4 et Stat6). Initialement la polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vers un phénotype Th17 avait été attribuée à l'effet de l'IL-23 (un hétérodimère de la sous unité p40, commune avec l'IL-12 et de la sous unité p19), via le récepteur à l'IL-23 (IL-23R) ciblant la voie Stat3<sup>132</sup>; cependant les cultures cellulaires produites dans ces conditions contenait de faibles quantités de lymphocytes produisant de l'IL-17<sup>133</sup>. Il a ensuite été montré que les lymphocytes Th17 étaient générés efficacement en présence de TGF-β1 et d'IL-6, via les protéines de la famille Smad et Stat3, respectivement<sup>134</sup> (Figure 14).

L'identification du facteur de transcription clé pour la différenciation des lymphocytes Th17, Retinoid-related orphan receptor γ thymus (ROR $\gamma$ t), codé par le gène *Rorc*, est venue confirmer que les lymphocytes Th17 sont une sous population distincte<sup>135</sup>. Retinoid-related orphan receptor α (ROR $\alpha$ ) est le second facteur de transcription clé identifié pour la différenciation des lymphocytes Th17<sup>136</sup>. Dans un modèle murin la délétion de Stat3 bloque la différenciation des lymphocytes Th17, en raison des nombreuses et pléiotropiques fonctions de Stat3 comme promoteur de *Rorc*, *Il17*, *Il17f*, et de nombreux autres gènes impliqués dans la polarisation et la survie des lymphocytes Th17<sup>137</sup>. Ainsi il

apparaît que la différenciation des lymphocytes Th17 est sous la dépendance de Stat3 et ROR $\gamma$ t en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$ 1 (Figure 14).



**Figure 14 : Représentation schématique des voies de signalisation et de la régulation transcriptionnelle des lymphocytes Th17.** (Muranski et coll. Blood, 2013<sup>138</sup>)

Le rôle de l'IL-23 dans la différenciation des lymphocytes Th17 a été exploré *in vitro* et dans des modèles murins. Si les lymphocytes T CD4 $^{+}$  naïfs expriment un faible niveau d'IL-23R, son expression est induite après exposition au TGF- $\beta$ 1 et à l'IL-6<sup>139</sup> (Figure 14). Par ailleurs, si les lymphocytes T CD4 $^{+}$  naïfs cultivés en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$ , sans IL-23, vont bien sécréter de l'IL-17A, ils produisent aussi de grandes quantités d'IL-10 et échouent à induire une encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) après transfert adoptif contrairement à ce qui était attendu<sup>133</sup>. De plus les lymphocytes Th17 IL-23R

déficients ne parviennent pas à maintenir leur phénotype<sup>140</sup>. Ainsi, si l'IL-23, majoritairement produite par les cellules du système immunitaire inné, n'est pas nécessaire à la différenciation initiale des lymphocytes Th17, l'IL-23 est indispensable à la stabilisation du phénotype et à la maturation complète des lymphocytes Th17, et donc à la production d'IL-21 et d'IL-22<sup>141</sup> (Figure 14).

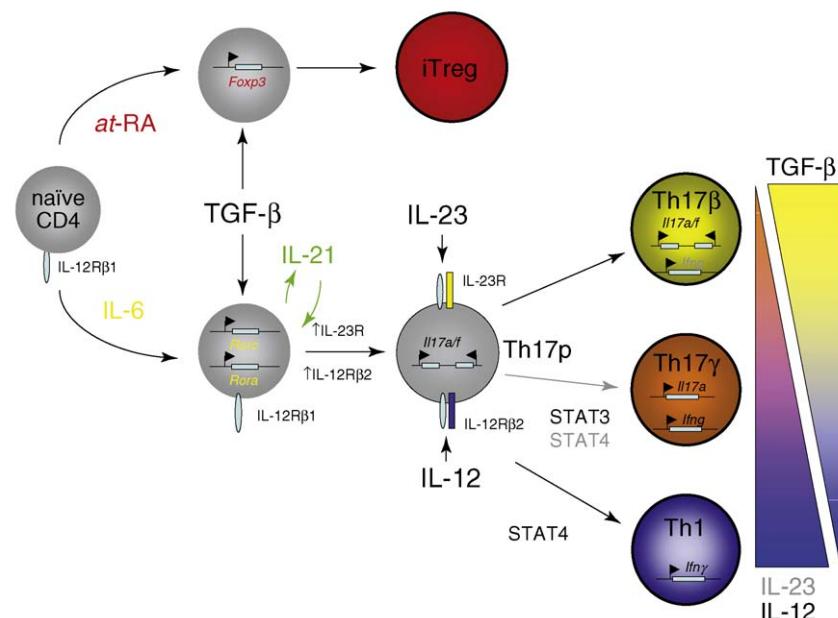
De nombreuses autres cytokines régulent la différenciation et la prolifération des lymphocytes Th17. Ainsi, l'IL-21 (via la voie Stat3) et le TGF-β en l'absence d'IL-6 induisent l'expression de RORyt et de l'IL-23R, conduisant à une différenciation Th17<sup>142</sup>. De plus, en présence d'IL-6, les lymphocytes T CD4+ stimulés vont produire de l'IL-21, favorisant la différenciation Th17 dans une boucle d'auto-amplification autocrine<sup>143</sup>. Le rôle de l'IL-1β dans la polarisation des lymphocytes Th17 a également été souligné dans certaines conditions inflammatoires<sup>144</sup>.

### **1-4-3- Plasticité des lymphocytes Th17**

Plusieurs études ont mis en évidence la plasticité des lymphocytes Th17 et l'interconnection des programmes de développement des lymphocytes Th17 et Treg (Figure 15). Après stimulation du TCR, un lymphocyte T CD4+ en présence de TGF-β co-exprime à la fois RORyt et Foxp3, la différenciation en lymphocyte Th17 ou en iTreg se faisant en fonction de la prédominance de l'IL-6 ou de l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA) respectivement<sup>145</sup>. De plus la stimulation des lymphocytes Treg naturels ou induits par l'IL-6 induit l'expression d'IL-17 et réprime Foxp3, suggérant que les lymphocytes Treg matures peuvent être convertis en lymphocytes Th17-like<sup>145</sup>. En revanche, la différenciation de lymphocytes Th17 en lymphocyte Treg n'a pas été rapportée, suggérant que la conversion des lymphocytes Treg en Th17 est irréversible.

Par ailleurs, bien que les facteurs de transcription et les cytokines impliqués dans la différenciation des lymphocytes Th17 soient distincts des lymphocytes Th1 et Th2, il existe des parallèles importants entre les voies Th1 et Th17<sup>145</sup>. Les 2 voies nécessitent l'induction d'un récepteur pour une cytokine de

la famille de l'IL-12 : l'IL-12 pour Th1 et l'IL-23 pour Th17. L'IL-12 et l'IL-23 partagent une sous-unité commune, l'IL-12p40, de même leurs récepteurs partagent une sous-unité commune, l'IL-12R $\beta$ 1, associée à l'IL-12R $\beta$ 2 pour le récepteur à l'IL-12 et à l'IL-23R pour le récepteur à l'IL-23<sup>145</sup>. Il s'est avéré que si les précurseurs des lymphocytes Th17 expriment l'IL-23R, ils expriment également de faibles quantités d'IL-12R $\beta$ 2. Ainsi selon la balance entre TGF- $\beta$ , IL-23 et IL-12, les précurseurs des lymphocytes Th17 peuvent produire majoritairement de l'IL-17A et IL-17F (dominance du TGF- $\beta$  ; Th17 $\beta$ ), de l'IL-17A, IL-22 et de l'IFN- $\gamma$  (dominance de l'IL-23 ; Th17 $\gamma$ ), ou réprimer l'expression d'IL-17A et IL-17F pour exprimer les cytokines liées à Th1, notamment l'IFN- $\gamma$  (dominance de l'IL-12 ; Th1)<sup>145</sup>(Figure 15). Cependant si l'exposition à l'IL-12 convertit les précurseurs des lymphocytes Th17 en Th1, les lymphocytes Th17 mémoires conservent leur phénotype malgré la stimulation par l'IL-12<sup>145</sup>.



**Figure 15 : Lien entre la différenciation des lymphocytes iTreg, Th17 et Th1, soulignant la plasticité des lymphocytes Th17.** (Lee et coll. Curr Opin Immunol, 2009<sup>145</sup>)

#### 1-4-4-Phénotype des lymphocytes Th17

Il n'existe pas de marqueur de surface spécifique des lymphocytes Th17, mais l'expression de certaines combinaisons de marqueurs est associée aux

lymphocytes Th17. Ainsi il a été montré que les cellules Th17 expriment le récepteur à C-C chimiokine (CCR, « CC chemokine receptor ») 6 mais pas CCR10<sup>146, 147</sup>, le récepteur de type C-lectine CD161 est un autre marqueur des lymphocytes Th17 chez l'homme<sup>148</sup>, enfin CXCR3 est un marqueur des lymphocytes sécrétant de l'IFN-γ mais pas d'IL-17A, il est donc retrouvé à la surface des cellules Th1 mais pas sur les Th17<sup>147</sup>.

#### **1-4-5- Rôle des lymphocytes Th17 dans la défense de l'organisme contre les infections**

Dans les conditions physiologiques, les lymphocytes Th17 se situent principalement dans la *lamina propria* de l'intestin grêle et sont rapidement induits au niveau des autres sites muqueux lors d'une infection<sup>138</sup>. Les lymphocytes Th17 et les cytokines associées contribuent à la protection de l'organisme contre une grande variété de pathogènes nécessitant une réponse inflammatoire majeure qui n'est pas apportée par les lymphocytes Th1 et Th2, notamment les bactéries extracellulaires et les champignons<sup>141</sup>.

Les lymphocytes Th17 produisent de l'IL-17A, l'IL-17F, l'hétérodimère IL-17A/F, mais aussi de l'IL-21, IL-22, du GM-CSF et de nombreux autres facteurs<sup>141</sup>. Si l'IL-21 agit sur les autres cellules immunitaires, notamment les lymphocytes B, les autres cytokines produites par les lymphocytes Th17 ont un large effet sur de nombreux types cellulaires et induisent la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines qui attirent les PNN au site de l'inflammation et les peptides antimicrobiens (AMP, « antimicrobial peptides ») pour renforcer les défenses de l'organisme contre les infections<sup>141</sup>.

La famille des cytokines de l'IL-17 inclut l'IL-17A (ou IL-17), l'IL-17B, l'IL-17C, l'IL-17D, l'IL-17E (ou IL-25) et l'IL-17F<sup>141</sup>. L'IL-17E n'est pas produite par les lymphocytes Th17, mais Th2. Les effets pro-inflammatoires de l'IL-17 sont médiés par le récepteur à l'IL-17 ou IL-17R, largement exprimé par les cellules du système immunitaire (lymphocytes T et B, et PNN) et de nombreux tissus (épithélium, endothélium, fibroblastes, cellules stromales mésenchymateuses et kératinocytes)<sup>149</sup>. Ainsi les effets de l'IL-17 sont pléiotropes, entraînant une

variété d'effets inflammatoires impliquant à la fois l'immunité innée et adaptative. L'IL-17 peut aussi être produite par d'autres cellules, principalement les lymphocytes T $\gamma$  $\delta$  et les cellules lymphoïdes innées<sup>138</sup>.

L'IL-17A et l'IL-17F présentent toutes deux des propriétés pro-inflammatoires, et entraînent la sécrétion par de nombreuses cellules de cytokines telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le GM-CSF, de chimiokines (CXCL1, CXCL8, CXCL10) et de récepteurs aux chimiokines qui agissent comme de puissants chemoattractants pour les granuleux<sup>138</sup>. L'IL-17 et les lymphocytes Th17 jouent un rôle important dans l'immunité contre de nombreuses bactéries telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter rodentium*, *Salmonella* et *Shigella* sp., et *Bordatella pertussis*<sup>138</sup>. Les lymphocytes Th17 contribuent à la réponse Th1 contre certaines bactéries intracellulaires (*Mycobacteria* et *Francisella tularensis*)<sup>138</sup>. Les lymphocytes Th17 sont aussi impliqués dans la réponse aux infections fongiques, notamment à *Candida*<sup>150</sup>; leur rôle dans la défense de l'organisme contre l'*Aspergillus fumigatus* et d'autres champignons est plus controversé et probablement délétère. Enfin, l'IL-17 a un rôle dans le maintien de l'intégrité et de l'homéostasie de la muqueuse digestive<sup>138</sup>.

L'IL-22 et l'IL-17 déclenchent en synergie la production de nombreux AMP tels que la  $\beta$ -defensine, la protéine S100, regenerating islet-derived protein 3  $\gamma$  (REG3 $\gamma$ ) ou encore la lipocalin-2<sup>151</sup>. Le récepteur à l'IL-22 (IL-22R) est exprimé par des cellules non hématopoïétiques, telles les keratinocytes, les hépatocytes ou les entérocytes et favorisent des effets tissulaires-protecteurs contre *Toxoplasma gondii* et différentes bactéries gram-négatives<sup>152</sup>.

#### **1-4-6- Rôle pathogène des lymphocytes Th17: les lymphocytes Th17 comme médiateurs des lésions tissulaires**

Le rôle des lymphocytes Th17 et des cytokines liées à Th17 a été mis en évidence dans différentes maladies auto-immunes et auto-inflammatoires dans des modèles animaux puis chez l'homme<sup>141</sup>. Ainsi un nombre croissant de données suggère un rôle pour les lymphocytes Th17 dans le psoriasis, la

polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaque ou encore les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin<sup>141</sup>.

Ainsi, dans le psoriasis, les lymphocytes T extraits de lésions cutanées présentent majoritairement un phénotype Th17<sup>153</sup> et l'IL-17, l'IL-22 et l'IL-23 contribuent au développement du psoriasis<sup>154, 155</sup>. Des essais thérapeutiques ont été conduits utilisant un anticorps monoclonal ciblant la sous-unité p40 de l'IL-12/IL-23 (ustekinumab)<sup>156</sup> ou l'IL-17R (brodalumab)<sup>157</sup> chez des patients atteints de psoriasis avec une efficacité significative, confirmant le rôle majeur des lymphocytes Th17 dans la physiopathologie du psoriasis.

De même dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, des données suggèrent un rôle des lymphocytes Th17 et de l'axe IL-17/IL-23. Ainsi dans un modèle murin, plusieurs études ont démontré le rôle de l'IL-23 dans la colite médiée par les lymphocytes T, via l'induction des cytokines pro inflammatoires IL-6 et IL-17<sup>158</sup>. De plus si l'IL-22 semble avoir un rôle protecteur sur les cellules épithéliales digestives<sup>159</sup>, l'IL-21 contribue aux effets pathogènes des lymphocytes Th17 sur la muqueuse intestinale<sup>160</sup>. Chez l'homme, la présence de lymphocytes Th17 a été mise en évidence dans la muqueuse digestive de patients avec une maladie de Crohn<sup>146</sup>. Si un essai clinique évaluant un anticorps monoclonal anti IL-17 a échoué à démontrer une efficacité sur la maladie de Crohn<sup>161</sup>, la déplétion en l'IL-23 avec l'ustekinumab semble permettre de contrôler la maladie<sup>162</sup>. Cela souligne le rôle de l'IL-23 non seulement dans l'induction d'une réponse Th17 mais aussi dans l'inflammation médiée par les cellules lymphoïdes innées (ILC, « innate lymphoid cells ») présentes dans la muqueuse digestive.

#### **1-4-7- Rôle des lymphocytes Th17 dans la GVHD aiguë**

##### **1-4-7-1- Rôle des lymphocytes Th17 dans la GVHD aiguë murine**

La contribution des lymphocytes Th17 a été explorée dans des modèles murins de GVHD utilisant des lymphocytes T déficients en IL-17. Les résultats de ces études sont contradictoires. Ainsi les données Yi *et coll.* suggéraient un rôle

protecteur des lymphocytes Th17: la GVHD était plus sévère en cas d'administration de lymphocytes T déficients en IL-17 et cet effet était associé à une majoration de la réponse Th1<sup>163</sup>. Ces données n'ont pas été reproduites, au contraire en utilisant le même modèle, Kappel *et coll.* montraient une diminution de la GVHD en cas d'administration de lymphocytes T déficients en IL-17<sup>164</sup>. De plus la transplantation de lymphocytes Th17 suffit à entraîner une GVHD mortelle marquée par des dommages tissulaires étendus<sup>165</sup>. La fonction des lymphocytes Th17 a également été étudiée en bloquant leur facteur de transcription clé, RORyt. Ainsi, si les lymphocytes Th17 peuvent induire à eux seuls la GVHD, elle peut également survenir en présence de lymphocytes Th1 seuls, sans lymphocyte Th17<sup>166</sup>. De plus l'administration de lymphocytes T CD4+ *rorc* KO aboutit à une diminution de la mortalité liée à la GVHD, associée à une diminution de l'IL-17 et du TNF- $\alpha$  dans les tissus cibles<sup>167</sup>. Différents groupes ont également montré que l'absence d'IL-21 ou d'IL-21R, inhibait la GVHD aiguë (et aussi l'effet GVT) et de façon intéressante une augmentation des iTreg et des nTreg était observée.

D'autres études se sont focalisées sur le rôle des cytokines associées à la différenciation des lymphocytes Th17 dans la physiopathologie de la GVHD aiguë. Ainsi, l'absence d'IL-6 dans les lymphocytes T du donneur ou l'inhibition de l'IL-6R avec un anticorps (Ac) bloquant diminue significativement la GVHD aiguë sans affecter l'effet GVT<sup>168</sup>. Cet effet était associé à une diminution des lymphocytes Th1 et Th17 dans les organes cibles de la GVHD aiguë et la rate et à une génération accrue de Treg. Ces résultats appuient le rôle des lymphocytes Th1 et Th17 dans la physiopathologie de la GVHD et de la balance entre Th17 et Treg. Une seconde étude confirme l'effet protecteur de l'inhibition de l'IL-6 mais n'est pas parvenue à mettre en évidence le rôle des lymphocytes T dans cet effet<sup>169</sup>. De même, lorsque la fonction de l'IL-23 est bloquée, la GVHD aiguë diminue alors que l'effet GVT est préservé<sup>170</sup>.

Bien que contradictoires, les résultats dans les modèles murins sont clairement en faveur d'une contribution des lymphocytes Th17 dans la physiopathologie de la GVHD aiguë.

#### **1-4-7-2- Rôle des lymphocytes Th17 dans la GVHD aiguë chez l'homme.**

Des études préliminaires ont également été réalisées chez l'homme avec là aussi des résultats contradictoires. Dander *et coll.* ont montré que la fréquence des lymphocytes Th17 dans le sang et le taux d'IL-17 plasmatique augmentaient chez les patients avec une GVHD aiguë par rapport aux patients allogreffiés sans GVHD et aux donneurs sains<sup>171</sup>. En parallèle le nombre de lymphocytes Treg diminuait dans le sang périphérique des patients avec une GVHD aiguë<sup>171</sup>. Ces résultats ont été confirmés par Liu *et coll.*, qui soulignent que l'augmentation du nombre de lymphocytes Th17 dans le sang lors de la survenue d'une GVHD aiguë est corrélée à une diminution des lymphocytes Treg<sup>172</sup>. En revanche deux autres groupes n'ont pas mis en évidence la présence de lymphocytes Th17 dans la peau ou la muqueuse digestive de patients avec une GVHD aiguë cutanée ou digestive. Ainsi, Broady *et coll.* n'ont pas mis en évidence de lymphocytes Th17 dans la peau des patients en utilisant un modèle de culture *ex-vivo* des lymphocytes T<sup>173</sup>. De même Ratajczak *et coll.* n'ont pas mis en évidence d'infiltration significative de la muqueuse digestive par les lymphocytes Th17 chez les patients avec une GVHD aiguë, mais ils ont montré paradoxalement qu'une augmentation du nombre de Treg dans la muqueuse digestive corrélait avec la sévérité de la GVHD<sup>174</sup>.

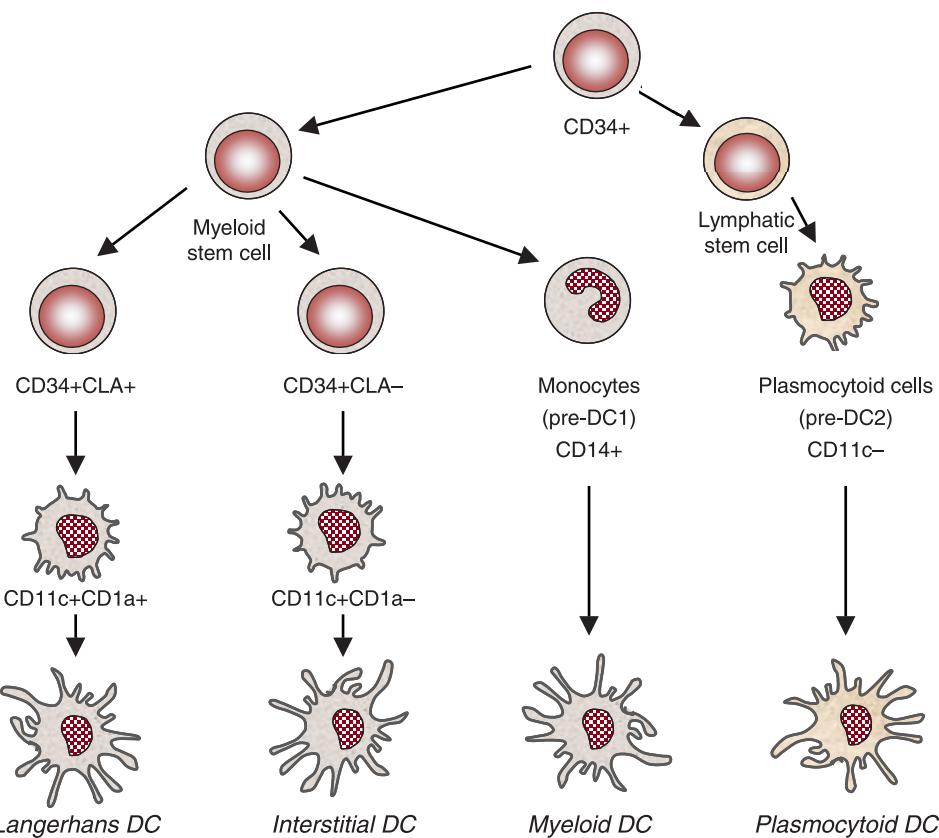
Une autre approche visant à évaluer le rôle de l'axe Th17 dans la physiopathologie de la GVHD a consisté à évaluer le polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP, « single nucleotide polymorphism ») associé à la GVHD aiguë dans l'IL-23 ou L'IL-23R. Des travaux préalables avaient montré une forte association entre un SNP présent dans l'IL-23R et la maladie de Crohn. La présence de ce SNP a été évaluée dans une cohorte de patients allogreffiés et chez leurs donneurs<sup>175</sup>. Il est retrouvé dans environ 12% des cas. L'incidence de GVHD sévère de grade III-IV était diminuée chez les patients greffés à partir d'un donneur avec le SNP IL-23R, par contre il n'a pas été mis en évidence de bénéfice lorsque le SNP était présent chez le receveur. Cependant si une seconde équipe a confirmé une diminution du risque de GVHD aiguë chez les patients greffés à partir d'un donneur avec le SNP IL-23R<sup>176</sup>, Nguyen *et coll.* n'ont pas mis en

évidence une association entre la présence du SNP et la survenue d'une GVHD aiguë<sup>177</sup>. La prophylaxie de la GVHD, le type de transplantation ou encore des différences ethniques entre les cohortes de patients expliquent probablement cette discordance ; des études complémentaires sont indispensables pour confirmer ces résultats.

Ainsi il existe un nombre croissant de données en faveur d'un rôle des lymphocytes Th17 dans la physiopathologie de la GVHD aiguë. En effet les lymphocytes Th17 sont augmentés dans le sang lors de la survenue d'une GVHD aiguë<sup>171, 172</sup>. De plus l'association entre la présence d'un SNP de l'IL-23R chez le donneur et la GVHD aiguë<sup>175, 176</sup> suggèrent également le rôle des lymphocytes Th17 dans la survenue de la GVHD aiguë ; en effet, l'IL-23 est indispensable à la stabilisation du phénotype des lymphocytes Th17. En revanche les études qui se sont attachées à évaluer la présence des lymphocytes Th17 dans les tissus cibles de la GVHD ont échoué<sup>173, 174</sup>. Cependant ces études présentaient de nombreuses limites, par exemple dans l'étude de Broady *et coll.*<sup>173</sup>, il n'est pas évident que les lymphocytes Th17 vont conserver leur phénotype après 3 semaines de culture *ex vivo* en l'absence de cytokines polarisantes qui n'ont pas été utilisées dans cette étude. Il est donc difficile de tirer des conclusions définitives de ces études sur le rôle *in situ* dans les tissus cibles de la GVHD aiguë des lymphocytes Th17. L'un des objectifs de ce travail de thèse est ainsi d'objectiver le rôle des lymphocytes Th17 *in situ* dans les tissus cibles de la GVHD.

## 1-5-Les cellules dendritiques plasmocytoïdes

Ralph Steinman et Zanvil Cohn ont découvert les cellules dendritiques dans les années 1970. Leurs travaux ont permis de mettre en évidence leur rôle dans la présentation antigénique et l'activation du système immunitaire. Aujourd'hui, il apparaît que les DC sont un groupe hétérogène de cellules (**Figure 16**). En effet, si les DC sont toutes capables de capture antigénique et de présentation antigénique aux lymphocytes T naïfs, il existe différents sous types de DC en fonction de leur localisation, de leur stade de différenciation et de maturation, mais aussi de leurs fonctions immunologiques.



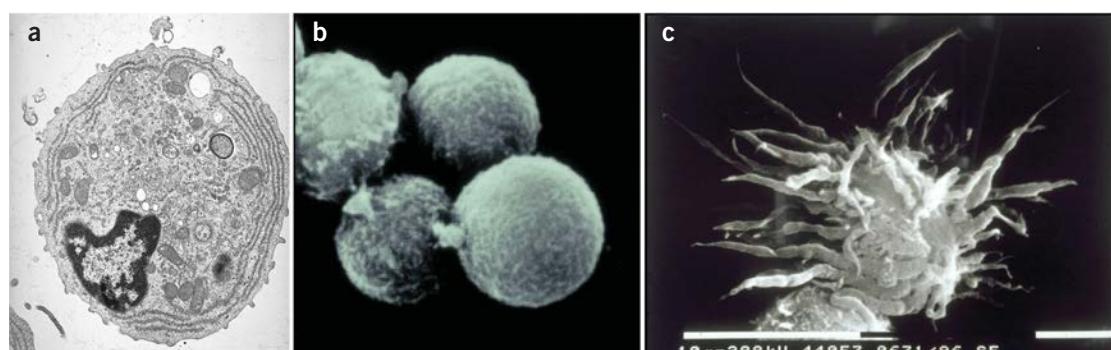
**Figure 16 : Voie de différenciation des différentes populations de cellules dendritiques.** (adapté de Schott M, Endocr Relat Cancer, 2006<sup>178</sup>)

Récemment un nouveau membre a été décrit dans la famille des DC. Leur morphologie semblable à celle des plasmocytes est à l'origine de leur nom : les cellules dendritiques plasmocytoïdes (PDC). Elles ont la particularité de produire en réponse à une stimulation virale des quantités énormes d'IFN de type I, faisant de ces cellules les cellules professionnelles productrices d'IFN de type I (100 à 1000 fois plus que tout autre type cellulaire)<sup>179, 180</sup>. Afin de distinguer les

PDC des DC décrites par Steinman, ces dernières ont alors été rebaptisées cellules dendritiques conventionnelles ou cDC. Nous allons voir dans cette partie les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des PDC, puis nous aborderons l'état des connaissances sur leur rôle dans la physiopathologie de la GVH.

### 1-5-1-Découverte des PDC

Dès 1958, Lennert et Remmele ont rapporté l'existence chez l'homme de cellules présentant une morphologie semblable aux plasmocytes mais qui n'exprimaient pas les marqueurs des plasmocytes, présentes en abondance dans la zone T des tissus lymphoïdes (Figure 17)<sup>181</sup>. Ces cellules ont alors été appelées cellules T plasmocytoïdes. Ce n'est qu'en 1999 que ces cellules sont reconnues par Siegal *et coll.*<sup>179</sup> et Cella *et coll.*<sup>180</sup> comme étant des DC spécialisées dans la production d'IFN de type I en réponse à une stimulation virale, et présentes dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires. Elles ont alors été appelées PDC ou IPC (« interferon producing cells »).



**Figure 17 : Morphologie des PDC.** (a) microscopie électronique  $\times 7000$  (b,c) microscopie électronique 3D  $\times 3000$ , les PDC au repos ont une morphologie sphérique (b), alors que les PDC activées ont une morphologie de cellule dendritique (c). (Colonna *et coll.* Nat Immunol, 2004<sup>182</sup>)

### 1-5-2-Phénotype des PDC

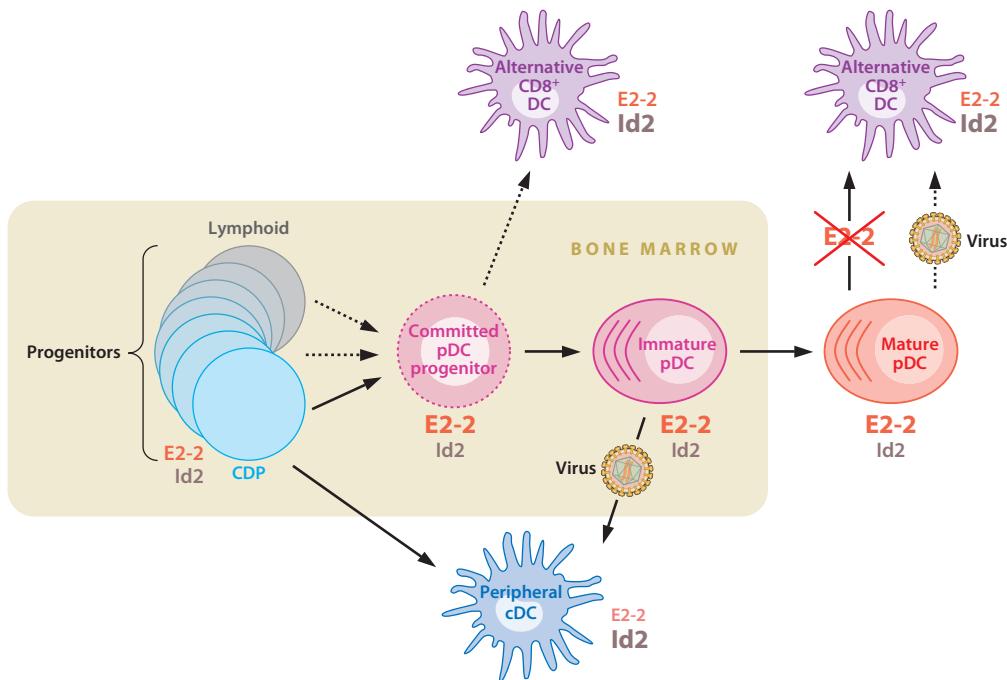
Les PDC humaines sont CD4 $^{+}$  CD45RA $^{+}$  IL-3R $\alpha$  (CD123) $^{+}$  ILT3 $^{+}$  ILT1 $^{-}$ , elles expriment également le CMH de classe II<sup>182</sup>. Les PDC n'expriment pas le CD3,

CD19, CD14, CD16 (lineage -) et les marqueurs de cDC tel le CD11c<sup>182</sup>. Enfin les PDC expriment 2 marqueurs restreints aux PDC humaines, BDCA-2 et BDCA-4 (blood dendritic cell antigen-2 et -4)<sup>182</sup>. BDCA-2 est une glycoprotéine transmembranaire de type C-lectin qui permet d'internaliser l'antigène pour la présentation aux cellules T et les anticorps anti-BDCA-2 inhibent la production d'IFN de type I par les PDC<sup>183</sup>. Le BDCA-4 est semblable à la neuropilin-1 un récepteur neuronal, les anticorps anti-BDCA-4 n'ont pas d'effet substantiel sur la fonction des PDC<sup>184</sup>.

### 1-5-3-Développement des PDC

Le développement et le contrôle transitionnels des PDC sont complexes et ne sont pas encore complètement élucidés, la **Figure 18** présente une vision simplifiée de ce que pourrait être le développement des PDC<sup>185</sup>. Les PDC se développent dans la moelle osseuse à partir de progéniteurs Flt3<sup>+</sup> c-Kit<sup>low</sup>, incluant à la fois des progéniteurs lymphoïdes et les progéniteurs communs de DC (CDP). Ensuite il existe probablement un progéniteur engagé des PDC (qui a perdu le potentiel de se différencier en cDC), mais il reste à identifier. Ce progéniteur va ensuite donner les PDC immatures présentes dans la moelle osseuse puis les PDC matures présentes en périphérie.

La cytokine Flt3 ligand (Flt3L) et son récepteur Flt3 présents à la surface des PDC, indispensables à la différenciation des DC, semblent être particulièrement importants pour les PDC<sup>186</sup>. Le nombre de PDC diminue dans les organes lymphoïdes des souris Flt3 invalidées<sup>187</sup> ou avec une mutation non fonctionnelle de Flt3<sup>188</sup>. Ces données suggèrent que la voie Flt3–Flt3L joue un rôle après le stade du progéniteur commun, dans la différenciation terminale des PDC ou la survie des PDC matures. La voie moléculaire induite par l'activation Flt3–Flt3L n'est pas bien connue, cependant des données suggèrent que cela passe par la voie du phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et l'activation de mTOR (mammalian target of rapamycin)<sup>185</sup>.



**Figure 18 : Proposition de développement des PDC et relation avec les cDC.**  
(Reizis *et coll.* Annu Rev Immunol, 2011<sup>185</sup>)

A côté de la voie Flt3–Flt3L, le facteur de transcription à motif basique hélice-boucle-hélice (E protéine) E2-2 semble être le facteur de transcription clé dans la différenciation des PDC<sup>189</sup>. En effet des progéniteurs hématopoïétiques invalidés pour E2-2 ne sont pas capables de produire des PDC, de plus les PDC expriment un niveau très faible de l'inhibiteur de la protéine E2-2, Id2. Cependant le stade exact où E2-2 intervient dans la différenciation des PDC reste à déterminer, de même pour les signaux responsables de son activation.

De plus, comme cela a été décrit pour d'autres lignées cellulaires, les PDC possèdent une plasticité cellulaire. Ainsi l'inactivation de PDC matures entraîne leur différenciation en cellules présentant un phénotype et une morphologie de cDC (**Figure 18**)<sup>185</sup>. Bien entendu, l'existence de cette plasticité *in vivo* reste à prouver.

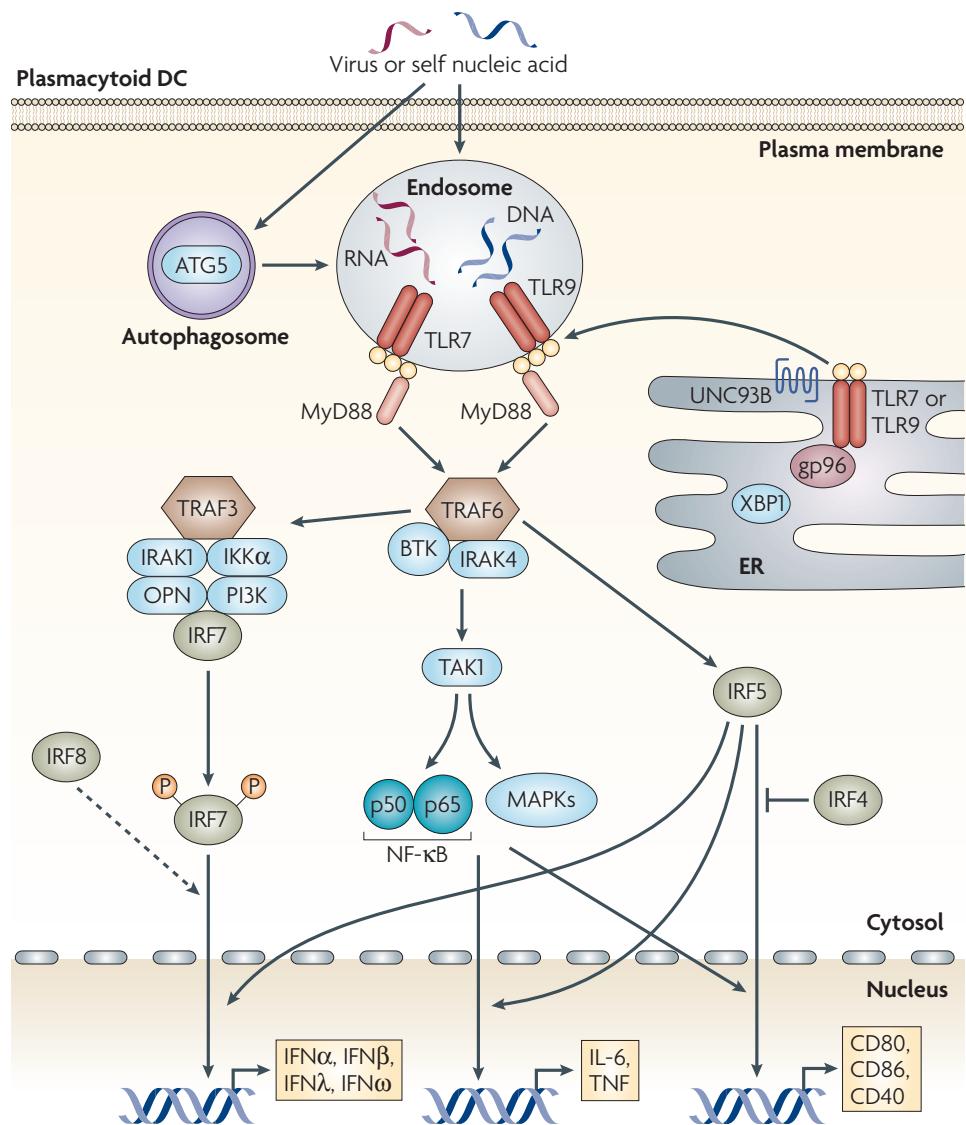
La durée de vie exacte des PDC périphériques n'est pas connue. En effet, si une étude suggère une longue durée de vie<sup>190</sup>, cela pourrait être lié à l'existence d'une phase de quiescence des PDC matures. La régulation de la survie et la quiescence des PDC reste à explorer.

#### **1-5-4-Rôle physiologique et pathogène des PDC**

Le rôle des PDC les situe à l'interface entre immunité innée et adaptative. En effet, si la caractéristique principale des PDC est leur capacité à produire des quantités importantes d'IFN de type I, en réponse à un stimulus viral ou bactérien, soulignant leur importance dans la réponse immunitaire innée<sup>191</sup>, elles sont également capables de présentation antigénique.

L'activation des PDC se fait par le biais de récepteurs de signaux de danger ou pattern recognition receptor (PRR), les toll like receptor (**Figure 19**)<sup>192</sup>. Seulement 2 TLR sont exprimés par les PDC, le TLR 7 et le TLR 9, ces TLR ont la particularité de ne pas être exprimés à la surface des cellules mais dans l'endosome et détectent la présence des acides nucléiques microbiens. Ainsi le TLR 7 est responsable de la réponse des PDC à la présence d'ARN (acides ribonucléiques) viral simple brin et aux agonistes synthétique tels que l'imiquimod ou le R-848. Le TLR 9 lui est responsable de la réponse des PDC à la présence d'ADN (acides désoxyribonucléiques) simple brin, viral ou bactérien, présentant des motifs CpG non méthylés, et aux agonistes synthétiques de type CpG ODNs de type A (CpG-containing oligodeoxynucleotides de type A). Après activation, les TLR 7 et 9 interagissent avec la protéine MyD88 (myeloid differentiation primary-response gene 88), conduisant à l'assemblage d'un complexe de transduction multi-protéique dans le cytoplasme. Ce complexe va activer TAK1 (transforming-growth-factor-β-activated kinase 1) et les facteurs de transcription IRF7 (interferon-regulatory factor 7) et IRF 5. Après activation, IRF7 passe dans le noyau où il initie la transcription de l'IFN de type I. TAK1 entraîne l'activation de NF-κB (nuclear factor-κB) et de MAPKs (mitogen-activated protein kinases), qui, avec IRF5 vont entraîner la production de cytokines pro inflammatoires (IL-6, TNF) et l'expression des molécules de costimulation (CD40, CD80, CD86).

L'ARN viral entraîne ainsi via le TLR7 l'activation des PDC avec la production d'IFN de type I et de cytokines pro-inflammatoires et l'expression de molécule de costimulation à l'origine de l'activité antivirale des PDC.



**Figure 19 : Activation des voies de signalisation intracellulaires des PDC en réponse aux acides nucléiques.** (Gilliet et coll. Nat Rev Immunol, 2008<sup>192</sup>).

De nombreuses cellules sont capables de produire de l'IFN de type I, cependant les PDC ont la capacité d'en produire 100 à 1000 fois plus que tout autre type de cellule. Les PDC expriment tous les sous types d'IFN de type I : IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ , IFN- $\omega$  et IFN- $\tau$ <sup>193</sup>. L'IFN de type I contribue à la défense de l'hôte contre les infections virales, notamment en induisant une résistance à la réplication virale dans les cellules non infectées en activant des gènes cellulaires qui entraînent la destruction des ARN messagers et inhibent la traduction des protéines virales et de certaines protéines de l'hôte<sup>192</sup>. L'IFN de type I induit ainsi l'expression dans les cellules de protéines responsables de cette activité antivirale, tel que Mx1 ou MxA (Myxovirus resistance 1), une protéine

permettant aux cellules de résister au virus de la grippe (*Myxovirus influenzae*). L'IFN de type I permet également d'augmenter l'expression du CMH de classe I à la fois dans les cellules infectées par un virus, les rendant plus sensibles à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques (CD8<sup>+</sup>), mais aussi sur les autres cellules de l'organisme leur conférant ainsi une résistance aux cellules NK, alors qu'en parallèle l'IFN de type I active les cellules NK pour qu'elles éliminent sélectivement les cellules infectées par un virus<sup>192</sup>. Enfin l'IFN de type I induit l'expression de molécules de costimulation sur les cDC et les macrophages, permettant d'activer la présentation antigénique et d'activer les lymphocytes T.

Les PDC sont également capables, comme les cDC, de présentation antigénique. L'activation des PDC via les TLR 7 et 9 entraîne leur maturation et l'expression des molécules HLA de classe II et des molécules de costimulation. Les PDC sont alors capables de présentation antigénique directe et croisée et vont activer les lymphocytes T. Les PDC ont un rôle dans l'initiation de réponses immunitaires T effectrices, via la production de cytokines pro inflammatoires notamment, mais aussi par la production d'IFN de type I. Il avait été montré initialement que les PDC induisaient une réponse de type Th1<sup>182</sup>, il a été montré plus récemment que les PDC étaient associées à des réponses Th17<sup>194-196</sup>.

Enfin plusieurs études suggèrent que les PDC immatures ont une fonction tolérogénique. Elles peuvent ainsi induire des lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+197</sup> ou entraîner la production d'indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) qui exerce une forte activité inhibitrice sur la prolifération des lymphocytes T<sup>198</sup>.

Le rôle des PDC a été largement étudié chez l'homme dans plusieurs infections virales chroniques, en particulier les infections liées au virus de l'hépatite C<sup>199</sup> ou au virus de l'immunodéficience humaine<sup>200</sup>. La mise en évidence de taux élevés de d'IFN de type I dans les maladies auto-immunes a conduit à l'étude du rôle des PDC dans leur physiopathologie. Le rôle des PDC a été particulièrement exploré dans le psoriasis. Dans le psoriasis, il existe une infiltration importante des lésions cutanées par les PDC, accompagnée d'une diminution du nombre de PDC circulantes dans le sang<sup>201</sup>. De plus lorsque l'on bloque la sécrétion d'IFN de type I par les PDC avec un Ac anti-BDCA2 bloquant, on inhibe le développement des lésions cutanées dans un modèle de murin de

xenotransplantation<sup>201</sup>. Gillet *et coll.* ont mis en évidence le stimulus à l'origine de l'activation des PDC dans le psoriasis : les acides nucléiques du soi (ADN ou ARN) se complexent avec un peptide antimicrobien, le LL37 et activent les TLR 7 et 9<sup>202, 203</sup>. Si l'origine de ces complexes et les conséquences exactes de l'activation des PDC restent à préciser, le rôle majeur des PDC dans le psoriasis apparaît bien établi.

### **1-5-5-Rôle des PDC dans la GVHD aiguë**

Le rôle des PDC dans la GVHD aiguë a été exploré dans des modèles murins. Koyama *et coll.*<sup>204</sup> ont ainsi mis en évidence que la présentation des allo-antigènes par les PDC du receveur, en l'absence des autres types de DC, était suffisante pour activer les lymphocytes T allogéniques et entraîner les lésions de GVHD. Ce résultat a permis de démontrer le rôle pathogène des PDC de présentation antigénique aux lymphocytes T, contrairement aux données suggérant un rôle tolérogène des PDC *in vivo*<sup>205</sup>. Les lésions induites par l'ICT du conditionnement ont un rôle important : en effet, si l'ICT entraîne la disparition des PDC du receveur<sup>206</sup>, il semblerait qu'avant leur disparition l'ICT contribue à la maturation des PDC, indispensable à la présentation antigénique<sup>207</sup>. Banovic *et coll.*<sup>208</sup> se sont intéressés aux PDC d'origine donneur : les PDC des greffons de moelle osseuse diminuent la GVHD, au contraire des PDC matures des greffons de CSP qui n'ont pas d'effet<sup>208, 209</sup>. De plus, la GVHD semble prévenir la reconstitution des PDC matures du donneur et favoriser la génération de DC suppressive à partir des mêmes précurseurs<sup>208</sup>.

Plusieurs équipes ont étudié les PDC dans la GVHD aiguë chez l'homme. Fagnoni *et coll.*<sup>210</sup> ont mis en évidence, après conditionnement myéloablatif, une augmentation des PDC dans le sang circulant lors de la survenue d'une GVHD aiguë, suivi d'une diminution brutale après mise sous corticoïdes<sup>210</sup>. La diminution des PDC circulantes chez les patients avec une GVHD aiguë de grade II à IV a été confirmée par plusieurs équipes, à la fois après conditionnement myéloablatif et à intensité réduite<sup>211-215</sup>. De plus il a été montré que les PDC circulantes après conditionnement à intensité réduite sont exclusivement

d'origine donneur<sup>216, 217</sup>. Plus récemment une équipe a mis en évidence une diminution de l'expression de CCR5 (récepteur à C-C chimiokine de type 5), un récepteur de chimiokine à la surface des PDC, précédant la survenue d'une GVHD aiguë de grade II-IV<sup>218</sup>, suggérant des modifications de l'activation et de l'homéostasie des PDC lors de la survenue d'une GVHD aiguë. En effet, si différentes études confirment une augmentation des PDC d'origine donneur dans le sang précédent la survenue d'une GVHD aiguë, suivi de leur diminution brutale accompagnant la mise sous corticoïdes, aucune étude ne s'est intéressée aux PDC infiltrant les tissus cibles de la GVHD aiguë (peau, tube digestif, foie). Cette augmentation suivie d'une diminution des PDC dans la GVHD aiguë, pourrait être liée à la migration des PDC dans les tissus cibles de la GVHD. L'un des objectifs de ce travail de thèse est ainsi d'évaluer la présence des PDC *in situ* dans les tissus cibles de la GVHD.

## **2- Résultats**

### **2-1-Article n°1: « Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease »**

#### **2-1-1-Résultats principaux**

Si la plupart des études réalisées dans les modèles murins suggèrent un rôle des lymphocytes Th17 dans la physiopathologie de la GVHD aiguë, leur contribution dans la GVHD aiguë chez l'homme n'est pas clair, en particulier leur contribution au niveau des organes cibles de la GVHD aiguë : la muqueuse digestive, la peau et le foie. Nous avons évalué l'infiltration par les lymphocytes Th17 dans la muqueuse digestive de 23 patients après allo-CSH lors de la survenue d'une GVHD aiguë digestive et avant toute corticothérapie. 5 patients de la cohorte, n'ayant pas présenté de GVHD aiguë (au moment de la biopsie et après) ont servi de groupe contrôle. Nous avons montré, en utilisant CCR6 et CD161, deux marqueurs des lymphocytes Th17, que le nombre de lymphocytes Th17 était significativement augmenté dans la muqueuse digestive des patients avec une GVHD aiguë par rapport aux patients sans GVHD aiguë. Afin de confirmer ces résultats, nous avons montré que le nombre de cellules exprimant ROR $\gamma$ t le facteur de transcription clé des lymphocytes Th17 était également augmenté dans la muqueuse digestive des patients avec une GVHD aiguë par rapport aux patients sans GVHD aiguë. Ensuite, au vu des données suggérant un rôle des PDC dans la différenciation des lymphocytes Th17, nous avons quantifié les PDC dans la muqueuse digestive. Le nombre de PDC CD123 $^{+}$  était significativement plus élevé dans la muqueuse digestive des patients avec une GVHD aiguë par rapport aux patients sans GVHD aiguë et le nombre de PDC CD123 $^{+}$  corrélait avec la sévérité de la GVHD aiguë. Ces résultats fournissent des arguments pour une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes Th17 et un nouveau lien entre les PDC et les lymphocytes Th17 dans la physiopathologie de la GVHD aiguë chez l'homme.

#### **2-1-2-Article**

Publié dans Leukemia, Février 2012.

## ORIGINAL ARTICLE

# Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease

C Bossard<sup>1,2,10</sup>, F Malard<sup>3,4,10</sup>, J Arbez<sup>5,6,7</sup>, P Chevallier<sup>4</sup>, T Guillaume<sup>4</sup>, J Delaunay<sup>4</sup>, J-F Mosnier<sup>1,2</sup>, P Tiberghien<sup>5,6,7,8</sup>, P Saas<sup>5,6,7,8</sup>, M Mohty<sup>3,4,9,11</sup> and B Gaugler<sup>5,6,7,8,11</sup>

The contribution of Th17 cells in acute graft-versus-host disease (aGVHD) has been demonstrated in aGVHD mouse models. However, their contribution in human gastrointestinal aGVHD remains unclear. We evaluated Th17 cells in a cohort of 23 patients at diagnosis of aGVHD. In this study, we have shown that the absolute number of Th17 cells using the CCR6 and CD161 markers were significantly higher in the intestinal mucosa of patients with aGVHD compared with intestinal mucosa of patients without aGVHD. Moreover, in keeping with the increase of CCR6+ and CD161+ T cells, ROR $\gamma$ t the key transcription factor that orchestrates the differentiation of Th17 cells, was significantly increased in the intestinal mucosa of patients with aGVHD compared with intestinal mucosa of patients without aGVHD ( $P=0.01$ ). Since plasmacytoid dendritic cells (PDCs) have been reported to drive the differentiation of the Th17 subset, we quantified PDCs in these patients. PDC CD123+ cells were increased in the intestinal mucosa of patients with aGVHD. Furthermore, the number of CD123+ PDCs paralleled the histological grade of aGVHD, providing evidence for a role of Th17-mediated responses and a potential new pathophysiological link between PDCs and Th17 in human aGVHD.

*Leukemia* advance online publication, 2 March 2012; doi:10.1038/leu.2012.41

**Keywords:** acute GVHD; Th17 cells; plasmacytoid dendritic cells

## INTRODUCTION

Acute graft-versus-host disease (aGVHD) after allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) is an exaggerated immune response against alloantigens involving dysregulation of inflammatory cytokine cascades. Previous studies established an important role of Th1 cells in aGVHD pathophysiology.<sup>1–3</sup> However, the identification of proinflammatory Th17 cells, which contribute to autoimmune diseases, especially inflammatory bowel disease<sup>4</sup> raised the question of the role of Th17 cells in human aGVHD. The contribution of Th17 cells in aGVHD has been explored in GVHD mouse models with conflicting results. Some data suggested that interleukin (IL)-17 is protective,<sup>5</sup> while others indicated a pathogenic role.<sup>6,7</sup> Of note, transplantation of Th17 cells caused lethal GVHD hallmarked by extensive tissue damage.<sup>8</sup> Finally, blockade of both Th1 and Th17 differentiation is required to prevent GVHD in mice.<sup>9</sup> In humans, an increased Th17 population in blood was observed in patients with aGVHD,<sup>10</sup> it was also reported that the imbalance between Th17 and regulatory T cells can be correlated with the pathological grade of GVHD.<sup>11</sup> In cutaneous GVHD, Broady *et al.*<sup>12</sup> found an expansion of tissue-localized Th1 and not Th17 cells. However, the contribution of Th17 cells to gastrointestinal aGVHD pathogenesis remains unclear. With this background, we investigated the role of Th17 cells in the gastrointestinal biopsies of aGVHD patients.

## PATIENTS AND METHODS

## Patients and study design

Studies described in this report were undertaken in a cohort of 23 patients who underwent allo-SCT at the University-Hospital of Nantes (Nantes, France) between May 2007 and December 2010. Patients included in this study were diagnosed with gastrointestinal aGVHD by histological examination of biopsies. The non-GVHD controls were asymptomatic allo-SCT patients. All patients were enrolled in clinical research protocols approved by local ethical committees. The control patients were all-SCT patients who volunteered to participate to the study and did not have digestive symptoms. Written informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki. Patients, donors and allo-SCT characteristics of these patients are summarized in Table 1.

## Morphological and immunohistochemical studies

Intestinal biopsies ( $n=16$  colonic, 4 rectal and 3 duodenal biopsies), obtained by fiber-optic examination for digestive symptoms (vomiting, diarrhea...) or in asymptomatic controls, were performed before any steroid treatment. One biopsy was analyzed for each patient. The median post-transplant time of biopsies was 42 days (range, 14–137): 35 days (range, 27–50) in the control group, 47 days (range, 14–137) in the aGVHD group. GI aGVHD was confirmed on formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies and graded on hematoxylin and eosin-stained sections according to the grading system described by Sale *et al.*<sup>13</sup> and Epstein *et al.*<sup>14</sup> grade

<sup>1</sup>EA4273 Biometadys, Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France; <sup>2</sup>Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) de Nantes, Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Nantes, France; <sup>3</sup>INSERM CRNCA UMR892, Nantes, France; <sup>4</sup>Service d'Hématologie Clinique, CHU, Université de Nantes, Nantes, France; <sup>5</sup>INSERM UMR1098, Besançon, France; <sup>6</sup>Université de Franche-Comté, Besançon, France; <sup>7</sup>EFS Bourgogne Franche-Comté, Besançon Cedex, France; <sup>8</sup>Centre d'Investigation Clinique en Biothérapie CBT506, Plateforme de Biomonitoring, Besançon, France and <sup>9</sup>Centre d'Investigation Clinique en Cancérologie (CI2C), Nantes, France. Correspondence: Professor M Mohty, Service d'Hématologie Clinique, CHU Hôtel-Dieu, Université de Nantes and INSERM U892, Place Alexis Ricordeau, F-44093 Nantes, France.

E-mail: Mohamad.mohty@univ-nantes.fr

or B Gaugler, INSERM UMR1098, EFS Bourgogne Franche-Comté, 1 Bd A Fleming, F-25020 Besançon Cedex, France.

E-mail: beatrice.gaugler@efs.sante.fr

<sup>10</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>11</sup>These authors share senior authorship.

Received 6 January 2012; revised 5 February 2012; accepted 7 February 2012; accepted article preview online 15 February 2012

**Table 1.** Patients, disease and transplant characteristics

Characteristic	Study population (N = 23)	No aGVHD (N = 5)	aGVHD (N = 18)
Median recipient age, years (range)	53 (16–69)	50 (21–60)	53.5 (16–69)
Patient sex, male/female, no. (%)	14/9 (61/39)	3/2 (60/40)	11/7 (61/39)
Donor sex, male/female, no. (%)	16/7 (70/30)	4/1 (80/20)	12/6 (67/33)
<i>GI aGVHD clinical grading</i>			
Grade 0	5	5	0
Grade 1	2	0	2
Grade 2	3	0	3
Grade 3	5	0	5
Grade 4	8	0	8
<i>Overall aGVHD clinical grading</i>			
No aGVHD	5	5	0
Grade I	2	0	2
Grade II	2	0	2
Grade III	6	0	6
Grade IV	8	0	8
<i>Histological GI aGVHD grading</i>			
Grade 0	5	5	0
Grade 1	2	0	2
Grade 2	5	0	5
Grade 3	5	0	5
Grade 4	6	0	6
Median post-transplant time of biopsy, days (range)	42 (14–137)	35 (27–50)	47 (14–137)
<i>Diagnosis, no. (%)</i>			
Myeloid malignancies	11 (48)	1 (20)	10 (56)
Acute myeloblastic leukemia	8 (35)	1 (20)	7 (39)
Myelodysplastic syndrome	3 (13)	0 (0)	3 (17)
Lymphoid malignancies	9 (39)	3 (60)	6 (33)
Acute lymphoblastic leukemia	1 (4)	1 (20)	0 (0)
Non-Hodgkin lymphoma	4 (17)	1 (20)	3 (17)
Multiple myeloma	2 (9)	1 (20)	1 (6)
Chronic lymphocytic leukemia	2 (9)	0 (0)	2 (11)
Aplastic anemia	3 (13)	1 (20)	2 (11)
<i>Conditioning regimen, no. (%)</i>			
Myeloablative	2 (9)	0 (0)	2 (11)
Reduced intensity	21 (91)	5 (100)	16 (89)
<i>GVHD prophylaxis, no. (%)</i>			
CsA alone	9 (39)	3 (60)	6 (33)
CsA + mycophenolate mofetil	11 (48)	1 (20)	10 (56)
CsA + methotrexate	3 (13)	1 (20)	2 (11)
<i>Graft source, no. (%)</i>			
Peripheral blood stem cells	18 (78)	5 (100)	13 (72)
Bone marrow	2 (9)	0 (0)	2 (11)
Cord blood	3 (13)	0 (0)	3 (17)
<i>Donor type (%)</i>			
Matched-related donor (MRD)	9 (39)	2 (40)	9 (50)
Matched-unrelated donor (MUD)	9 (39)	3 (60)	7 (39)
Mismatched-unrelated donor (MISUD)	1 (4)	0 (0)	2 (11)

Abbreviations: aGVHD, acute graft-versus-host disease; CsA, cyclosporine; GI, gastrointestinal.

1 = isolated apoptotic epithelial cells without crypt loss; grade 2 = individual crypt loss; grade 3 = contiguous area of multiple crypt loss; grade 4 = extensive crypt dropout with denudation of epithelium. As controls, colonic and duodenal biopsies from five patients without clinical and pathological GI aGVHD were also examined on hematoxylin and eosin-stained sections. None had evidence of viral infection. Immunohistochemistry was performed on 5 µm formalin-fixed, paraffin-embedded sections using an indirect immunoperoxidase method. Slides were stained with the following primary antibodies: Tbet (clone 4B10; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), CD161 (clone B199.2; AbD Serotec, Colmar, France), CCR6 (clone 53103; R&D Systems, Abingdon, UK), ROR $\gamma$ t (rabbit polyclonal antibody; Abcam, Paris, France) and CD123 (clone 9F5; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). The immunological reaction

was visualized with the Bond Polymer Refine Detection system (Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK) and 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride as the chromogen. As negative control, omission of primary antibodies was performed. Quantitative evaluation of antigens expression was performed independently by two examiners (CB, FM) by counting the absolute number of positive cells in the whole biopsy at 200 magnifications (mean 10 fields) for each sample.

#### Statistical analysis

Clinical, morphological information as well as the number of Tbet, CD161, CCR6, ROR $\gamma$ t and CD123+ cells were entered in a database. Data were computed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Mann-Whitney non-parametric test and analysis of variance test were used to assess (1) the correlation between the number of Th1, Th17 and CD123+ cells and the presence of aGVHD and (2) the correlation between the number of Th17 cells and CD123+ cells and the histological grade of aGVHD.

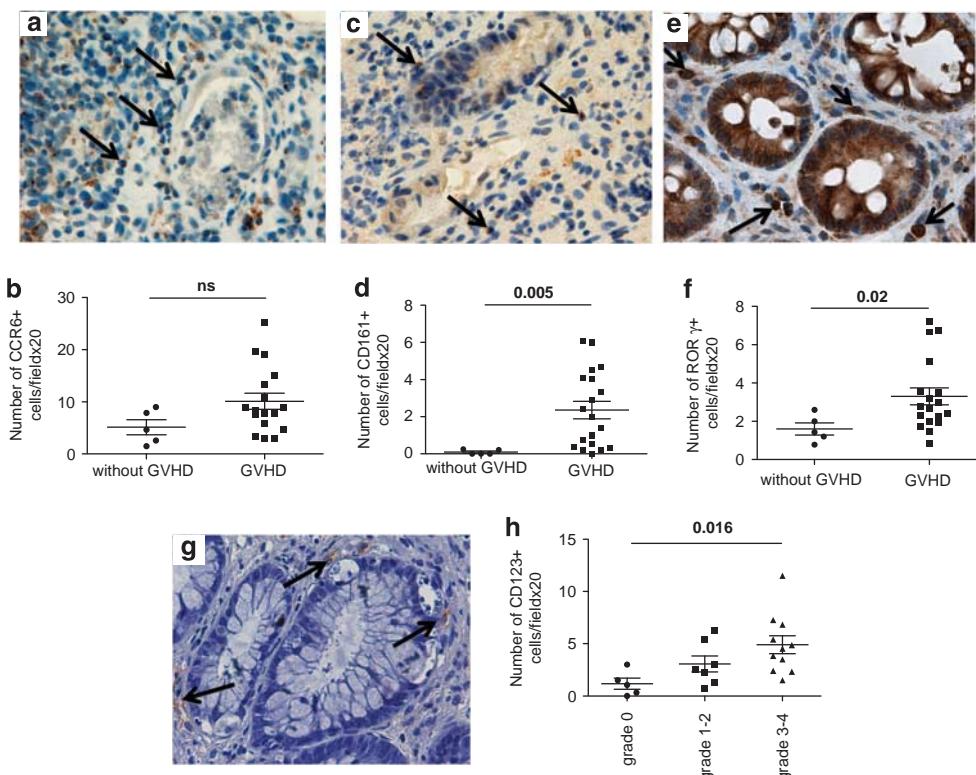
#### RESULTS AND DISCUSSION

Th17 cells have a major role in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease,<sup>4</sup> and mouse studies have shown the presence of Th17 cells in the gastrointestinal mucosa of mice with gastrointestinal aGVHD.<sup>7</sup> We hypothesized that Th17 cells could preferentially accumulate within the target tissues of aGVHD. Thus, gastrointestinal biopsies obtained from a cohort of 23 allo-SCT patients ( $n=5$  without and 18 with histologically proven GI aGVHD taken before starting corticosteroids) were analyzed for Th17 cell infiltration. Th17 cells have been found to express the mucosal chemokine receptor CCR6 but not CCR10.<sup>15,16</sup> Also, the C-type lectin-like receptor CD161 is another well-established marker of human Th17 cells.<sup>17</sup>

In this study, we have shown that the absolute number of CD161+ cells was significantly higher in the intestinal mucosa of patients with aGVHD compared with intestinal mucosa of patients without aGVHD ( $P=0.0045$ ). The absolute number of CCR6+ cells was also higher in intestinal mucosa of patients with aGVHD, but the difference was not statistically significant. These CD161 and CCR6+ cells were mainly found in the lamina propria but also in the epithelium of altered glands (Figures 1a–d). To confirm the Th17 cells infiltration, we assessed the expression of ROR $\gamma$ t, the key transcription factor that orchestrates the differentiation of Th17 cells.<sup>18</sup> In keeping with the increase of CCR6+ and CD161+ T cells, ROR $\gamma$ t+ cells with a nuclear staining were significantly increased in the intestinal mucosa of patients with aGVHD compared with intestinal mucosa of patients without aGVHD ( $P=0.01$ ) (Figures 1e and f), further supporting a role for Th17 cells in gastrointestinal aGVHD pathophysiology. As reported elsewhere, we also found an increased number of the cells expressing Tbet, the transcription factor characterizing the Th1 cells, in the intestinal mucosa of patients with aGVHD compared with patients without aGVHD ( $P=0.02$ , data not shown).

Since plasmacytoid dendritic cells (PDCs), the professional type I interferon (IFN)-secreting cells, were shown to have a major role in different autoimmune diseases<sup>19,20</sup> and in triggering Th17-related cytokines,<sup>21–24</sup> we sought next to determine the density of PDCs in intestinal biopsies from patients with and without aGVHD. We observed a significant increase of CD123+ PDCs in the intestinal mucosa of patients with aGVHD compared with mucosa of patients without aGVHD ( $P=0.01$ , data not shown), these positive cells being around altered glands. Furthermore, the number of CD123+ cells paralleled the histological grade of aGVHD: the higher the grade, the higher the number of PDC ( $P=0.01$ ) (Figures 1g and h). There was also a tendency to an increased number of CD161+ cells and ROR $\gamma$ t+ cells in histological grades 3–4 aGVHD compared with grades 1–2 aGVHD, but this difference was not statistically significant.

The current study shed some light on the role of Th17 cells in the context of GI aGVHD. Using well-established specific markers,



**Figure 1.** Th17 cells and PDCs infiltrate the intestinal mucosa of GI aGVHD patients. Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples of colonic and/or duodenal biopsies. Biopsies from 23 patients including patients with histologically confirmed GI aGVHD ( $N=18$ ) or no aGVHD ( $N=5$ ) were collected and analyzed morphologically and by immunohistochemistry. For the quantitative evaluation, the mean number of positive cells for each marker, obtained from each patient, was retained for the statistical analysis. Examples of CCR6+ (a), CD161+ (c), ROR $\gamma$ T+ (e) or CD123+ (g) mononuclear cells around altered mucosal glands with numerous apoptotic epithelial cells (arrows) are shown (original magnification  $\times 400$ ). The quantitative evaluation of CCR6+ (b), CD161+ (d), ROR $\gamma$ T+ (f) or CD123+ (h) cells in intestinal mucosa is represented. The quantitative evaluation of CD123 (h) cells is represented according to the histological grade (grade 0 aGVHD,  $N=5$ ; grades 1–2 aGVHD,  $N=7$ ; grades 3–4 aGVHD,  $N=11$ ). The mean value and s.e.m. for each group is represented.

we have shown that Th17 cells infiltrate intestinal mucosa from patients with aGVHD. In addition, Th17 cells infiltration paralleled the infiltration of CD123+ PDCs, suggesting a potential new pathophysiological link between PDCs and Th17 response in the context of gastrointestinal aGVHD. Unfortunately, the relatively limited number of patients analyzed as part of this study, did not allow establishing statistically significant correlations between immunosuppression levels or types (e.g., use of mycophenolate mofetil or not) and PDCs and Th17 infiltration. Also, there was no statistically significant correlation between the Th17 cells and GVHD histology grade, endoscopic GVHD grading or response to steroids.

Controversies exist regarding the role of Th17 cells in the pathogenesis of human aGVHD. Broady *et al.*<sup>12</sup> did not find an association between Th17 cells and the onset of human aGVHD. But this study focused only on skin pathology, and it remains possible that T-cell differentiation differs depending on the environment and was not the same in skin aGVHD and gastrointestinal aGVHD. Also, conditioning and immunosuppressive regimens, stem cell source, disease features and different experimental conditions such as *in vitro* culture might all have impacted the cytokine profile of pathogenic cells described by Broady *et al.*<sup>12</sup> Ratajczak *et al.*<sup>11</sup> did not find a significant infiltration of CD4+ IL-17+ T cells in the intestinal mucosa of patients with aGVHD. This study was based on the *in situ* detection of IL-17 by CD4+ cells. However, recent *in vivo* studies in mice have shown that Th17 cells can acquire the capacity to completely shut off IL-17 production in the course of inflammatory immune responses.<sup>25</sup> Similarly, conditioning and immunosuppressive regimens are very different in the study by Ratajczak *et al.*,<sup>11</sup> with a

majority of myeloablative conditioning regimens, compared with our study. The latter might explain the observed differences between both studies. Furthermore, some studies, especially in autoimmune diseases, proposed that the Th17 phenotype is unstable and that Th17 cells may convert to Th1 cells.<sup>26</sup> We can suggest that in a context of gastrointestinal aGVHD, some Th17 cells infiltrate early the intestinal mucosa and then can differentiate into Th1 cells making their detection more difficult if intestinal biopsies are performed too late after the onset of aGVHD. Recently, Esplugues *et al.*<sup>27</sup> proposed a general mechanism for controlling immunopathogenic Th17 response by acquisition of an immune-suppressive phenotype or elimination into the intestinal lumen. We can speculate that Th17 recruited in the intestine of patients after allo-SCT are retained in the inflamed tissues and either conserve their pathologic properties or convert into a Th1 phenotype rather than a regulatory phenotype.

From the pathophysiological standpoint, our findings support a gut aGVHD induction model that can mimic data from other autoimmune diseases,<sup>20,21,28,29</sup> where recruited PDCs in GVHD target tissues following local damage (e.g., conditioning regimen), can promote the production of Th17 cytokines, as the induction of Th17-related cytokines is abrogated in PDC-depleted mice.<sup>21</sup> This is consistent with studies showing that PDCs can drive the differentiation of Th17 cells.<sup>22–24</sup> Moreover, type I IFN produced by PDCs after stimulation with a TLR7 agonist could drive Th17 responses *in vivo*.<sup>30</sup> Although the exact mechanism that links type I IFN production to PDC-mediated Th17 response is still unclear in aGVHD, data described in this paper does not contradict the established role of Th1 cells in aGVHD pathophysiology.<sup>31</sup> In fact, human Th17 cells may exhibit a close

developmental relationship with Th1 cells.<sup>26</sup> A likely scenario is a synchronized or reciprocal interplay between Th1 and Th17 as reported in autoimmune arthritis.<sup>26</sup>

In summary, our study provides a framework for a role of PDCs and Th17-mediated responses in human aGVHD. As a matter of fact, the current study does not provide a specific cause-effect link between Th17 cells and GI aGVHD, as multiple other pathways could be triggered by PDCs and type I IFNs. However, these data raise the prospect of future innovative approaches to optimize immunosuppression regimens for the treatment or prophylaxis of aGVHD by targeting PDCs and the Th17 response. There are already clinical trials aiming to block the Th17 response using anti-IL-17 monoclonal antibodies for autoimmune diseases.<sup>32</sup>

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the technical and logistical support of V Dehame, S Leclercq, S Blandin, C Deleine and E Drouet. We also thank the nursing staff for providing excellent care for our patients, and the following physicians: N Blin, E Brissot, X Cahu, V Dubruille, T Gastinne, JL Harousseau, S Le Gouill, B Mahe, F Mechinaud, P Moreau and F Rialland for their dedicated patient care. We also thank the 'Région Pays de Loire,' the 'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC; Grant #3175 to MM and BG),' the 'Fondation de France,' the 'Fondation contre la Leucémie,' the 'Agence de Biomédecine,' the 'Association Cent pour Sang la Vie,' the 'Association Laurette Fugain' and the IRGHT for their generous and continuous support for our clinical and basic research work. Our transplant program was supported by several grants from the French national cancer institute (PHRC INCa to MM). We acknowledge the continuous support of the cell banking facility ('tumorotheque') of the CHU de Nantes.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

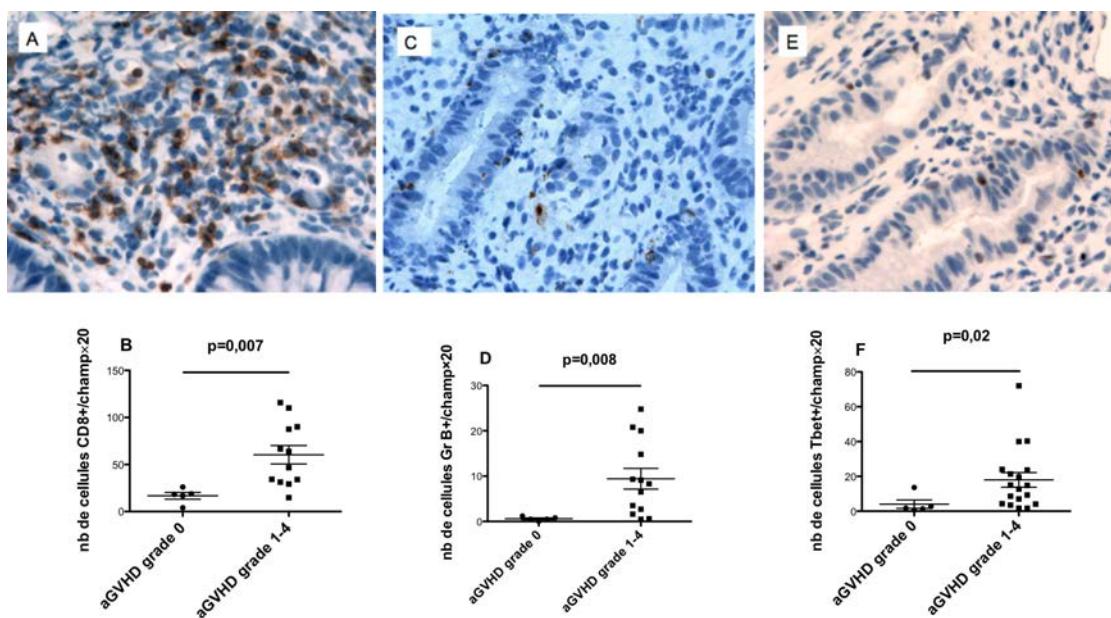
All authors listed in the manuscript have contributed substantially to this work: conception and design: Mohamad Mohty, Béatrice Gaugler, Céline Bossard and Jean-François Mosnier; financial support: Mohamad Mohty, Béatrice Gaugler, Pierre Tiberghien and Philippe Saas; administrative and logistical support: Mohamad Mohty, Béatrice Gaugler, Pierre Tiberghien and Philippe Saas; provision of study materials and patients care: Patrice Chevallier, Thierry Guillaume, Jacques Delaunay and Mohamad Mohty; experimental work: Céline Bossard, Florent Malard, Jessy Arbez and Béatrice Gaugler; collection and assembly of clinical data: Florent Malard and Mohamad Mohty; data analysis and interpretation: Céline Bossard, Florent Malard, Jessy Arbez, Mohamad Mohty, Béatrice Gaugler, Philippe Saas and Pierre Tiberghien; manuscript writing and revision: Mohamad Mohty, Céline Bossard, Florent Malard and Béatrice Gaugler; final approval of manuscript: all co-authors.

## REFERENCES

- Holler E, Kolb HJ, Mittermuller J, Kaul M, Ledderose G, Duell T et al. Modulation of acute graft-versus-host-disease after allogeneic bone marrow transplantation by tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) release in the course of pretransplant conditioning: role of conditioning regimens and prophylactic application of a monoclonal antibody neutralizing human TNF alpha (MAK 195F). *Blood* 1995; **86**: 890-899.
- Krenger W, Hill GR, Ferrara JL. Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 1997; **64**: 553-558.
- Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 139-170.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 485-517.
- Yi T, Zhao D, Lin CL, Zhang C, Chen Y, Todorov I et al. Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood* 2008; **112**: 2101-2110.
- Kappel LW, Goldberg GL, King CG, Suh DY, Smith OM, Ligh C et al. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood* 2009; **113**: 945-952.
- Iclozan C, Yu Y, Liu C, Liang Y, Yi T, Anasetti C et al. T helper17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; **16**: 170-178.
- Carlson MJ, West ML, Coghill JM, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood* 2009; **113**: 1365-1374.
- Yu Y, Wang D, Liu C, Kaosaard K, Semple K, Anasetti C et al. Prevention of GVHD while sparing GVL by targeting Th1 and Th17 transcription factor T-bet and ROR  $\gamma$  t in mice. *Blood* 2011; **118**: 5011-5020.
- Dander E, Baldazzi A, Zappa G, Lucchini G, Perseghin P, Andre V et al. Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2009; **88**: 1261-1272.
- Ratajczak P, Janin A, Peffault de Latour R, Leboeuf C, Desveaux A, Keyvanfar K et al. Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood* 2010; **116**: 1165-1171.
- Broady R, Yu J, Chow V, Tantiworawit A, Kang C, Berg K et al. Cutaneous GVHD is associated with the expansion of tissue localised Th1 and not Th17 cells. *Blood* 2010; **116**: 5748-5751.
- Sale GE, Shulman HM, McDonald GB, Thomas ED. Gastrointestinal graft-versus-host disease in man. A clinicopathologic study of the rectal biopsy. *Am J Surg Pathol* 1979; **3**: 291-299.
- Epstein RJ, McDonald GB, Sale GE, Shulman HM, Thomas ED. The diagnostic accuracy of the rectal biopsy in acute graft-versus-host disease: a prospective study of thirteen patients. *Gastroenterology* 1980; **78**: 764-771.
- Annunziato F, Cosmi L, Santarsieri V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007; **204**: 1849-1861.
- Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzerbucchia A et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007; **8**: 639-646.
- Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP et al. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med* 2009; **206**: 525-534.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; **126**: 1121-1133.
- Swiecki M, Colonna M. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev* 2010; **234**: 142-162.
- Lande R, Gregorio J, Facchinetto V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007; **449**: 564-569.
- Gregorio J, Meller S, Conrad C, Di Nardo A, Homey B, Lauerman A et al. Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J Exp Med* 2010; **207**: 2921-2930.
- Isaksson M, Ardesjo B, Ronnlblom L, Kampe O, Lassmann H, Eloranta ML et al. Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE. *Eur J Immunol* 2009; **39**: 2925-2935.
- Yu CF, Peng WM, Oldenburg J, Hoch J, Bieber T, Limmer A et al. Human plasmacytoid dendritic cells support Th17 cell effector function in response to TLR7 ligation. *J Immunol* 2010; **184**: 1159-1167.
- Bonnefoy F, Couturier M, Clauzon A, Remy-Martin JP, Gaugler B, Tiberghien P et al. TGF-beta-exposed plasmacytoid dendritic cells participate in Th17 commitment. *J Immunol* 2011; **186**: 6157-6164.
- Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 2011; **12**: 255-263.
- Nistala K, Adams S, Cambrook H, Ursu S, Olivito B, de Jager W et al. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 14751-14756.
- Esplugues E, Huber S, Gagliani N, Hauser AE, Town T, Wan YY et al. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature* 2011; **475**: 514-518.
- Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetto V et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med* 2009; **206**: 1983-1994.
- Guiducci C, Tripodo C, Gong M, Sangaletti S, Colombo MP, Coffman RL et al. Autoimmune skin inflammation is dependent on plasmacytoid dendritic cell activation by nucleic acids via TLR7 and TLR9. *J Exp Med* 2010; **207**: 2931-2942.
- van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* 2009; **182**: 5836-5845.
- Mohty M, Blaise D, Faucher C, Vey N, Bouabdallah R, Stoppa AM et al. Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2005; **106**: 4407-4411.
- Platanias LC. Abnormalities in Th17T cells in aplastic anemia. *Blood* 2010; **116**: 4039-4040.

## 2-1-3-Résultats supplémentaires

Nous avons voulu confirmer la présence dans la muqueuse digestive des cellules immunitaires effectrices classiquement décrites comme étant responsables des dommages tissulaires de la GVHD aiguë. Il existe une augmentation statistiquement significative des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans la muqueuse digestive des patients avec une GVHD aiguë par rapport aux patients allogreffiés qui n'ont pas présenté de signes de GVHD aiguë ( $p=0,007$ ) (Figure 20 A, B). Le nombre de cellules positives pour Granzyme B, un marqueur de cytotoxicité des lymphocytes T, était également augmenté dans la muqueuse digestive des patients avec une GVHD aiguë, par rapport aux patients allogreffiés qui n'ont pas présenté de signes de GVHD aiguë ( $P=0,008$ ) (Figure 20 C, D). Nous avons également trouvé une augmentation du nombre des lymphocytes T exprimant Tbet (le facteur de transcription caractéristique des lymphocytes Th1) dans la muqueuse digestive des patients avec une GVHD aiguë par rapport aux patients allogreffiés qui n'ont pas présenté de signes de GVHD aiguë ( $P=0,02$ ) (Figure 20 E, F).



**Figure 20 : Les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules Th1 infiltrent la muqueuse digestive des patients avec une GVHD aiguë digestive. Exemple de cellules mononucléées CD8<sup>+</sup> (A), Granzyme B<sup>+</sup> (C) et Tbet<sup>+</sup> (E) au niveau de la muqueuse digestive de patients présentant une GVHD aiguë cutanée. L'évaluation quantitative des cellules CD8<sup>+</sup> (B), Granzyme B (D) et Tbet<sup>+</sup> (F) est montrée (grossissement × 200).**

## **2-2-Article n°2: « Increased plasmacytoid dendritic cells and ROR $\gamma$ t-expressing immune effectors in cutaneous acute graft-versus-host disease »**

### **2-2-1-Résultats principaux**

Au vu de nos premiers résultats suggérant un rôle des lymphocytes Th17 et des PDC dans la physiopathologie de la GVHD aiguë digestive, nous avons voulu évaluer l'implication de ces cellules dans un autre tissu cible de la GVHD aiguë : la peau. Nous avons évalué l'infiltration par les lymphocytes Th17 et les PDC dans la peau de 38 patients après allo-CSH lors de la survenue d'une GVHD aiguë cutanée et avant toute corticothérapie. 9 patients de la cohorte, n'ayant pas présenté de GVHD aiguë (au moment de la biopsie et après), ont servi de groupe contrôle. Nous avons recherché en immunohistochimie la présence de cellules BDCA2+, un marqueur spécifique des PDC dans les biopsies cutanées. Nous avons mis en évidence une augmentation du nombre de PDC BDCA-2+ dans la peau des patients avec une GVHD aiguë. Nous avons ensuite recherché l'expression de la protéine Mx1 dont l'expression est induite par l'IFN de type I. Il existe une forte expression de cette protéine dans la peau des patients avec une GVHD aiguë par rapport aux patients sans GVHD aiguë, suggérant que les PDC infiltrant la peau des patients avec une GVHD aiguë sont fonctionnelles et produisent de l'IFN de type I. Comme dans la GVHD aiguë digestive nous avons évalué l'infiltration par les lymphocytes Th17 grâce à 2 marqueurs de surface : CD161 et CCR6, et ROR $\gamma$ t le facteur de transcription clé des lymphocytes Th17. Il existe une augmentation statistiquement significative du nombre de lymphocytes Th17 ROR $\gamma$ t+, CD161+ et CCR6+ dans la peau des patients avec une GVHD aiguë cutanée par rapport aux patients sans GVHD. Ces résultats viennent confirmer dans un autre organe cible de la GVHD aiguë, la peau, l'existence d'une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes Th17 et d'un lien entre les PDC et les lymphocytes Th17.

### **2-2-2-Article**

Publié dans Journal of Leukocyte Biology, 2013.

# Increased plasmacytoid dendritic cells and ROR $\gamma$ t-expressing immune effectors in cutaneous acute graft-versus-host disease

Florent Malard,<sup>\*,†,I</sup> Céline Bossard,<sup>‡,§,I</sup> Eolia Brissot,<sup>\*,†</sup> Patrice Chevallier,<sup>†</sup>  
Thierry Guillaume,<sup>†</sup> Jacques Delaunay,<sup>†</sup> Jean-François Mosnier,<sup>‡,§</sup> Philippe Moreau,<sup>\*,†,II</sup>  
Marc Grégoire,<sup>\*</sup> Béatrice Gaugler,<sup>¶,#,\*\*††,2</sup> and Mohamad Mohty<sup>\*,†,II,2,3</sup>

<sup>\*</sup>CRNCA, INSERM UMR 892, CNRS 6299, Nantes, France; <sup>†</sup>Service d'Hématologie Clinique, and <sup>‡</sup>Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, CHU, Nantes, France; <sup>§</sup>EA4273 Biometadys, Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France; <sup>¶</sup>Centre d'Investigation Clinique en Cancérologie (CI2C), Nantes, France; <sup>I</sup>INSERM UMR1098, Besançon, France; <sup>#</sup>Université de Franche-Comté, Besançon, France; <sup>\*\*</sup>EFS Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France; and <sup>II</sup>Centre d'Investigation Clinique en Biothérapie CBT506, Plateforme de Biomonitoring, Besançon, France

RECEIVED MAY 22, 2013; REVISED JULY 14, 2013; ACCEPTED AUGUST 1, 2013. DOI: 10.1189/jlb.0513295

## ABSTRACT

The role of PDCs and Th17 cells is not well understood in the pathogenesis of aGVHD. We evaluated PDC and Th17 cells in skin biopsies of 38 patients at diagnosis of aGVHD. The biopsies were tested by immunohistochemistry for the expression of BDCA2, a typical marker of PDCs. We found an increase of BDCA2 $^{+}$  cells in the skin of the patients with aGVHD. Moreover, we observed a strong expression of the type I IFN-inducible protein Mx1 in the skin of the patients with aGVHD, compared with that of those without it, suggesting that PDCs produce type I IFN. We also analyzed the expression of two Th17 surface markers—CD161 and CCR6—and ROR $\gamma$ t, the key transcription factor that orchestrates the differentiation of Th17 cells. Significantly higher numbers of ROR $\gamma$ t $^{+}$ , CD161 $^{+}$ , and CCR6 $^{+}$  cells were counted in the skin of the patients with aGVHD than in the skin of those who underwent allo-SCT and in whom aGVHD did not develop. This study provides evidence for a role of Th17-mediated responses and a potential new pathophysiological link between PDCs and Th17 in human cutaneous aGVHD.

*J. Leukoc. Biol.* **94:** 000–000; 2013.

## Introduction

aGVHD after allo-SCT is an exaggerated immune response against alloantigens that involves dysregulation of inflammatory cytokine cascades. The generation of T-cell-mediated alloimmune responses is dependent on antigen presentation, which is a cognate interaction between donor T cells and APCs. PDCs are a rare population of circulating cells specialized in the production of large amounts of type I IFN in response to viral infections [1]. Under steady-state conditions, PDCs are present in the blood stream and secondary lymphoid organs, but are normally absent from most peripheral tissues, including the skin. However, large numbers of PDCs have also been found in the skin of patients with psoriasis [2]. Moreover, it has been demonstrated in mouse models that skin injury can induce rapid infiltration of PDCs and activate them to produce IFN- $\alpha$ . Also, humans skin injury induces infiltration of PDCs and a type I IFN signature [3, 4]. Very few studies have focused on the characterization of immune cells in the target tissues of acute GVHD, especially for PDCs. In the intestinal mucosa of patients with gastrointestinal aGVHD, our group has recently shown an increase in PDCs that correlated with an increased infiltration by Th17 cells [5]. Previous studies established a major role for type I cytokine-driven effectors in aGVHD pathophysiology [6]. The contribution of Th17 has been investigated in aGVHD mouse models with conflicting results. Thus, Yi et al. [7] reported that IL-17A $^{-/-}$  T cells exacerbate aGVHD, whereas other studies of IL-17 or RORC-deficient T cells have shown that Th17 cells contribute to aGVHD [8, 9]. Furthermore, blockade of both Th1 and Th17 differentiation has been shown to be essential for preventing GVHD in mice [10]. In humans, the contribution of Th17 cells to aGVHD pathogenesis

Abbreviations: aGVHD=acute graft-versus-host-disease; allo-SCT=allogeneic stem cell transplantation; AMP=antimicrobial peptides; APC=antigen presenting cell; BDCA2=blood dendritic cell antigen 2; CCR=chemokine receptor; CD=cluster of differentiation; CHU=Centre Hospitalier et Universitaire (University Hospital); CNRS=Centre National de la Recherche Scientifique; CRNCA=Centre Régional de la Recherche en Cancérologie (Regional Center for Cancer Research, Nantes); GrB=granzyme B; IFN=interferon; IL=interleukin; INSERM=Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (National Institute of Health and Medical Research); Mx1=myxovirus resistance protein 1; PDC=plasmacytoid dendritic cell; ROR $\gamma$ t=retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t; T-bet=Th1 signature transcription factor; Th=T helper (cell); TNFR=tumor necrosis factor receptor; UMR=Unité Mixte de Recherche (Joint Research Unit)

- These authors contributed equally to this work.
- These authors share senior authorship.
- Correspondence: Service d'Hématologie Clinique, CHU Hôtel-Dieu, Université de Nantes and INSERM U892, Place Alexis Ricordeau, F-44093 Nantes, France. E-mail: mohamad.mohty@inserm.fr

remains the subject of considerable debate because of similarly conflicting results. Broady et al. [11] found a low frequency of both circulating IL17-producing cells and tissue-localized Th17 cells in cutaneous aGVHD. Conversely, Dander et al. [12] reported a significant increase of circulating Th17 cells in patients with aGVHD. Moreover, Ratajczak et al. [13] reported that the imbalance between Th17 and regulatory T cells could be correlated with the pathologic grade of aGVHD. Because PDCs have been shown to play a major role in different autoimmune diseases [14] and in triggering proinflammatory as well as Th17-related cytokines [3, 15], we attempted to characterize the PDCs and proinflammatory immune cells that infiltrate the skin of patients with cutaneous aGVHD.

## MATERIALS AND METHODS

### Study design

Thirty-eight patients who underwent allo-SCT at the University-Hospital of Nantes from June 2006 through September 2010 were included in the study. Among them, 29 (study group) had a diagnosis of cutaneous aGVHD supported by histologic examination of a skin biopsy performed at the onset of symptoms and before initiation of corticosteroid treatment. The remaining 9 patients volunteered to participate as the non-aGVHD control group. All had undergone allo-SCT, showed no sign or symptom of aGVHD, and had received histologic proof of the absence of cutaneous aGVHD. All the patients were enrolled in clinical research protocols approved by local ethics committees. Written, informed consent was obtained in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. Characteristics of the patients and donors and of allo-SCT are summarized in **Table 1**. aGVHD clinical [16] and histologic [17] grading data are summarized in **Table 2**. In this series, in all the patients engrafted in both groups, full donor chimerism was achieved at a median of 59 (range, 23–117) days after transplantation. The biopsies were identified by a numerical code; thus, when conducting the morphologic and immunohistochemical studies, the examiner did not know to which group the specimens belonged.

### Morphologic studies

One skin biopsy was analyzed for each patient. In the control group, the median time for biopsies was 35 (range, 27–50) days after allo-SCT, and in the aGVHD study group, it was 33 (range, 7–131). The skin biopsies were performed according to standard procedures, and histologic examination was performed on hematoxylin-, eosin-, safran-stained sections (**Fig. 1A**). Cutaneous aGVHD was graded according to the system described by Lerner et al. [17]. None of the patients from the control or study groups had evidence of viral infection.

### Immunohistochemical studies

Immunohistochemistry was performed on 5  $\mu\text{m}$ , formalin-fixed, paraffin-embedded sections by an indirect immunoperoxidase method. Slides were stained with the following primary antibodies: CD8 (clone C8/144B; DakoCytomation, Glostrup, Denmark), GrB (clone GrB-7; DakoCytomation), CD30 (Ber-H2; DakoCytomation), T-bet (clone 4B10; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), CD161 (clone B199.2; AbDSerotec, Colmar, France), CCR6 (clone 53.103; R&D Systems, Abingdon, UK), ROR $\gamma$ t (rabbit polyclonal antibody; Abcam, Paris, France), BDCA2 (clone 104C12.08; CliniScience, Montrouge, France), and Mx1 (rabbit polyclonal antibody; Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden). The immunologic reaction was visualized with the Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Nussloch, Germany), with 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride as the chromogen. As a negative control, the primary antibodies were omitted. A quantitative evaluation of each antigen expression was performed independently by 2 examiners (F.M. and C.B.) by counting the number of positive cells in the whole biopsy at 200 $\times$  magnification (mean, 10 fields) for each sample. For Mx1, as previously described [18], we first compared the patients with or without Mx1 expression, and in those with Mx1 expression, we used the following semiquantitative grading scale [19]: grade 0, no expression; grade 1, low expression; grade 2, medium expression; and grade 3, high expression. The semiquantitative grading of antigen expression was also performed independently by 2 examiners (F.M. and C.B.).

**TABLE 1. Patients, disease and transplant characteristics**

Characteristic	No aGVHD (n=9)	aGVHD (n=29)	P
Recipient median age, y (range)	49 (21–63)	55 (16–70)	NS
Patient sex, male/female, n (%)	5/4 (56/44)	20/9 (66/34)	NS
Donor sex, male/female, n (%)	7/2 (78/22)	15/14 (52/48)	NS
Diagnosis, n (%)			
Myeloid malignancies	3 (33)	14 (48)	
Acute myeloblastic leukemia	2 (22)	6 (21)	
Myelodysplastic syndrome	1 (11)	2 (7)	
Myeloproliferative neoplasm	0	6 (21)	
Lymphoid malignancies	5 (56)	14 (48)	
Acute lymphoblastic leukemia	2 (22)	4 (14)	NS
Non-Hodgkin lymphoma	1 (11)	4 (14)	
Hodgkin disease	1 (11)	1 (3)	
Multiple myeloma	1 (11)	2 (7)	
Chronic lymphocytic leukemia	0	2 (7)	
Prolymphocytic leukemia	0	1 (3)	
Aplastic anemia, n (%)	1 (11)	1 (3)	
Conditioning regimen, n (%)			
Myeloablative	0	9 (31)	NS
Reduced intensity	9 (100)	20 (69)	
GVHD prophylaxis, n (%)			
CyA alone	3 (33)	9 (31)	
CyA+mycophenolate mofetil	6 (67)	15 (52)	NS
CyA+methotrexate	0	5 (17)	
Graft source, n (%)			
Peripheral blood stem cells	8 (89)	19 (66)	NS
Bone marrow	0	5 (17)	
Cord blood	1 (11)	5 (17)	
Donor type, n (%)			
Matched related donor (MRD)	2 (22)	9 (31)	NS
Matched unrelated donor (MUD)	7 (78)	20 (69)	

Abbreviations: NS=not significant; CyA=cyclosporin A.

tion (mean, 10 fields) for each sample. For Mx1, as previously described [18], we first compared the patients with or without Mx1 expression, and in those with Mx1 expression, we used the following semiquantitative grading scale [19]: grade 0, no expression; grade 1, low expression; grade 2, medium expression; and grade 3, high expression. The semiquantitative grading of antigen expression was also performed independently by 2 examiners (F.M. and C.B.).

### Statistical analysis

Clinical and morphologic data, as well as the number of CD8 $^+$ , GrB $^+$ , CD30 $^+$ , T-bet $^+$ , CD161 $^+$ , CCR6 $^+$ , ROR $\gamma$ t $^+$ , and BDCA2 $^+$  cells, were entered into a

**TABLE 2. Acute GVHD grading**

Characteristic	Acute GVHD (n=29)
Overall aGVHD clinical grading, n	
No aGVHD	0
Grade I	7
Grade II	13
Grade III	5
Grade IV	4
Cutaneous aGVHD clinical grading, n	
Grade 0	0
Grade 1	4
Grade 2	10
Grade 3	15
Grade 4	0
Histological cutaneous aGVHD grading, n	
Grade 0	0
Grade 1	0
Grade 2	28
Grade 3	1
Grade 4	0
Others clinical aGVHD lesion, n	
Gastrointestinal	11
Liver	4

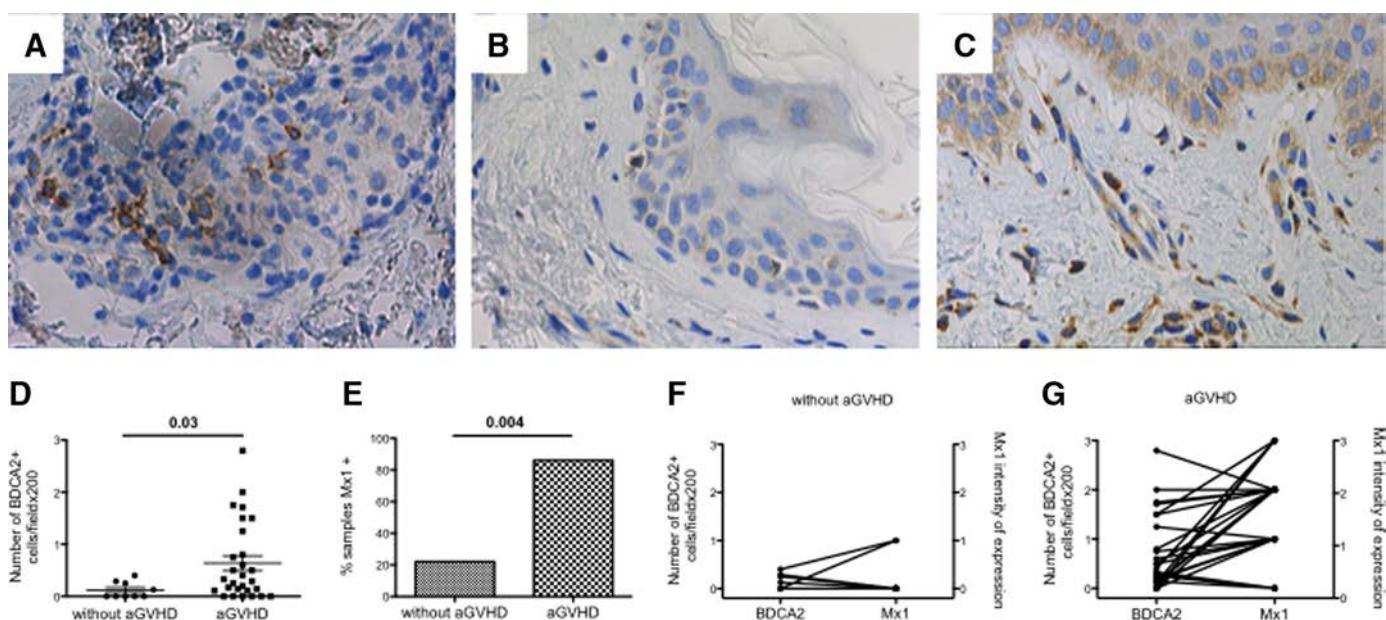
database. The Mann-Whitney nonparametric test and Fisher exact test were used to assess the correlation between the number of CD8<sup>+</sup>, GrB<sup>+</sup>, CD30<sup>+</sup>, Th1, Th17, and BDCA2<sup>+</sup> cells, as well as the expression level of Mx1 and the presence of aGVHD. For categorical variables, comparison of the aGVHD group and the control group was performed with the  $\chi^2$  test for patient and donor sex and Fisher's exact test for diagnosis, conditioning regimen, GVHD

prophylaxis, graft source, and donor type. All data were computed with GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

## RESULTS

### PDCs infiltrated the skin of patients with cutaneous aGVHD and induced type I IFN signaling

In this study, we attempt to determine the proportion of PDCs in skin biopsies of patients with or without aGVHD, by quantification of the expression of BDCA2, a typical marker of PDCs. We observed a significant increase of BDCA2<sup>+</sup> PDCs in the dermal infiltrate of the skin of the patients with aGVHD (study group) as compared with the skin of those who underwent allo-SCT and in whom aGVHD signs did not develop (control group;  $P=0.03$ ) (Fig. 1A, D). Since PDCs are the specialized producer cells of type I IFN, producing 100–1000 times more than other cell types [1], we searched for the presence of a type I IFN signature. For this purpose, we investigated whether skin PDCs were activated to produce type I IFN, by using immunohistochemistry to determine the expression of the type I IFN-inducible protein Mx1 [20]. In the control group without cutaneous aGVHD, a relatively low Mx1 expression was detected in the skin of only 2 (22%) patients, whereas in 25 (86%) of 29 patients with cutaneous aGVHD, Mx1 was expressed by mononuclear cells and endothelial cells in the dermal infiltrate ( $P=0.002$ ) (Fig. 1B, C, E). Furthermore, we found a marked correlation between the number of BDCA2<sup>+</sup> cells and the intensity of Mx1 expression in each biopsy specimen in the 2 groups of patients. Of note, in the patients without cutaneous aGVHD, the few detectable BDCA2<sup>+</sup> PDCs most likely did not secrete significant amounts of type I



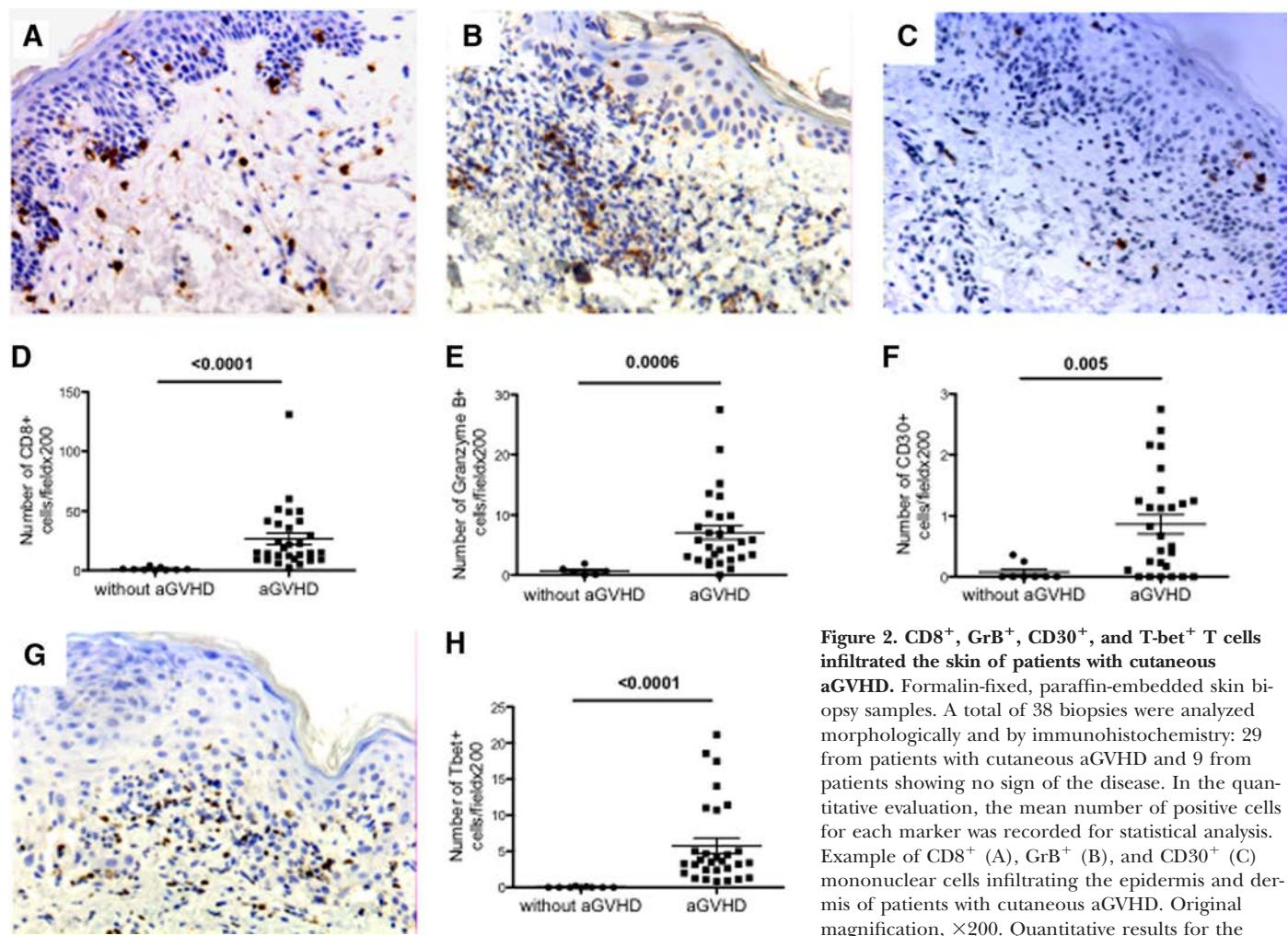
**Figure 1. PDCs infiltrated the skin of patients with cutaneous aGVHD.** Examples of BDCA2<sup>+</sup> (A) mononuclear cells infiltrating the skin of a patient with cutaneous aGVHD and examples of Mx1 expression in the skin of patients without (B) or with (C) cutaneous aGVHD are shown. Original magnification,  $\times 400$ . (D) Quantitative results for the BDCA2<sup>+</sup> cells are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (E) The percentage of samples with a significant expression of Mx1 is shown. The correlation between the number of BDCA2<sup>+</sup> cells per  $\times 200$  field and the intensity of Mx1 expression for each biopsy from patients without (F) or with (G) aGVHD are represented.

IFN, as the dermal infiltrate expressed only low levels of Mx1 or none at all (Fig. 1F). Because it has been demonstrated in mouse models that skin injury induces rapid infiltration of PDCs and activates them to produce IFN- $\alpha$  [3, 4], we assumed, as did Gregorio et al. [3] in humans with psoriasis, that IFN- $\alpha$  is produced by PDCs. Conversely, in patients with diagnosed cutaneous aGVHD, even a relatively low number of BDCA2 $^{+}$  PDCs induced type I IFN signaling, as suggested by the strong expression of Mx1 in the dermal infiltrate (Fig. 1G).

### Cytotoxic and effectors T cells in the skin of patients with cutaneous aGVHD

As PDCs have been shown to promote proinflammatory responses in injured skin, we assessed the presence of the cellular effectors usually encountered and previously described in the skin of patients with aGVHD [21]. We found that the number of CD8 $^{+}$  T cells was significantly increased in the dermal infiltrate of the skin in the patients with cutaneous aGVHD, as compared with the control group of without

signs of the disease ( $P<0.0001$ ) (Fig. 2 A, D). The number of cells positive for GrB, a well-established marker of cytotoxic T cells, was also increased in the dermal infiltrate of the skin of the patients with aGVHD, compared with those without it ( $P<0.0006$ ) (Fig. 2B, E). We found an increased number of T cells that expressed T-bet (the transcription factor characteristic of Th1 cells) in the skin infiltrate of the patients with aGVHD, compared with those without it ( $P<0.0001$ ) (Fig. 2G, H). We also focused on the analysis of CD30, a cell membrane protein of the tumor necrosis factor (TNFR) superfamily expressed on activated CD3 $^{+}$  T cells and upregulated in T cells when exposed to alloantigenic antigens [22]. We observed that the absolute number of CD30 $^{+}$  lymphocytes was significantly higher in the dermal infiltrate of the skin of the patients with aGVHD, compared with those without it ( $P=0.005$ ) (Fig. 2C, F). Thus, the accumulation of cytotoxic and activated CD30 $^{+}$  T cells reflected an activated immune status in the skin of the patients with aGVHD.



**Figure 2. CD8 $^{+}$ , GrB $^{+}$ , CD30 $^{+}$ , and T-bet $^{+}$  T cells infiltrated the skin of patients with cutaneous aGVHD.** Formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy samples. A total of 38 biopsies were analyzed morphologically and by immunohistochemistry: 29 from patients with cutaneous aGVHD and 9 from patients showing no sign of the disease. In the quantitative evaluation, the mean number of positive cells for each marker was recorded for statistical analysis. Example of CD8 $^{+}$  (A), GrB $^{+}$  (B), and CD30 $^{+}$  (C) mononuclear cells infiltrating the epidermis and dermis of patients with cutaneous aGVHD. Original magnification,  $\times 200$ . Quantitative results for the CD8 $^{+}$  (D), GrB $^{+}$  (E), and CD30 $^{+}$  (F) cells are expressed as the mean  $\pm$  SEM for each group. (G) Example of T-bet $^{+}$  cells infiltrating the epidermis and dermis of a patient with cutaneous aGVHD. Original magnification,  $\times 200$ . (H) Quantitative results for the T-bet $^{+}$  cells are shown as the mean  $\pm$  SEM for each group.

expressed as the mean  $\pm$  SEM for each group. (G) Example of T-bet $^{+}$  cells infiltrating the epidermis and dermis of a patient with cutaneous aGVHD. Original magnification,  $\times 200$ . (H) Quantitative results for the T-bet $^{+}$  cells are shown as the mean  $\pm$  SEM for each group.

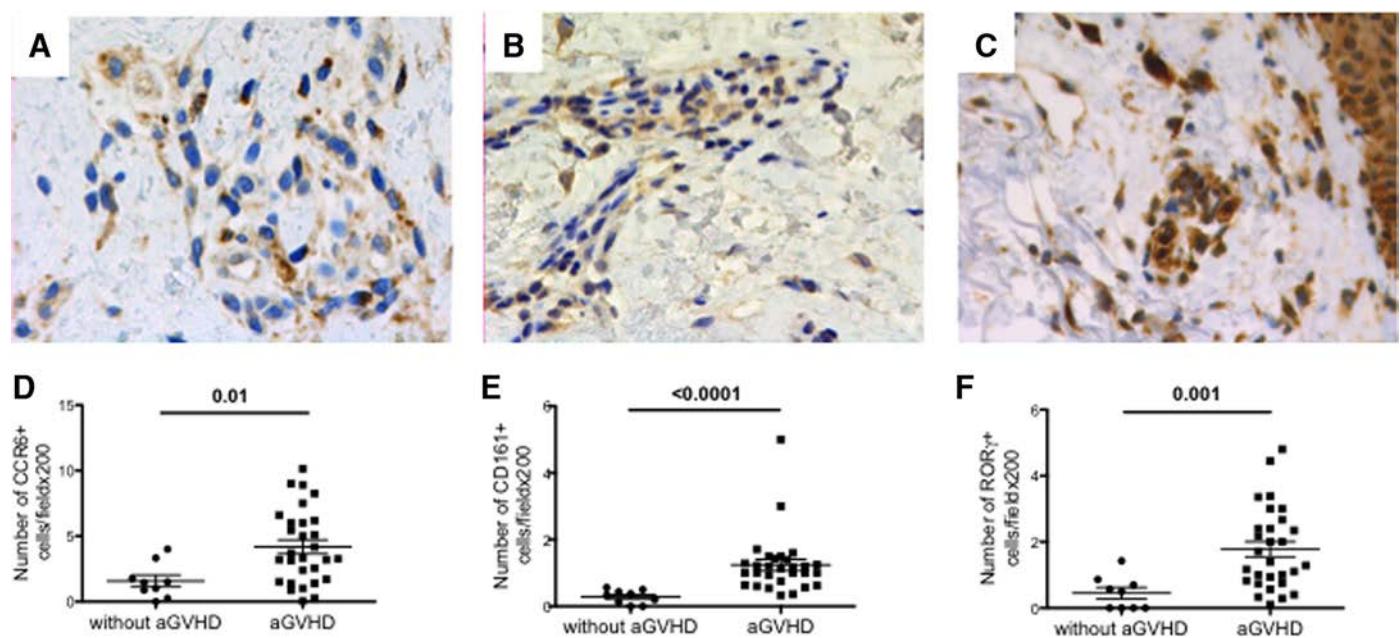
### Th17 cells infiltrated the skin of patients with cutaneous aGVHD

Results in mouse studies have suggested that Th17 cells are critical in the skin injury that occurs in aGVHD [9, 23]. Also, mouse studies have shown that PDC depletion before skin injury inhibits type-17 cytokines, including IL-17 and -22 [3]. Thus, we hypothesized that Th17 cells would preferentially accumulate in the skin of the patients with aGVHD. For the purpose of Th17 cell identification, we used the mucosal chemokine receptor CCR6 [24] and the C-type lectin-like receptor CD161, which are both well-established markers of human Th17 cells [25]. Thus, we could show that the absolute number of CD161<sup>+</sup> and CCR6<sup>+</sup> cells was significantly higher in the dermal infiltrate of the skin of the patients with aGVHD than in those without it ( $P<0.0001$  and  $P=0.01$ , respectively) (Fig. 3 A, B, D, E). To further confirm Th17 cell infiltration, we also assessed the expression of ROR $\gamma$ t, the key transcription factor that orchestrates the differentiation of Th17 cells [26]. In keeping with the increase in CCR6<sup>+</sup> and CD161<sup>+</sup> cells, ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells (with nuclear staining) were significantly increased in the skin infiltrate of the patients with aGVHD, when compared with those without it ( $P=0.001$ ) (Fig. 3C, F).

## DISCUSSION

The current study sheds light on the role of PDCs and Th17 cells in the context of cutaneous aGVHD. Using well-established, specific markers, we showed that in the skin of patients with aGVHD, compared with that of patients without it, the number of BDCA2<sup>+</sup> PDCs was significantly increased; the infiltration of the skin by PDCs was associated with a type-I IFN signature; and

the number of ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> infiltrating cells increased significantly. At present, the controversy continues regarding the role of Th17 cells in the pathogenesis of human aGVHD. Ratajczak et al. [13] focused on gastrointestinal aGVHD and did not find an association between CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T cells and the onset of human aGVHD. Their study was based on the *in situ* detection of IL-17 by CD4<sup>+</sup> cells. However, recent *in vivo* studies in mice have shown that IL-17 production could be shut off in the course of inflammatory immune responses [27]. Also, one should acknowledge that different conditioning and immunosuppressive regimens, stem cell sources, and disease features may explain the differences between the studies. In our study, we elected not to use skin biopsies from healthy controls, but rather from patients without aGVHD who had undergone allo-SCT, to create the optimal comparative setting by avoiding biases such as the use of systemic immunosuppressive therapy in only one arm of the cohort. Broady et al. [11] did not find an association between Th17 cells and the onset of human cutaneous aGVHD. However, they examined only 7 cases and used very specific experimental conditions, including *in vitro* culture of dermal cells. It is not clear whether alloreactive Th17 cells would maintain their phenotype after 3 weeks of culture, especially in the absence of polarizing cytokines, which were not added. Indeed, the Th17 phenotype is unstable, and Th17 cells may convert to Th1 cells after a long-term culture period [28]. Van der Waart et al. [29] recently published that functional CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> coexpressing T cells disappear from the circulation and home to GVHD-affected tissue sites. Our study confirms and strengthens the results of analyses of the expression of ROR $\gamma$ t, the key transcription factor of Th17 cells. However, in this study, we could not exclude the possibility that ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells are not truly Th17 cells. Indeed, a skin-invading



**Figure 3. Th17 cells infiltrated the skin of patients with cutaneous aGVHD.** Example of CCR6<sup>+</sup> (A), CD161<sup>+</sup> (B), and ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> (C) mononuclear cells infiltrating the epidermis and dermis of patients with cutaneous aGVHD. Original magnification,  $\times 400$ . Quantitative results for CCR6<sup>+</sup> (D), CD161<sup>+</sup> (E), and ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> (F) cells are expressed as the mean  $\pm$  SEM for each group.

population of innate lymphocytes and  $\gamma\delta$  T cells expressing ROR $\gamma$ t has been identified in an experimental psoriasis model and is involved in the initiation of psoriatic plaque formation [30]. It remains to be established whether such cell populations are involved in human diseases.

Our results suggest a potential new pathophysiological link between PDCs and the Th17 response, in the context of cutaneous aGVHD, most likely through the production of type I IFN. Our group has published a report that PDC levels were decreased in the blood of patients with aGVHD [31], and our results provide evidence that this decrease is related to infiltration of aGVHD target tissues by PDCs. Our findings support a cutaneous aGVHD induction model that can mimic data from autoimmune diseases, where recruited PDCs in GVHD target tissues after local damage (e.g., a conditioning regimen) can promote the production of Th17 cytokines, as the induction of Th17-related cytokines is abrogated in PDC-depleted mice [3, 4]. This is consistent with studies showing that PDCs can drive the differentiation of Th17 cells [15]. Moreover, type I IFN produced by PDCs after stimulation with a TLR7 agonist could drive Th17 responses in vivo [32].

In our study, we also assessed the presence of CD30 $^+$  T cells in the skin of patients with cutaneous aGVHD. CD30 is preferentially expressed by activated or memory Th cells, and its ligand (CD30L; CD153) belongs to the TNF superfamily and is expressed on a large spectrum of immune cells, including PDCs [33]. Studies in mice indicated that the CD30/CD30L interaction could contribute to the CD4 $^+$  T cell-mediated aGVHD, as the number of CD4 $^+$  T cells in aGVHD target organs decreased when the CD30/CD30L interaction was blocked [34]. To our knowledge, this is the first demonstration of the infiltration of the skin by CD30 $^+$  T cells in cutaneous aGVHD. This result is in accordance with those of Chen et al. [35] showing an increase of CD30 $^+$  T cells in the blood and in the intestinal mucosa of patients with gastrointestinal aGVHD. Although CD30 is normally expressed on the well-known Th1 and Th2 cells, a recent study in mice showed that not only is CD30 expressed on Th17 cells, but also that the CD30–CD30L interaction plays a critical role in the differentiation of these cells [36]. Thus, the functional consequences of the interaction of CD30 $^+$  T cells with PDCs remain to be investigated in the context of aGVHD. Furthermore, the finding that CD30 $^+$  T cells infiltrate the skin in cutaneous aGVHD is an encouraging result, given that several clinical trials evaluating the effectiveness of brentuximab vedotin, a CD30-specific antibody-conjugated drug, in aGVHD prophylaxis are currently ongoing.

Although the exact mechanism that links type I IFN production to PDC-mediated Th17 responses is still unclear in aGVHD, data described in this paper do not contradict the established role of Th1 cells in aGVHD pathophysiology [21]. In fact, human Th17 cells may exhibit a close developmental relationship with Th1 cells [28]. A likely scenario would involve AMPs, which bind extracellular self-DNA fragments into aggregated particles that enter PDCs and trigger robust type I IFN production [37]. Of note, the AMP elafin is increased in the skin biopsies and serum of patients with aGVHD [38]. Persistent overexpression of these AMPs may lead to uncontrolled

type I IFN responses, as already reported in some autoimmune diseases [28, 39].

## CONCLUSIONS

In conclusion, our study provides a framework for a role for PDCs and Th17-mediated responses in human cutaneous aGVHD, raising the prospect of future innovative approaches to optimizing immunosuppression regimens for the treatment or prophylaxis of aGVHD by targeting PDCs and the Th17 response. Our findings thus support a compelling rationale for designing clinical trials in this setting, based on a current trial aiming to block the Th17 response by using anti-IL-17 monoclonal antibodies in autoimmune diseases [40].

## AUTHORSHIP

M.M., B.G., C.B., and F.M. contributed to the conception and design of the study; M.M., B.G., and M.G. obtained financial support; M.M., B.G., and M.G., provided administrative and logistic support; E.B., P.C., T.G., J.D., P.M., and M.M. provided biological material and patient care; F.M. and C.B. performed the experimental work; F.M., E.B., and M.M. collected and assembled the clinical data; F.M., C.B., M.M., and B.G. performed and data analysis and interpreted the results; and F.M., M.M., C.B., and B.G. wrote the manuscript. All authors approved the final manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

E.B. and F.M. were supported by educational grants from the Association for Training, Education and Research in Hematology, Immunology and Transplantation (ATERHIT). This work was supported by funding as part of the CESTI (European Clinical Center for Transplantation Sciences) project (Nantes, France). We also thank the Région Pays de Loire, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC grant 3175 to M.M. and B.G.), the Fondation de France, the Fondation contre la Leucémie, the Agence de Biomédecine, the Association CentpourSang la Vie, the Association Laurette Fugain, the IRGNET and the Ligue Contre le Cancer (Comités Grand-Ouest), for their generous and continuous support for our clinical and basic research work. Our transplant programs are supported by several grants from the French National Cancer Institute (PHRC, INCa to M.M.) The authors acknowledge the technical and logistical support of S. Blandin, C. Deleine, S. Leclercq, and V. Dehame. We thank the nursing staff for providing excellent care for our patients, and the physicians, N. Blin, A. Clavert, V. Dubruille, T. Gastinne, J.L. Harousseau, S. Le Gouill, B. Mahe, F. Mechinaud, and F. Rialland, for their dedicated patient care. M.M. thanks Professor J. V. Melo (Adelaide, Australia) for critical reading of the manuscript and for helpful discussions.

## DISCLOSURES

The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., Colonna, M. (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* **5**, 919–923.
- Gilliet, M., Conrad, C., Geiges, M., Cozzio, A., Thurlimann, W., Burg, G., Nestle, F. O., Dummer, R. (2004) Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Arch. Dermatol.* **140**, 1490–1495.
- Gregorio, J., Meller, S., Conrad, C., Di Nardo, A., Homey, B., Lauerman, A., Arai, N., Gallo, R. L., Digiovanni, J., Gilliet, M. (2010) Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J. Exp. Med.* **207**, 2921–2930.
- Guiducci, C., Tripodo, C., Gong, M., Sangaletti, S., Colombo, M. P., Coffman, R. L., Barrat, F. J. (2010) Autoimmune skin inflammation is dependent on plasmacytoid dendritic cell activation by nucleic acids via TLR7 and TLR9. *J. Exp. Med.* **207**, 2931–2942.
- Bossard, C., Malaré, F., Arbez, J., Chevallier, P., Guillaume, T., Delauw, J., Mosnier, J. F., Tiberghein, P., Saas, P., Mohty, M., Gaugler, B. (2012) Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Leukemia* **26**, 1471–1474.
- Holler, E., Kolb, H. J., Mittermuller, J., Kaul, M., Ledderose, G., Duell, T., Seeber, B., Schleuning, M., Hintermeier-Knabe, R., Ertl, B., et al. (1995) Modulation of acute graft-versus-host-disease after allogeneic bone marrow transplantation by tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) release in the course of pretransplant conditioning: role of conditioning regimens and prophylactic application of a monoclonal antibody neutralizing human TNF alpha (MAK 195F). *Blood* **86**, 890–899.
- Yi, T., Zhao, D., Lin, C. L., Zhang, C., Chen, Y., Todorov, I., LeBon, T., Kandeel, F., Forman, S., Zeng, D. (2008) Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood* **112**, 2101–2110.
- Kappel, L. W., Goldberg, G. L., King, C. G., Suh, D. Y., Smith, O. M., Ligh, C., Holland, A. M., Grubin, J., Mark, N. M., Liu, C., Iwakura, Y., Heller, G., van den Brink, M. R. (2009) IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood* **113**, 945–952.
- Carlson, M. J., West, M. L., Coghill, J. M., Panoskalsis-Mortari, A., Blazar, B. R., Serody, J. S. (2009) In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood* **113**, 1365–1374.
- Yu, Y., Wang, D., Liu, C., Kaosaard, K., Semple, K., Anasetti, C., Yu, X. Z. (2011) Prevention of GVHD while sparing GVL effect by targeting Th1 and Th17 transcription factor T-bet and RORgammat in mice. *Blood* **118**, 5011–5020.
- Broady, R., Yu, J., Chow, V., Tantiworawit, A., Kang, C., Berg, K., Martinka, M., Ghoreishi, M., Dutz, J., Leving, M. K. (2010) Cutaneous GVHD is associated with the expansion of tissue-localized Th1 and not Th17 cells. *Blood* **116**, 5748–5751.
- Dander, E., Balduzzi, A., Zappa, G., Lucchini, G., Perseghin, P., Andre, V., Todisco, E., Rahal, D., Migliavacca, M., Longoni, D., Solinas, G., Villa, A., Berti, E., Mina, P. D., Parma, M., Allavena, P., Biagi, E., Rovelli, A., Biondi, A., D'Amico, G. (2009) Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* **88**, 1261–1272.
- Ratajczak, P., Janin, A., Peffault de Latour, R., Leboeuf, C., Desveaux, A., Keyvanfar, K., Robin, M., Clave, E., Douay, C., Quinquel, A., Pichereau, C., Bertheau, P., Mary, J. Y., Socie, G. (2010) Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood* **116**, 1165–1171.
- Swiecki, M., and Colonna, M. (2010) Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol. Rev.* **234**, 142–162.
- Yu, C. F., Peng, W. M., Oldenburg, J., Hoch, J., Bieber, T., Limmer, A., Hartmann, G., Barchet, W., Eis-Hubinger, A. M., Novak, N. (2010) Human plasmacytoid dendritic cells support Th17 cell effector function in response to TLR7 ligation. *J. Immunol.* **184**, 1159–1167.
- Glucksberg, H., Storb, R., Fefer, A., Buckner, C. D., Neiman, P. E., Clift, R. A., Lerner, K. G., Thomas, E. D. (1974) Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* **18**, 295–304.
- Lerner, K. G., Kao, G. F., Storb, R., Buckner, C. D., Clift, R. A., Thomas, E. D. (1974) Histopathology of graft-vs.-host reaction (GvHR) in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplant. Proc.* **6**, 367–371.
- Ghoreishi, M., Martinka, M., Dutz, J. P. (2010) Type I interferon signature in the scalp lesions of alopecia areata. *Br. J. Dermatol.* **163**, 57–62.
- Scheler, M., Wenzel, J., Tuting, T., Takikawa, O., Bieber, T., von Bubnoff, D. (2007) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): the antagonist of type I interferon-driven skin inflammation? *Am. J. Pathol.* **171**, 1936–1943.
- Aebi, M., Fah, J., Hurt, N., Samuel, C. E., Thomis, D., Bazzigher, L., Pavlovic, J., Haller, O., Staeheli, P. (1989) cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol. Cell Biol.* **9**, 5062–5072.
- Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P., Holler, E. (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet* **373**, 1550–1561.
- Martinez, O. M., Villanueva, J., Abtahi, S., Beatty, P. R., Esquivel, C. O., Krams, S. M. (1998) CD30 expression identifies a functional alloreactive human T-lymphocyte subset. *Transplantation* **65**, 1240–1247.
- Cheng, H., Tian, J., Li, Z., Zeng, L., Pan, B., Song, G., Chen, W., Xu, K. (2012) TH17 cells are critical for skin-specific pathological injury in acute graft-versus-host disease. *Transplant. Proc.* **44**, 1412–1418.
- Acosta-Rodriguez, E. V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Napolitani, G. (2007) Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* **8**, 639–646.
- Kleinschek, M. A., Boniface, K., Sadekova, S., Grein, J., Murphy, E. E., Turner, S. P., Raskin, L., Desai, B., Faubion, W. A., de Waal Malefyt, R., Pierce, R. H., McClanahan, T., Kastelein, R. A. (2009) Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **206**, 525–534.
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., Littman, D. R. (2006) The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ T directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 $+$  T helper cells. *Cell* **126**, 1121–1133.
- Hirota, K., Duarte, J. H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D. J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., Garefalaki, A., Potocnik, A. J., Stockinger, B. (2011) Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat. Immunol.* **12**, 255–263.
- Nistala, K., Adams, S., Cambrook, H., Ursu, S., Olivito, B., de Jager, W., Evans, J. G., Cimaz, R., Bajaj-Elliott, M., Wedderburn, L. R. (2010) Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14751–14756.
- Van der Waart, A. B., van der Velden, W. J., van Halteren, A. G., Leenders, M. J., Feuth, T., Blijlevens, N. M., van der Voort, R., Dolstra, H. (2012) decreased levels of circulating IL17-producing CD161(+)CCR6(+) T cells are associated with graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS. One.* **7**, e50896.
- Pantelyushin, S., Haak, S., Ingold, B., Kulig, P., Heppner, F. L., Navarini, A. A., Becher, B. (2012) Rorgammat+ innate lymphocytes and gammadelta T cells initiate psoriasisiform plaque formation in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 2252–2256.
- Mohty, M., Blaise, D., Faucher, C., Bardou, V. J., Gastaut, J. A., Viens, P., Olive, D., Gaugler, B. (2005) Impact of plasmacytoid dendritic cells on outcome after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* **19**, 1–6.
- Van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., Cornelissen, F., Mus, A. M., Florencia, E., Prens, E. P., Lubberts, E. (2009) Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J. Immunol.* **182**, 5836–5845.
- Zeiser, R., Nguyen, V. H., Hou, J. Z., Beilhack, A., Zambricki, E., Bues, M., Contag, C. H., Negrin, R. S. (2007) Early CD30 signaling is critical for adoptively transferred CD4+CD25+ regulatory T cells in prevention of acute graft-versus-host disease. *Blood* **109**, 2225–2233.
- Blazar, B. R., Levy, R. B., Mak, T. W., Panoskalsis-Mortari, A., Muta, H., Jones, M., Roskos, M., Serody, J. S., Yagita, H., Podack, E. R., Taylor, P. A. (2004) CD30/CD30 ligand (CD153) interaction regulates CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease. *J. Immunol.* **173**, 2933–2941.
- Chen, Y. B., McDonough, S., Hasserjian, R., Chen, H., Coughlin, E., Illiano, C., Park, I. S., Jagasia, M., Spitzer, T. R., Cutler, C. S., Soiffer, R. J., Ritz, J. (2012) Expression of CD30 in patients with acute graft-versus-host disease. *Blood* **120**, 691–696.
- Sun, X., Yamada, H., Shibata, K., Muta, H., Tani, K., Podack, E. R., Yoshikai, Y. (2010) CD30 ligand/CD30 plays a critical role in Th17 differentiation in mice. *J. Immunol.* **185**, 2222–2230.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetto, V., Chatterjee, B., Wang, Y. H., Homey, B., Cao, W., Su, B., Nestle, F. O., Zal, T., Mellman, I., Schroder, J. M., Liu, Y. J., Gilliet, M. (2007) Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* **449**, 564–569.
- Paczesny, S., Braun, T. M., Levine, J. E., Hogan, J., Crawford, J., Coffing, B., Olsen, S., Choi, S. W., Wang, H., Faca, V., Pitteri, S., Zhang, Q., Chin, A., Kitko, C., Mineishi, S., Yanik, G., Peres, E., Hanauer, D., Wang, Y., Reddy, P., Hanash, S., Ferrara, J. L. (2010) Elafin is a biomarker of graft-versus-host disease of the skin. *Sci. Transl. Med.* **2**, 13ra2.
- Ganguly, D., Chamilos, G., Lande, R., Gregorio, J., Meller, S., Facchinetto, V., Homey, B., Barrat, F. J., Zal, T., Gilliet, M. (2009) Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J. Exp. Med.* **206**, 1983–1994.
- Leonardi, C., Matheson, R., Zachariae, C., Cameron, G., Li, L., Edson-Heredia, E., Braun, D., Banerjee, S. (2012) Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1190–1199.

## KEY WORDS:

allogeneic stem cell transplantation · Th17 cells · Type I Interferon

### **3-Discussion**

Le rôle des lymphocytes Th17 est clairement établi dans la physiopathologie de certaines maladies auto-immunes ou auto-inflammatoires chez l'homme telles que le psoriasis ou la maladie de Crohn<sup>141</sup>. De plus des études réalisées dans des modèles murins d'allo-CSH ont mis en évidence une infiltration des organes cibles de la GVHD aiguë par les lymphocytes Th17. Nous avons donc émis l'hypothèse que les lymphocytes Th17 ont un rôle clé dans la physiopathologie de la GVHD aiguë et s'accumulent dans les tissus cibles tels que la peau ou la muqueuse digestive.

Dans un premier temps, on a voulu confirmer l'infiltration des tissus cibles de la GVHD par les cellules immunitaires effectrices qui avaient été identifiées comme étant responsables de la GVHD aiguë. Ainsi on retrouve dans la peau et le tube digestif des patients avec une GVHD significativement plus de lymphocytes CD8+ et GrB+, attestant de la présence de lymphocytes T cytotoxiques et NK à l'origine de la destruction tissulaire observée dans la GVHD<sup>69</sup>. Nos résultats confirment également l'implication des lymphocytes Th1 dans la physiopathologie de la GVHD aiguë : il existe une infiltration des tissus cibles par des cellules exprimant Tbet le facteur de transcription spécifique des lymphocytes Th1<sup>219</sup>. En utilisant 2 marqueurs des lymphocytes Th17, CCR6 et CD161, et RORyt, le facteur de transcription clé des lymphocytes Th17, nous avons mis en évidence une infiltration des lymphocytes Th17 dans la muqueuse digestive et la peau des patients à la phase précoce d'une GVHD aiguë.

Du fait que les PDC, cellules professionnelles pour la sécrétion d'IFN de type I, jouent un rôle majeur dans différentes maladies auto-immunes<sup>220, 221</sup> et auto-inflammatoires<sup>222</sup> et dans le déclenchement des cytokines liées à Th17<sup>195, 196, 223</sup>, nous avons ensuite voulu explorer leur contribution dans la physiopathologie de la GVHD aiguë. On a mis en évidence une infiltration par les PDC de la peau et de la muqueuse intestinale des patients avec une GVHD aiguë, suggérant un lien physiopathologique entre les PDC et les Th17 dans le contexte de la GVHD aiguë digestive et cutanée. De plus l'infiltration de la peau par les PDC s'accompagne d'une signature IFN de type I, attestée par la forte expression

de la protéine induite par l'IFN de type I, Mx1, suggérant que les PDC sont fonctionnelles et produisent de l'IFN de type I.

La controverse existe toujours sur le rôle des lymphocytes Th17 dans la physiopathologie de la GVHD aiguë chez l'homme. Broady *et coll.* ne met pas en évidence d'augmentation des Th17 dans la peau des patients lors de la survenue d'une GVHD aiguë cutanée mais confirmait le rôle des lymphocytes Th1<sup>173</sup>. Dans cette étude, le conditionnement, la prophylaxie de la GVHD ou encore la source de cellules souches sont différents de notre étude. De plus Broady *et coll.* s'appuie sur un effectif de patients beaucoup plus restreint : seulement 7 malades avec une GVHD aiguë, et des conditions expérimentales très spécifiques avec une étape de culture *in vitro* des cellules du derme. Il n'est pas certain que les lymphocytes Th17 vont conserver leur phénotype à l'issue de 3 semaines de culture, surtout en l'absence de cytokines polarisantes, qui n'étaient pas ajoutées. En effet le phénotype Th17 est instable et les lymphocytes Th17 peuvent se transformer en lymphocytes Th1 après une longue période de culture<sup>224</sup>. Ratajczak *et coll.* se sont attachés à définir les contributions relatives des lymphocytes Th17 et Treg dans la physiopathologie de la GVHD aiguë cutanée et digestive<sup>174</sup>. Il n'y a pas dans cette étude d'infiltrat significatif par les lymphocytes Th17 dans la peau et la muqueuse digestive des patients avec une GVHD aiguë. Dans cette étude, l'identification des lymphocytes Th17 était basée sur la détection *in situ* de cellules CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>. Cependant il a été récemment mis en évidence dans une étude *in vivo* chez la souris que la production d'IL-17 peut être complètement arrêtée lors d'une réponse inflammatoire<sup>225</sup>. De même, les conditionnements et les traitements immunosuppresseurs sont très différents dans l'étude de Ratajczak *et coll.* avec une majorité de conditionnement myéloablatifs par rapport à notre étude. Cela peut expliquer les différences observées entre les 2 études. De plus dans notre étude nous avons choisi de ne pas utiliser des biopsies de donneurs sains mais des biopsies de patients ayant eu une allo-CSH qui n'ont pas développé de GVHD afin d'obtenir un groupe contrôle optimal et d'éviter certains biais comme l'utilisation d'immunosuppresseurs dans un seul groupe.

Van der Waart *et coll.*<sup>226</sup> ont récemment montré que des lymphocytes T CD161<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> disparaissaient de la circulation sanguine pour infiltrer les tissus

cibles de la GVHD aiguë. Notre étude vient confirmer et même renforcer ces résultats grâce à l'utilisation de ROR $\gamma$ t le facteur de transcription clé des lymphocytes Th17. La diminution des lymphocytes Th17 dans le sang circulant rapportée dans l'étude de Van der Waart *et coll.*<sup>226</sup> s'accompagne d'une infiltration par les lymphocytes Th17 dans les tissus cibles de la GVHD aiguë mise en évidence dans notre étude. On peut supposer que les lymphocytes Th17 infiltrent précocement les tissus dans la GVHD aiguë et, la plasticité entre les lymphocytes Th17 et Th1 étant bien établie<sup>145</sup>, se différencient en lymphocytes Th1 ensuite, rendant leur détection difficile lorsque les biopsies sont réalisées tardivement. Nous ne pouvons exclure que les cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> ne soient pas réellement des lymphocytes Th17, en effet il existe une sous population d'ILC, les ILC de type 3 caractérisées par l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, qui produisent de l'IL-17 et l'IL-22 comme les lymphocytes Th17<sup>227</sup>. De même une population de lymphocytes T $\gamma$ δ produisant de l'IL-17 et exprimant le facteur de transcription ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> a été mise en évidence chez l'homme et la souris<sup>228</sup>. La découverte de ces cellules a conduit à réexplorer les pathologies où un rôle pathogène des cellules produisant de l'IL-17 avait été mis en évidence. Ainsi, une infiltration de la peau par des ILC et des lymphocytes T $\gamma$ δ exprimant ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> a été mise en évidence dans un modèle murin de psoriasis et est impliquée dans la formation de la plaque de psoriasis<sup>229</sup>. De même, le rôle pathogène des ILC produisant de l'IL-17 dans la colite est suggéré dans plusieurs modèles murins<sup>230, 231</sup>. Chez l'homme des arguments suggèrent également la présence des ILC IL17<sup>+</sup> dans la maladie de Crohn<sup>232</sup>, cependant le nombre absolu de ces cellules reste très faible et il n'est pas encore certain que ces cellules jouent un rôle dans la survenue de la maladie de Crohn. Ainsi, il apparaît que nous ne pouvons affirmer avec certitude que les cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> que nous avons identifié sont des lymphocytes Th17, mais peut être des ILC de type 3, IL-17<sup>+</sup> ou des lymphocytes T $\gamma$ δ, populations lymphocytaires produisant également de l'IL-17 et de l'IL-22. De plus il existe de plus en plus d'arguments suggérant que le rôle délétère de ces cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> dans la GVHD serait lié, au moins en partie, à la sécrétion d'IL-22. L'IL-22 peut avoir à la fois un rôle protecteur ou pathogène dans les maladies auto-inflammatoire en fonction du tissu et de l'environnement cytokinique. Hanash *et coll.*<sup>233</sup> a ainsi montré que l'IL-22 produite par les ILC du

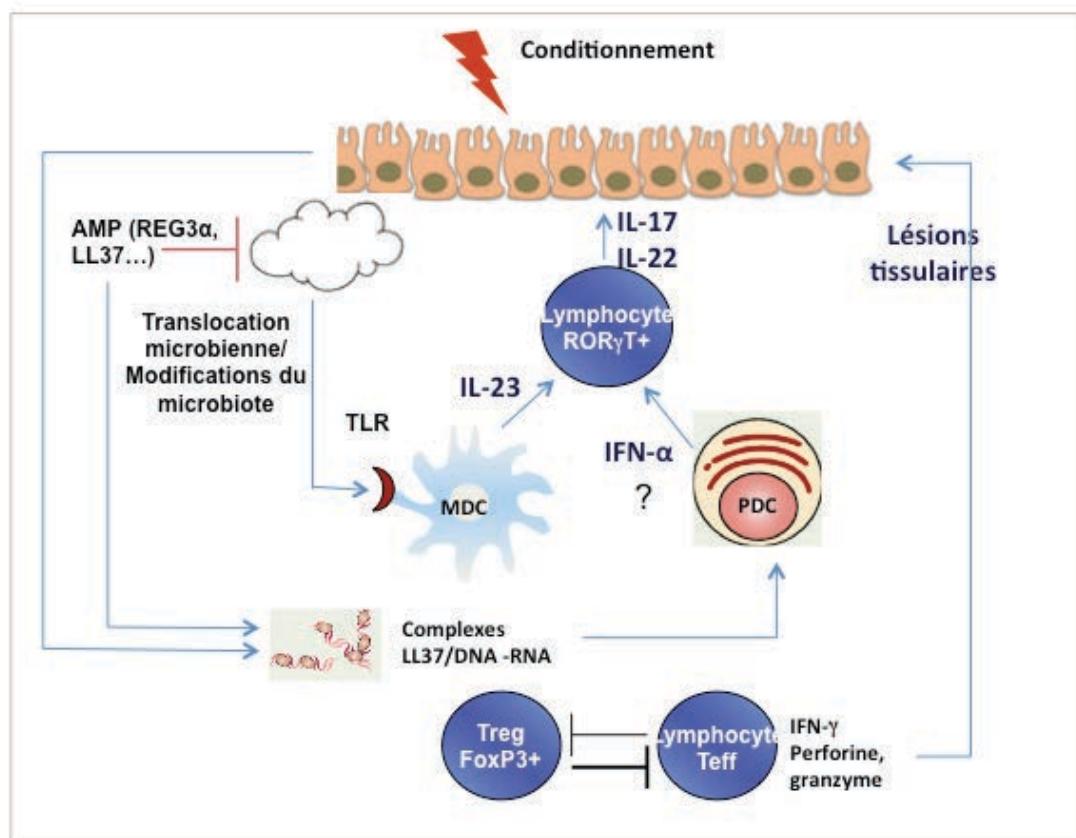
receveur diminuait la GVHD digestive et la mortalité des souris en protégeant les cellules souches intestinales. En revanche, nous avons montré dans un modèle murin que le rôle clé de l'IL-22 d'origine donneur contribuait à l'exacerbation des lésions de GVHD, soulignant que selon l'origine donneur ou receveur une même cytokine peut avoir des effets opposés sur la GVHD (**annexe 6-2, article 4**)<sup>234</sup>. L'environnement pro-inflammatoire lié à l'allo-CSH et au conditionnement favorise probablement un effet pathogène et non tissu protecteur de l'IL-22.

Nos résultats suggèrent un nouveau lien physiopathologique entre les PDC et la réponse Th17 dans le contexte de la GVHD aiguë digestive et cutanée, probablement via la sécrétion d'IFN de type I. Notre groupe a publié il y a quelques années que le nombre de PDC diminuait dans le sang des patients avec une GVHD aiguë, et notre étude montre que cette diminution est liée à l'infiltration des tissus cibles de la GVHD, peau et tube digestif, par les PDC. D'un point de vue physiopathologique, nos données suggèrent que l'induction de la GVHD aiguë digestive ou cutanée miment certaines maladies auto-immunes<sup>203, 220, 223, 235</sup> ou auto-inflammatoires<sup>222</sup> où les PDC, recrutées au niveau des tissus cibles de la GVHD suite aux dommages tissulaires (i.e. le conditionnement), peuvent induire la production des cytokines liées à Th17. En effet l'induction des cytokines liées à Th17 est bloquée dans un modèle animal de souris déplétée en PDC<sup>223</sup>. Ceci est cohérent avec des études montrant que les PDC peuvent induire la différenciation des cellules Th17<sup>195, 196</sup>. De plus, l'IFN de type I produit par les PDC après stimulation par les agonistes du TLR7 peut induire une réponse Th17 *in vivo*<sup>236</sup>. Bien que le mécanisme exact reliant la production d'IFN de type I par les PDC à la réponse Th17 dans la GVHD n'est pas clair, les données décrites dans cette étude ne contredisent pas le rôle bien établi des lymphocytes Th1 dans la physiopathologie de la GVHD aiguë<sup>117</sup>. En effet la plasticité entre les lymphocytes Th17 et Th1 est bien établie<sup>145</sup>.

L'impact du microbiote digestif sur la GVHD est bien connu. En effet, dès les années 1970, des études murines ont montré une diminution de la GVHD après décontamination digestive par antibiotiques<sup>237</sup> ou lorsque la transplantation est réalisée en l'absence de germes<sup>238</sup>. Cela avait conduit la communauté médicale à développer des protocoles de décontamination digestive chez les patients recevant une allo-CSH<sup>239</sup>. Si les premiers résultats

étaient prometteurs, les études suivantes n'ont pas permis de confirmer ces résultats<sup>240</sup>, conduisant à l'arrêt de la décontamination digestive des patients dans la plupart des centres d'allo-CSH, même si la controverse persiste. Jusqu'à récemment, la nécessité de recourir aux techniques de culture microbiologique pour caractériser la composition de la flore a limité ces études. La mise au point de techniques indépendantes de la culture, telles que le séquençage de l'ARN ribosomal (ARNr) a montré que l'immense majorité des espèces bactériennes présentes dans le tube digestif chez l'homme n'est pas détectée par culture<sup>241</sup>. Les relations entre microbiote et GVHD ont depuis été réexplorées à l'ère de ces nouvelles techniques. Jenq *et coll.* ont mis en évidence dans un modèle murin, mais également chez l'homme, une modification du microbiote avec une perte de diversité lors de la survenue d'une GVHD digestive<sup>242</sup>. De plus ils ont observé chez les patients qui vont développer une GVHD une augmentation significative du chaos microbien après allo-CSH (précédent les modifications observées lors de la survenue de la GVHD). Ces résultats, confirmés par Holler *et coll.*<sup>243</sup> suggéraient que des fluctuations précoces et importantes du microbiote conduisent à un risque accru de GVHD<sup>242</sup>. De plus une faible diversité bactérienne à la greffe apparaît comme un facteur prédictif de mortalité indépendant après allo-CSH chez l'homme<sup>244</sup>. Si les mécanismes exacts qui relient perte de diversité du microbiote et GVHD restent à élucider, la perte d'intégrité de la barrière intestinale est probablement d'une importance majeure. Nalle *et coll.*<sup>245</sup> ont ainsi récemment mis en évidence dans un modèle murin de GVHD avec incompatibilité mineure que la perte d'intégrité de la barrière intestinale induite par le conditionnement était indispensable à la survenue d'une GVHD digestive. Schawb *et coll.*<sup>246</sup> ont confirmé l'importance des lésions de la muqueuse intestinale induites par le conditionnement à l'origine d'une translocation bactérienne qui va déclencher les mécanismes effecteurs de la GVHD. Le rôle des modifications du microbiote et de l'altération de la muqueuse intestinale par le conditionnement paraît bien établi dans la survenue de la GVHD. La barrière intestinale se protège de tels dommages en sécrétant des AMP qui vont réguler la composition du microbiote et protéger la muqueuse intestinale de l'agression des pathogènes. Le rôle de ces AMP a été mis en évidence dans la GVHD. Ainsi, les concentrations plasmatiques de REG3α, un

AMP, sont trois fois plus élevées chez les patients allogreffés lors de la survenue d'une GVHD aiguë<sup>247</sup>. De même une augmentation d'un autre AMP, elafin, est retrouvée dans les biopsies cutanées et le sérum des patients avec une GVHD aiguë<sup>248</sup>. Les modifications du microbiote et la translocation bactérienne stimulent probablement la sécrétion des AMP par l'épithélium afin d'essayer de contrebalancer ces modifications, conduisant à un épuisement des AMP, à une perte de contrôle de la composition du microbiote et à une majoration des lésions de la muqueuse. De plus l'augmentation persistante d'AMP peut conduire à une réponse IFN de type I incontrôlée, comme cela a déjà été rapporté dans les maladies auto-immunes<sup>203, 224</sup>. Ainsi l'équipe de Michel Gilliet a montré que les AMP peuvent se complexer avec les fragments extracellulaires d'ADN ou d'ARN du soi pour former des particules qui vont entrer dans les PDC et entraîner la production d'IFN de type I<sup>202, 203</sup>.



**Figure 21 : Interactions cellulaires de l'immunité innée et adaptive dans la GVHD intestinale.**

Nos résultats éclairent d'un nouveau jour la physiopathologie de la GVHD en permettant d'identifier le rôle des PDC et des lymphocytes ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, et renforcent la nécessité d'une interaction entre immunité innée et adaptative dans la GVHD. Nous pouvons proposer un scénario intégrant ces différentes étapes aboutissant à la survenue de la GVHD digestive (Figure 21). Les modifications du microbiote après allo-CSH et les lésions de la muqueuse digestive induites par le conditionnement vont induire la libération d'AMP et de fragments d'ADN et ARN du soi qui vont se complexer pour entrer dans les PDC et entraîner la production d'IFN de type I. La translocation bactérienne entraîne la libération de PAMP qui vont activer les mDC via leurs TLR. Les DC vont activer les lymphocytes ROR  $\gamma$ t<sup>+</sup> qui sécrètent des cytokines, IL-17 et IL-22 notamment. Par ailleurs, comme nous l'avons vu, nos résultats n'excluent pas le rôle des lymphocytes Th1 qui vont sécréter des cytokines IL-2 et IFN- $\gamma$ . L'ensemble de ces étapes conduit à l'étape 3 de la GVHD aiguë avec l'activation des cellules effectrices qui vont amplifier les lésions tissulaires induites par le conditionnement et majorer la libération de cytokines pro-inflammatoires aboutissant à une véritable tempête cytokinique. Les lésions vont également majorer la libération d'AMP et d'ADN-ARN du soi, conduisant à la formation des complexes AMP/ADN-ARN, qui vont dans une boucle de rétrocontrôle positif activer les PDC.

Ces données soulèvent la question de l'utilisation de nouvelles approches innovantes pour optimiser le traitement immunosuppresseur pour la prophylaxie et le traitement de la GVHD. En effet, les traitements actuels reposent sur des drogues qui ont un effet immunosuppresseur sur l'ensemble du système immunitaire telles que la CsA et le MMF. Si ces traitements permettent de diminuer l'incidence de la GVHD, il persiste des GVHD aiguës sévères qui aboutissent au décès du patient. De plus l'immunosuppression de l'ensemble du système immunitaire expose au risque d'infection et de rechute de la maladie. La décroissance rapide de l'immunosuppression chez les patients avec une maladie à haut risque afin de limiter le risque de rechute se fait souvent au prix de la survenue d'une GVHD aiguë sévère. Ainsi le développement de stratégies de

prévention de la GVHD plus ciblées semble indispensable. Une meilleure compréhension des facteurs et des sous populations de cellules immunitaires impliquées dans la GVHD permet d'améliorer les stratégies thérapeutiques pour la prévention et le traitement de la GVHD. Une façon de cibler les lymphocytes ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> serait de cibler le facteur de transcription ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, cela pourrait être obtenu chez les patients en utilisant des petites molécules inhibitrices de ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, comme Huh *et coll.* l'a fait chez la souris<sup>249</sup>. Il serait probablement plus sûr de bloquer la voie Th17 en bloquant la cascade cytokinique Th17. Ainsi des résultats prometteurs ont été obtenus dans le psoriasis en utilisant un anticorps monoclonal ciblant la sous-unité p40 de l'IL-12/IL-23 (ustekinumab)<sup>156</sup> ou l'IL-17R (brodalumab)<sup>157</sup> chez des patients atteints de psoriasis. Pidala *et coll.* a rapporté récemment l'efficacité de l'ustekinumab dans un cas de GVHD aiguë corticorésistante<sup>250</sup>. Les DC représentent également une cible thérapeutique séduisante pour la prise en charge de la GVHD. Ainsi si on arrivait à prévenir l'activation des mDC par les signaux de danger ou des PDC par les complexes ADN ou ARN du soi et AMP, on préviendrait la survenue de la GVHD. La solution viendra probablement de l'association de plusieurs stratégies thérapeutiques ciblées. Ces nouvelles stratégies permettront probablement de réduire l'incidence de la GVHD, diminuer la mortalité non liée à la rechute et d'améliorer la qualité de vie des patients.

## 4-Références bibliographiques

1. Osgood EE R.M. MT. Aplastic anemia treated with daily transfusion and intravenous marrow. *Ann Intern Med* 1939; **13**: 357-67.
2. Jacobson LO ME, Robson MJ, et al. Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. *J Lab Clin Med* 1949; **34**: 1538-43.
3. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951; **12**(1): 197-201.
4. Thomas ED, Collins JA, Herman EC, Jr., Ferrebee JW. Marrow transplants in lethally irradiated dogs given methotrexate. *Blood* 1962; **19**: 217-28.
5. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959; **38**: 1709-16.
6. Mathe G, Jammet H, Pendic B, Schwarzenberg L, Duplan JF, Maupin B et al. [Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation]. *Rev Fr Etud Clin Biol* 1959; **4**(3): 226-38.
7. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattan A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res* 1965; **25**(9): 1525-31.
8. Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* 1970; **9**(6): 571-87.
9. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol* 1958; **20**(1-4): 156-66.
10. van Rood JJ. The detection of transplantation antigens in leukocytes. *Semin Hematol* 1968; **5**(2): 187-214.
11. Storb R, Raff RF, Appelbaum FR, Graham TC, Schuening FG, Sale G et al. Comparison of fractionated to single-dose total body irradiation in conditioning canine littermates for DLA-identical marrow grafts. *Blood* 1989; **74**(3): 1139-43.
12. Santos GW, Owens AH, Jr. Allogeneic marrow transplants in cyclophosphamide treated mice. *Transplant Proc* 1969; **1**(1): 44-6.
13. Santos GW, Tutschka PJ. Marrow transplantation in the busulfan-treated rat: preclinical model of aplastic anemia. *J Natl Cancer Inst* 1974; **53**(6): 1781-5.

14. Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med* 2007; **357**(15): 1472-5.
15. Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorror ML, Boeckh M *et al.* Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2010; **363**(22): 2091-101.
16. Malard F, Chevallier P, Guillaume T, Delaunay J, Rialland F, Harousseau JL *et al.* Continuous Reduced Nonrelapse Mortality after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Single-Institution's Three Decade Experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014.
17. Passweg JR, Baldomero H, Bregni M, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF *et al.* Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011. *Bone Marrow Transplant* 2013.
18. Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Masszi T. *The EBMT Handbook, Haematopoietic Stem Cell Transplantation*, 2012 Revised Edition edn EBMT, 2012.
19. Yakoub-Agha I, Mesnil F, Kuentz M, Boiron JM, Ifrah N, Milpied N *et al.* Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: a prospective study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy. *J Clin Oncol* 2006; **24**(36): 5695-702.
20. Malard F, Furst S, Loirat M, Chevallier P, El-Cheikh J, Guillaume T *et al.* Effect of graft source on mismatched unrelated donor hemopoietic stem cell transplantation after reduced intensity conditioning. *Leukemia* 2013.
21. Fuchs EJ. Haploidentical transplantation for hematologic malignancies: where do we stand? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012; **2012**: 230-6.
22. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR *et al.* Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med* 2012; **367**(16): 1487-96.
23. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V *et al.* Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; **15**(12): 1628-33.
24. Sorror ML, Giralt S, Sandmaier BM, De Lima M, Shahjahan M, Maloney DG *et al.* Hematopoietic cell transplantation specific comorbidity index as an outcome predictor for patients with acute myeloid leukemia in first remission: combined FHCRC and MDACC experiences. *Blood* 2007; **110**(13): 4606-13.

25. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG *et al.* Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 2001; **97**(11): 3390-400.
26. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ *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* 2005; **11**(12): 945-56.
27. Pavletic SZ, Fowler DH. Are we making progress in GVHD prophylaxis and treatment? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012; **2012**: 251-64.
28. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; **373**(9674): 1550-61.
29. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA *et al.* Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974; **18**(4): 295-304.
30. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J *et al.* 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; **15**(6): 825-8.
31. Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ *et al.* IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol* 1997; **97**(4): 855-64.
32. Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise D, Antin JH *et al.* Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood* 2005; **106**(4): 1495-500.
33. Lerner KG, Kao GF, Storb R, Buckner CD, Clift RA, Thomas ED. Histopathology of graft-vs.-host reaction (GvHR) in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplant Proc* 1974; **6**(4): 367-71.
34. Malard F, Mohty M. New insight for the diagnosis of gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Mediators Inflamm* 2014; **2014**: 701013.

35. Nevo S, Enger C, Swan V, Wojno KJ, Fuller AK, Altomonte V *et al.* Acute bleeding after allogeneic bone marrow transplantation: association with graft versus host disease and effect on survival. *Transplantation* 1999; **67**(5): 681-9.
36. Ponec RJ, Hackman RC, McDonald GB. Endoscopic and histologic diagnosis of intestinal graft-versus-host disease after marrow transplantation. *Gastrointest Endosc* 1999; **49**(5): 612-21.
37. Sale GE, Shulman HM, McDonald GB, Thomas ED. Gastrointestinal graft-versus-host disease in man. A clinicopathologic study of the rectal biopsy. *Am J Surg Pathol* 1979; **3**(4): 291-9.
38. Epstein RJ, McDonald GB, Sale GE, Shulman HM, Thomas ED. The diagnostic accuracy of the rectal biopsy in acute graft-versus-host disease: a prospective study of thirteen patients. *Gastroenterology* 1980; **78**(4): 764-71.
39. Levine JE, Huber E, Hammer ST, Harris AC, Greenson JK, Braun TM *et al.* Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality. *Blood* 2013; **122**(8): 1505-9.
40. Snover DC. Acute and chronic graft versus host disease: histopathological evidence for two distinct pathogenetic mechanisms. *Hum Pathol* 1984; **15**(3): 202-5.
41. Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM, Nisperos BB, Flournoy N, Martin PJ *et al.* Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *N Engl J Med* 1985; **313**(13): 765-71.
42. Gale RP, Bortin MM, van Bekkum DW, Biggs JC, Dicke KA, Gluckman E *et al.* Risk factors for acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 1987; **67**(4): 397-406.
43. Hahn T, McCarthy PL, Jr., Zhang MJ, Wang D, Arora M, Frangoul H *et al.* Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia. *J Clin Oncol* 2008; **26**(35): 5728-34.
44. Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH *et al.* Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* 2001; **98**(7): 2043-51.
45. Flowers ME, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW *et al.* Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood* 2011; **117**(11): 3214-9.

46. Jagasia M, Arora M, Flowers ME, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS *et al.* Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2012; **119**(1): 296-307.
47. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W *et al.* Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med* 1986; **314**(12): 729-35.
48. Chao NJ, Schmidt GM, Niland JC, Amylon MD, Dagus AC, Long GD *et al.* Cyclosporine, methotrexate, and prednisone compared with cyclosporine and prednisone for prophylaxis of acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1993; **329**(17): 1225-30.
49. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, Devine SM, Klein JL, Weisdorf D *et al.* Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 1998; **92**(7): 2303-14.
50. Bolwell B, Sobecks R, Pohlman B, Andresen S, Rybicki L, Kuczkowski E *et al.* A prospective randomized trial comparing cyclosporine and short course methotrexate with cyclosporine and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis in myeloablative allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; **34**(7): 621-5.
51. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR *et al.* Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2009; **10**(9): 855-64.
52. Mohty M, Labopin M, Balere ML, Socie G, Milpied N, Tabrizi R *et al.* Antithymocyte globulins and chronic graft-vs-host disease after myeloablative allogeneic stem cell transplantation from HLA-matched unrelated donors: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *Leukemia* 2010; **24**(11): 1867-74.
53. Soiffer RJ, Lerademacher J, Ho V, Kan F, Artz A, Champlin RE *et al.* Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Blood* 2011; **117**(25): 6963-70.
54. Crocchiolo R, Esterni B, Castagna L, Furst S, El-Cheikh J, Devillier R *et al.* Two days of antithymocyte globulin are associated with a reduced incidence of acute and chronic graft-versus-host disease in reduced-intensity conditioning transplantation for hematologic diseases. *Cancer* 2013; **119**(5): 986-92.

55. Cutler C, Li S, Ho VT, Koreth J, Alyea E, Soiffer RJ *et al.* Extended follow-up of methotrexate-free immunosuppression using sirolimus and tacrolimus in related and unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2007; **109**(7): 3108-14.
56. Luznik L, Bolanos-Meade J, Zahurak M, Chen AR, Smith BD, Brodsky R *et al.* High-dose cyclophosphamide as single-agent, short-course prophylaxis of graft-versus-host disease. *Blood* 2010; **115**(16): 3224-30.
57. Alousi AM, Weisdorf DJ, Logan BR, Bolanos-Meade J, Carter S, Difronzo N *et al.* Etanercept, mycophenolate, denileukin, or pentostatin plus corticosteroids for acute graft-versus-host disease: a randomized phase 2 trial from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. *Blood* 2009; **114**(3): 511-7.
58. Bolanos-Meade J, Logan BR, Alousi AM, Antin JH, Barowski K, Carter SL *et al.* Phase III clinical trial steroids/mycophenolate mofetil vs steroids/placebo as therapy for acute graft-versus-host disease: BMT CTN 0802. *Blood* 2014.
59. Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, Ballen K, Curtin PT, Cutler C *et al.* First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; **18**(8): 1150-63.
60. Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn JY *et al.* Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* 2002; **100**(2): 406-14.
61. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE *et al.* Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 1980; **69**(2): 204-17.
62. Pidala J, Kurland B, Chai X, Majhail N, Weisdorf DJ, Pavletic S *et al.* Patient-reported quality of life is associated with severity of chronic graft-versus-host disease as measured by NIH criteria: report on baseline data from the Chronic GVHD Consortium. *Blood* 2011; **117**(17): 4651-7.
63. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 1966; **62**: 21-78.
64. Sackstein R. A revision of Billingham's tenets: the central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; **12**(1 Suppl 1): 2-8.

65. Korngold R, Sprent J. T cell subsets in graft-vs.-host disease. In: Burakoff SJ, Deeg HJ, Ferrara F (eds). *Graft-vs.-Host Disease: Immunology, Pathophysiology, and Treatment*. Dekker: New York, 1990, pp 31-50.
66. Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood* 1986; **68**(3): 770-3.
67. Krensky AM, Weiss A, Crabtree G, Davis MM, Parham P. T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *N Engl J Med* 1990; **322**(8): 510-7.
68. Janeway, Murphy, Travers, Walport. *Immunobiologie*, de boeck: Paris, 2009.
69. Ferrara JL, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin Hematol* 2006; **43**(1): 3-10.
70. Holler E, Kolb HJ, Moller A, Kempeni J, Liesenfeld S, Pechumer H *et al.* Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood* 1990; **75**(4): 1011-6.
71. Holler E, Kolb HJ, Mittermuller J, Kaul M, Ledderose G, Duell T *et al.* Modulation of acute graft-versus-host-disease after allogeneic bone marrow transplantation by tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) release in the course of pretransplant conditioning: role of conditioning regimens and prophylactic application of a monoclonal antibody neutralizing human TNF alpha (MAK 195F). *Blood* 1995; **86**(3): 890-9.
72. Antin JH, Ferrara JL. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1992; **80**(12): 2964-8.
73. Mohty M, Gaugler B. Inflammatory cytokines and dendritic cells in acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; **19**(1): 53-63.
74. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997; **90**(8): 3204-13.
75. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J *et al.* Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999; **285**(5426): 412-5.
76. Ordemann R, Hutchinson R, Friedman J, Burakoff SJ, Reddy P, Duffner U *et al.* Enhanced allostimulatory activity of host antigen-presenting cells in

- old mice intensifies acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2002; **109**(9): 1249-56.
77. Matte CC, Liu J, Cormier J, Anderson BE, Athanasiadis I, Jain D *et al.* Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med* 2004; **10**(9): 987-92.
  78. Mapara MY, Kim YM, Wang SP, Bronson R, Sachs DH, Sykes M. Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells. *Blood* 2002; **100**(5): 1903-9.
  79. Mapara MY, Kim YM, Marx J, Sykes M. Donor lymphocyte infusion-mediated graft-versus-leukemia effects in mixed chimeras established with a nonmyeloablative conditioning regimen: extinction of graft-versus-leukemia effects after conversion to full donor chimerism. *Transplantation* 2003; **76**(2): 297-305.
  80. Reddy P, Maeda Y, Liu C, Krijanovski OI, Korngold R, Ferrara JL. A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med* 2005; **11**(11): 1244-9.
  81. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; **296**(5566): 301-5.
  82. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**: 685-711.
  83. Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, Suematsu M, Terashima Y, Harada A *et al.* Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol* 2003; **4**(2): 154-60.
  84. Sprent J, Schaefer M, Gao EK, Korngold R. Role of T cell subsets in lethal graft-versus-host disease (GVHD) directed to class I versus class II H-2 differences. I. L3T4+ cells can either augment or retard GVHD elicited by Lyt-2+ cells in class I different hosts. *J Exp Med* 1988; **167**(2): 556-69.
  85. Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J *et al.* Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1996; **334**(5): 281-5.
  86. Mutis T, Gillespie G, Schrama E, Falkenburg JH, Moss P, Goulmy E. Tetrameric HLA class I-minor histocompatibility antigen peptide complexes demonstrate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease. *Nat Med* 1999; **5**(7): 839-42.

87. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; **136**(7): 2348-57.
88. Krenger W, Ferrara JL. Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol Res* 1996; **15**(1): 50-73.
89. Murphy WJ, Welniak LA, Taub DD, Wiltzout RH, Taylor PA, Vallera DA *et al.* Differential effects of the absence of interferon-gamma and IL-4 in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Clin Invest* 1998; **102**(9): 1742-8.
90. Burman AC, Banovic T, Kuns RD, Clouston AD, Stanley AC, Morris ES *et al.* IFNgamma differentially controls the development of idiopathic pneumonia syndrome and GVHD of the gastrointestinal tract. *Blood* 2007; **110**(3): 1064-72.
91. Nikolic B, Lee S, Bronson RT, Grusby MJ, Sykes M. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J Clin Invest* 2000; **105**(9): 1289-98.
92. Yi T, Chen Y, Wang L, Du G, Huang D, Zhao D *et al.* Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood* 2009; **114**(14): 3101-12.
93. Tawara I, Maeda Y, Sun Y, Lowler KP, Liu C, Toubai T *et al.* Combined Th2 cytokine deficiency in donor T cells aggravates experimental acute graft-vs-host disease. *Exp Hematol* 2008; **36**(8): 988-96.
94. Chakraverty R, Cote D, Buchli J, Cotter P, Hsu R, Zhao G *et al.* An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *J Exp Med* 2006; **203**(8): 2021-31.
95. Murai M, Yoneyama H, Harada A, Yi Z, Vestergaard C, Guo B *et al.* Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 1999; **104**(1): 49-57.
96. Wysocki CA, Jiang Q, Panoskaltsis-Mortari A, Taylor PA, McKinnon KP, Su L *et al.* Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood* 2005; **106**(9): 3300-7.
97. Wysocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* 2005; **105**(11): 4191-9.
98. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S *et al.* Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994; **265**(5171): 528-30.

99. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 1994; **370**(6491): 650-2.
100. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; **407**(6805): 789-95.
101. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**(9): 745-56.
102. Rissoan MC, Soumelis V, Kadokami N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R *et al*. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; **283**(5405): 1183-6.
103. Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999; **5**(6): 347-56.
104. Cooke KR, Gerbitz A, Crawford JM, Teshima T, Hill GR, Tesolin A *et al*. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 2001; **107**(12): 1581-9.
105. Hattori K, Hirano T, Miyajima H, Yamakawa N, Tateno M, Oshimi K *et al*. Differential effects of anti-Fas ligand and anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on acute graft-versus-host disease pathologies. *Blood* 1998; **91**(11): 4051-5.
106. Cooke KR, Hill GR, Gerbitz A, Kobzik L, Martin TR, Crawford JM *et al*. Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduces lung injury after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 2000; **70**(2): 272-9.
107. 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. *J Exp Med* 1994; **179**(4): 1109-18.
108. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; **12**(2): 121-7.
109. Lester SM, Wood JG, Gooding LR. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* 1988; **141**(8): 2629-34.
110. Abhyankar S, Gilliland DG, Ferrara JL. Interleukin-1 is a critical effector molecule during cytokine dysregulation in graft versus host disease to minor histocompatibility antigens. *Transplantation* 1993; **56**(6): 1518-23.

111. Atkinson K, Matias C, Guiffre A, Seymour R, Cooley M, Biggs J *et al.* In vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage CSF, interleukin-1 (IL-1), and IL-4, alone and in combination, after allogeneic murine hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1991; **77**(6): 1376-82.
112. Hill GR, Teshima T, Gerbitz A, Pan L, Cooke KR, Brinson YS *et al.* Differential roles of IL-1 and TNF-alpha on graft-versus-host disease and graft versus leukemia. *J Clin Invest* 1999; **104**(4): 459-67.
113. Antin JH, Weisdorf D, Neuberg D, Nicklow R, Clouthier S, Lee SJ *et al.* Interleukin-1 blockade does not prevent acute graft-versus-host disease: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interleukin-1 receptor antagonist in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2002; **100**(10): 3479-82.
114. Teshima T, Ordemann R, Reddy P, Gagin S, Liu C, Cooke KR *et al.* Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med* 2002; **8**(6): 575-81.
115. Langrehr JM, Murase N, Markus PM, Cai X, Neuhaus P, Schraut W *et al.* Nitric oxide production in host-versus-graft and graft-versus-host reactions in the rat. *J Clin Invest* 1992; **90**(2): 679-83.
116. Krenger W, Falzarano G, Delmonte J, Jr., Snyder KM, Byon JC, Ferrara JL. Interferon-gamma suppresses T-cell proliferation to mitogen via the nitric oxide pathway during experimental acute graft-versus-host disease. *Blood* 1996; **88**(3): 1113-21.
117. Mohty M, Blaise D, Faucher C, Vey N, Bouabdallah R, Stoppa AM *et al.* Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2005; **106**(13): 4407-11.
118. Piguet PF, Grau GE, Allet B, Vassalli P. Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *J Exp Med* 1987; **166**(5): 1280-9.
119. Fegan C, Poynton CH, Whittaker JA. The gut mucosal barrier in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1990; **5**(6): 373-7.
120. Toubai T, Sun Y, Reddy P. GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? *Best Pract Res Clin Haematol* 2008; **21**(2): 101-17.
121. Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S, Takeuchi K, Harada M, Tanimoto M *et al.* Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2007; **109**(4): 1756-64.
122. Socie G. Chronic GVHD: B cells come of age. *Blood* 2011; **117**(7): 2086-7.

123. Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1987; **166**(5): 1229-44.
124. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; **7**: 145-73.
125. Rotteveel FT, Kokkelink I, van Lier RA, Kuenen B, Meager A, Miedema F *et al.* Clonal analysis of functionally distinct human CD4+ T cell subsets. *J Exp Med* 1988; **168**(5): 1659-73.
126. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; **89**(4): 587-96.
127. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; **100**(6): 655-69.
128. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**(7): 490-500.
129. Boniface K, Moynet D, Mossalayi M. Role of Th17 cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *World J Rheumatol* 2013; **12**(3(3)): 25-31.
130. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; **6**(11): 1123-32.
131. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; **6**(11): 1133-41.
132. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B *et al.* Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; **13**(5): 715-25.
133. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; **201**(2): 233-40.

134. Hirahara K, Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Kanno Y, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; **21**(6): 425-34.
135. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ *et al.* The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ T directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; **126**(6): 1121-33.
136. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y *et al.* T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ . *Immunity* 2008; **28**(1): 29-39.
137. Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L *et al.* Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity* 2010; **32**(5): 605-15.
138. Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* 2013; **121**(13): 2402-14.
139. Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS *et al.* STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 2007; **282**(13): 9358-63.
140. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM *et al.* The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol* 2009; **10**(3): 314-24.
141. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 485-517.
142. Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* 2007; **19**(6): 400-8.
143. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB *et al.* IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007; **448**(7152): 484-7.
144. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE *et al.* Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 2010; **467**(7318): 967-71.
145. Lee YK, Mukasa R, Hatton RD, Weaver CT. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol* 2009; **21**(3): 274-80.

146. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007; **204**(8): 1849-61.
147. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A *et al.* Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007; **8**(6): 639-46.
148. Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP *et al.* Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med* 2009; **206**(3): 525-34.
149. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**(8): 556-67.
150. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis* 2004; **190**(3): 624-31.
151. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; **203**(10): 2271-9.
152. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA *et al.* IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008; **14**(3): 275-81.
153. Pene J, Chevalier S, Preisser L, Venereau E, Guilleux MH, Ghannam S *et al.* Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol* 2008; **180**(11): 7423-30.
154. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinás M, Cardinale I *et al.* Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol* 2008; **159**(5): 1092-102.
155. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 2009; **129**(6): 1339-50.
156. Krueger GG, Langley RG, Leonardi C, Yeilding N, Guzzo C, Wang Y *et al.* A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N Engl J Med* 2007; **356**(6): 580-92.
157. Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Krueger JG, Kricorian G *et al.* Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med* 2012; **366**(13): 1181-9.

158. Ahern PP, Schiering C, Buonocore S, McGeachy MJ, Cua DJ, Maloy KJ *et al.* Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity* 2010; **33**(2): 279-88.
159. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Stevens S, Flavell RA. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 2008; **29**(6): 947-57.
160. Fantini MC, Rizzo A, Fina D, Caruso R, Becker C, Neurath MF *et al.* IL-21 regulates experimental colitis by modulating the balance between Treg and Th17 cells. *Eur J Immunol* 2007; **37**(11): 3155-63.
161. Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, Vandemeulebroecke M, Reinisch W, Higgins PD *et al.* Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* 2012; **61**(12): 1693-700.
162. Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RN, Scherl E, Fleisher MR, Katz S *et al.* A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2008; **135**(4): 1130-41.
163. Yi T, Zhao D, Lin CL, Zhang C, Chen Y, Todorov I *et al.* Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood* 2008; **112**(5): 2101-10.
164. Kappel LW, Goldberg GL, King CG, Suh DY, Smith OM, Ligh C *et al.* IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood* 2009; **113**(4): 945-52.
165. Carlson MJ, West ML, Coghill JM, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood* 2009; **113**(6): 1365-74.
166. Iclozan C, Yu Y, Liu C, Liang Y, Yi T, Anasetti C *et al.* T helper17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; **16**(2): 170-8.
167. Fulton LM, Carlson MJ, Coghill JM, Ott LE, West ML, Panoskaltsis-Mortari A *et al.* Attenuation of acute graft-versus-host disease in the absence of the transcription factor RORgammat. *J Immunol* 2012; **189**(4): 1765-72.
168. Chen X, Das R, Komorowski R, Beres A, Hessner MJ, Mihara M *et al.* Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood* 2009; **114**(4): 891-900.

169. Tawara I, Koyama M, Liu C, Toubai T, Thomas D, Evers R *et al.* Interleukin-6 modulates graft-versus-host responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Cancer Res* 2011; **17**(1): 77-88.
170. Thompson JS, Chu Y, Glass JF, Brown SA. Absence of IL-23p19 in donor allogeneic cells reduces mortality from acute GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2010; **45**(4): 712-22.
171. Dander E, Balduzzi A, Zappa G, Lucchini G, Perseghin P, Andre V *et al.* Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2009; **88**(11): 1261-72.
172. Liu Y, Cai Y, Dai L, Chen G, Ma X, Wang Y *et al.* The Expression of Th17-Associated Cytokines in Human Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013; **19**(10): 1421-9.
173. Broady R, Yu J, Chow V, Tantiworawit A, Kang C, Berg K *et al.* Cutaneous GVHD is associated with the expansion of tissue-localized Th1 and not Th17 cells. *Blood* 2010; **116**(25): 5748-51.
174. Ratajczak P, Janin A, Peffault de Latour R, Leboeuf C, Desveaux A, Keyvanfar K *et al.* Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood* 2010; **116**(7): 1165-71.
175. Elmaagacli AH, Koldehoff M, Landt O, Beelen DW. Relation of an interleukin-23 receptor gene polymorphism to graft-versus-host disease after hematopoietic-cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008; **41**(9): 821-6.
176. Gruhn B, Intek J, Pfaffendorf N, Zell R, Corbacioglu S, Zintl F *et al.* Polymorphism of interleukin-23 receptor gene but not of NOD2/CARD15 is associated with graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; **15**(12): 1571-7.
177. Nguyen Y, Al-Lehibi A, Gorbe E, Li E, Haagenson M, Wang T *et al.* Insufficient evidence for association of NOD2/CARD15 or other inflammatory bowel disease-associated markers on GVHD incidence or other adverse outcomes in T-replete, unrelated donor transplantation. *Blood* 2010; **115**(17): 3625-31.
178. Schott M. Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers. *Endocr Relat Cancer* 2006; **13**(3): 779-95.

179. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S *et al.* The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; **284**(5421): 1835-7.
180. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A *et al.* Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; **5**(8): 919-23.
181. Lennert K, Remmeli W. [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes]. *Acta Haematol* 1958; **19**(2): 99-113.
182. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004; **5**(12): 1219-26.
183. Dzionaek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F *et al.* BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *The Journal of experimental medicine* 2001; **194**(12): 1823-34.
184. Dzionaek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Rock J, Sohma Y *et al.* Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol* 2002; **63**(12): 1133-48.
185. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 2011; **29**: 163-83.
186. Schmid MA, Kingston D, Boddupalli S, Manz MG. Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunol Rev* 2010; **234**(1): 32-44.
187. Waskow C, Liu K, Darrasse-Jeze G, Guermonprez P, Ginhoux F, Merad M *et al.* The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2008; **9**(6): 676-83.
188. Eidenschenk C, Crozat K, Krebs P, Arens R, Popkin D, Arnold CN *et al.* Flt3 permits survival during infection by rendering dendritic cells competent to activate NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**(21): 9759-64.
189. Cisse B, Caton ML, Lehner M, Maeda T, Scheu S, Locksley R *et al.* Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 2008; **135**(1): 37-48.
190. O'Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, Caminschi I, Miller JL, Anders EM *et al.* Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface

phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J Exp Med* 2002; **196**(10): 1307-19.

191. Seeds RE, Gordon S, Miller JL. Receptors and ligands involved in viral induction of type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* 2006; **211**(6-8): 525-35.
192. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**(8): 594-606.
193. Ito T, Kanzler H, Duramad O, Cao W, Liu YJ. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells. *Blood* 2006; **107**(6): 2423-31.
194. Bonnefoy F, Couturier M, Clauzon A, Remy-Martin JP, Gaugler B, Tiberghien P *et al.* TGF-beta-exposed plasmacytoid dendritic cells participate in Th17 commitment. *J Immunol* 2011; **186**(11): 6157-64.
195. Isaksson M, Ardesjo B, Ronnblom L, Kampe O, Lassmann H, Eloranta ML *et al.* Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE. *Eur J Immunol* 2009; **39**(10): 2925-35.
196. Yu CF, Peng WM, Oldenburg J, Hoch J, Bieber T, Limmer A *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells support Th17 cell effector function in response to TLR7 ligation. *J Immunol* 2010; **184**(3): 1159-67.
197. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004; **173**(7): 4433-42.
198. Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2001; **2**(7): 585-9.
199. Albert ML, Decalf J, Pol S. Plasmacytoid dendritic cells move down on the list of suspects: in search of the immune pathogenesis of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008; **49**(6): 1069-78.
200. Fitzgerald-Bocarsly P, Jacobs ES. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection: striking a delicate balance. *J Leukoc Biol* 2010; **87**(4): 609-20.
201. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O *et al.* Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 2005; **202**(1): 135-43.
202. Lande R, Gregorio J, Facchinetto V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007; **449**(7162): 564-9.

203. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetto V *et al.* Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med* 2009; **206**(9): 1983-94.
204. Koyama M, Hashimoto D, Aoyama K, Matsuoka K, Karube K, Niiro H *et al.* Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. *Blood* 2009; **113**(9): 2088-95.
205. Hadeiba H, Sato T, Habtezion A, Oderup C, Pan J, Butcher EC. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol* 2008; **9**(11): 1253-60.
206. Markey KA, MacDonald KP, Hill GR. Recipient plasmacytoid DCs are not required to prime allogeneic T-cell responses after BMT. *Blood* 2009; **113**(23): 6038-9.
207. Teshima T, Kadokami M, Koyama M. Response: Recipient plasmacytoid dendritic cells and graft-versus-host disease. *Blood* 2009; **114**(6): 1280.
208. Banovic T, Markey KA, Kuns RD, Olver SD, Raffelt NC, Don AL *et al.* Graft-versus-host disease prevents the maturation of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2009; **182**(2): 912-20.
209. Darlak KA, Wang Y, Li JM, Harris WA, Owens LM, Waller EK. Enrichment of IL-12-producing plasmacytoid dendritic cells in donor bone marrow grafts enhances graft-versus-leukemia activity in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013; **19**(9): 1331-9.
210. Fagnoni FF, Oliviero B, Giorgiani G, De Stefano P, Deho A, Zibera C *et al.* Reconstitution dynamics of plasmacytoid and myeloid dendritic cell precursors after allogeneic myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2004; **104**(1): 281-9.
211. Mohty M, Blaise D, Faucher C, Bardou VJ, Gastaut JA, Viens P *et al.* Impact of plasmacytoid dendritic cells on outcome after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 2005; **19**(1): 1-6.
212. Vakkila J, Thomson AW, Hovi L, Vettenranta K, Saarinen-Pihkala UM. Circulating dendritic cell subset levels after allogeneic stem cell transplantation in children correlate with time post transplant and severity of acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2005; **35**(5): 501-7.

213. Lau J, Sartor M, Bradstock KF, Vuckovic S, Munster DJ, Hart DN. Activated circulating dendritic cells after hematopoietic stem cell transplantation predict acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 2007; **83**(7): 839-46.
214. Arpinati M, Chirumbolo G, Urbini B, Bonifazi F, Bandini G, Saunthararajah Y *et al.* Acute graft-versus-host disease and steroid treatment impair CD11c+ and CD123+ dendritic cell reconstitution after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; **10**(2): 106-15.
215. Podgorny PJ, Liu Y, Dharmani-Khan P, Pratt LM, Jamani K, Luider J *et al.* Immune Cell Subset Counts Associated with Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014.
216. Mohty M, Gaugler B, Faucher C, Sainty D, Lafage-Pochitaloff M, Vey N *et al.* Recovery of lymphocyte and dendritic cell subsets following reduced intensity allogeneic bone marrow transplantation. *Hematology* 2002; **7**(3): 157-64.
217. Auffermann-Gretzinger S, Lossos IS, Vayntrub TA, Leong W, Grumet FC, Blume KG *et al.* Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 2002; **99**(4): 1442-8.
218. Shahin K, Sartor M, Hart DN, Bradstock KF. Alterations in chemokine receptor CCR5 expression on blood dendritic cells correlate with acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 2013; **96**(8): 753-62.
219. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 139-70.
220. Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann NY Acad Sci* 2010; **1183**: 89-103.
221. Swiecki M, Colonna M. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev* 2010; **234**(1): 142-62.
222. Baumgart DC, Metzke D, Guckelberger O, Pascher A, Grotzinger C, Przesdzinski I *et al.* Aberrant plasmacytoid dendritic cell distribution and function in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2011; **166**(1): 46-54.
223. Gregorio J, Meller S, Conrad C, Di Nardo A, Homey B, Lauferma A *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J Exp Med* 2010; **207**(13): 2921-30.

224. Nistala K, Adams S, Cambrook H, Ursu S, Olivito B, de Jager W *et al.* Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**(33): 14751-6.
225. Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ *et al.* Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 2011; **12**(3): 255-63.
226. van der Waart AB, van der Velden WJ, van Halteren AG, Leenders MJ, Feuth T, Blijlevens NM *et al.* Decreased Levels of Circulating IL17-Producing CD161(+)CCR6(+) T Cells Are Associated with Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *PLoS One* 2012; **7**(12): e50896.
227. Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol* 2011; **12**(1): 21-7.
228. Sutton CE, Mielke LA, Mills KH. IL-17-producing gammadelta T cells and innate lymphoid cells. *Eur J Immunol* 2012; **42**(9): 2221-31.
229. Pantelyushin S, Haak S, Ingold B, Kulig P, Heppner FL, Navarini AA *et al.* Rorgammat+ innate lymphocytes and gammadelta T cells initiate psoriasisiform plaque formation in mice. *J Clin Invest* 2012; **122**(6): 2252-6.
230. Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, Thompson C, Joyce-Shaikh B, Stepankova R *et al.* Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 2006; **25**(2): 309-18.
231. Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov II, Littman DR, Maloy KJ *et al.* Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 2010; **464**(7293): 1371-5.
232. Geremia A, Arancibia-Carcamo CV, Fleming MP, Rust N, Singh B, Mortensen NJ *et al.* IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 2011; **208**(6): 1127-33.
233. Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, O'Connor MH, Young LF, Singer NV *et al.* Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* 2012; **37**(2): 339-50.
234. Couturier M, Lamarthee B, Arbez J, Renauld JC, Bossard C, Malard F *et al.* IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect. *Leukemia* 2013.

235. Guiducci C, Tripodo C, Gong M, Sangaletti S, Colombo MP, Coffman RL *et al.* Autoimmune skin inflammation is dependent on plasmacytoid dendritic cell activation by nucleic acids via TLR7 and TLR9. *J Exp Med* 2010; **207**(13): 2931-42.
236. van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD *et al.* Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* 2009; **182**(9): 5836-45.
237. van Bekkum DW, Roodenburg J, Heidt PJ, van der Waaij D. Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *J Natl Cancer Inst* 1974; **52**(2): 401-4.
238. Jones JM, Wilson R, Bealmear PM. Mortality and gross pathology of secondary disease in germfree mouse radiation chimeras. *Radiat Res* 1971; **45**(3): 577-88.
239. Storb R, Prentice RL, Buckner CD, Clift RA, Appelbaum F, Deeg J *et al.* Graft-versus-host disease and survival in patients with aplastic anemia treated by marrow grafts from HLA-identical siblings. Beneficial effect of a protective environment. *N Engl J Med* 1983; **308**(6): 302-7.
240. Petersen FB, Buckner CD, Clift RA, Nelson N, Counts GW, Meyers JD *et al.* Infectious complications in patients undergoing marrow transplantation: a prospective randomized study of the additional effect of decontamination and laminar air flow isolation among patients receiving prophylactic systemic antibiotics. *Scand J Infect Dis* 1987; **19**(5): 559-67.
241. Manson JM, Rauch M, Gilmore MS. The commensal microbiology of the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 2008; **635**: 15-28.
242. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA *et al.* Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2012; **209**(5): 903-11.
243. Holler E, Butzhammer P, Schmid K, Hundsrucker C, Koestler J, Peter K *et al.* Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; **20**(5): 640-5.
244. Taur Y, Jenq RR, Perales MA, Littmann ER, Morjaria S, Ling L *et al.* The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2014; **124**(7): 1174-82.
245. Nalle SC, Kwak HA, Edelblum KL, Joseph NE, Singh G, Khramtsova GF *et al.* Recipient NK cell inactivation and intestinal barrier loss are required for

- MHC-matched graft-versus-host disease. *Sci Transl Med* 2014; **6**(243): 243ra87.
246. Schwab L, Goroncy L, Palaniyandi S, Gautam S, Triantafyllopoulou A, Mocsai A *et al.* Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat Med* 2014; **20**(6): 648-54.
  247. Ferrara JL, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T *et al.* Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 2011; **118**(25): 6702-8.
  248. Paczesny S, Braun TM, Levine JE, Hogan J, Crawford J, Coffing B *et al.* Elafin is a biomarker of graft-versus-host disease of the skin. *Sci Transl Med* 2010; **2**(13): 13ra2.
  249. Huh JR, Leung MW, Huang P, Ryan DA, Krout MR, Malapaka RR *et al.* Digoxin and its derivatives suppress TH17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ mat activity. *Nature* 2011; **472**(7344): 486-90.
  250. Pidala J, Perez L, Beato F, Anasetti C. Ustekinumab demonstrates activity in glucocorticoid-refractory acute GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2012; **47**(5): 747-8.

## **5-Annexes**

### **5-1-Article n°3 : « Increased Th17/Treg ratio in chronic liver GVHD »**

#### **5-1-1-Résultats principaux**

Si la plupart des études réalisées dans les modèles murins suggèrent un rôle des lymphocytes Th17 dans la physiopathologie de la GVHD chronique, leur contribution dans la GVHD chronique chez l'homme n'est pas claire, en particulier leur contribution au niveau des organes cibles de la GVHD chronique. Nous avons évalué l'infiltration par les lymphocytes Th17 dans le foie de 17 patients après allo-CSH lors de la survenue ou de la reprise évolutive d'une GVHD chronique hépatique et avant toute instauration ou reprise de la corticothérapie. 8 patients sans hémopathie maligne ayant une biopsie hépatique ont constitué le groupe contrôle. Nous avons montré, en utilisant CCR6 et CD161, deux marqueurs des lymphocytes Th17, que le nombre de lymphocytes Th17 était significativement augmenté dans le foie des patients avec une GVHD chronique. Afin de confirmer ces résultats, nous avons montré que le nombre de cellules exprimant RORyt, le facteur de transcription clé des lymphocytes Th17, était également augmenté dans le foie des patients avec une GVHD chronique. Nous avons également analysé la présence des cellules exprimant Tbet et Foxp3, les facteurs de transcription des lymphocytes Th1 et T régulateurs (Tregs) respectivement. Le nombre de cellules Th1 et Tregs était très faible dans le foie des patients avec une GVHD chronique, il n'y avait pas de différence avec le groupe contrôle. De plus, les ratios Th17/Th1 et Th17/Tregs étaient significativement augmentés dans le foie des patients avec une GVHD chronique. Ces résultats suggèrent l'existence d'un déficit des mécanismes immunorégulateurs dirigés par les Tregs et d'une activation inappropriée des cellules effectrices, en particulier les Th17, dans la GVHD chronique hépatique chez l'homme.

#### **5-2-1-Article**

Publié dans Bone Marrow Transplantation en Janvier 2014.

## ORIGINAL ARTICLE

# Increased Th17/Treg ratio in chronic liver GVHD

F Malard<sup>1,2</sup>, C Bossard<sup>3,4</sup>, E Brissot<sup>1,2</sup>, P Chevallier<sup>2</sup>, T Guillaume<sup>2</sup>, J Delaunay<sup>2</sup>, J-F Mosnier<sup>3,4</sup>, P Moreau<sup>1,2,5</sup>, M Grégoire<sup>1</sup>, B Gaugler<sup>6,7,8,9</sup> and M Mohty<sup>1,2,10</sup>

The contribution of Th17 cells to chronic GVHD (cGVHD) has been demonstrated in cGVHD mouse models. However, their contribution to human liver cGVHD remains unclear. We evaluated Th17 cells in biopsies from a cohort of 17 patients with liver cGVHD. We observed a significant increase in Th17 cells in the liver of patients with cGVHD, as demonstrated by an increase in CCR6+, CD161+ and ROR $\gamma$ t+ T cells ( $P = 0.03$ ,  $P = 0.0001$  and  $P = 0.03$ , respectively). We also assessed the presence of Th1 and regulatory (Treg) T cells: the numbers of Th1 and Treg cells were very low, with no difference between the two groups ( $P = 0.88$  and  $P = 0.12$ , respectively). Furthermore, Th17/Th1 and Th17/Treg ratios were significantly increased in the liver of patients with liver cGVHD ( $P = 0.005$  and  $P = 0.002$ , respectively). This study provides evidence for an infiltration by Th17 cells in the liver of patients with cGVHD and an increased Th17/Treg ratio, suggesting a defect in the regulatory mechanism driven by Treg cells or an inappropriate activation of effector cells, especially Th17 cells, or both mechanisms, in human liver cGVHD.

*Bone Marrow Transplantation* advance online publication, 13 January 2014; doi:10.1038/bmt.2013.215

**Keywords:** Allo-SCT; liver cGVHD; Th17 cells; regulatory T cells

## INTRODUCTION

Chronic GVHD (cGVHD) is the main cause of late non-relapse mortality (NRM) and morbidity after allo-SCT. In contrast to acute GVHD (aGVHD), the pathophysiology of cGVHD remains poorly understood. Whereas aGVHD is classically restricted to the skin, liver and gastrointestinal tract, cGVHD is often more extensive and can also affect the eyes, lung or mucosa.<sup>1</sup> cGVHD presents clinical features that mimic autoimmune diseases such as systemic sclerosis, lupus erythematosus or Sjögren syndrome, and autoimmune-like manifestations are a defining characteristic of cGVHD.<sup>2</sup> The well-established role of Th17 cells in the pathophysiology of autoimmune diseases<sup>3–5</sup> raises the question about the role of Th17 cells in cGVHD. The contribution of Th17 cells to cGVHD has been investigated in chronic GVHD mouse models. Although cGVHD can occur in the absence of IL-17,<sup>6</sup> most studies have suggested its pathogenic role.<sup>7–9</sup> It can be noted that, in a mouse model of cGVHD, a significant amount of Th17 cell infiltrate was found in the liver of allogeneic recipients as compared with syngeneic recipients.<sup>10</sup> Furthermore, one of these studies indicated that the expansion of Th1 and Th17 cells is favored by the progressive loss of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells (Treg), leading to cGVHD onset.<sup>8</sup> In humans, only a few studies explored the contribution of Th17 cells to cGVHD pathogenesis, and most studies have focused on skin cGVHD. Ritchie *et al.*<sup>11</sup> showed that Th17-related cytokines are increased in patients with cGVHD. Furthermore, Dander *et al.*<sup>12</sup> found a significant increase in circulating Th17 cells in patients with active cGVHD. With this background, the current study aimed to investigate the balance of Th17, Th1 and Treg cells in the liver of patients diagnosed with cGVHD.

## PATIENTS AND METHODS

### Study design

Seventeen patients who underwent allo-SCT and who developed liver cGVHD at the University-Hospital of Nantes (Nantes, France), and for whom biopsies were available, were included in this study. Liver cGVHD was proven histologically from a liver biopsy performed at the time of the first hepatic symptoms declaration or during their reappearance and prior to initiation or resumption of corticosteroid treatment. Hepatic cGVHD diagnosis was retained after exclusion of other differential diagnoses by physical examination and standard screening tests. Patients with new drug exposure or recent change in the dose schedule were excluded. Routine bacterial and fungal cultures were performed to exclude ongoing infection, and viral hepatitis caused by hepatitis A, B and C, VZV, HSV, adenovirus (ADV) and CMV was ruled out by serologic testing or PCR analysis. The control group included eight patients (three male and five female patients) without hematological malignancies. These control liver biopsies were performed for different indications (sleeve gastrectomy for morbid obesity,  $n=2$ , and adjacent tumor surgery,  $n=6$ ). The median age was not significantly different compared with the cGVHD group (47 (range, 31–80) years vs 54 (27–71 years;  $P=0.70$ ). All patients from the control group presented a histologically proven normal liver biopsy. All patients were enrolled in clinical research protocols approved by local ethical committees. Written informed consent was obtained in accordance with the principles of the declaration of Helsinki. Patients, donors and allo-SCT characteristics of the cGVHD group are summarized in Table 1.

### Morphological studies

One liver biopsy was analyzed for each patient. Liver biopsies were performed according to standard procedures. In the cGVHD study group, the median time of biopsies was 264 (range, 119–1121) days after allo-SCT and 6.5 (range, 0–243) days after the first diagnosis of cGVHD. Liver cGVHD diagnosis was confirmed histologically on hematoxylin and eosin-stained

<sup>1</sup>CRNCA, UMR 892 INSERM - 6299 CNRS, Nantes, France; <sup>2</sup>Service d'Hématologie Clinique, Centre Hospitalier et Universitaire (CHU), Université de Nantes, Nantes, France; <sup>3</sup>EA4273 Biometadys, Faculté de médecine, Université de Nantes, Nantes, France; <sup>4</sup>Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, CHU de Nantes, Nantes, France; <sup>5</sup>Centre d'Investigation Clinique en Cancérologie (CIC), Nantes, France; <sup>6</sup>INSERM UMR 1098, Besançon, France; <sup>7</sup>Université de Franche-Comté, Besançon, France; <sup>8</sup>EFS Bourgogne Franche-Comté, 25020 Besançon Cedex, Besançon, France and <sup>9</sup>Centre d'Investigation Clinique en Biothérapie CBT506, Plateforme de Biomonitoring, Besançon, France. Correspondence: Professor M Mohty, Service d'Hématologie Clinique, CHU Hôtel-Dieu, Université de Nantes and INSERM U892, Place Alexis Ricordeau, Paris F-44093, France. E-mail: Mohamad.mohty@inserm.fr

<sup>10</sup>Current address: Service d'Hématologie Clinique et de Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint Antoine, APHP, Paris, France; Université Pierre et Marie Curie, Paris, France; and INSERM, UMRs 938, Paris, France.

Received 14 August 2013; revised 4 October 2013; accepted 10 November 2013

**Table 1.** Patients, disease and transplant characteristics

Characteristic	cGVHD (N = 17)
Median recipient age, years (range)	54 (27–71)
Patient gender, male/female, no. (%)	11/6 (65/35)
Donor gender, male/female, no. (%)	8/9 (47/53)
<i>Diagnosis, no. (%)</i>	
Myeloid malignancies	9 (53)
AML	4 (24)
Myelodysplastic syndrome	2 (12)
Myeloproliferative neoplasm	1 (6)
CML	2 (12)
Lymphoid malignancies	8 (47)
ALL	3 (18)
Non-Hodgkin's lymphoma	3 (18)
Multiple myeloma	1 (6)
CLL	1 (6)
<i>Conditioning regimen, no. (%)</i>	
Myeloablative	9 (53)
Reduced intensity	8 (47)
<i>GVHD prophylaxis, no. (%)</i>	
CsA alone	5 (29)
CsA + mycophenolate	3 (18)
Mofetil CsA + MTX	9 (53)
<i>Graft source, no. (%)</i>	
Peripheral blood stem cells	9 (53)
BM	8 (47)
<i>Donor type (%)</i>	
Matched related donor (MRD)	13 (76)
Matched unrelated donor (MUD)	4 (24)
<i>aGVHD after allo-SCT, no. (%)</i>	15 (88)
Liver involvement, no. (%)	4 (24)
Median post-transplant time of onset of cGVHD, days (range)	243 (108–878)
Median post-transplant time of biopsy, days (range)	264 (119–1121)

Abbreviations: aGVHD = acute GVHD; cGVHD = chronic GVHD.

(HES) sections according to the current recommendations.<sup>13</sup> The liver biopsies from the eight patients of the control group were also examined on (HES) sections. In addition, none of the patients from the control or study group had evidence of viral infection.

#### Immunohistochemical studies

Immunohistochemical analysis was performed on 5 µm formalin-fixed, paraffin-embedded sections using an indirect immunoperoxidase method. Slides were stained with the following primary Abs: CD8 (clone C8/144B; DakoCytomation, Glostrup, Denmark), granzyme B (clone GrB-7; DakoCytomation) and Foxp3 (clone 236A/E7; Abcam, Paris, France) for Treg cells; Tbet (clone 4B10; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for Th1 cells; and CD161 (mouse MoAb, clone B199.2; AbDSerotec, Colmar, France), CCR6 (clone 53103; R&D Systems, Abingdon, UK) and RORγt (rabbit polyclonal Abs; Abcam, Paris, France) for Th17 cells. The immunological reaction was visualized with the bond polymer refine detection system and 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride as the chromogen. In negative control experiments the primary Abs were omitted. A quantitative evaluation of the expression of the Abs was performed in a blinded manner independently by two examiners (FM and CB) by counting the number of positive cells in the whole biopsy at × 200 magnification (mean 10 fields) for each sample.

#### Statistical analysis

Clinical and morphological data, as well as the numbers of CD8-, granzyme B (GrB)-, Tbet-, Foxp3-, CD161-, CCR6- and RORγt-positive cells, were

entered into a database. The Mann-Whitney non-parametric test was used to compare patient age and to assess the correlation between the number of CD8, GrB, Th1, Th17 and Treg cells and the presence of liver cGVHD. For patient gender, comparison between the cGVHD group and the control group was carried out using the chi-square test. All data were computed using GraphPad Software (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA).

## RESULTS

Activated cytotoxic CD8+ and Gr B+ cells infiltrate the liver of patients with liver cGVHD

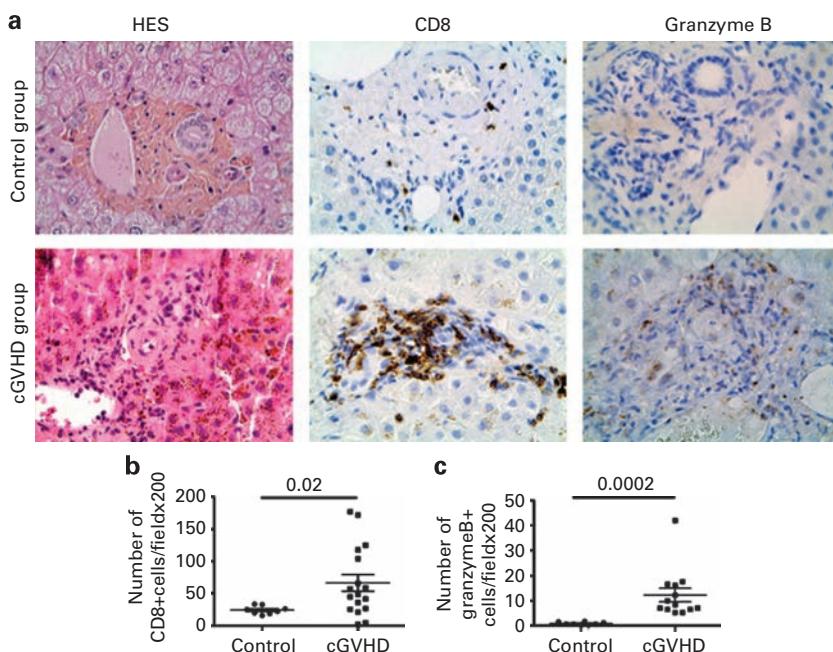
The histological diagnosis of liver cGVHD was first confirmed. All HES sections of liver biopsies were retrospectively and blindly reviewed. All patients in the control group presented a histologically normal liver biopsy, whereas all patients in the cGVHD group presented with histological damage compatible with liver cGVHD, mainly bile duct damages with mild lymphocytic infiltration in the portal space and in the bile duct epithelium going up to the destruction of bile ducts in some cases (Figure 1a). Then, we sought to assess the presence of CD8+ T cells in the liver of cGVHD patients. We found that the number of CD8+ T cells was significantly increased in the liver of patients with liver cGVHD compared with the control group ( $P=0.02$ ) (Figure 1b). We observed a predominantly portal infiltration of CD8+ cells in close contact with epithelial cells of the bile duct and associated in some cases with bile duct destruction (Figure 1a). We next assessed whether those CD8+ cells corresponded to activated cytotoxic T cells using GrB immunostaining. We found that the number of GrB+ cells paralleled the number of CD8+ T cells and was significantly increased in the liver of patients with liver cGVHD ( $P=0.0002$ ) (Figures 1a and c).

#### Th17 cells infiltrate the liver of patients with liver cGVHD

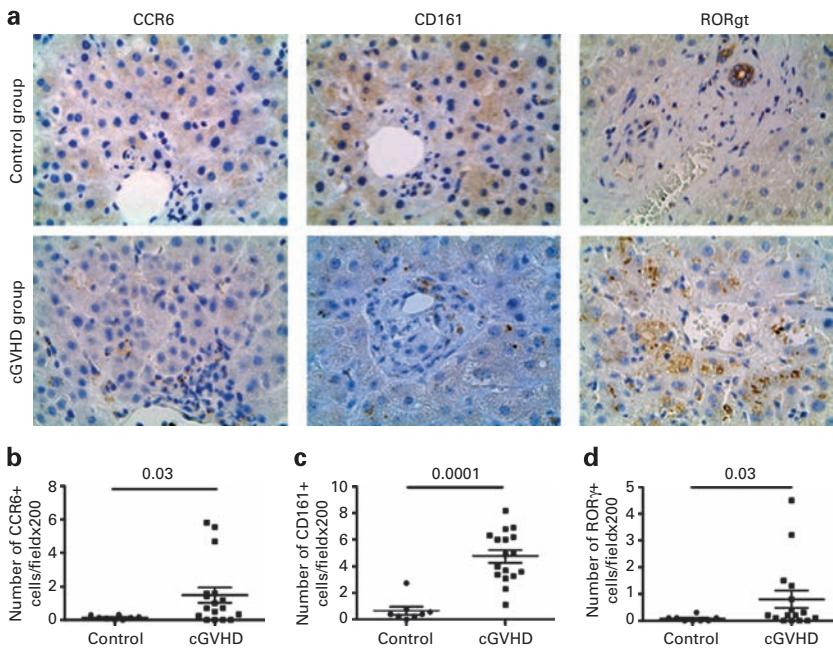
Previous mouse studies suggested that Th17 cells are critical for injury in cGVHD. Thus, we hypothesized that Th17 cells could preferentially accumulate within the target tissues in human cGVHD. For the purpose of identification of Th17 cells we used the mucosal chemokine receptor CCR6<sup>14,15</sup> and the C-type lectin-like receptor CD161, both of which are well-established markers of human Th17 cells.<sup>16</sup> Using these two markers, we observed that the absolute number of CD161+ and CCR6+ cells was significantly higher in the liver of patients with cGVHD compared with the liver of patients in the control group ( $P=0.0001$  and  $P=0.03$ , respectively; Figures 2a–c). These cells were mainly observed in the portal space, paralleling the localization of the CD8+ and GrB+ cells. In order to further confirm the Th17 cell infiltration, we also assessed the expression of RORγt, the key transcription factor that orchestrates the differentiation of Th17 cells.<sup>17</sup> In keeping with the increase of CCR6+ and CD161+ T cells, RORγt+ cells (with nuclear staining) were significantly increased in the liver of patients with cGVHD compared with the liver of patients of the control group ( $P=0.03$ ) (Figures 2a and d).

#### Th17/Th1 and Th17/Treg ratios are increased in the liver of patients with liver cGVHD

We also assessed the presence of T cells expressing Tbet (the transcription factor characterizing Th1 cells) and Foxp3 (the master regulator gene of Treg cells) in the liver biopsies of the two groups of patients. Interestingly, there was no difference in the number of Th1 and Treg cells between the two groups ( $P=0.88$  and  $P=0.12$ , respectively). These cells were scarce, observed both in the portal space (never in close contact with the epithelial cells of bile duct) and in the lobule inside sinusoids (Figures 3a–c). Finally, we looked at Th17/Th1 and Th17/Treg ratios in liver cGVHD. Considering that RORγt is the key transcription factor of



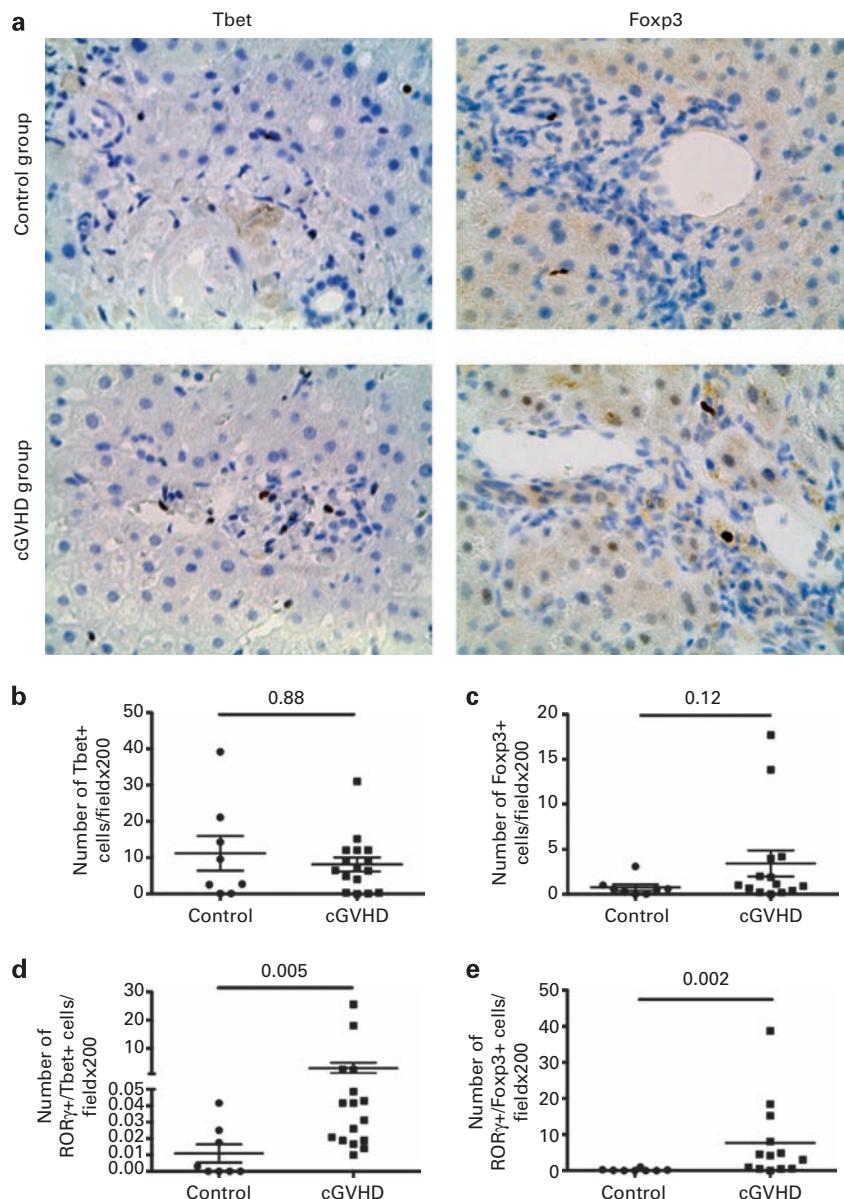
**Figure 1.** CD8- and GrB-positive T cells infiltrate the liver of patients with liver cGVHD. Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples of liver biopsies. A total of 25 biopsies were analyzed morphologically and by immunohistochemistry: 17 had liver cGVHD and 8 control patients did not. (a) Example of an HES section of liver biopsy showing bile duct damage up to destruction in cGVHD (lower panel) but not in healthy donors (upper panel) (original magnification  $\times 400$ ). For quantitative evaluation, the mean number of positive cells for each marker was retained for the statistical analysis. (a) CD8- and GrB-positive mononuclear cells are significantly increased in the liver of patients with liver cGVHD (lower panel) compared with healthy donors (upper panel) (original magnification  $\times 400$ ). (b, c) Quantitative evaluation of CD8 (b) and GrB (c)-positive cells are represented. The mean values and s.e.m. for each group are represented.



**Figure 2.** Th17 cells infiltrate the liver of hepatic cGVHD patients. (a) CCR6-, CD161- and ROR $\gamma$ t-positive mononuclear cells are significantly increased in the dermis of liver with hepatic cGVHD (lower panel) compared with healthy donors (upper panel) (original magnification  $\times 400$ ). (b-d) Quantitative evaluation of CCR6 (b), CD161 (c) and ROR $\gamma$ t (d)-positive cells are represented. The mean values and s.e.m. for each group are represented.

Th17 cells and the more specific hallmark of Th17 cells, we defined the Th17/Th1 and Th17/Treg ratios as the ratio of ROR $\gamma$ t-positive cells/Tbet-positive cells and that of ROR $\gamma$ t-positive cells/Foxp3-positive cells, respectively. Both Th17/Th1 and Th17/Treg ratios

were significantly increased in the liver of patients with liver cGVHD ( $P = 0.005$  and  $P = 0.002$ , respectively; Figures 3d and e), suggesting an impaired regulatory response in the liver of patients with cGVHD.



**Figure 3.** Th17/Th1 and Th17/Treg ratios are increased in hepatic cGVHD. (a) The number of Tbet- and Foxp3-positive mononuclear cells in the liver of patients with liver cGVHD (lower panel) and in healthy donors (upper panel) was very low, and was identical in both groups (original magnification  $\times 400$ ). (b, c) Quantitative evaluation of CD8 (b) and GrB (c)-positive cells is represented. The mean values and s.e.m. for each group are represented. (d, e) Th17/Th1 (d) and Th17/Treg (e) ratios are increased in the liver of patients with liver cGVHD compared with healthy donors.

## DISCUSSION

The current study sheds some light on the role of Th17 and Treg cells in the context of liver cGVHD. Using well-established specific markers, we showed that (i) the number of activated cytotoxic CD8<sup>+</sup> and GrB<sup>+</sup> T cells was significantly increased in liver cGVHD, compared with the control group of patients; (ii) the number of Th17 cells was significantly increased in liver cGVHD compared with the control group of patients; and (iii) the number of Th1 and Treg cells was very low, not statistically different between the two groups of patients. Although immune dysfunction and autoreactivity may contribute to cGVHD pathophysiology, our study suggests a role for cytotoxic CD8<sup>+</sup> donor T cells in cGVHD, especially in the liver. Only scarce information is available on the role of CD8<sup>+</sup> T cells in cGVHD. Grogan *et al.*<sup>18</sup> showed an expansion of activated CD8<sup>+</sup> effector T cells in the blood of

patients with cGVHD, the CD8<sup>+</sup> central memory T cells being increased in cGVHD as well.<sup>19</sup> In contrast, D'Asaro *et al.*<sup>20</sup> observed a decrease in circulating CD8<sup>+</sup> naive T cells in cGVHD patients; however, in this study all patients were receiving immunosuppressive treatment at the time of analysis. On the other hand, our study provides evidence that liver cGVHD is associated with a liver infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells, especially in the portal space, in close contact with epithelial cells and associated with bile duct damage; furthermore, these cells are activated, as evidenced by GrB expression, the protein associated with cytotoxic granules. Thus, these data strongly suggest that CD8<sup>+</sup> T cells are part of the effector cells involved in liver cGVHD and likely contribute to tissue damage.

Croudace *et al.*<sup>21</sup> have recently shown a decrease in CD4<sup>+</sup> T cells expressing CXCR3 in the blood of patients with active

cGVHD, whereas CD4+ T cells were increased in skin biopsies of the same patients. Furthermore, the CXCR3-binding chemokines, CXCL9, CXCL10 and CXCL11, were significantly increased in the serum of patients with cutaneous cGVHD. These data established a role for CD4+ T cells in cGVHD. However, controversies remained regarding the role and nature of the different CD4+ T-cell subsets. Although Th2 immune responses have long been considered responsible for the development of cGVHD,<sup>22</sup> several studies have recently explored the role of Th1 and Th17 cells mainly in cGVHD mouse models, concluding on their pathological role.<sup>8,10</sup> However, analysis on their role in humans is scarcer. Some studies observed an increase in cytokines related to Th1 and Th17 in the blood of patients with cGVHD.<sup>11,23,24</sup> Furthermore, Dander et al.<sup>12</sup> observed a significant increase in the number of Th17 cells in the blood of patients with active cGVHD, and a high number of ROR $\gamma$ t+ cells infiltrating the skin and liver of patients with cGVHD compared with healthy donors. Unfortunately, because of the small sample size, the latter findings in the skin and the liver were not statistically significant. Thus, our findings confirmed and extended the knowledge about the pathogenic role of Th17 cells in liver cGVHD. Furthermore, the increased Th17/Th1 ratio in cGVHD highlights the predominant role of Th17 cells over Th1 cells in liver cGVHD pathogenesis. Also, it is worth mentioning that these results are in line with the increased IFN- $\gamma$  production in the blood of patients with cGVHD.<sup>25</sup> Indeed, Th17 and Th1 cells present a close relationship and plasticity,<sup>26</sup> and some ROR $\gamma$ t+ Th17 cells can produce both IFN- $\gamma$  and IL-17A especially in an inflammatory setting, when the precursors of Th17 cells are in the dominant presence of IL-23 and not of TGF- $\beta$ .<sup>27</sup> Furthermore, if Th1 cells are not observed in active liver cGVHD at the time of the biopsy, we can speculate that they act earlier in the initial stages of the disease.

Regarding Treg cells, published data are more homogeneous. Most studies showed a decreased frequency of Treg in the blood of patients with cGVHD<sup>28,29</sup> Furthermore, our results in liver cGVHD are in accordance with those of Dander et al.<sup>12</sup> in skin and liver cGVHD: the number of Foxp3+ Treg cells was very low and comparable in cGVHD liver biopsies and in healthy donor liver biopsies. Furthermore, our results suggest that there is an imbalance in liver cGVHD between Treg and Th17 cells as we found an increased Th17/Treg ratio. In contrast, Ratajczak et al.<sup>30</sup> found a decreased Th17/Treg ratio in cutaneous cGVHD. However, they did not analyze active cGVHD but chronic lichenoid skin lesions, and the number of patients included was lower than in our study (only five patients with cGVHD). This imbalance in the Th17/Treg ratio in liver cGVHD suggests the existence of a defect in the regulatory mechanisms driven by Treg cells or an inappropriate activation of effector cells, especially Th17 cells, or both mechanisms. One must acknowledge that one potential weakness of this study is the comparison of cGVHD patients with healthy controls. The ideal control would have been liver biopsies from patients who underwent allo-SCT and who did not develop any sign of cGVHD, which was impossible for obvious ethical reasons.

In conclusion, our study provides a framework for a regulatory defect and role of Th17-mediated response in human liver cGVHD,

raising the prospect of future innovative approaches to optimize immunosuppression regimens for the treatment of cGVHD by targeting the Th17 response. There are already clinical trials aiming to block the Th17 response using anti-IL-17 MoAbs for autoimmune diseases.<sup>31,32</sup>

**CONFLICT OF INTEREST**  
The authors declare no conflict of interest.

**ACKNOWLEDGEMENTS**  
The authors acknowledge the technical and logistical support of S Blandin, C Deleine, S Leclercq and V Dehame. We also thank the nursing staff for providing excellent care

for our patients, and the following physicians: N Blin, A Clavert, V Dubruille, T Gastinne, JL Harousseau, S Le Gouill, B Mahe, F Mechinaud and F Rialland for their dedicated patient care. FM and EB were supported by educational grants from the 'Association for Training, Education and Research in Hematology, Immunology and Transplantation' (ATERHIT). This work was supported by funding as part of the CESTI project (Nantes, France). We also thank the 'Région Pays de Loire', the 'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC; grant #3175 to MM and BG)', the 'Fondation de France', the 'Fondation contre la Leucémie', the 'Agence de Biomédecine', the 'Association CentpourSang la Vie', the 'Association Laurette Fugain', the IRGHET and the 'Ligue Contre le Cancer' (Comités Grand-Ouest) for their generous and continuous support of our clinical and basic research work. Our transplant programs are supported by several grants from the French national cancer institute (PHRC, INCa to MM). The authors acknowledge the continuous support of the cell banking facility ('tumorotheque') of the CHU de Nantes.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed in the manuscript have contributed substantially to this work: conception and design: Florent Malard, Mohamad Mohty, Béatrice Gaugler, Céline Bossard; financial support: Mohamad Mohty, Marc Grégoire; administrative and logistical support: Jean-François Mosnier, Mohamad Mohty, Béatrice Gaugler, Marc Grégoire; provision of study materials and patients care: Eolia Brissot, Patrice Chevallier, Thierry Guillaume, Jacques Delaunay, Philippe Moreau, Mohamad Mohty; experimental work: Florent Malard, Céline Bossard; collection and assembly of clinical data: Florent Malard, Eolia Brissot, Mohamad Mohty; data analysis and interpretation: Florent Malard, Céline Bossard, Mohamad Mohty, Béatrice Gaugler; manuscript writing: Florent Malard, Mohamad Mohty, Céline Bossard, Béatrice Gaugler; final approval of manuscript: all co-authors.

## REFERENCES

- 1 Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; **373**: 1550–1561.
- 2 Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ 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* 2005; **11**: 945–956.
- 3 Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K et al. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? *J Dermatol Sci* 2008; **50**: 240–242.
- 4 Sakai A, Sugawara Y, Kuroishi T, Sasano T, Sugawara S. Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. *J Immunol* 2008; **181**: 2898–2906.
- 5 Espinosa A, Dardalhon V, Brauner S, Ambrosi A, Higgs R, Quintana FJ et al. Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by dysregulating the IL-23-Th17 pathway. *J Exp Med* 2009; **206**: 1661–1671.
- 6 Chen X, Das R, Komorowski R, van Snick J, Uyttenhove C, Drobyski WR. Interleukin 17 is not required for autoimmune-mediated pathologic damage during chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; **16**: 123–128.
- 7 Lohr J, Knoechel B, Wang JJ, Villarino AV, Abbas AK. Role of IL-17 and regulatory T lymphocytes in a systemic autoimmune disease. *J Exp Med* 2006; **203**: 2785–2791.
- 8 Chen X, Vodanovic-Jankovic S, Johnson B, Keller M, Komorowski R, Drobyski WR. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2007; **110**: 3804–3813.
- 9 Hill GR, Olver SD, Kuns RD, Varelias A, Raffelt NC, Don AL et al. Stem cell mobilization with G-CSF induces type 17 differentiation and promotes scleroderma. *Blood* 2010; **116**: 819–828.
- 10 Nishimori H, Maeda Y, Teshima T, Sugiyama H, Kobayashi K, Yamasuji Y et al. Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17. *Blood* 2012; **119**: 285–295.
- 11 Ritchie D, Seconi J, Wood C, Walton J, Watt V. Prospective monitoring of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma to predict the onset of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; **11**: 706–712.
- 12 Dander E, Baldazzi A, Zappa G, Lucchini G, Perseghin P, Andre V et al. Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2009; **88**: 1261–1272.

cGVHD, whereas CD4+ T cells were increased in skin biopsies of the same patients. Furthermore, the CXCR3-binding chemokines, CXCL9, CXCL10 and CXCL11, were significantly increased in the serum of patients with cutaneous cGVHD. These data established a role for CD4+ T cells in cGVHD. However, controversies remained regarding the role and nature of the different CD4+ T-cell subsets. Although Th2 immune responses have long been considered responsible for the development of cGVHD,<sup>22</sup> several studies have recently explored the role of Th1 and Th17 cells mainly in cGVHD mouse models, concluding on their pathological role.<sup>8,10</sup> However, analysis on their role in humans is scarcer. Some studies observed an increase in cytokines related to Th1 and Th17 in the blood of patients with cGVHD.<sup>11,23,24</sup> Furthermore, Dander et al.<sup>12</sup> observed a significant increase in the number of Th17 cells in the blood of patients with active cGVHD, and a high number of ROR $\gamma$ t+ cells infiltrating the skin and liver of patients with cGVHD compared with healthy donors. Unfortunately, because of the small sample size, the latter findings in the skin and the liver were not statistically significant. Thus, our findings confirmed and extended the knowledge about the pathogenic role of Th17 cells in liver cGVHD. Furthermore, the increased Th17/Th1 ratio in cGVHD highlights the predominant role of Th17 cells over Th1 cells in liver cGVHD pathogenesis. Also, it is worth mentioning that these results are in line with the increased IFN- $\gamma$  production in the blood of patients with cGVHD.<sup>25</sup> Indeed, Th17 and Th1 cells present a close relationship and plasticity,<sup>26</sup> and some ROR $\gamma$ t+ Th17 cells can produce both IFN- $\gamma$  and IL-17A especially in an inflammatory setting, when the precursors of Th17 cells are in the dominant presence of IL-23 and not of TGF- $\beta$ .<sup>27</sup> Furthermore, if Th1 cells are not observed in active liver cGVHD at the time of the biopsy, we can speculate that they act earlier in the initial stages of the disease.

Regarding Treg cells, published data are more homogeneous. Most studies showed a decreased frequency of Treg in the blood of patients with cGVHD<sup>28,29</sup> Furthermore, our results in liver cGVHD are in accordance with those of Dander et al.<sup>12</sup> in skin and liver cGVHD: the number of Foxp3+ Treg cells was very low and comparable in cGVHD liver biopsies and in healthy donor liver biopsies. Furthermore, our results suggest that there is an imbalance in liver cGVHD between Treg and Th17 cells as we found an increased Th17/Treg ratio. In contrast, Ratajczak et al.<sup>30</sup> found a decreased Th17/Treg ratio in cutaneous cGVHD. However, they did not analyze active cGVHD but chronic lichenoid skin lesions, and the number of patients included was lower than in our study (only five patients with cGVHD). This imbalance in the Th17/Treg ratio in liver cGVHD suggests the existence of a defect in the regulatory mechanisms driven by Treg cells or an inappropriate activation of effector cells, especially Th17 cells, or both mechanisms. One must acknowledge that one potential weakness of this study is the comparison of cGVHD patients with healthy controls. The ideal control would have been liver biopsies from patients who underwent allo-SCT and who did not develop any sign of cGVHD, which was impossible for obvious ethical reasons.

In conclusion, our study provides a framework for a regulatory defect and role of Th17-mediated response in human liver cGVHD,

- 13 Shulman HM, Kleiner D, Lee SJ, Morton T, Pavletic SZ, Farmer E et al. Histopathologic diagnosis of chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II. Pathology Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; **12**: 31–47.
- 14 Annunziato F, Cosmi L, Santarasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007; **204**: 1849–1861.
- 15 Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007; **8**: 639–646.
- 16 Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP et al. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med* 2009; **206**: 525–534.
- 17 Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; **126**: 1121–1133.
- 18 Grogan BM, Tabellini L, Storei B, Bumgarner TE, Astigarraga CC, Flowers ME et al. Activation and expansion of CD8(+) T effector cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; **17**: 1121–1132.
- 19 Yamashita K, Horwitz ME, Kwatemaa A, Nomicos E, Castro K, Sokolic R et al. Unique abnormalities of CD4(+) and CD8(+) central memory cells associated with chronic graft-versus-host disease improve after extracorporeal photopheresis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; **12**: 22–30.
- 20 D'Asaro M, Salerno A, Dieli F, Caccamo N. Analysis of memory and effector CD8+ T cell subsets in chronic graft-versus-host disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009; **22**: 195–205.
- 21 Croudace JE, Inman CF, Abbotts BE, Nagra S, Nunnick J, Mahendra P et al. Chemokine-mediated tissue recruitment of CXCR3+ CD4+ T-cells plays a major role in the pathogenesis of chronic graft versus host disease. *Blood* 2012; **120**: 4246–4255.
- 22 De Wit D, Van Mechelen M, Zanin C, Doutrelépont JM, Velu T, Gerard C et al. Preferential activation of Th2 cells in chronic graft-versus-host reaction. *J Immunol* 1993; **150**: 361–366.
- 23 Ochs LA, Blazar BR, Roy J, Rest EB, Weisdorf DJ. Cytokine expression in human cutaneous chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1996; **17**: 1085–1092.
- 24 Faber LM, van Luxemburg-Heijns SA, Veenhof WF, Willemze R, Falkenburg JH. Generation of CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones from a patient with severe graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: implications for graft-versus-leukemia reactivity. *Blood* 1995; **86**: 2821–2828.
- 25 Korholz D, Kunst D, Hempel L, Sohngen D, Heyll A, Bonig H et al. Decreased interleukin 10 and increased interferon-gamma production in patients with chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; **19**: 691–695.
- 26 Nistala K, Adams S, Cambrook H, Ursu S, Olivito B, de Jager W et al. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 14751–14756.
- 27 Lee YK, Mukasa R, Hatton RD, Weaver CT. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol* 2009; **21**: 274–280.
- 28 Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005; **106**: 2903–2911.
- 29 Li Q, Zhai Z, Xu X, Shen Y, Zhang A, Sun Z et al. Decrease of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematopoiesis stem cell transplantation. *Leuk Res* 2010; **34**: 1158–1168.
- 30 Ratajczak P, Janin A, Peffault de Latour R, Leboeuf C, Desveaux A, Keyvanfar K et al. Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood* 2010; **116**: 1165–1171.
- 31 Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, Cameron G, Li L, Edson-Heredia E et al. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med* 2012; **366**: 1190–1199.
- 32 Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Krueger JG, Kricorian G et al. Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med* 2012; **366**: 1181–1189.

## **5-2-Article n°4 : « IL-22 deficiency in donor T cells attenuate murine acute graft-versus-host-disease mortality while sparing the graft versus leukemia effect »**

### **5-2-1-Résultats principaux**

Nous avons mis en évidence que les lymphocytes Th17 contribuaient à la GVHD aiguë chez l'homme. Les modèles murins ont mis en évidence que les dommages induits par les Th17 dans la GVHD aiguë étaient médiés notamment par l'IL-17 et l'IL-21. L'IL-22 est une cytokine de la famille de l'IL-10, sécrétée par les Th17, les lymphocytes T $\gamma$  $\delta$ , les cellules NK et les ILC. Au vu du rôle paradoxal de l'IL-22 dans l'inflammation, avec un rôle pro ou anti-inflammatoire selon le contexte clinique, nous avons voulu déterminer si l'IL-22 avait un rôle dans la physiopathologie de la GVHD aiguë dans un modèle murin d'allo-CSH. Nous avons montré que l'utilisation de lymphocytes T du donneur invalidés pour l'IL-22 entraîne une diminution de la sévérité de la GVHD aiguë et une augmentation de l'inflammation systémique et locale dans les organes cibles de la GVHD aiguë. De plus, nous avons montré une augmentation des Tregs dans les souris recevant des lymphocytes T invalidés pour l'IL-22, suggérant que les Tregs sont impliqués dans la diminution de la sévérité de la GVHD. Enfin, nous avons montré que l'effet du greffon contre la leucémie médié par les lymphocytes T était conservé en l'absence d'IL-22. Ces résultats suggèrent que les effets des lymphocytes Th17 dans la physiopathologie de la GVHD aiguë sont liés, en partie au moins, à l'IL-22. On ne peut cependant exclure que l'IL-22 soit sécrétée par d'autres sous types de lymphocytes, en particulier les ILC. L'IL-22 apparaît être une cible thérapeutique potentielle séduisante pour diminuer la sévérité de la GVHD aiguë après allo-CSH, tout en préservant l'effet du greffon contre la leucémie.

### **5-2-2-Article**

Publié dans Leukemia en Février 2013.

## ORIGINAL ARTICLE

# IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect

M Couturier<sup>1,2,3,8</sup>, B Lamarthée<sup>1,2,3,8</sup>, J Arbez<sup>1,2,3</sup>, J-C Renaud<sup>4</sup>, C Bossard<sup>5</sup>, F Malard<sup>6,7</sup>, F Bonnefoy<sup>1,2,3</sup>, M Mohty<sup>6,7</sup>, S Perruche<sup>1,2,3</sup>, P Tiberghien<sup>1,2,3</sup>, P Saas<sup>1,2,3</sup> and B Gaugler<sup>1,2,3</sup>

Acute graft-versus-host disease (aGVHD) remains a major complication following allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT), limiting the success of this therapy. Many proinflammatory cytokines secreted following the conditioning regimen have been linked to aGVHD initiation. Interleukin-22 (IL-22) is a cytokine related to IL-10 for its structure and is secreted by T helper type 17 (TH17) cells and innate immune cells. Given the paradoxical role of IL-22 in inflammation with both protective or proinflammatory functions, we investigated whether IL-22 could have a role in aGVHD pathophysiology in a mouse allo-HCT model. In this study, we show that IL-22 deficiency in donor T cells can decrease the severity of aGVHD, while limiting systemic and local inflammation in aGVHD target organs. In addition, we found that Foxp3+ regulatory T cells (Treg cells) were increased in recipient mice that received IL-22-deficient T cells, suggesting that Treg were involved in the reduced severity of GVHD. Finally, we found that the graft-versus-leukemia (GVL) effect mediated by donor T cells was preserved in the absence of IL-22. Overall, these data suggest that targeting of IL-22 may represent a valid approach towards decreasing aGVHD severity after allo-HCT while preserving the GVL effect.

*Leukemia* advance online publication, 5 March 2013; doi:10.1038/leu.2013.39

**Keywords:** IL-22; GVHD; transplantation

## INTRODUCTION

Acute graft-versus-host disease (aGVHD) remains a major complication following allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT), limiting the success of this therapy.<sup>1,2</sup> GVHD is the result of alloreactive donor T cells attacking host tissues, including, but not limited to, the skin, liver and gut.<sup>3</sup> Many proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1β, tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-12 and interferon (IFN)-γ secreted following the conditioning regimen have been linked to aGVHD initiation and pathophysiology.<sup>4–6</sup> More recently, we and others reported that T helper type 17 (TH17)-related cytokines (especially IL-17A and IL-21) can contribute to aGVHD pathophysiology.<sup>7–10</sup> IL-22 is a cytokine structurally related to the IL-10 family and is secreted by TH17 cells, γδ T cells, natural killer cells and innate lymphoid cells (ILC).<sup>11–13</sup> The IL-22 receptor (IL-22R) is mainly expressed by non-hematopoietic cells, including epithelial cells of the lung and of the gastrointestinal tract as well as keratinocytes,<sup>14,15</sup> found in the sites of aGVHD. *In vitro* studies showed that IL-22 can activate Stat3 (signal transducer and activator of transcription factor 3) inducing the expression of antimicrobial molecules S100A7, S100A8, S100A9 and β-defensins in keratinocytes.<sup>14,16,17</sup> IL-22 can have either a protective or a pathogenic role in chronic inflammatory diseases depending on the nature of the affected

tissue and the local cytokine milieu. IL-22 has been shown to be protective in several colitis models.<sup>18–20</sup> By contrast, it has been reported that IL-22 is associated with the pathogenesis of rheumatoid arthritis<sup>21</sup> or in the development of psoriasis.<sup>14,22</sup> Given the broad activity of IL-22, we hypothesized that donor-derived IL-22 could contribute to aGVHD pathophysiology. Thus, we examined the contribution of donor-derived IL-22 to aGVHD in experimental mouse models of allo-HCT using IL-22-deficient mice. We found that donor-derived IL-22 has a key role in exacerbating the inflammation in the gastrointestinal tract and contributes to the severity of aGVHD but does not significantly interfere with the graft-versus-leukemia (GVL) effect.

## MATERIALS AND METHODS

## Mice

BALB/c (H-2<sup>d</sup>) and B6D2F1 (H-2<sup>b/d</sup>) mice were purchased from Janvier (Genest-St-Isle, France). C57BL/6 IL-22<sup>-/-</sup> (B6.IL-22<sup>-/-</sup>, H-2<sup>b</sup>), which were originally generated in the 129 background and were subsequently backcrossed with C57BL/6 for 13 generations, and C57BL/6 (B6.WT, H-2<sup>b</sup>) mice were provided by J.C. Renaud (Ludwig Institute for Cancer Research, Brussel, Belgium). We next maintained breeding colonies in our animal facility. All mice were used at 8–12 weeks of age. All protocols were

<sup>1</sup>INSERM UMR1098, Besançon, France; <sup>2</sup>Université de Franche-Comté, UMR 1098, Besançon, France; <sup>3</sup>EFS Bourgogne Franche-Comté, UMR 1098, Besançon, France; <sup>4</sup>Ludwig Institute for Cancer Research and Experimental Medicine Unit, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium; <sup>5</sup>EA 4273 Biometadys, Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France; <sup>6</sup>Service d'Hématologie Clinique, CHU and Université de Nantes, Nantes, France and <sup>7</sup>INSERM CRNCA UMR892, Nantes, France. Correspondence: Dr B Gaugler, INSERM UMR1098, EFS Bourgogne Franche-Comté, 1 Bd A Fleming, Besançon Cedex F-25020, France. E-mail: beatrice.gaugler@efs.sante.fr

<sup>a</sup>These authors contributed equally to this work.

Received 1 October 2012; revised 20 January 2013; accepted 6 February 2013; accepted article preview online 12 February 2013

performed according to the approval of the 'Services Vétérinaires de la Santé et de la Protection Animale' delivered by the Ministry of Agriculture (Paris, France).

#### Hematopoietic cell transplantation procedures

Recipient mice were conditioned with total body irradiation administered at a single lethal dose on day -1 at 1100 cGy (B6D2F1) or 750 cGy (BALB/c). To induce aGVHD in BALB/c recipients, mice were transplanted with  $5 \times 10^6$  allogeneic T-cell-depleted bone marrow (TCD BM) from B6.WT and  $1 \times 10^6$  allogeneic donor splenic T cells from B6.WT or B6.IL-22<sup>-/-</sup> mice. Syngeneic control mice were obtained by transferring  $1 \times 10^6$  splenic T cells from BALB/C mice. T-cell depletion was performed using the CD3 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) and purified populations of donor T cells were obtained using the Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Treg (regulatory T cells; CD25)-T-cell depletion was performed using CD25-PE and anti-PE microbeads and AutoMacsPro (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. The purity of TCD BM and T cells in all the experiments exceeded 95%. CD25-depleted T cells' purity were, respectively,  $98.2 \pm 1.6\%$  for WT T cells and  $98.2 \pm 2.1\%$  for IL-22<sup>-/-</sup> T cells. To induce aGVHD in B6D2F1 recipients, mice were transplanted with allogeneic splenocytes ( $10 \times 10^6$  cells, B6.WT or B6.IL-22<sup>-/-</sup>) or syngeneic splenocytes ( $10 \times 10^6$  cells, B6D2F1) isolated from donor mice previously treated by subcutaneous injection of 10 µg/animal recombinant human granulocyte colony-forming factor (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) on day -5. Cells were injected in the lateral tail vein.

#### GVL effect analysis

To examine the GVL effect,  $5 \times 10^5$  luciferase-expressing A20 leukemic cells (A20-luc, H-2<sup>d</sup>) were given along with TCD BM in BALB/c recipients. Mice received 750 cGy total body irradiation on day -1. Delayed allogeneic T-cell infusions ( $1.10^6$  T B6.WT or B6.IL-22<sup>-/-</sup>) were given on day 7 after allo-HCT. For GVL effect assessment by bioluminescence imaging (BLI), mice were injected intravenously with 150 µg/g body weight E-luciferin (Promega, Lyon, France) diluted in phosphate-buffered saline and anesthetized using isofluorane (2.5% vaporized in O<sub>2</sub>). For analysis, imaging was done 5 min later using NightOWL I imaging system (Berthold Technologies GmbH and Co. KG, Bad Wildbad, Germany) and total photon flux (photons per second) was measured from a fixed region of interest over the entire abdomen and thorax using WinLight software (Berthold Technologies). BLI was performed 1 day before and 3 days after delayed donor T-cell infusions, then once every week until day 40 after allo-HCT.

#### Assessment of GVHD

The degree of systemic aGVHD was assessed by a scoring system that sums changes in five clinical parameters: weight loss, posture (hunching), activity, fur texture and skin integrity (maximum index = 10), as previously described.<sup>23</sup> Recipient mice were graded weekly from 0 to 2 for each criterion without knowledge of the treatment group. Animals with severe clinical aGVHD (scores > 6) were killed according to ethical guidelines. For histological analyses, samples of the skin, small and large intestine were removed immediately after killing, and fixed in 4% formalin. Paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin. The histological grade of skin aGVHD was assessed according to the grading system, used routinely to assess the human skin aGVHD:<sup>24</sup> grade 1, focal or diffuse vacuolar alteration of the basal cell layer; grade 2, grade 1 change plus dyskeratotic squamous cell in the epidermis; grade 3, grade 2 plus subepidermal vesical formation; and grade 4, complete separation of the epidermis from the dermis. The histological grade of small and large intestine aGVHD was assessed according to the grading system previously described.<sup>25</sup> Scores were determined in a blinded fashion by two pathologists.

#### Flow cytometry analysis

At designated time points, animals were killed and organs were collected. Single-cell suspensions of the spleen, peripheral (PLN) and mesenteric lymph nodes (MLN) were prepared passing through sterile mesh filters. For detection of cytokine production, cells were stimulated for 6 h with 25 ng/ml phorbol-12-myristate-13-acetate (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and 1 µg/ml ionomycin (Sigma-Aldrich), with 1 µl/ml Golgi Plug (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France) before staining for flow cytometric analysis. Cells were first stained with eFluor780 Fixable Viability Dye (eBioscience, Paris,

France) according to the manufacturer's instructions. Surface staining was performed using FITC (fluorescein isothiocyanate)-conjugated CD3 (from BD Biosciences), Pacific Blue-CD4 and PE-CD8 antibodies (from Biolegend, Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), cells were then fixed and permeabilized using CytoFix/Perm Buffer (BD Biosciences) before staining with PE/Cy7-IFN-γ, PercP/Cy5.5-TNF-α (Biolegend) and APC (allophycocyanin)-IL-17A- (eBioscience) specific antibodies or the corresponding isotype controls. For the detection of IL-22-secreting cells, cells were stained with Horizon V500-conjugated CD3 (from BD Biosciences), Pacific Blue-CD4 and PercP-CD8 antibodies (from Biolegend, Ozyme), cells were then fixed and permeabilized using CytoFix/Perm Buffer (BD Biosciences) before staining with PE/Cy7-IFN-γ (Biolegend), PE-IL-22 and APC-IL-17A- (eBioscience) specific antibodies or the corresponding isotype controls. Analysis was performed using FACSCanto II and FACSDiva software (BD Biosciences). Treg cell analysis was performed by cell surface staining with FITC-CD3, Pacific Blue-CD4 (from Biolegend) and APC-CD25 (from BD Biosciences), cells were then fixed and permeabilized with Foxp3 Staining Buffer set (eBioscience) and stained with PE-Foxp3 (clone FJK16, eBioscience).

#### Real-time PCR analysis

Before RNA extraction, tissue samples were homogenized using FastPrep-24 system (MP Biomedicals Europe, Illkirch, France). RNA was extracted using RNeasy Mini kit (Qiagen, Cergy-Pontoise, France) with RLT buffer (Qiagen) supplemented with β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Total RNA was subjected to reverse transcription (High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix, Applied Biosystems, Courtabœuf, France) and quantified by real-time quantitative PCR using commercially available primer/probe sets (Assay On Demand, Applied Biosystems). Real-time PCR were performed on the iCycler CFX96 real-time PCR system (Life Science, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Relative expression for the mRNA transcripts was calculated using the ΔΔCt method and G6PDH mRNA transcript as reference.

#### Cytokines measurements

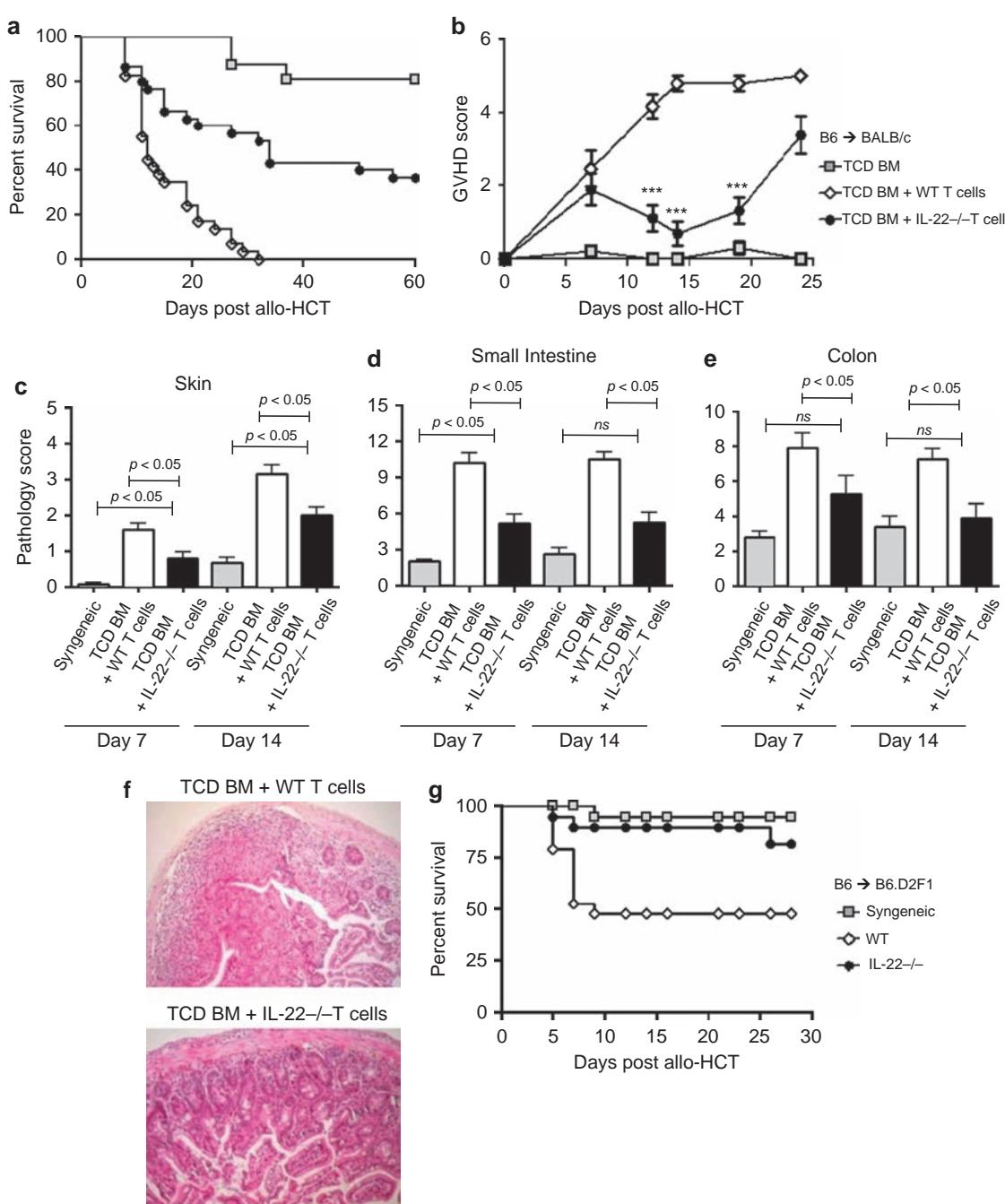
Blood samples were obtained from recipient mice at day 6 after allo-HCT. Cytokines were quantified in plasma using BD cytometric bead array kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. TNF-α and IL-22 levels in cell culture supernatants were measured using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits (Biolegend) according to the manufacturer's instructions.

#### Statistical analysis

Group comparisons of cell populations, gene expression, cytokine levels and pathology scores data were performed using the Student's t-test. Survival curves were compared using the log-rank test. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant in all the experiments. Data were computed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## RESULTS

Absence of IL-22 in donor T cells decreases acute GVHD severity To examine the contribution of IL-22 produced by donor T cells in regulating development of aGVHD, we induced aGVHD by transferring T cells from wild-type C57BL/6 (B6.WT) or IL-22-deficient C57BL/6 (B6.IL-22<sup>-/-</sup>) mice with TCD BM into lethally irradiated allogeneic BALB/c-recipient mice. The absence of IL-22 in donor T cells led to a reduction from aGVHD-induced mortality as compared with recipients receiving WT allogeneic T cells (median survival time 12 versus 34 days,  $P < 0.0001$ ; Figure 1a) and to a reduced morbidity as shown by a significant lower clinical score up to day 24 (clinical aGVHD score on day 12 following allo-HCT: WT T cells  $4.17 \pm 0.33$  versus IL-22<sup>-/-</sup> T cells  $1.11 \pm 0.36$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 1b). Furthermore, we observed that the severity of aGVHD assessed by histological grade was significantly reduced in the skin and small intestine and colon of mice that received IL-22-deficient donor T cells compared with mice that received WT donor T cells (Figures 1c-f). As expected, we observed a significant increase of pathological scores in tissues from mice receiving allogeneic T cells as compared with syngeneic T cells. By contrast,



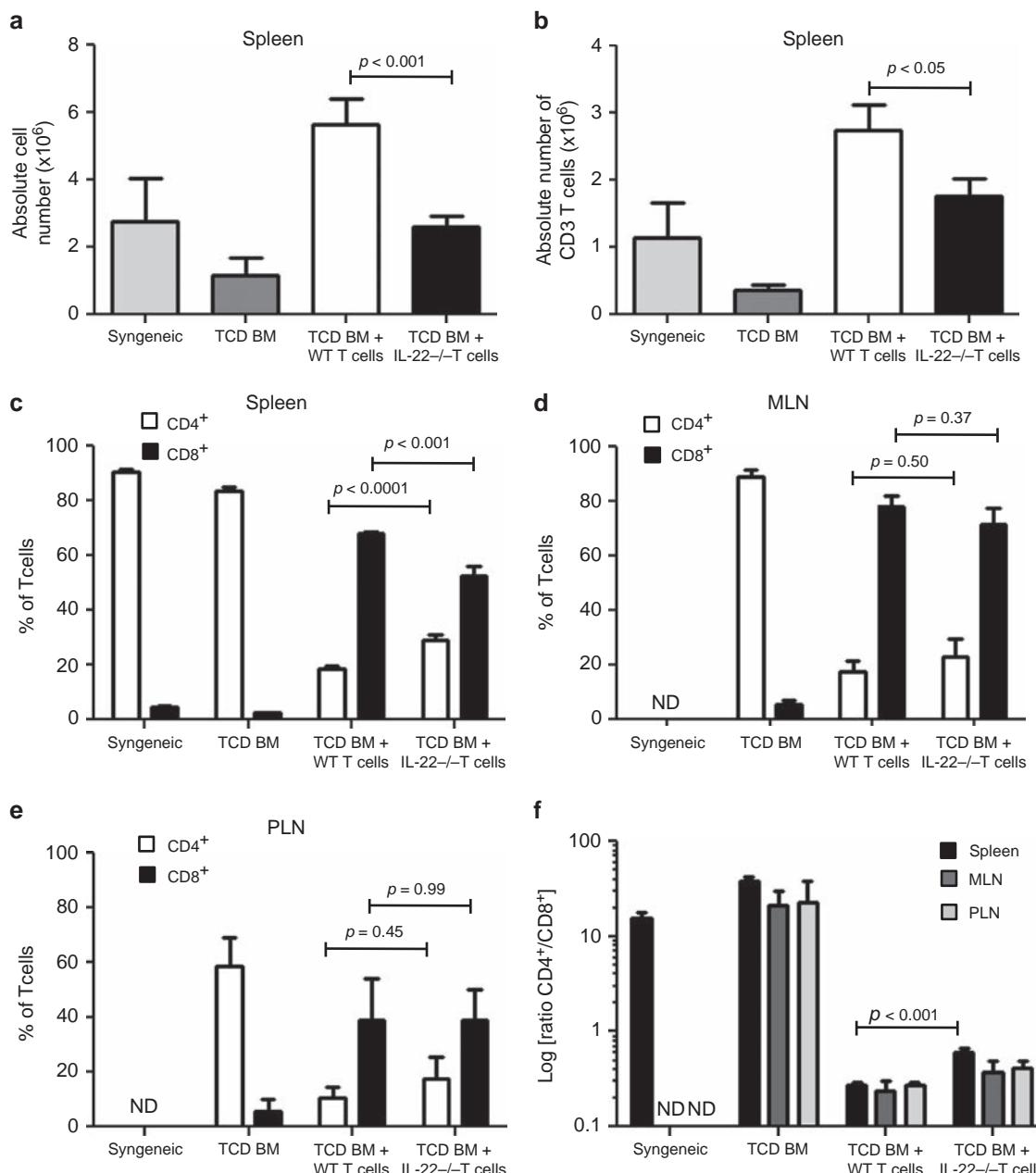
**Figure 1.** Absence of T-cell-derived IL-22 decreases acute GVHD severity. Lethally irradiated BALB/c recipients were transplanted with  $5 \times 10^6$  B6.WT TCD BM only or with  $1 \times 10^6$  B6.WT T cells or  $1 \times 10^6$  B6.IL22<sup>-/-</sup> T cells ( $n=30$  per group and five independent experiments). (a) Survival data are shown (log-rank test,  $P<0.0001$  for B6 TCD BM + B6.WT T cells versus B6.IL22<sup>-/-</sup> T cells). (b) GVHD clinical scores were determined as described in Methods and were decreased in B6.TCD BM + B6.IL22<sup>-/-</sup> T-cell recipients, at days 12, 14 and 19 post allo-HCT,  $P<0.0001$ . (c–e) Pathology scores in the skin, small intestine and colon in mice 7 and 14 days after allo-HCT. Data are presented as the mean  $\pm$  s.e.m. from cumulative results from three experiments for day 7 and two experiments for day 14. Scores are significantly different between the syngeneic groups and the TCD BM + WT T cells groups ( $P<0.05$ ),  $P$ -values are indicated on the graphs for comparison between the groups of syngeneic and TCD BM + WT T cells or between TCD BM + WT T cells and TCD BM + IL-22<sup>-/-</sup> T cells. (f) A representative example of the section of the small intestine of BALB/C mice transplanted with TCD BM and B6.WT T cells or B6.IL22<sup>-/-</sup> T cells at day 7 ( $\times 20$  magnification). Intestinal mucosa of TCD BM + B6.WT T-cell recipient mice was characterized by an increased number of mononuclear inflammatory cells with extensive crypt loss and an increased number of apoptotic epithelial cells in resting crypts. Non-inflammatory intestinal mucosa was characterized by a normal architecture without crypt loss. Only some apoptotic epithelial cells were individualized in the bottom of some crypt. (g) Splenocytes from granulocyte colony-forming factor mobilized B6.WT or B6.IL-22<sup>-/-</sup> donor mice or syngeneic B6.D2F1 as control were transplanted into lethally irradiated B6.D2F1-recipient mice ( $n=12$  per group). Survival data are shown (log-rank test,  $P<0.01$  for B6.WT versus B6.IL-22<sup>-/-</sup> splenocytes).

for small intestine and colon, no significant differences were detected between mice receiving syngeneic T cells and IL-22<sup>-/-</sup> T cells, reflecting the reduced severity of aGVHD induced by IL-22<sup>-/-</sup> T cells. Moreover, we also observed a reduction in aGVHD-induced mortality in another aGVHD model<sup>26</sup> consisting of transplanting lethally irradiated B6D2F1-recipient mice with donor splenocytes from B6.WT or B6.IL-22<sup>-/-</sup> mice that have received subcutaneous injections of granulocyte colony-forming factor (median survival: 9 days versus a median survival not reached, log-rank test  $P < 0.01$ ; Figure 1g). In this model, in which lethality related to GVHD was reduced as compared with the B6 → BALB/C model, we confirmed the decreased severity of aGVHD in the absence of IL-22 from donor cells. These data demonstrated that

IL-22 deficiency in donor T cells reduced aGVHD mortality and decreased aGVHD severity after allo-HCT, suggesting a potential pathological role of IL-22 in this allo-HCT setting.

#### Absence of T-cell-derived IL-22 leads to a reduction of inflammatory CD8 T cells in lymphoid organs

To investigate the contribution of T effector cell subsets in the development of aGVHD, we examined the proportion of CD4+ and CD8+ T cells in the spleen, PLN and MLN of recipient mice at day 6 after allo-HCT. As shown in Figure 2, absolute splenocytes and CD3+ T-cell numbers were decreased in recipient mice receiving B6.IL-22<sup>-/-</sup> T cells as compared with mice receiving



**Figure 2.** Absence of T-cell-derived IL-22 leads to decreased splenic CD8+ T cells. Lethally irradiated BALB/c recipients were transplanted with B6 TCD BM only or with B6.WT T cells or B6.IL-22<sup>-/-</sup> T cells. Syngeneic controls were transplanted with BALB/c TCD BM and BALB/c T cells. Splenocytes, MLN and PLN from recipient mice were harvested at day 6 post allo-HCT. Absolute numbers of (a) total splenocytes and (b) CD3+ T cells are shown. The proportion of CD4+ and CD8+ T cells in the (c) spleen, (d) MLN and (e) PLN were analyzed by flow cytometry. Mean ± s.e.m. is shown ( $n = 12$ ) and data are combined from at least three independent experiments. (f) CD4+/CD8+ ratio is indicated. ND, not determined.

B6.WT T cells (Figures 2a and b). Also, the proportion of CD8+ T cells was significantly decreased in the spleen, but not in MLN and PLN, of recipient mice receiving B6.IL-22<sup>-/-</sup> T cells as compared with mice receiving B6.WT T cells (Figures 2c–e), leading to an increased CD4/CD8 T-cell ratio (Figure 2f,  $P < 0.001$  in spleen). These differences observed *in vivo* were not related to an attenuated proliferative capacity of IL-22<sup>-/-</sup> T cells, as demonstrated by similar *in vivo* proliferation assessed by CFSE (carboxy-fluorescein succinimidyl ester) staining (Supplementary Figure S1), as well as *in vitro* proliferation in response to the stimulation by anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Supplementary Figure S2A and B). We also observed a trend towards an increased CD4/CD8 ratio in the PLN and MLN of B6.IL-22<sup>-/-</sup> T cell allo-HCT-recipient mice (Figure 2f).

We next investigated the profile of cytokines secreted by alloreactive T cells post allo-HCT. We observed that IL-22 secretion was induced in splenocytes as well as in cells isolated from MLN (Figure 3a) from B6.WT T-cell recipients, but not from B6.IL-22<sup>-/-</sup> T-cell recipients as expected, further suggesting that IL-22 contributes to aGVHD pathophysiology. In addition, we also observed that intracellular IL-22 staining was revealed in CD4+ T cells in the spleen and MLN in the B6.WT T-cell recipients, but not in syngeneic T-cell recipients, suggesting that IL-22 production resulted, at least in the spleen, from the alloreactive response of T cells (Figures 3b and c). Furthermore, IL-22 secretion was detected only after *ex vivo* restimulation of T cells (data not shown). We excluded that IL-22 was secreted by  $\gamma/\delta$  T cells, because they were not detectable in the spleen and MLN after allo-HCT (data not shown). We next addressed whether the absence of IL-22 in donor T cells affected the generation of TH1 and TH17 cells *in vivo* 1 week after allo-HCT. We found no significant difference in IL-17A+ T cells among CD3+CD4+ splenocytes (Figure 3d), whereas a strong TH1 response was observed (Figures 3e and f). We could observe a trend for a decrease in the number of IFN- $\gamma$  secreting CD8+ T cells in the spleen from B6.IL-22<sup>-/-</sup> allo-HCT recipients as compared with B6.WT recipients (Figures 3e and f), suggesting that IL-22 indirectly could be involved in the modulation of the TH1 response. Nevertheless, we did not observe differences in the capacity of T cells isolated from the spleen of B6.WT or B6.IL-22<sup>-/-</sup> mice and activated *in vitro* by anti-CD3/CD28 antibodies to secrete IFN- $\gamma$  (Supplementary Figure S2C–E). The great majority of IL-22+ CD4+ and CD8+ T cells were also IFN- $\gamma$ + but not IL-17A+ (Supplementary Figure S3). We also analyzed the secretion of TNF- $\alpha$  by splenocytes isolated from allo-HCT recipients 1 week after allo-HCT. A significantly reduced number of TNF- $\alpha$ + CD4+ and CD8+ T cells were detected in B6.IL-22<sup>-/-</sup> recipients (Figures 3g and h,  $P < 0.01$ ). Moreover, the level of TNF- $\alpha$  measured by enzyme-linked immunosorbent assay in the supernatant of splenocytes activated *in vitro* for 24 h by phorbol-12-myristate-13-acetate and ionomycin was significantly reduced in B6.IL-22<sup>-/-</sup> recipients (Figure 3i,  $P < 0.05$ ). Thus, the decreased TNF- $\alpha$  secretion could contribute to the diminished incidence of aGVHD in IL-22<sup>-/-</sup> T-cell recipients.

#### Absence of T-cell-derived IL-22 leads to an expansion of Treg cells in lymphoid organs

As IL-22 deficiency in donor T cells resulted in reduced aGVHD, we analyzed whether inhibition of aGVHD involved a Treg-dependent mechanism. On day 6 after allo-HCT, we found a significant increase in the proportion of CD25+ Foxp3+ Treg among CD4+ T cells from the spleen (Figures 4a and b,  $P < 0.005$ ) as well as an increase of the numbers of Treg in the spleen of B6.IL-22<sup>-/-</sup> T-cell recipients as compared with B6.WT T-cell recipients (Figure 4c,  $P < 0.005$ ), suggesting that the increase in Treg could contribute to the regulation of the alloreactive response. This difference was not due to a difference in the graft content because the numbers of Treg CD4+CD25+Foxp3+ were similar

in T cells from the spleen of B6.WT or B6.IL-22<sup>-/-</sup> mice ( $11.9\% \pm 0.7$  for WT Treg and  $9.8\% \pm 1.1$  for IL-22<sup>-/-</sup> Treg,  $P = 0.21$ ). Moreover, we did not detect any differences in their suppressive capacity by evaluating *in vitro* using CD4+CD25+ T cells stained with CFSE cultured in the presence of CD4+CD25+ Treg isolated from B6.WT or B6.IL-22<sup>-/-</sup> spleen cells (Supplementary Figure S4). To evaluate the contribution of Treg for the IL-22-mediated effects on aGVHD, we performed BMT experiments using CD25-depleted T cells from WT and IL-22<sup>-/-</sup> donor mice. On day 6 after allo-HCT, the numbers of CD25+ Foxp3+ Treg among CD4+ cells were severely decreased in the groups of mice receiving CD25-depleted T cells (Figure 4c), suggesting that the majority of Treg observed at day 6 post allo-HCT resulted from the proliferation of natural Treg present in the graft. However, we could still observe an increase in the numbers of Treg in the spleen of B6.IL-22<sup>-/-</sup> CD25-depleted T-cell recipients, as compared with B6.WT CD25-depleted T-cell recipients (Figure 4c,  $P < 0.005$ ), suggesting that in the absence of IL-22, both expansion of natural Treg and conversion of naive CD4+CD25+ T cells into induced Treg was more effective. We also observed that Treg cells were mainly of donor origin in the spleens of mice receiving B6.WT T cells. By contrast, the proportion of residual recipient Treg cells was significantly increased in mice receiving B6.IL-22<sup>-/-</sup> T cells, suggesting that they were spared from the alloreactive response (Figure 4d). Finally, when we compared the survival of recipient mice infused with B6.WT CD25-depleted T cells versus B6.IL-22<sup>-/-</sup> CD25-depleted T cells, we did not observe the beneficial effect of the absence of IL-22, suggesting that Treg cells were involved in the protection conferred by the absence of IL-22 in donor T cells (Figure 4e).

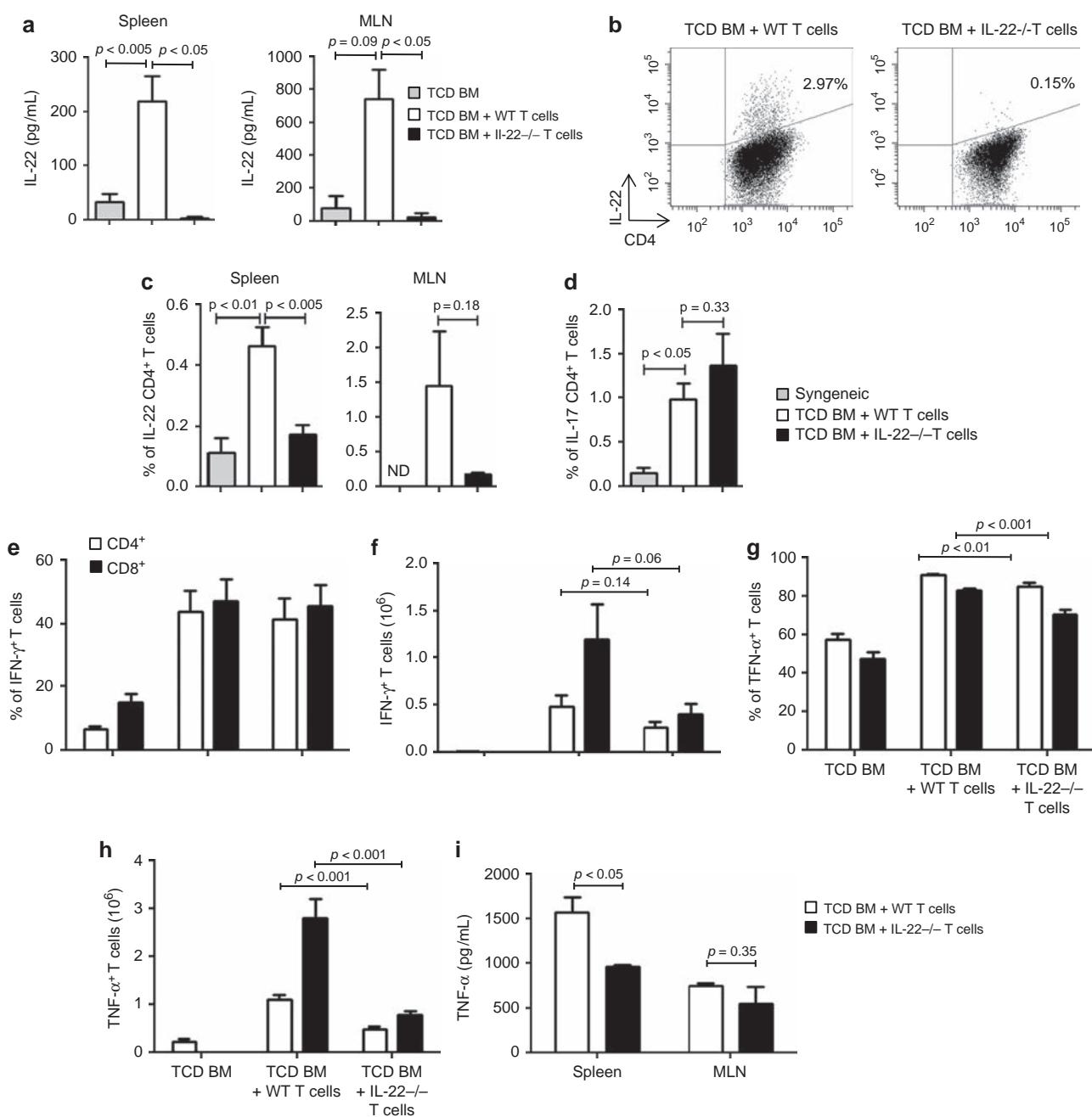
#### Absence of T-cell-derived IL-22 leads to a reduction of inflammatory mediators both systemically and in aGVHD target organs

To further investigate the underlying mechanism of reduced aGVHD severity in recipients of IL-22<sup>-/-</sup> T cells, we studied the role of IL-22 in controlling the systemic and local inflammatory response. We evaluated inflammatory cytokine levels in the plasma of recipient mice during aGVHD. A significant decrease of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and MCP-1 in the plasma was detected in the first week following allo-HCT with B6.IL-22<sup>-/-</sup> T cells as compared with B6.WT T cells, whereas IL-6 level was unchanged (Figure 5). We detected neither IL-10 nor IL-12 in the plasma of treated mice (data not shown), suggesting that circulating IL-10, a negative regulator of inflammation, was not involved in the IL-22-deficiency-mediated decreased aGVHD severity.

We also examined the local inflammatory response induced in aGVHD target organs, the skin and the small intestine, given the fact that IL-22 has been associated with the pathogenesis of several inflammatory disorders in these organs. As shown in Figure 6, we observed a reduced expression of IFN- $\gamma$  and the chemokines CXCL9 (C-X-C motif chemokine ligand 9), CXCL10, CXCL11 involved in the recruitment of TH1 lymphocytes, in the small intestine of allo-HCT recipients receiving B6.IL-22<sup>-/-</sup> T cells. The expression of  $\beta$ -defensin 3 and cathelicidin, both known to be induced by IL-22, were also decreased in the skin of B6.IL-22<sup>-/-</sup> T-cell allo-HCT recipients, thus likely contributing to a reduced recruitment of immune effector cells in GVHD target tissues. Expression of CXCL9 and IL-6 were also significantly reduced in the lung of B6.IL-22<sup>-/-</sup> T-cell allo-HCT recipients, indicating that IL-22 deficiency reduced proinflammatory mediators in multiple organs after allo-HCT.

#### The GVL effect is preserved in donor IL-22-deficient T cells

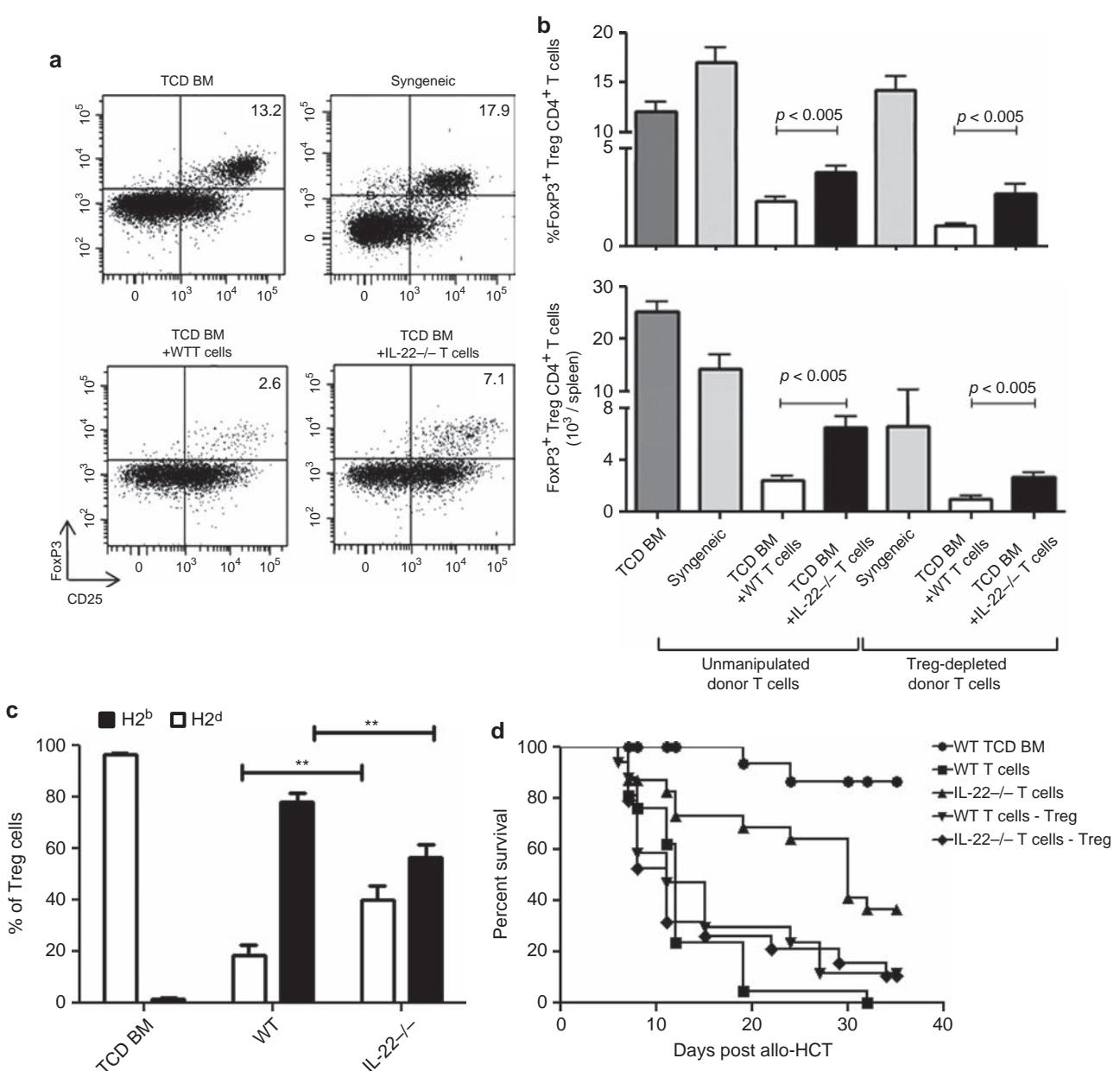
Given the classical association between GVHD and GVL, we next sought to determine whether donor IL-22<sup>-/-</sup> T cells were able to retain their capacity to control tumor growth in relation to the GVL



**Figure 3.** Absence of T-cell-derived IL-22 reduces secretion of inflammatory cytokines. Lethally irradiated BALB/c recipients were transplanted with BALB/c TCD BM with BALB/c T cells (syngeneic) or with B6 TCD BM only or with either B6.WT T cells or B6.IL-22<sup>-/-</sup> T cells. Splenocytes and MLN cells were harvested at day 6 post allo-HCT. (a) IL-22 level was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the supernatant of splenocytes and MLN cells activated for 48 h with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and ionomycin. Mean ± s.e.m. are represented. (b, c) Splenocytes and MLN cells were activated for 6 h with PMA, ionomycin and Brefeldin A. Expression of IL-22 on gated CD3 + CD4<sup>+</sup> T cells is shown for a representative MLN sample (b) and mean ± s.e.m. of the percentages of IL-22<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in the spleen and MLN is represented (c). (d) Expression of IL-17A on gated CD3 + CD4<sup>+</sup> T cells in the spleen is represented, mean ± s.e.m. from three independent experiments. (e–i) Intracellular IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels of splenic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were analyzed. Mean ± s.e.m. of the percentage (e) and number (f) of T cells CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> secreting IFN- $\gamma$  in the spleen is shown. Mean ± s.e.m. of the percentage (g) and number (h) of T cells CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> secreting TNF- $\alpha$  in the spleen is shown. Data are combined from three independent experiments ( $n = 12$ ). (i) TNF- $\alpha$  level was measured by ELISA in the supernatant of splenocytes and MLN cells activated for 24 h with PMA and ionomycin. Mean ± s.e.m. is represented from three independent experiments.

effect expected in the context of allo-HCT. To this end, we administered A20-luc leukemia cells to allo-HCT-recipient mice, which were subsequently monitored *in vivo* by BLI. As shown in Figure 7, a strong signal was observed at day 30 in recipient mice

receiving TCD-BM and A20 cells, attesting for tumor growth (Figure 7a). By contrast, when recipient mice received both TCD-BM and A20 cells and then WT T cells, a low BLI signal was observed, indicating that tumor growth was controlled by WT T

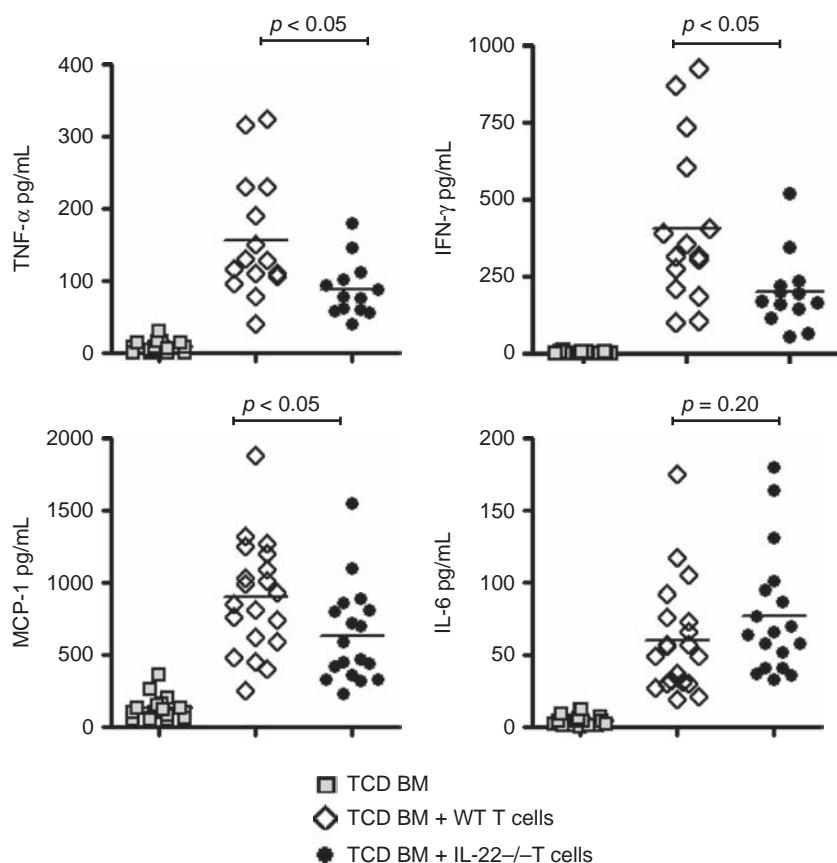


**Figure 4.** Absence of T-cell-derived IL-22 is associated with an increase of T regulatory cells. Lethally irradiated BALB/c-recipient mice were transplanted with B6 TCD BM alone or with unmanipulated or CD25-depleted B6.WT or IL22<sup>-/-</sup> T cells. Syngeneic controls were transplanted with BALB/c T cells. Splenocytes were harvested 1 week after allo-HCT ( $n=18$ ) and were analyzed for the expression of CD4, CD25 and Foxp3. (a) Expression of CD25 and Foxp3 on gated CD4<sup>+</sup> T cells is shown for a representative sample. (b) Mean  $\pm$  s.e.m. of the percentage and (c) absolute number of CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> in the spleen of at least three independent experiments with three mice/group are represented. Data comparing the three groups were significantly different using analysis of variance test,  $P<0.0001$ . (c) Origin of Treg cells was determined by the expression of H-2d and H-2b after gating on CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> foxp3<sup>+</sup> T cells. Mean  $\pm$  s.e.m. of the percentage of H-2b donor Treg and H-2d-recipient cells are represented. (e) Survival data after depletion of CD25<sup>+</sup> T cells from the graft are shown (log-rank test,  $P<0.0001$  for WT T cells versus IL22<sup>-/-</sup> T cells,  $P=0.109$  for WT T cells versus IL-22<sup>-/-</sup> T cells-Treg,  $P=0.82$  for WT T cells versus WT-Treg T cells,  $P=0.004$  for IL-22<sup>-/-</sup> T cells versus IL-22<sup>-/-</sup> T cells-Treg,  $P=0.087$  for WT T cells versus IL-22<sup>-/-</sup> T cells-Treg).

cells (Figures 7a–c). Ultimately, all recipient mice died from severe aGVHD, leading to an increased mortality (Figure 7d). A strong GVL effect was mediated by IL-22<sup>-/-</sup> T cells as shown by the absence of BLI signal in recipient mice (Figures 7a and b) and was comparable to that obtained with WT T cells (Figure 7c). Moreover, the majority of IL-22<sup>-/-</sup> T-cell recipients survived through the 40 days observation period without or with very little BLI signal (Figure 7d). Altogether, these data indicated that IL-22<sup>-/-</sup> T cells retained their capacity to mediate a GVL effect while preserving recipient mice from aGVHD mortality.

## DISCUSSION

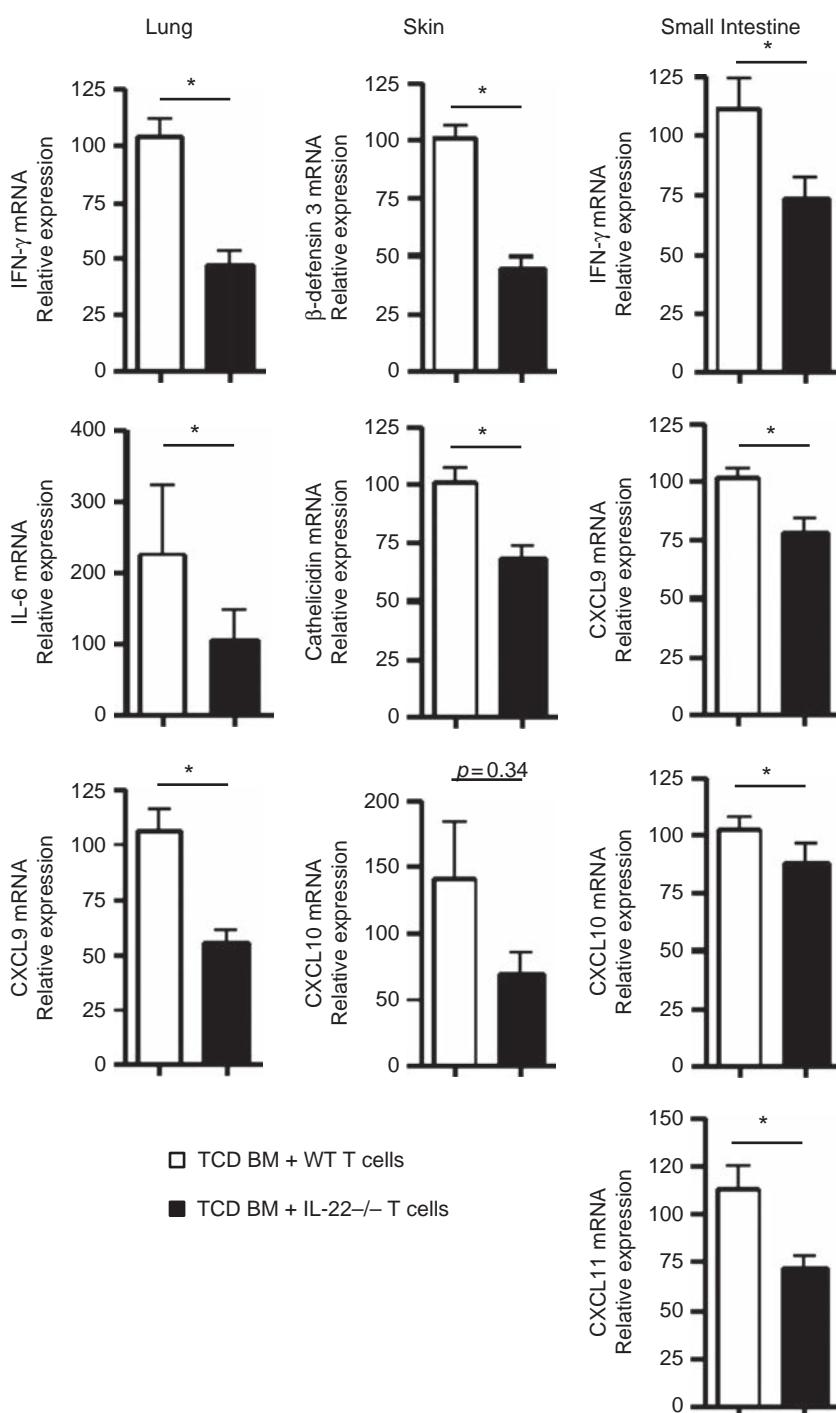
Thus far, the role of IL-22, a TH17-related cytokine, has not been extensively addressed in the context of aGVHD pathophysiology. Our data show that donor-derived IL-22 contributes to the severity of aGVHD by participating into the systemic inflammation process and through amplification of local inflammation in aGVHD target tissues. This is in line with the critical role of IL-22, which can promote local or systemic inflammation.<sup>27,28</sup> Paradoxically, IL-22 has been found not only to promote pathological inflammation but also to prevent tissue



**Figure 5.** Absence of T-cell-derived IL-22 decreases inflammatory cytokine levels in blood. Lethally irradiated BALB/c mice were transplanted with B6 TCD BM and either B6.WT or B6.IL-22<sup>-/-</sup> T cells. Plasma was collected at day 6 after allo-HCT and cytokines concentrations were measured using BD cytometric bead array set. Data from three independent experiments are shown. Mean is indicated by a bar.

destruction. Thus, IL-22 was tissue protective in mouse models of hepatitis,<sup>29</sup> whereas IL-22 deficiency exacerbated tissue destruction in a dextran sodium sulfate-mediated colitis<sup>18</sup> or a T-cell-transfer model of colitis.<sup>19,20</sup> Recently, Hanash *et al.*<sup>30</sup> demonstrated that IL-22 produced by recipient ILC protected mice from aGVHD-induced tissue damage and mortality by protecting intestinal stem cells, which express IL-22R. Thus, these results highlight the fact that the same cytokine produced by donor versus recipient-derived sources may have opposing effects on clinical outcome of allo-HCT recipients. The inflammatory milieu resulting of the allo-HCT procedure and the induction of the so-called cytokine storm may favor the pathological function of IL-22 rather than its tissue-protective effect during the first week after allo-HCT. This is consistent with data showing that IL-22 was involved in immunopathology of the gut after *Toxoplasma gondii* infection and development of TH1 cytokine-mediated inflammation.<sup>31</sup> The contribution of TH17 cells in aGVHD is somewhat controversial. In our study, we did not detect any differences in IL-17A production by T cells 1 week after allo-HCT. By contrast, we observed a significant increase of CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells in recipients administered with B6.IL-22<sup>-/-</sup> T cells. The protective effect of Treg on aGVHD was already demonstrated in several models.<sup>32,33</sup> The mechanism through which IL-22 deficiency results in Treg expansion is not clear, but likely involves indirect factors as Treg cells do not express IL-22R.<sup>14,15</sup> Alternatively, Treg cell expansion could be the result of immune compensatory mechanisms in response to compromised containment of commensal bacteria in the absence of IL-22, leading to a change of the microbiota and the induction of Treg

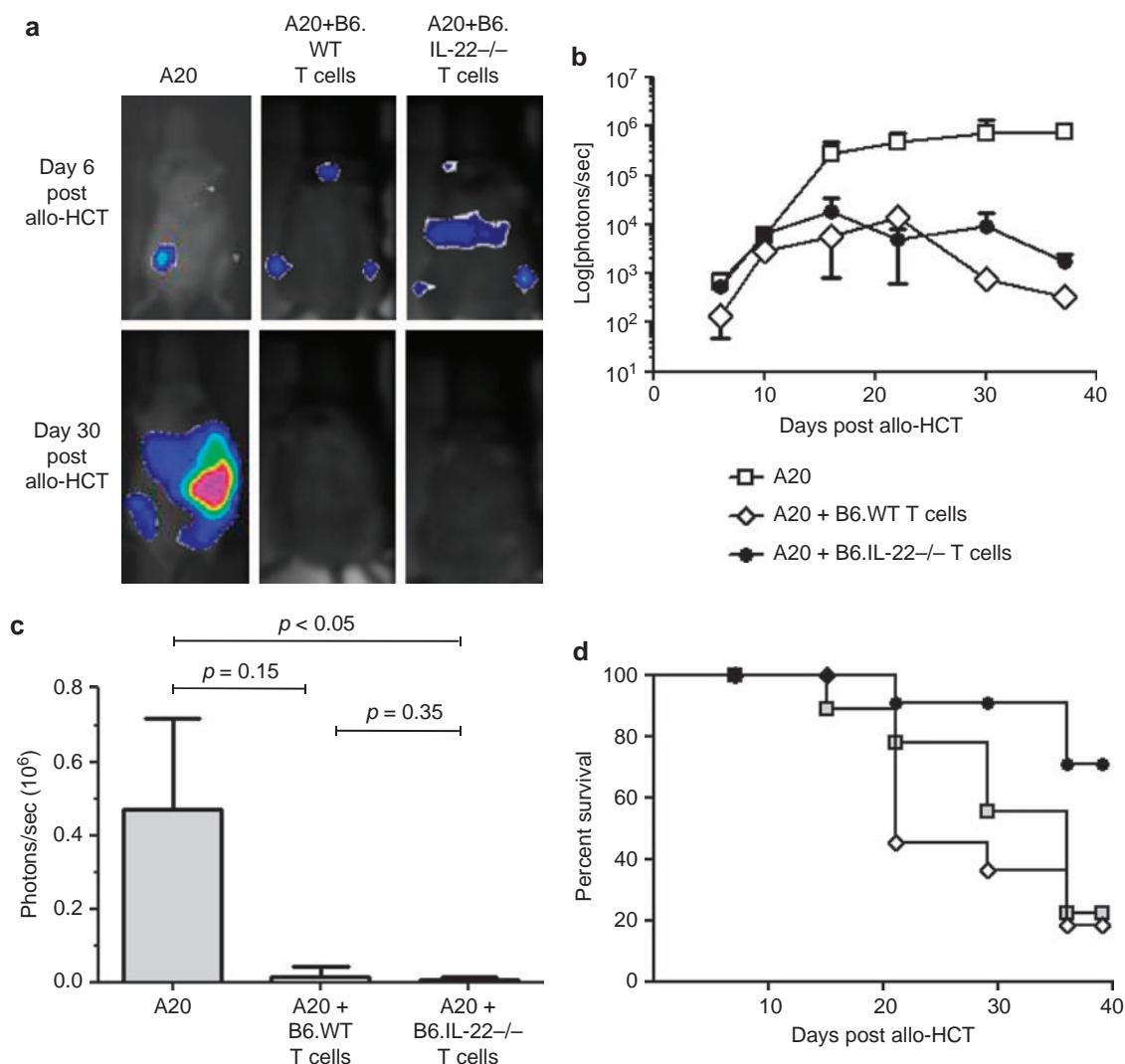
by bacteria.<sup>34</sup> Of note, specific changes in the microbiota following allo-HCT have been recently reported and associated to aGVHD.<sup>35,36</sup> In our study, we did not completely abrogate aGVHD by using IL-22<sup>-/-</sup> T cells to induce GVHD. Although we did not observe a source of IL-22 other than T cells, we cannot exclude that radioresistant ILC from the recipient might persist and could contribute to the regulation of intestinal inflammation. However, Hanash *et al.*<sup>30</sup> showed that ILC were eliminated during aGVHD. The role of IL-22 in T-cell activation seems to be indirect given the restricted expression of IL-22R on non-hematopoietic cells.<sup>14,15</sup> However, we cannot exclude that antigen-presenting cells (APC) could modulate the alloreactive response in the absence of IL-22. Indeed, it has been reported that hematopoietic CD11b<sup>+</sup> APCs expressed increased levels of IL-22R during induction of disease after immunization with uveitogenic antigen in an experimental model of autoimmune uveitis.<sup>37</sup> Despite previous findings showing that MHC (major histocompatibility complex) class II-bearing host APCs are required to induce CD4<sup>+</sup> T-cell dependent aGVHD,<sup>38</sup> recent reports indicated that non-hematopoietic APCs are sufficient to induce lethal aGVHD.<sup>39,40</sup> In fact, MHC class II-expressing recipient non-hematopoietic cells of the gastrointestinal tract were shown to be able to induce aGVHD.<sup>39</sup> By using well established BM chimeras, the group of Reddy and colleagues recently demonstrated that sex-mismatched H-Y antigens can induce GVHD even in the absence of radiosensitive host-derived APC.<sup>40</sup> Thus, one may speculate that the modulation of IFN- $\gamma$  in the gastrointestinal tract in the absence of IL-22 could impair the induction of class II expression on epithelial cells, leading to



**Figure 6.** Absence of T-cell-derived IL-22 decreases inflammatory gene expression in aGVHD target tissues. Lethally irradiated BALB/c mice were transplanted with B6 TCD BM and either B6.WT or B6.IL-22 $^{-/-}$  T cells. Quantitative reverse transcriptase-PCR analysis for each indicated gene was performed using RNA isolated from the lung, skin and small intestine collected at day 6 after allo-HCT. Mean  $\pm$  s.e.m. of gene expression levels are represented. Data are combined from three independent experiments ( $n = 12$ ).

decreased incidence and severity of aGVHD. Interestingly, both TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  have been shown to upregulate IL-22R expression in keratinocytes and fibroblasts, suggesting that these cytokines released after conditioning may amplify IL-22 activity on target tissues of aGVHD.<sup>14,41</sup> Notably, it has been recently reported that the C-type lectin regenerating-islet-3a (REG3 $\alpha$ ), which is produced by Paneth cells and induced by IL-22, is detected in the serum of aGVHD patients and validated as a biomarker of intestinal

aGVHD.<sup>42</sup> Therefore, REG3 $\alpha$  expression likely increased upon inflammation and is then released into the systemic circulation as a consequence of breaches in the mucosal epithelial barrier caused by aGVHD. Interestingly, we also observed in our model an increase in antimicrobial peptide expression, such as  $\beta$ -defensin3 and cathelicidin, during aGVHD. As expected, in the absence of IL-22, the expression of these molecules was downregulated. Of note, another alarmin, namely Elafin, was also reported as a



**Figure 7.** GVL activity is preserved in the absence of donor-T-cell-derived IL-22. Lethally irradiated BALB/c mice were administered with B6 TCD BM and A20-luc leukemic cells. On day 7 after allo-HCT,  $1 \times 10^6$  B6.WT T cells or B6.IL-22<sup>-/-</sup> T cells were administered. Tumor growth in recipients was monitored by *in vivo* bioluminescent imaging (BLI). (a) One representative mouse from each group is shown at days 6 and 30 after administration of T cells. BLI signal intensity (photons/sec measured from the ventral view) is shown at (b) multiple time points or at (c) day 30 after administration of B6.WT or B6.IL-22<sup>-/-</sup> T cells. Data are obtained from two independent experiments with five recipient mice per group. (d) Recipient survival is shown for the three groups, median survival time 21 days versus undefined days, log-rank test  $P < 0.01$ .

biomarker of human skin aGVHD.<sup>43</sup> Finally, because of the critical role of IL-22 in keratinocyte differentiation and pathology of the skin,<sup>28,44</sup> we can also speculate that IL-22 could mediate a role in skin pathology during GVHD. Indeed, recent data demonstrated a crucial role of IL-22 in thymic regeneration after thymic injury. In the elegant study of Dudakov *et al.*,<sup>45</sup> they observed that intrathymic IL-22 was produced by ILC after thymic insult and was essential to promote thymic recovery. Thus, this study emphasize the importance of IL-22 in allo-HCT by inducing a delicate balance between T-cell recovery and adverse effects on alloreactivity.

Overall, findings from this work suggest a potential important role of IL-22 in aGVHD pathophysiology. From the translational standpoint, the IL-22/IL-22R axis need to be further explored to delineate its inflammatory versus protective effects in GVHD. Data showing that blocking donor-derived IL-22 can attenuate aGVHD without impairing the GVL effect support the design of clinical approaches aiming to target IL-22 pathways in allo-HCT patients.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the technical support of D. Paris for animal care. We also thank the 'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC; Grant No.3175 to MM and BG)', the 'Agence de Biomédecine', the 'Association Cent pour Sang la Vie', the Conseil Régional de Franche-Comté (AutoMACS Pro), the Agence Nationale de la Recherche (Labex LipSTIC, ANR-11-LABX-0021) and the Etablissement Français du Sang (AO#2011-11) for their generous and continuous support for our research work.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed in the manuscript have contributed substantially to this work. BG designed experimental research, interpreted data and wrote the manuscript; MC and BL participated in experimental design, performed research, analyzed data and wrote the manuscript; JA, FB and SP participated in experimental work; JCR generated IL-22-deficient mice; FM and CB performed histological

analyses; MM, PS and PT participated in experimental design, interpretation of data and helped in writing and revising the manuscript.

## REFERENCES

- 1 Wingard JR, Majhail NS, Brazauskas R, Wang Z, Sobocinski KA, Jacobsohn D et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 2230–2239.
- 2 Baron F, Labopin M, Niederwieser D, Vigouroux S, Cornelissen JJ, Malm C et al. Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation. *Leukemia* 2012; **26**: 2462–2468.
- 3 Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; **373**: 1550–1561.
- 4 Antin JH, Ferrara JL. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1992; **80**: 2964–2968.
- 5 Mohty M, Blaise D, Faucher C, Vey N, Bouabdallah R, Stoppa AM et al. Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2005; **106**: 4407–4411.
- 6 Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 2012; **12**: 443–458.
- 7 Kappel LW, Goldberg GL, King CG, Suh DY, Smith OM, Ligh C et al. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood* 2009; **113**: 945–952.
- 8 Carlson MJ, West ML,Coghill JM, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood* 2009; **113**: 1365–1374.
- 9 Hanash AM, Kappel LW, Yim NL, Nejat RA, Goldberg GL, Smith OM et al. Abrogation of donor T-cell IL-21 signaling leads to tissue-specific modulation of immunity and separation of GVHD from GVL. *Blood* 2011; **118**: 446–455.
- 10 Bossard C, Malard F, Arbez J, Chevallier P, Guillaume T, Delaunay J et al. Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Leukemia* 2012; **26**: 1471–1474.
- 11 Renaud JC. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 667–676.
- 12 Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; **203**: 2271–2279.
- 13 Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol* 2011; **12**: 21–27.
- 14 Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004; **21**: 241–254.
- 15 Tachiri A, Imamura R, Wang Y, Fukui M, Umemura M, Suda T. Genomic structure and inducible expression of the IL-22 receptor alpha chain in mice. *Genes Immunity* 2003; **4**: 153–159.
- 16 Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 2005; **174**: 3695–3702.
- 17 Wolk K, Witte E, Wallace E, Docke WD, Kunz S, Asadullah K et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 2006; **36**: 1309–1323.
- 18 Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008; **118**: 534–544.
- 19 Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Stevens S, Flavell RA. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 2008; **29**: 947–957.
- 20 Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* 2009; **206**: 1465–1472.
- 21 Geboes L, Dumoutier L, Kelchtermans H, Schurgers E, Mitera T, Renaud JC et al. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 390–395.
- 22 Caproni M, Antiga E, Melani L, Volpi W, Del Bianco E, Fabbri P. Serum levels of IL-17 and IL-22 are reduced by etanercept, but not by acitretin, in patients with psoriasis: a randomized-controlled trial. *J Clin Immunol* 2009; **29**: 210–214.
- 23 Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte Jr. J, Crawford JM et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 1996; **88**: 3230–3239.
- 24 Lerner KG, Kao GF, Storb R, Buckner CD, Clift RA, Thomas ED. Histopathology of graft-vs.-host reaction (GVHR) in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplant Proc* 1974; **6**: 367–371.
- 25 Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997; **90**: 3204–3213.
- 26 Pan L, Teshima T, Hill GR, Bungard D, Brinson YS, Reddy VS et al. Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized allogeneic stem cell transplantation maintains graft-versus-leukemia effects through a perforin-dependent pathway while preventing graft-versus-host disease. *Blood* 1999; **93**: 4071–4078.
- 27 Liang SC, Nickerson-Nutter C, Pittman DD, Carrier Y, Goodwin DG, Shields KM et al. IL-22 induces an acute-phase response. *J Immunol* 2010; **185**: 5531–5538.
- 28 Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; **445**: 648–651.
- 29 Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 2007; **27**: 647–659.
- 30 Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, O'Connor MH, Young LF, Singer NV et al. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* 2012; **37**: 339–350.
- 31 Munoz M, Heimesaat MM, Danker K, Struck D, Lohmann U, Plickert R et al. Interleukin (IL)-23 mediates Toxoplasma gondii-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *J Exp Med* 2009; **206**: 3047–3059.
- 32 Shin HJ, Baker J, Leveson-Gower DB, Smith AT, Segal El, Negrin RS. Rapamycin and IL-2 reduce lethal acute graft-versus-host disease associated with increased expansion of donor type CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood* 2011; **118**: 2342–2350.
- 33 Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002; **99**: 3493–3499.
- 34 Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 2011; **331**: 337–341.
- 35 Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2012; **209**: 903–911.
- 36 Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H et al. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins. *Blood* 2012; **120**: 223–231.
- 37 Ke Y, Sun D, Jiang G, Kaplan HJ, Shao H. IL-22-induced regulatory CD11b+ APCs suppress experimental autoimmune uveitis. *J Immunol* 2011; **187**: 2130–2139.
- 38 Teshima T, Ordemann R, Reddy P, Gagin S, Liu C, Cooke KR et al. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med* 2002; **8**: 575–581.
- 39 Koyama M, Kuns RD, Olver SD, Raffelt NC, Wilson YA, Don AL et al. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med* 2011; **18**: 135–142.
- 40 Toubai T, Tawara I, Sun Y, Liu C, Nieves E, Evers R et al. Induction of acute GVHD by sex-mismatched H-Y antigens in the absence of functional radiosensitive host hematopoietic-derived antigen-presenting cells. *Blood* 2012; **119**: 3844–3853.
- 41 Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Wagstaff K, Anderson M et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol Med (Berl)* 2009; **87**: 523–536.
- 42 Ferrara JL, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T et al. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 2011; **118**: 6702–6708.
- 43 Paczesny S, Braun TM, Levine JE, Hogan J, Crawford J, Coffing B et al. Elafin is a biomarker of graft-versus-host disease of the skin. *Sci Translational Med* 2010; **2**: 13ra12.
- 44 Van Belle AB, de Heusch M, Lemaire MM, Hendrickx E, Warnier G, Dunussi-Joannopoulos K et al. IL-22 is required for imiquimod-induced psoriasisiform skin inflammation in mice. *J Immunol* 2012; **188**: 462–469.
- 45 Dudakov JA, Hanash AM, Jenq RR, Young LF, Ghosh A, Singer NV et al. Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice. *Science* 2012; **336**: 91–95.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

## Table des figures

<b>Figure 1 :</b> Histoire et évolution de l'allo-CSH de 1957 à nos jours. (Appelbaum <i>et coll.</i> N Engl J Med 2007 <sup>14</sup> ).....	11
<b>Figure 2 :</b> Devenir après allo-CSH selon la décennie de traitement de 1983 à 2010. (A) Survie globale, (B) Mortalité non liée à la rechute. (Adapté de Malard <i>et coll.</i> Biol Blood Marrow Transplantation, 2014 <sup>16</sup> ) .....	12
<b>Figure 3:</b> Evolution du nombre d'allo-CSH par an au CHU de Nantes de 1983 à 2010. (Malard <i>et coll.</i> Données non publiées) .....	13
<b>Figure 4 :</b> Les grandes étapes de l'allo-CSH. ....	14
<b>Figure 5 :</b> Nombre absolu et proportion d'allo-CSH pour chaque indication en Europe en 2011. (Passweeg <i>et coll.</i> Bone Marrow Transplant 2013 <sup>17</sup> ) .....	15
<b>Figure 6 :</b> Proposition d'algorithme de choix d'un donneur.....	17
<b>Figure 7:</b> Classification des conditionnements en 3 catégories selon la durée de la pancytopenie et la nécessité d'un support en CSH. (Bacigalupo <i>et coll.</i> Biol Blood Marrow Transplant, 2009 <sup>23</sup> ) .....	18
<b>Figure 8 :</b> Classification de la GVH aiguë et chronique d'après Filipovich <i>et coll.</i> (Pavletic et Fowler, Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2012 <sup>27</sup> )..	24
<b>Figure 9 :</b> Exemple de GVHD aiguë cutanée sévère (stade 3-4).....	25
<b>Figure 10 :</b> Biopsies cutanées après coloration HES : peau saine, grossissement × 100 (A) ; GVHD aiguë cutanée de stade 2, grossissement × 200 (B), GVHD aiguë cutanée de stade 3, grossissement × 200 (C).....	28
<b>Figure 11 :</b> Biopsies de muqueuse colique après coloration HES : GVHD aiguë digestive de grade 1, grossissement × 400 (A) ; GVHD aiguë digestive de grade 2, grossissement × 200 (B), GVHD aiguë digestive de grade 4, grossissement × 100 (C). ....	29
<b>Figure 12 :</b> Représentation schématique de la physiopathologie de la GVHD. (Mohty et Gaugler, Cytokine Growth Factor Rev, 2008 <sup>72</sup> ) .....	40
<b>Figure 13 :</b> Caractéristiques et rôle majeur des principales populations Th, cytokines et facteurs de transcription impliqués dans leur différenciation. (adaptée de Boniface <i>et coll.</i> World J Rheumatol, 2013 <sup>128</sup> ).....	49
<b>Figure 14 :</b> Représentation schématique des voie de signalisation et de la régulation transcriptionnelle des lymphocytes Th17. (Muranski <i>et coll.</i> Blood, 2013 <sup>137</sup> ) .....	51
<b>Figure 15 :</b> Lien entre la différenciation des lymphocytes iTreg, Th17 et Th1, soulignant la plasticité des lymphocytes Th17. (Lee <i>et coll.</i> Curr Opin Immunol, 2009 <sup>144</sup> ) .....	53
<b>Figure 16 :</b> Voie de différenciation des différentes populations de cellules dendritiques. (adapté de Schott M, Endocr Relat Cancer, 2006 <sup>177</sup> ).....	60
<b>Figure 17 :</b> Morphologie des PDC. (a) microscopie électronique × 7000 (b,c) microscopie électronique 3D × 3000, les PDC au repos ont une morphologie sphérique (b), alors que les PDC activées ont une morphologie de cellule dendritique (c). (Colonna <i>et coll.</i> Nat Immunol, 2004 <sup>181</sup> ) .....	61
<b>Figure 18 :</b> Proposition de développement des PDC et relation avec les cDC. (Reizis <i>et coll.</i> Annu Rev Immunol, 2011 <sup>184</sup> ).....	63
<b>Figure 19 :</b> Activation des voies de signalisation intracellulaires des PDC en réponse aux acides nucléiques. (Gilliet <i>et coll.</i> Nat Rev Immunol, 2008 <sup>191</sup> ).	65

<b>Figure 20 :</b> Les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules Th1 infiltrent la muqueuse digestive des patients avec une GVHD aiguë digestive. Exemple de cellules mononucléées CD8 <sup>+</sup> (A), Granzyme B <sup>+</sup> (C) et Tbet <sup>+</sup> (E) au niveau de la muqueuse digestive de patients présentant une GVHD aiguë cutanée. L'évaluation quantitative des cellules CD8 <sup>+</sup> (B), Granzyme B (D) et Tbet <sup>+</sup> (F) est montrée (grossissement × 200).....	74
<b>Figure 21 :</b> Interactions cellulaires de l'immunité innée et adaptive dans la GVHD intestinale.....	88

## Table des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Classification de la GVHD aiguë et chronique d'après Filipovich <i>et coll.</i> (Filipovich <i>et coll.</i> Biol Blood Marrow Transplant, 2005 <sup>26</sup> ) .....	24
<b>Tableau 2 :</b> Score de sévérité clinique de l'atteinte des organes cibles au cours de la GVHD aiguë, classification de Glucksberg, révisée par Przepiorka <i>et coll.</i> (Glucksberg <i>et coll.</i> Transplantation, 1974 <sup>29</sup> ; Przepiorka <i>et coll.</i> Bone Marrow Transplant, 1995 <sup>30</sup> ).....	26
<b>Tableau 3 :</b> Grade de sévérité de la GVHD, classification de Glucksberg, révisée par Przepiorka <i>et coll.</i> (Glucksberg <i>et coll.</i> Transplantation, 1974 <sup>29</sup> ; Przepiorka <i>et coll.</i> Bone Marrow Transplant, 1995 <sup>30</sup> ).....	27
<b>Tableau 4 :</b> Grade histologique de la GVH aiguë cutanée, classification de Lerner <i>et coll.</i> (Lerner <i>et coll.</i> Transplant Proc, 1974 <sup>33</sup> ) .....	28
<b>Tableau 5 :</b> Grade histologique de la GVHD aiguë digestive, classification de Sale <i>et coll.</i> et Epstein <i>et coll.</i> (Sale <i>et coll.</i> Am J Surg Pathol, 1979 <sup>37</sup> ; Epstein <i>et coll.</i> Gastroenterology, 1980 <sup>38</sup> ) .....	29
<b>Tableau 6 :</b> Signes cliniques de la GVHD chronique selon les critères du NIH (Filipovich <i>et coll.</i> Biol Blood Marrow Transplant, 2005) <sup>26</sup> .....	35
<b>Tableau 7 :</b> Classification de la GVHD chronique selon Shulman <i>et coll.</i> (Shulman <i>et coll.</i> Am J Med, 1980 <sup>60</sup> ) .....	36
<b>Tableau 8 :</b> Grade de la GVHD chronique selon les critères du NIH. (Filipovich <i>et coll.</i> Biol Blood Marrow Transplant, 2005 <sup>26</sup> ).....	37
<b>Tableau 9 :</b> Version révisée des critères de Billingham pour le développement de la GVHD. (Billingham <i>et coll.</i> Harvey Lect, 1966; Sackstein <i>et coll.</i> Bio Blood Marrow Transplant, 2006 <sup>62, 63</sup> ).....	38

Résumé :

La réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) aiguë reste une complication majeure de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques limitant le succès de ce traitement. La GVHD aiguë est liée à la reconnaissance et la destruction par les lymphocytes T alloréactifs du donneur des tissus cibles du receveur (peau, tube digestif et foie), après activation par les cellules dendritiques du receveur. Si le rôle des lymphocytes Th17 dans la GVHD aiguë a été mis en évidence dans des modèles murins, leur rôle chez l'homme est moins clair. Nous avons exploré la présence des lymphocytes Th17 dans la muqueuse digestive de 23 patients et dans la peau de 38 patients lors du diagnostic de GVHD aiguë, au moyen de 2 marqueurs des Th17, CCR6 et CD161 et du facteur de transcription des Th17, ROR $\gamma$ t. Il existe une augmentation significative des cellules CCR6 $^+$ , CD161 $^+$  et ROR $\gamma$ t $^+$  dans la muqueuse digestive et la peau des patients avec une GVHD aiguë. De plus, comme il a été rapporté que les cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC) favorisent la différenciation des lymphocytes Th17, nous avons voulu quantifier chez ces patients les PDC au moyen des 2 marqueurs, CD123 et BDCA2. Il existe une augmentation des PDC dans la muqueuse digestive et la peau des patients avec une GVHD aiguë. De plus la forte expression de la protéine induite par l'IFN de type I Mx1 dans la peau des patients avec une GVHD aiguë suggère que les PDC sont fonctionnelles et produisent de l'IFN de type I. L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'une réponse médiée par les lymphocytes Th17 dans la GVHD aiguë digestive et cutanée ainsi qu'un nouveau lien physiopathologique entre les PDC et les lymphocytes Th17.

Mots clés : hématologie, immunologie, allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, réaction aiguë du greffon contre l'hôte, lymphocytes Th17, cellules dendritiques plasmacytoïdes

**Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation**

**Abstract :**

Acute graft-versus-host disease (GVHD) remains a major complication following allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) limiting the success of the therapy. GVHD is the result of alloreactive donor T cells attacking host tissues: the skin, gut and liver after activation by the recipient dendritic cells. The contribution of Th17 cells in acute GVHD has been demonstrated in mouse models. However their contribution in human acute GVHD remains unclear. We evaluated the presence of Th17 cells in the intestinal mucosa of 23 patients and the skin of 35 patients at diagnosis of acute GVHD using CCR6 and CD161, 2 markers of Th17 cells, and ROR $\gamma$ t the key transcription factor of Th17 cells. CCR6 $^+$ , CD161 $^+$  and ROR $\gamma$ t $^+$  cells were significantly increased in the intestinal mucosa and the skin of patients with acute GVHD. Since plasmacytoid dendritic cells (PDC) have been reported to drive the differentiation of the Th17 subset, we quantified PDC using 2 markers CD123 and BDCA. PDC were significantly increased in the intestinal mucosa and the skin of patients with acute GVHD. Moreover, we observed a strong expression of the type I IFN-inducible protein Mx1 in the skin of patients with acute GVHD, suggesting that PDC produce type I IFN. Overall this study provides evidence for a Th17-mediated response and a potential pathophysiological link between PDC and Th17 in human acute GVHD.

Keywords : hematolgy, immunology, allogeneic stem cell transplantation, graft-versus-host disease, Th17 cells, plasmacytoid dendritic cells