



HAL
open science

Modulation de l'effet des lymphocytes T régulateurs par la voie $TNF\alpha/TNFR2$: une nouvelle immunothérapie en allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Mathieu Leclerc

► To cite this version:

Mathieu Leclerc. Modulation de l'effet des lymphocytes T régulateurs par la voie $TNF\alpha/TNFR2$: une nouvelle immunothérapie en allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2017. Français. NNT : 2017PESC0014 . tel-01743736

HAL Id: tel-01743736

<https://theses.hal.science/tel-01743736v1>

Submitted on 26 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris-Est
Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse de doctorat

Biologie cellulaire et moléculaire

Spécialité Immunologie

**Modulation de l'effet des lymphocytes T régulateurs par la
voie TNF α /TNFR2 : une nouvelle immunothérapie en
allogreffe de cellules souches hématopoïétiques**

Mathieu Leclerc

21/06/2017

Jury :

Pr. Olivier HERMINE	Rapporteur
Pr. Philippe BOUSSO	Rapporteur
Pr. Frédéric BARON	Examineur
Pr. Philippe SAAS	Examineur
Pr. Sébastien MAURY	Co-directeur de thèse
Pr. José COHEN	Directeur de thèse

Remerciements

Un immense merci à José. Merci pour la confiance que tu m'as accordée. Outre tes précieux conseils tout au long de ces 3 années que j'ai eu le plaisir de passer dans ton laboratoire, j'ai particulièrement apprécié tes grandes qualités humaines et ton éternel optimisme! J'espère pouvoir poursuivre notre collaboration à l'avenir en essayant notamment de transposer les résultats de ce travail, ainsi que d'autres à venir, en pratique clinique.

Merci Sébastien pour ta confiance et ton soutien. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir offert, avec José, la possibilité d'effectuer ce travail passionnant. C'est un privilège de pouvoir travailler à tes côtés.

My Azizam, merci pour ton aide dans ce travail, qui est autant le tien que le mien. Pendant 3 ans, on a bien bossé, mais, il faut le dire, on s'est aussi bien marré et on a bien bouffé! Merci aussi d'avoir été le lien social le plus puissant dans ce laboratoire et d'avoir mis une bonne ambiance au quotidien. Je te souhaite une bonne continuation pour la suite de ta carrière de chercheur qui sera, je n'en doute pas, brillante.

Don Kikito de la Vega, un grand merci pour ton aide et tes conseils. Ta curiosité intellectuelle, ta générosité et ta rigueur scientifique nous ont été d'une aide précieuse (même si tu partais parfois un peu trop en mode « fly f...er »!).

Merci bien évidemment à tout le reste de l'équipe 21 (non bis!) : Caroline, Claire, Salim, Jérémy, Ismaïl, Marie, Cynthia, Rayane et nos « petits » étudiants qui ont travaillé sur ce projet (Lola, Yeni, Chloé).

Un grand merci à Benoît Salomon et son équipe à la Pitié (Charlotte Pouchy, Bruno Zaragoza) pour leur contribution à ce travail.

Merci à l'équipe du service de radiothérapie du Pr. Belkacemi et notamment à Jean-Pierre Mège, Etienne Gaidier et Claude Dominique. Merci d'avoir pu vous rendre disponible à des horaires pas toujours réjouissants...

Merci à Frédéric Charlotte d'avoir pris le temps d'analyser les (nombreuses!) coupes histologiques réalisées au cours de ce travail.

Merci à Aurélie et Adeline, les reines du tri cellulaire.

Merci à l'équipe de l'EFPA et particulièrement à Rachid Souktani.

Merci à Marie Tamagne, Cécile Lecointe et Cindy Le Bret pour votre immense gentillesse, votre bonne humeur si appréciable et votre volonté constante de nous aider et de faire avancer le projet. Vous avez vraiment le cœur sur la main!

Merci à mes parents pour leur soutien indéfectible. Sans votre aide et vos encouragements, rien de tout cela n'aurait été possible.

Enfin, last but definitely not least, le plus grand des mercis ira à mon « gang des meufs » qui m'a supporté et encouragé tout au long de ce travail. Françolette, Juliette et Louise, je vous aime de tout mon cœur et vous valez bien plus, fort heureusement, que tous les Treg du monde! Et comme à cinq c'est encore mieux, little baby is coming soon...

Je dédicace cette thèse à ma fille Louise, qui est née pendant cette parenthèse au laboratoire et qui a déjà bien grandi et est une ravissante petite fille. Dedicace spéciale également à Lou Reed, David Bowie et Leonard Cohen qui nous ont quittés au cours des années consacrées à ce travail et m'ont beaucoup accompagné pendant la réalisation des manip! Heureusement, Iggy and Neil are still here to rock the place!

A Laurette...

Résumé en français

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) jouent un rôle majeur dans la modulation de l'alloréactivité après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques et permettent notamment de contrôler la réaction du greffon contre l'hôte (GVH) dans des modèles expérimentaux. Le potentiel thérapeutique des Treg est donc très important dans ce domaine, mais aussi dans l'auto-immunité ou en cancérologie. Cependant, de nombreuses barrières rendent difficile l'élaboration de stratégies thérapeutiques reposant sur le transfert adoptif de Treg chez l'homme et une meilleure compréhension des facteurs et mécanismes contrôlant la prolifération et les capacités suppressives de ces cellules permettrait de les cibler directement et si possible spécifiquement in vivo.

Dans ce travail, après avoir élaboré un nouveau système d'évaluation clinique de la GVH chez la souris et démontré sa simplicité, sa reproductibilité et sa performance, nous avons pu montrer que l'action suppressive des Treg dans la GVH dépendait de l'interaction entre le TNF α produit par les lymphocytes T conventionnels (Tconv) du donneur et le récepteur TNFR2 exprimé par les Treg. En effet, en bloquant cette interaction de 3 façons différentes, à savoir par un anticorps monoclonal bloquant anti-TNFR2, ou en utilisant soit des Treg n'exprimant pas TNFR2 soit des Tconv ne produisant pas de TNF α , nous avons à chaque fois montré que l'effet protecteur des Treg était aboli en l'absence du signal TNF. Le récepteur TNFR2 étant exprimé préférentiellement par les Treg par rapport aux Tconv, nos résultats ouvrent la voie au ciblage des Treg in vivo via TNFR2, soit pour activer ce récepteur par un agoniste et donc stimuler les Treg afin de contrôler la GVH, soit à l'inverse pour bloquer l'axe TNF α /TNFR2 par un antagoniste et ainsi inhiber les Treg, ce qui permettrait alors de lever un frein à l'alloréactivité dans les situations où l'on cherche à la stimuler pour renforcer l'effet anti-tumoral, comme par exemple dans le cas des rechutes post-allogreffe.

Résumé en anglais

Regulatory T cells (Tregs) are key players involved in the modulation of alloreactivity after hematopoietic stem cell transplantation. Indeed, Tregs can prevent graft-versus-host disease (GVHD) in experimental models. Therefore, the therapeutic potential of these cells in GVHD is substantial, as it is in other fields like auto-immunity or oncology. However, many obstacles still make the application of cellular therapy strategies based on the adoptive transfer of Tregs in humans quite complicated. A better understanding of factors and mechanisms that control the proliferation and suppressive capacities of Tregs could allow for a direct and specific targeting of these cells in vivo.

In this work, after designing a new clinical grading system for murine GVHD and demonstrating its ease of use, reproducibility and performance, we have shown that the suppressive action of Tregs in GVHD depends on the interaction between TNF α produced by donor conventional T cells (Tconvs) and TNFR2 expressed by Tregs. Using 3 different ways to block this interaction, i.e. with an anti-TNFR2 blocking monoclonal antibody, or Tregs that do not express TNFR2 or donor Tconvs that cannot produce TNF α , we were able to show in each situation that blocking TNF signaling resulted in a loss of protection by Tregs. TNFR2 being highly expressed by Tregs as compared with Tconvs, our results pave the way for in vivo targeting of Tregs through TNFR2, either to activate this receptor with an agonist and therefore stimulate Tregs to control GVHD, or to block the TNF α /TNFR2 axis with an antagonist and in this case inhibit Tregs, which could boost alloreactivity, as expected in some particular settings like post-transplant relapse.

Mots clés (français)

Lymphocytes T régulateurs (Treg)

Maladie du greffon contre l'hôte (GVH)

Récepteur au TNF de type 2 (TNFR2)

TNF α

Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Immunothérapie

Mots clés (anglais)

Regulatory T cells (Treg)

Graft-versus-host disease (GVHD)

TNF receptor type 2 (TNFR2)

TNF α

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Immune therapy

Laboratoire d'accueil

Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB)

INSERM U955 – Equipe 21 – « Immunomodulation en transplantation »

Hôpital Henri Mondor

51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny

94010 Créteil

SOMMAIRE

Liste des figures et tableaux	15
Abréviations	18
INTRODUCTION.....	22
Chapitre 1 : Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	23
Principe	23
Indications	24
Types de donneurs.....	27
Source des CSH.....	28
Conditionnement	30
Complications de l'allogreffe.....	32
Chapitre 2 : Maladie du greffon contre l'hôte (GVH).....	34
Définition	34
Epidémiologie.....	35
Physiopathologie	36
<i>Activation des CPA du receveur</i>	<i>38</i>
<i>Activation des lymphocytes T du donneur</i>	<i>39</i>

<i>Phase effectrice</i>	43
Classification de la GVHa.....	46
<i>Classification de la GVHa chez l'homme</i>	46
<i>Evaluation clinique de la GVHa chez la souris : principe, intérêt et limites des moyens actuellement utilisés</i>	48
Limites des modèles expérimentaux de GVHa.....	52
Prophylaxie de la GVH	54
<i>Méthotrexate + inhibiteur de calcineurine</i>	54
<i>Autres molécules efficaces</i>	56
<i>Cyclophosphamide post-greffe : vers une révolution de la prophylaxie de la GVH ?</i>	57
Traitement de la GVHa.....	58
<i>Première ligne</i>	58
<i>Deuxième ligne et au-delà</i>	60
Chapitre 3 : Lymphocytes T régulateurs (Treg)	61
Définition	61
Historique	61
<i>Cellules T suppressives</i>	62
<i>Lymphocytes T CD4⁺ avec activité suppressive de l'auto-immunité</i>	63
<i>Lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ naturels : rôle dans la tolérance au soi</i>	64
Foxp3 : le régulateur clé de la lignée Treg	66
<i>Découverte</i>	66
<i>Structure et fonction</i>	67

<i>Régulation transcriptionnelle</i>	68
<i>Modulation de la signalisation intracellulaire</i>	69
<i>Expression de Foxp3 au-delà des Treg</i>	71
<i>Interaction entre les « master regulators » Foxp3, T-bet, GATA-3 et ROR-γt</i>	72
Caractérisation phénotypique des Treg.....	74
<i>CD4 et CD25</i>	74
<i>CTLA-4 et GITR</i>	75
<i>Foxp3</i>	77
<i>CD127</i>	77
<i>L'intégrine αE (CD103)</i>	78
<i>PD-1</i>	79
<i>OX40 (CD134)</i>	79
<i>ICOS</i>	80
Mécanismes d'action des Treg.....	82
<i>Sécrétion de cytokines inhibitrices</i>	83
<i>Suppression par cytolyse</i>	84
<i>Induction de perturbations métaboliques</i>	86
<i>Ciblage des cellules dendritiques</i>	87
<i>Mécanismes suppresseurs récemment élucidés</i>	89
Treg naturels et Treg induits.....	89
<i>Sélection thymique des nTreg</i>	90
<i>Induction de Treg en périphérie</i>	92
<i>Différences fonctionnelles entre nTreg et iTreg</i>	93

<i>Helios et Nrp-1 : des marqueurs spécifiques des nTreg ?</i>	94
L'interleukine 2 (IL-2) : une cytokine essentielle pour les Treg	96
<i>Rôle de l'IL-2 dans l'homéostasie du système immunitaire</i>	96
<i>Signalisation par le récepteur de l'IL-2</i>	98
<i>Rôle de l'IL-2 dans le développement, la fonction et la survie des Treg</i>	98
Délinéation fonctionnelle et dynamique de différenciation des Treg humains.....	101
<i>Treg au repos (rTreg) et Treg activés (aTreg)</i>	101
<i>Intérêt du marqueur HLA-DR</i>	103
Chapitre 4 : Immunothérapie de la GVHa reposant sur les Treg	105
Rôle des Treg pour contrôler les réactions allogéniques.....	105
Traitement de la GVHa par injection d'IL-2 : résultats chez la souris	106
<i>Propriétés immunorégulatrices de l'IL-2 à faible dose</i>	107
<i>Prévention de la GVHa par l'IL-2 en monothérapie</i>	107
<i>Association IL-2 + rapamycine</i>	109
Traitement de la GVH par injection d'IL-2 : résultats chez l'homme	110
Transfert adoptif de Treg dans la GVHa : résultats chez la souris	112
<i>Preuve de principe et dissociation des effets GVH et GVL</i>	112
<i>Expansion ex vivo</i>	113
<i>Importance de la spécificité antigénique des Treg</i>	113
<i>Treg spécifiques d'un seul antigène exogène</i>	114
Transfert adoptif de Treg dans la GVHa : essais cliniques.....	115

<i>Contraintes liées à une telle stratégie chez l'homme</i>	115
<i>Première expérience chez l'homme</i>	116
<i>Etude de Brunstein et al.</i>	117
<i>Etude de Di Ianni et al.</i>	119
<i>Résultats plus récents</i>	120
Chapitre 5 : L'axe TNFα/récepteur au TNFα de type 2 (TNFR2) et son rôle dans la fonction des Treg	124
Le TNF α et ses récepteurs	124
Différences fonctionnelles entre les récepteurs TNFR1 et TNFR2	125
Le TNF α : une molécule également immunosuppressive ?	127
TNFR2 et Treg	129
<i>Implication des Treg dans l'effet anti-inflammatoire paradoxal du TNFα : rôle du récepteur TNFR2</i>	129
<i>L'expression de TNFR2 permet de caractériser les Treg les plus supprimeurs et est corrélée à l'expression de Foxp3</i>	131
<i>Sécrétion de TNFR2 soluble : un nouveau mécanisme suppresseur des Treg</i>	132
<i>Rôle du TNFα dans la stabilité phénotypique des Treg et boucle d'amplification</i>	133
<i>Controverse</i>	134
Treg et Tconv : vers une interaction bidirectionnelle ?	136
OBJECTIFS	138

Première partie : Mise au point et validation d'un nouveau système d'évaluation clinique de la GVHa chez la souris	139
Seconde partie : Etude du rôle de l'axe TNFα/TNFR2 dans le contrôle de GVHa par les Treg.....	141
RESULTATS	143
Premier article	144
Second article	173
DISCUSSION.....	188
Un nouveau standard pour la gradation de la GVHa chez la souris ?.....	189
Ciblage de TNFR2 : Une nouvelle immunothérapie ?.....	195
Importance de l'interaction TNF α /TNFR2 pour le contrôle de la GVHa par les Treg	195
Les Tconv sont capables de réguler in vivo la fonction des Treg	197
TNFR2 : la clé des résultats contrastés observés avec les anti-TNF α dans le traitement de la GVH ?	198
TNFR2 : une cible pour stimuler spécifiquement les Treg	200
Ciblage de TNFR2 dans la GVHa et les maladies auto-immunes	203
Intérêt du blocage spécifique de TNFR2 pour le traitement des rechutes post-allogreffe	206

Intérêt du blocage spécifique de TNFR2 pour le traitement du cancer..... 208

Ciblage de TNFR2 : une équation à plusieurs inconnues ?..... 211

Conclusion..... 213

REFERENCES214

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Evolution du nombre d'allogreffes de CSH réalisées chaque année en France entre 2006 et 2015, en fonction du type de donneur (apparenté ou non).	24
Figure 2 : Répartition des principales indications d'allogreffe de CSH en France pour l'année 2015, en fonction du type de donneur (apparenté ou non).	25
Figure 3 : Evolution de l'âge moyen des patients ayant reçu une allogreffe de CSH en France entre 2006 et 2015.	26
Figure 4 : Exemples de conditionnements utilisés en allogreffe de CSH, répartis en fonction de leur intensité, corrélée à leur toxicité, et de l'importance de leur dépendance vis-à-vis de l'effet GVL.	31
Figure 5 : Représentation schématique des mécanismes physiopathologiques de la GVHa, selon le modèle de la « roue » de Ferrara.	37
Figure 6 : Principaux couples ligand/récepteur impliqués dans la costimulation en fonction du caractère activateur ou inhibiteur des signaux qu'ils déclenchent.	42
Figure 7 : Altération des voies de signalisation en aval du récepteur à l'IL-2 et du complexe TCR/CD28 dans les Treg.	71
Figure 8 : Principaux mécanismes utilisés par les Treg pour exercer leur effet suppresseur.	82

Figure 9 : Destinée des précurseurs thymiques en fonction de l'intensité du signal TCR déclenché lors de leur interaction avec les complexes CMH/peptide du soi.	91
Figure 10 : Développement thymique des nTreg.....	92
Figure 11 : Différenciation des cellules T CD4 ⁺ naïves en différents sous-types de LT effecteurs ou en iTreg.	93
Figure 12 : Rôle de l'IL-2 dans l'homéostasie du système immunitaire.	97
Figure 13 : Signalisation par le récepteur de l'IL-2.	99
Figure 14 : Délinéation fonctionnelle des Treg en fonction de l'expression des marqueurs Foxp3 et CD45RA.....	102
Figure 15 : Différenciation des lymphocytes T conventionnels et régulateurs.....	104
Figure 16 : Signalisation induite par le TNF via TNFR1 et TNFR2.	126
Figure 17 : TNFR2 est préférentiellement exprimé par les Treg par rapport aux Tconv.....	130
Figure 18 : Effet de l'interaction entre Tconv et Treg impliquant le couple TNF α /TNFR2 et blocage de cet axe selon 3 méthodes différentes.	196
Figure 19 : Optimisation de l'expansion ex vivo des Treg humains grâce à un agoniste de TNFR2.	202
Figure 20 : Stimulation de l'immunité anti-tumorale par le blocage des points de contrôle du système immunitaire ou par l'inhibition de l'effet des Treg via un anti-TNFR2.	210

Tableau 1 : Classification de la GVHa chez l'homme.	47
Tableau 2 : Système de gradation de la GVHa chez la souris décrit par l'équipe de Cooke.	50
Tableau 3 : Principaux marqueurs des Treg et leurs niveaux d'expression dans le sang et différents tissus chez l'homme et la souris.	81
Tableau 4 : Nouveau score clinique d'évaluation de la GVHa chez la souris, développé au cours de ce travail de thèse.	190

Abréviations

ABM : Agence de la Biomédecine

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CPA : Cellules présentatrice d'antigène

CsA : Ciclosporine A

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CSP : Cellules souches du sang périphérique

CTL : « Cytotoxic T lymphocyte » = Lymphocyte T cytotoxique

DC : « Dendritic cells » = Cellules dendritiques

DFS : « Disease-free survival » = Survie sans maladie

DLI : « Donor lymphocyte infusion » = Réinjection des lymphocytes du donneur

Foxp3 : « Forkhead box P3 » = Facteur de transcription essentiel au développement des Treg

GVH ou GVHD : « Graft-versus-host disease » = Maladie du greffon contre l'hôte

- GVHa : Forme aiguë de la maladie du greffon contre l'hôte
- GVHc : Forme chronique de la maladie du greffon contre l'hôte

GVL : « Graft-versus-leukemia » = Effet du greffon contre la leucémie

Gy : Gray

HAT : Histone actétyltransférase

HDAC : Histone désacétylase

HLA : « Human leukocyte antigen » = Complexe majeur d'histocompatibilité chez l'homme

IBMTR : International Bone Marrow Transplant Registry

ICT : Irradiation corporelle totale

IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase

IFN γ : Interféron gamma

IL : Interleukine

LAG-3 : « Lymphocyte activating gene 3 »

LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique

LAM : Leucémie aiguë myéloïde

LB : lymphocyte B

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocyte T

mAb : « Monoclonal antibody » = Anticorps monoclonal

MAC : « Myelo-ablative conditioning » = Conditionnement myélo-ablatif

MFI : Mean fluorescence intensity = Intensité moyenne de fluorescence

mHA : « Minor histocompatibility antigen » = Antigène mineur d'histocompatibilité

MO : Moelle osseuse

MTX : Méthotrexate

NK : « Natural killer cells » = Cellules tueuses naturelles

NMA : « Non myelo-ablative conditioning » = Conditionnement non myélo-ablatif

NRM : « Non relapse mortality » = Mortalité non liée à la rechute

Nrp-1 : Neuropiline 1

OS : « Overall survival » = Survie globale

PAMP : « Pathogen-associated molecular pattern » : Motif moléculaire conservé associé aux agents pathogènes

PD-1 : « Programmed death-1 »

PR : Polyarthrite rhumatoïde

PT-Cy : « Post-transplant cyclophosphamide » = Cyclophosphamide administré en post-greffe

RIC : « Reduced-intensity conditioning » = Conditionnement à intensité réduite

SAL : Sérum Anti-Lymphocytaire

SEP : Sclérose en plaque

TBI : « Total body irradiation » = Irradiation corporelle totale

Tconv : Lymphocytes T conventionnels

TCR : « T cell receptor » = Récepteur à l'antigène des cellules T

Teff : Lymphocytes T effecteurs

TLR : « Toll-like receptor » = Récepteur de l'immunité innée de type Toll

TNF α : « Tumor necrosis factor alpha » = Facteur de nécrose tumorale, de type alpha

TNFR : Récepteur au TNF α

- TNFR1 : récepteur au TNF α de type 1
- TNFR2 : récepteur au TNF α de type 2

Treg : Lymphocytes T régulateurs

- aTreg : Treg activé
- HY-Treg : Treg spécifiques de l'antigène mâle HY
- iTreg : Treg induit
- nTreg : Treg naturel
- rTreg : « resting Treg » = Treg au repos
- rsTreg : Treg spécifiques des antigènes du receveur

TSDR : « Treg-specific demethylated region » = Région du promoteur de *FOXP3* riche en CpG et spécifiquement déméthylée chez les nTreg

USP : Unité de sang placentaire

VEGF : « Vascular endothelial growth factor » = Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Principe

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une thérapeutique reposant sur l'injection, chez un patient receveur atteint d'hémopathie de mauvais pronostic (le plus souvent une hémopathie maligne de type leucémie aiguë ou syndrome myélodysplasique), d'un greffon cellulaire contenant des CSH provenant d'un donneur sain. Le principe thérapeutique de l'allogreffe de CSH est l'éradication des cellules leucémiques résiduelles dans le cadre d'une hémopathie maligne et le remplacement d'une moelle (et/ou d'un système immunitaire) dysfonctionnelle par une moelle saine dans le cadre des hémopathies non malignes comme l'aplasie médullaire idiopathique, les hémoglobinopathies ou les déficits immunitaires combinés sévères de l'enfant. L'effet anti-leucémique de l'allogreffe est lié en partie à l'administration avant la greffe proprement dite d'un traitement appelé conditionnement qui associe généralement diverses molécules de chimiothérapie et/ou de la radiothérapie, mais aussi et surtout à la destruction des cellules leucémiques résiduelles par les cellules immunitaires du donneur, principalement les lymphocytes T (LT) mais aussi les cellules « natural killer » (NK), on parle alors d'effet « graft-versus-leukemia » (GVL) ou « graft-versus-tumor ».

Comme décrit ci-dessous, le développement des conditionnements à intensité réduite (RIC) et non myélo-ablatifs (NMA) d'une part, permettant l'accès à l'allogreffe à des sujets plus âgés, et des greffes à partir de donneurs alternatifs d'autre part, augmentant la probabilité pour chaque patient de trouver un donneur, ont permis une hausse quasi-constante du nombre d'allogreffes réalisées chaque année depuis 20 ans (**figure 1**). Ainsi, selon le rapport médical et scientifique de l'Agence de la Biomédecine (ABM) consacré à l'activité nationale d'allogreffe de CSH pour l'année

2015, 1964 allogreffes ont été réalisées en France cette année-là, contre 1656 en 2010, 1205 en 2005 et 799 en l'an 2000.

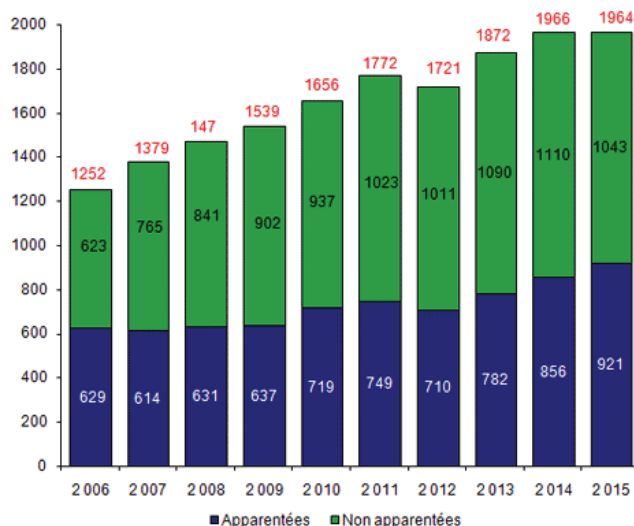


Figure 1 : Evolution du nombre d'allogreffes de CSH réalisées chaque année en France entre 2006 et 2015, en fonction du type de donneur (apparenté ou non).

Source : Rapport annuel 2015 de l'ABM sur l'activité globale de greffe allogénique, d'après les déclarations d'activité des centres de greffe.

Indications

L'allogreffe de CSH est une thérapie lourde, associée à un fort taux de mortalité et à de nombreuses complications potentielles, y compris sur le long terme, pour les patients survivants. Par conséquent, elle est réservée aux patients atteints d'hémopathies de moins bon pronostic, les plus à risque de rechute. Ce risque est évalué individuellement pour chaque patient en fonction principalement du type de son hémopathie, de caractéristiques cytogénétiques et/ou moléculaires au diagnostic et de l'évaluation de la réponse au traitement. Cette dernière a été améliorée ces

dernières années par le développement de techniques moléculaires et de cytométrie en flux permettant de détecter de la maladie résiduelle chez des patients jusqu'alors considérés en rémission complète de leur hémopathie (Appelbaum 2015).

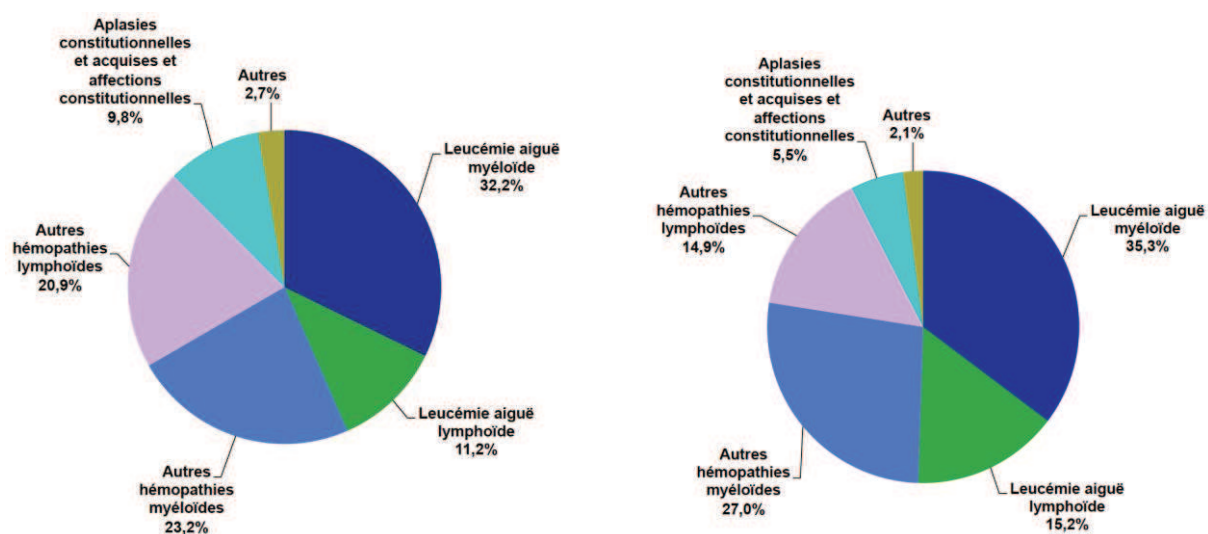


Figure 2 : Répartition des principales indications d'allogreffe de CSH en France pour l'année 2015, en fonction du type de donneur (apparenté ou non).

A gauche : Allogreffes apparentées (n = 810 patients). A droite : Allogreffes non apparentées (n = 964 patients).

Source : Rapport annuel 2015 de l'ABM sur l'activité globale de greffe allogénique, d'après les déclarations d'activité des centres de greffe.

Selon le rapport 2015 de l'ABM, les 3 principales indications d'allogreffe restent la leucémie aiguë myéloïde (LAM) dans 34.1% des cas, les syndromes myélodysplasiques (en forte augmentation depuis 2005) dans 15.4% des cas et la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) dans 13.4% des cas. A l'inverse, d'autres hémopathies comme le myélome multiple voient leur nombre d'indications d'allogreffe diminuer chaque année (3.9% des allogreffes en 2015 contre 8.3% en 2010), en raison principalement de l'apparition récente de nombreuses nouvelles

molécules efficaces permettant de prolonger significativement la survie des patients traités, y compris ceux présentant des critères de mauvais pronostic au diagnostic (Naymagon and Abdul-Hay 2016). La répartition des indications pour les allogreffes réalisées en France en 2015 est représentée dans la **figure 2**.

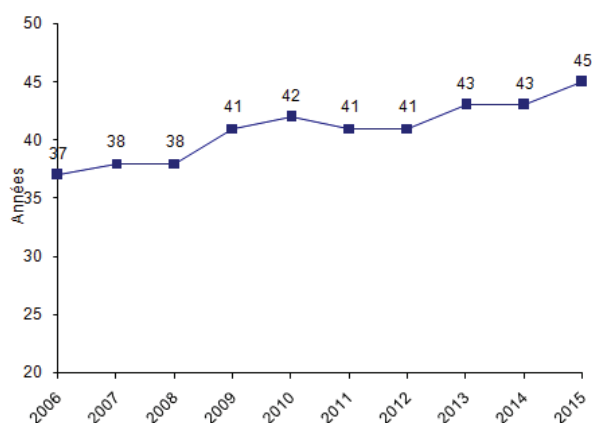


Figure 3 : Evolution de l'âge moyen des patients ayant reçu une allogreffe de CSH en France entre 2006 et 2015.

Source : Rapport annuel 2015 de l'ABM sur l'activité globale de greffe allogénique, d'après les déclarations d'activité des centres de greffe.

Du fait de la forte toxicité de ce traitement, l'indication d'allogreffe de CSH est aussi conditionnée par des caractéristiques propres au patient, notamment son âge, ses antécédents médicaux et ses comorbidités. Des scores cliniques ou clinico-biologiques d'évaluation des comorbidités avant allogreffe ont ainsi été développés et sont prédictifs de la survie après greffe (Sorrer, Logan et al. 2015, Vaughn, Storer et al. 2015). Si l'allogreffe a été initialement réservée aux patients les plus jeunes (moins de 40 à 45 ans) en raison de la forte toxicité des conditionnements myélo-ablatifs (MAC) alors utilisés, le développement des conditionnements RIC et NMA a

permis l'accès à la greffe à des patients plus âgés (jusqu'à 70 ans voire plus actuellement). Ainsi, en 2015, l'âge moyen des patients allogreffés en France était toujours en augmentation, à hauteur de 45 ans contre 41 ans en 2012 et 37 ans en 2006. Si l'on exclut la population pédiatrique (c'est-à-dire les patients âgés de moins de 18 ans), l'âge moyen à la greffe était alors de 51 ans en 2015. La proportion des patients âgés de plus de 55 ans est ainsi passée de 33% en 2012 à 41.6% en 2015. L'évolution de l'âge moyen des patients allogreffés de CSH en France au cours des 10 dernières années est représentée en **figure 3**.

Types de donneurs

Si les caractéristiques de la maladie et les caractéristiques du patient permettent de retenir une indication d'allogreffe de CSH, la troisième condition à la réalisation de ce traitement est la disponibilité d'un donneur, et si possible d'un « bon » donneur. Un certain nombre de critères interviennent dans le choix d'un donneur, au premier rang desquels figure le degré de compatibilité HLA avec le patient receveur. Il est donc recherché en priorité un donneur compatible dans la fratrie, dit « géno-identique » car ayant reçu par son père et sa mère les mêmes gènes du système HLA que le patient. En l'absence de donneur disponible dans la fratrie, on peut alors rechercher un donneur volontaire de CSH inscrit sur un fichier international. On parle alors de donneur « phéno-identique », car ayant le même phénotype HLA pour les antigènes testés. Ces antigènes sont généralement au nombre de 10 (HLA A, B, C, DR β 1 et DQ β 1, avec 2 allèles pour chaque gène), même si certains centres, notamment aux Etats-Unis, se contentent d'une compatibilité sur 8 antigènes en omettant DQ β 1, ou si à l'inverse il est possible d'aller jusqu'à 12 antigènes en incluant HLA DP. Enfin, en l'absence de donneur HLA-compatible 10/10, une allogreffe à partir d'un donneur dit alternatif pourra éventuellement être discutée. Il s'agit alors soit d'un donneur phéno-identique présentant une seule incompatibilité HLA (on parle de « mismatch ») et

donc 9/10, soit d'un donneur dit « haplo-identique », c'est-à-dire d'un donneur intra-familial n'ayant qu'un haplotype (soit la moitié des gènes du système HLA) en commun avec le receveur, soit d'une greffe à partir d'une ou 2 unités de sang placentaire (USP).

Les autres critères à prendre en considération pour le choix d'un donneur sont son statut sérologique pour le cytomégalovirus (CMV), son âge, son poids, son sexe, son nombre de grossesses pour les femmes (corrélé au risque d'immunisation anti-HLA), son groupe sanguin et de façon plus secondaire son pays d'origine ou sa préférence quant à un type de don en particulier (moelle osseuse ou cellules souches du sang périphérique).

Si depuis 2007 les allogreffes à partir d'un donneur non apparenté sont majoritaires en France (53.1% des greffes réalisées en 2015, soit environ 1000 à 1100 greffes par an de façon stable depuis 5 ans, **figure 1**), la proportion des greffes apparentées a quant à elle connu depuis peu une nette augmentation (921 greffes en 2015 contre 710 en 2011, **figure 1**) du fait principalement du développement des greffes haplo-identiques (277 allogreffes haplo-identiques ont été réalisées en 2015).

Source des CSH

Un autre facteur à considérer avant la réalisation d'une allogreffe est la source des CSH utilisées. En effet, si pendant de nombreuses années les allogreffes ont été exclusivement réalisées à partir du prélèvement d'un greffon médullaire sous anesthésie générale par aspiration de la moelle osseuse (MO) au niveau de la crête iliaque postérieure, l'apparition des facteurs de croissance de la lignée granuleuse (G-CSF) et les progrès des techniques de cytophérèse ont permis dans les années 1990 le développement de la greffe à partir de cellules souches du sang périphérique

(CSP) (Matsunaga, Sakamaki et al. 1993). Dans ce cas, le donneur mobilise donc des CSH par injections répétées de G-CSF, puis ses cellules mononuclées du sang périphérique, contenant les CSH mobilisées, sont recueillies par cytophérèse. Enfin, la troisième source possible de CSH est constituée par le sang présent au niveau du cordon ombilical, recueilli à la naissance dans certaines maternités spécialisées, puis congelé et stocké dans des banques de sang placentaire.

En 2015, toujours selon le rapport de l'ABM, la répartition de ces 3 types de sources de CSH pour les allogreffes réalisées en France était la suivante : CSP dans 67% des cas, MO dans 26.6% des cas et USP pour les 6.4% restant. A noter que les greffes à partir d'USP, après une période de forte croissance entre 2003 et 2009, connaissent un déclin depuis quelques années, parallèlement au développement des greffes haplo-identiques.

Les greffons de MO et de CSP ne sont pas équivalents en termes de contenu cellulaire. En effet, les greffons de CSP sont à la fois plus riches en cellules souches CD34⁺ (de l'ordre de 3 à 4 fois plus) et en LT CD3⁺ (de l'ordre de 10 fois plus) que les greffons médullaires. Ainsi, plusieurs études prospectives randomisées ont pu montrer que la période d'aplasie est plus courte (de l'ordre de 5 à 10 jours de moins) et les risques de non-prise de greffe et de rechute généralement plus faibles après allogreffe à partir de CSP mais qu'en revanche, le risque de réaction du greffon contre l'hôte (GVH) est alors plus élevé, surtout dans sa forme chronique (Blaise, Kuentz et al. 2000, Powles, Mehta et al. 2000, Bensinger, Martin et al. 2001, Schmitz, Beksac et al. 2002, Anasetti, Logan et al. 2012). Cependant, les données de ces études montrent aussi globalement que les résultats en termes de survie globale (OS) ou de survie sans maladie (DFS) sont identiques après allogreffe à partir de CSP ou de MO.

Conditionnement

En dehors de certains cas très rares d'allogreffe pour un déficit immunitaire combiné sévère chez l'enfant, l'injection des cellules du donneur est précédée par un traitement de type radio- et/ou chimiothérapie appelé conditionnement, ayant pour but de détruire les cellules leucémiques résiduelles (en cas d'hémopathie maligne), les CSH et précurseurs hématopoïétiques du receveur (pour « faire de la place » au greffon) et enfin les cellules immunitaires du receveur, créant ainsi une immunodépression nécessaire à la prise de greffe. On distingue de façon schématique 3 types de conditionnement, en fonction de leurs toxicités et de leurs propriétés plutôt myélo-ablatives ou plutôt immunosuppressives :

- 1) Les conditionnements MAC, reposant généralement sur l'association d'une irradiation corporelle totale (ICT) à 12 Grays (Gy) avec de la chimiothérapie à forte dose par cyclophosphamide ou sur de la chimiothérapie à forte dose seule, par busulfan et cyclophosphamide. Les conditionnements de types MAC sont ceux dont l'activité anti-leucémique propre est la plus forte, mais ils sont aussi les plus toxiques. Ils sont donc réservés aux sujets les plus jeunes.
- 2) Les conditionnements RIC ont, comme leur nom l'indique, été conçus pour réduire l'intensité et donc la toxicité des conditionnements à la greffe. Ils peuvent donc être proposés à des sujets plus âgés. Ils reposent essentiellement sur des chimiothérapies à base de doses plus faibles de busulfan, de melphalan, de thiotepa et de molécules davantage lymphopéniantes et donc immunosuppressives que myélo-toxiques, comme la fludarabine, éventuellement associées à du sérum anti-lymphocytaire (SAL) ou à une ICT à plus faible dose.

- 3) Les conditionnements NMA, les moins toxiques, associant généralement de l'ICT à faible dose (2 Gy) à de la fludarabine, voire une ICT à 2 Gy seule (on parle aussi de « mini-allogreffe »). Ces derniers peuvent être proposés à des sujets âgés, même au-delà de 70 ans. Leur effet anti-leucémique propre est faible et la prévention du risque de rechute de l'hémopathie repose ici essentiellement sur l'effet GVL.

La **figure 4** montre les différences d'intensité de dose et de toxicité pour une sélection de divers conditionnements utilisés en allogreffe de CSH, allant du NMA au MAC.

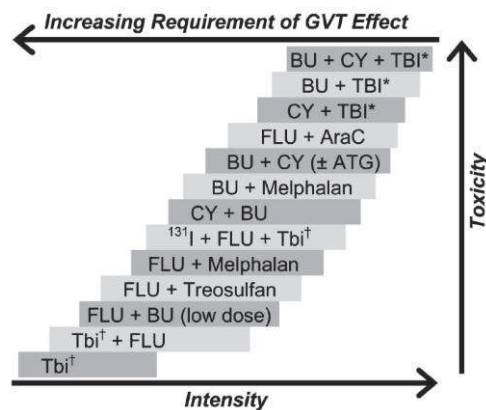


Figure 4 : Exemples de conditionnements utilisés en allogreffe de CSH, répartis en fonction de leur intensité, corrélée à leur toxicité, et de l'importance de leur dépendance vis-à-vis de l'effet GVL.

Plus un conditionnement est intense, plus il est toxique et moins il nécessite l'effet GVL pour éradiquer les cellules leucémiques résiduelles.

BU : busulfan; CY : cyclophosphamide; TBI : irradiation corporelle totale; FLU : fludarabine; AraC : aracytine; ATG : sérum anti-lymphocytaire; ¹³¹I : anticorps anti-CD45 couplé à de l'iode 131; * : TBI à forte dose (8 à 13.2 Gy); † : TBI à faible dose (2 à 4 Gy). Source : Deeg *et al.* (Deeg and Sandmaier 2010).

Complications de l'allogreffe

Si l'allogreffe de CSH est le traitement permettant de prévenir le plus efficacement la rechute des hémopathies malignes, elle est associée à une forte toxicité et à de nombreuses complications potentielles faisant réserver ce traitement lourd aux patients atteints des hémopathies les plus graves et les plus aptes à le tolérer.

Tout d'abord, l'allogreffe ne prévient malheureusement pas la rechute dans tous les cas, loin de là. L'incidence des rechutes post-allogreffe varie ainsi d'environ 25% des cas pour les patients greffés pour une LAM en première rémission complète, à plus de 60% des cas pour les patients greffés en rechute (Alyea, DeAngelo et al. 2010). Ces rechutes post-greffes sont généralement associées à un pronostic très sombre (Mielcarek, Storer et al. 2007, Thanarajasingam, Kim et al. 2013), et ce d'autant plus qu'elles surviennent de façon précoce après la greffe. La rechute de l'hémopathie initiale constitue ainsi la première cause de décès après allogreffe géno-identique (à 10 ans de la greffe, environ 15% des patients sont décédés de rechute) (Gratwohl, Brand et al. 2005).

Ensuite, la réaction immunologique allogénique des LT du donneur, dont on a vu plus haut qu'elle pouvait être bénéfique et recherchée pour éradiquer les cellules leucémiques résiduelles (effet GVL), est aussi associée à un versant néfaste conduisant à la destruction des tissus sains du receveur : c'est la réaction du greffon contre l'hôte ou GVH, cause majeure de morbi-mortalité après greffe (voir chapitre 2). La GVH est ainsi la principale cause de mortalité tardive non liée à la rechute puisqu'à 10 ans de la greffe, environ 10% des patients sont morts de GVH en cas de greffe géno-identique (Gratwohl, Brand et al. 2005, Ferrara, Levine et al. 2009).

Après la rechute et la GVH, la troisième grande cause de décès après allogreffe est représentée par les complications infectieuses. En effet, à 10 ans de la greffe, environ 5% des patients sont décédés d'une complication infectieuse (Gratwohl,

Brand et al. 2005). Ces dernières peuvent être très diverses (bactériennes, virales, fongiques ou parasitaires) et le risque de survenue de chaque type d'infection varie en fonction du temps écoulé depuis la greffe et du degré d'immunosuppression (Tomblyn, Chiller et al. 2009).

Si la GVH et les infections constituent les 2 principales causes de mortalité non liée à la rechute (NRM), un grand nombre d'autres complications peuvent survenir après allogreffe et sont responsables globalement du décès d'environ 15% des patients à 10 ans (Gratwohl, Brand et al. 2005). Ces complications peuvent être regroupées en 2 grandes catégories :

- Les complications précoces : comprenant entre autres la maladie veino-occlusive du foie (ou syndrome d'obstruction sinusoidale), les micro-angiopathies thrombotiques, l'hémorragie intra-alvéolaire diffuse ou la cystite hémorragique.
- Les complications tardives : très nombreuses et pouvant survenir plus de 10 ou 20 ans après l'allogreffe. Elles sont non seulement responsables d'une mortalité significative, expliquant que même les patients allogreffés et survivants à 2 ans de la greffe ont une survie moins bonne que la population générale (Wingard, Majhail et al. 2011), mais aussi d'une importante morbidité avec un impact fort sur la vie sociale et la qualité de vie (Tichelli, Rovo et al. 2009). Citons notamment les complications ophtalmologiques (cataracte, kérato-conjonctivite), les dysfonctions thyroïdiennes, l'infertilité, les complications cardio-vasculaires (insuffisance cardiaque, accident vasculaire cérébral, coronaropathie, artériopathie), le syndrome de pneumonie idiopathique, le syndrome métabolique, la surcharge martiale, l'ostéoporose et les ostéonécroses avasculaires, les maladies rénales chroniques, l'hypertension artérielle et enfin les cancers secondaires, qu'ils soient hématologiques ou solides.

Chapitre 2 : Maladie du greffon contre l'hôte (GVH)

Définition

La maladie du greffon contre l'hôte (« graft-versus-host disease » = GVH ou GVHD) est une complication fréquente et grave de l'allogreffe de CSH, responsable d'une importante morbi-mortalité. Elle s'inscrit dans le cadre de la réaction immunitaire allogénique post-greffe au cours de laquelle les cellules immunitaires du donneur, principalement les LT, reconnaissent comme étrangères et attaquent les cellules de l'organisme du receveur. Cette réaction allogénique est à l'origine de 2 effets : l'un, voulu et bénéfique, correspond à l'élimination des cellules cancéreuses ou leucémiques par le système immunitaire du donneur (GVL). L'autre, néfaste et que l'on cherche à éviter, correspond à la destruction des tissus sains du receveur, c'est la GVH.

Cliniquement, il existe 2 formes de GVH : la GVH aiguë (GVHa) et la GVH chronique (GVHc), qui diffèrent également fortement sur le plan physiopathologique. Classiquement, la distinction entre ces 2 formes reposait uniquement sur un critère chronologique, la forme aiguë survenant durant les 100 premiers jours suivant la greffe et la GVHc après J100. Cependant, suite au développement des conditionnements de type RIC et à l'apparition de GVHa retardées (« late-onset acute GVHD »), cette distinction temporelle est devenue caduque. Ainsi, à l'heure actuelle, les diagnostics de GVHa et GVHc reposent uniquement sur des critères cliniques. De ce fait, il est également possible que GVHa et GVHc surviennent concomitamment chez un même patient, on parle alors de syndrome de recouvrement (« overlap syndrome »). Si la GVHa est caractérisée sur le plan clinique par l'atteinte de 3 organes cibles, à savoir la peau, le foie et le tube digestif (Glucksberg, Storb et al. 1974), la GVHc peut en théorie atteindre tous les organes

du receveur, mais sa gravité est le plus souvent liée à la présence de lésions pulmonaires (Jagasia, Greinix et al. 2015). Dans la suite de ce travail, nous nous focaliserons sur la GVHa, les modèles murins de GVHc étant rares, complexes, souvent peu pratiques et pas toujours pertinents en termes de délai de survenue des lésions et de variété des organes atteints.

Epidémiologie

Chez l'homme, l'incidence de la GVHa est directement liée au degré de disparité HLA entre le donneur et le receveur. Cependant, même en cas de donneur géno-identique, des lésions de GVHa nécessitant une corticothérapie systémique surviennent dans environ 40% des cas (Ferrara, Levine et al. 2009), du fait de différences génétiques au niveau d'antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHA).

Par ailleurs, un certain nombre d'autres facteurs influencent le développement de la GVH, notamment l'âge du receveur (et possiblement aussi celui du donneur), le type de conditionnement reçu (incidence plus élevée en cas de MAC), la source des cellules utilisées comme greffon (risque plus important avec des CSP par rapport à un greffon de MO, surtout en ce qui concerne la GVHc) et la présence d'une différence de sexe entre le donneur et le receveur (risque particulièrement important en cas de couple donneuse allo-sensibilisée/receveur masculin) (Deeg 2007).

Globalement, l'incidence de la GVHa de grade 2 à 4 après allogreffe est d'environ 50% et pour les patients réfractaires au traitement de première ligne par corticoïdes, la survie à long-terme est mauvaise, de l'ordre de 5 à 30% (Martin, Rizzo et al. 2012).

Physiopathologie

Bien que la description de ce qui serait plus tard appelé GVHa remonte aux modèles murins d'allogreffe réalisés dès les années 1950 par Barnes et Loutit (Barnes, Corp et al. 1956), la physiopathologie de cette réaction immunologique complexe reste à ce jour encore imparfaitement connue. En 1966, Billingham énonce les 3 conditions nécessaires au développement de la GVH : 1) le greffon doit contenir des cellules immunocompétentes, 2) le receveur doit exprimer des antigènes tissulaires qui ne sont pas présents chez le donneur et 3) le patient doit être incapable de monter une réponse effectrice pour éliminer les cellules transplantées (Billingham 1966). En 2006, les critères de Billingham ont été révisés afin d'inclure une quatrième condition nécessaire au développement de la GVH : les lymphocytes du donneurs doivent être capables de migrer dans les tissus cibles de la GVH (Sackstein 2006).

Il a été très clairement démontré que les LT du donneur sont les principaux médiateurs de la GVH. En effet, en cas de déplétion des greffons en LT, on observe de faibles taux d'incidence de GVH (Horowitz, Gale et al. 1990). Malheureusement, cela s'accompagne également d'une plus forte probabilité de rechute, par perte de l'effet GVL, d'un risque augmenté de non prise ou de rejet de la greffe et d'une fréquence plus élevée des infections post-greffe, notamment virales.

La description physiopathologique de la GVHa peut classiquement être découpée en 3 phases successives, comme décrit principalement par James Ferrara à partir de données provenant de modèles murins. Au cours de la première, des dégâts tissulaires sont causés par le conditionnement pré-greffe, conduisant à l'activation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du receveur. La deuxième phase correspond à l'activation, la prolifération, la différenciation et la migration des LT du donneur. Enfin, la troisième phase est la phase effectrice, au cours de laquelle les effecteurs cellulaires et inflammatoires (cytokines) aboutissent à la destruction des tissus cibles. L'ensemble de ces mécanismes est représenté dans la **figure 5**,

communément connue sous le nom de « roue » de Ferrara (Ferrara, Levine et al. 2009).

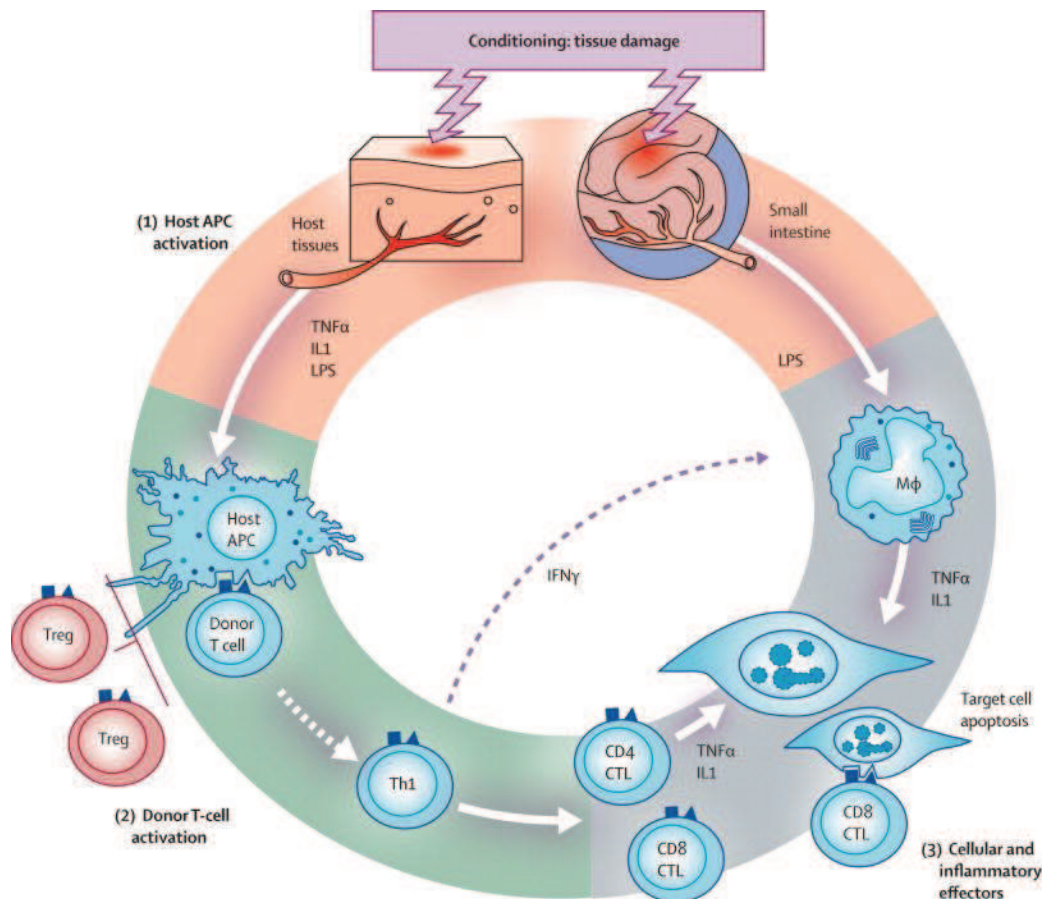


Figure 5 : Représentation schématique des mécanismes physiopathologiques de la GVHa, selon le modèle de la « roue » de Ferrara.

La première phase correspond à l'activation des CPA du receveur suite aux dommages tissulaires causés par le conditionnement. La deuxième phase correspond à l'activation des LT du donneur. La troisième phase est la phase effectrice, aboutissant à destruction des tissus cibles par l'implication de différents acteurs cellulaires et médiateurs solubles de l'inflammation.

APC : cellule présentatrice d'antigène; CTL : lymphocyte T cytotoxique; M ϕ : macrophage; Treg : lymphocyte T régulateur; IL1 : interleukine 1; LPS : lipopolysaccharide. Source : Ferrara *et al.* (Ferrara, Levine et al. 2009).

Activation des CPA du receveur

La première étape indispensable au déclenchement d'une GVHa est l'activation des CPA du receveur, par la maladie hématologique sous-jacente mais surtout par le conditionnement pré-greffe. En effet, celui-ci, surtout lorsqu'il comporte une ICT à forte dose, engendre des lésions tissulaires chez le receveur, surtout au niveau de la peau et de la muqueuse digestive. Les tissus lésés répondent en produisant des signaux de danger, en libérant massivement des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'interleukine (IL) 1 (IL-1) et l'IL-6 (on parle classiquement d' « orage cytokinique »), des chimiokines et en conduisant à l'augmentation de l'expression par les CPA du receveur de molécules d'adhésion, d'antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et de molécules de costimulation (Xun, Thompson et al. 1994, Hill, Crawford et al. 1997). A ce titre, l'augmentation une semaine après l'allogreffe du taux plasmatique du récepteur au TNF α de type 1 (TNFR1), qui peut être vu comme un marqueur de substitution au TNF α , est fortement corrélée au développement d'une GVH, à sa sévérité et à la survie des patients (Choi, Kitko et al. 2008).

Les dégâts causés par le conditionnement au niveau du tube digestif jouent un rôle particulièrement important, puisqu'ils permettent la translocation de signaux inflammatoires supplémentaires d'origine microbienne, tel le lipopolysaccharide (LPS), et majorent ainsi le phénomène d'activation des CPA du receveur (Hill and Ferrara 2000). Par ailleurs, au-delà de la simple libération de LPS, le microbiote semble jouer un rôle important dans le déclenchement de la GVHa, mis en évidence dès 1974, et l'incidence de cette dernière, notamment en ce qui concerne l'atteinte digestive, diminue après décontamination par un traitement antibiotique ciblant en particulier les bactéries anaérobies (van Bakkum, Roodenburg et al. 1974, Beelen, Elmaagacli et al. 1999, Jenq, Ubeda et al. 2012).

Les tissus lymphoïdes secondaires associés à la muqueuse digestive constituent vraisemblablement le lieu de rencontre initial entre les CPA activées du receveur et les LT du donneur (Murai, Yoneyama et al. 2003). Si ces CPA du receveur sont 100 à 1000 fois plus « efficaces » pour activer les LT allo-réactifs du donneur, par rapport à des CPA du donneur (Koyama, Kuns et al. 2011), elles ne sont pas indispensables, puisqu'en leur absence, des cellules non hématopoïétiques du receveur exprimant aussi le CMH de classe II, comme les myofibroblastes, peuvent activer les LT du donneur. De même, les cellules dendritiques (DC) CD103⁺ du donneur, qui résident dans le côlon, sont également capables, une fois la GVH déclenchée, d'activer les LT du donneur après migration dans les ganglions mésentériques, ce qui accentue localement de façon indirecte la stimulation allogénique et la sécrétion de cytokines (Koyama, Cheong et al. 2015).

Notons enfin qu'une plus forte activation des CPA du receveur pourrait également être l'explication au fait que certaines infections virales, notamment à CMV, soient associées à un risque accru de GVH. En effet, les CPA détectent les infections en reconnaissant des motifs moléculaires conservés appelés PAMP (pour « pathogen-associated molecular pattern ») grâce à un certain nombre de récepteurs membranaires, notamment les TLR (pour « Toll-like receptor ») (Akira, Uematsu et al. 2006). Ainsi, il existe des TLR reconnaissant spécifiquement l'ADN ou l'ARN viral et qui peuvent donc être à l'origine de l'activation des CPA en cas d'infection virale, notamment à CMV.

Activation des lymphocytes T du donneur

Elle est rendue possible par la cooccurrence de 3 signaux indispensables :

- l'activation du récepteur T (TCR)

- la balance entre les signaux de costimulation activateurs et inhibiteurs
- les cytokines nécessaires à l'activation et la survie des LT.

L'activation du TCR se fait par sa ligation à un complexe CMH-peptide étranger. Une incompatibilité entre le CMH du donneur et celui du receveur n'est pas requise pour le déclenchement de la GVH, puisque cette dernière peut survenir même en cas de greffe HLA-compatible 10/10, ce qui signifie que la réponse T à des antigènes mineurs peut suffire à déclencher une GVH. La cascade de signalisation intracellulaire après stimulation du TCR est en revanche essentielle, notamment la phosphorylation des kinases Erk1/2 et STAT-3, dont l'inhibition entraîne un blocage de la GVH (Lu, Alpdogan et al. 2008). Par ailleurs, l'intensité du signal TCR, modulée entre autres par l'affinité de ce TCR pour le complexe CMH/peptide rencontré, la durée d'interaction entre la CPA et le LT, la densité d'expression du TCR à la surface du LT et une molécule dénommée cavéoline-1 impliquée dans l'organisation des microdomaines intracellulaires, détermine le devenir des LT alloréactifs du donneur, qui en cas de signal trop faible peuvent se convertir in vivo en lymphocytes T régulateurs (Treg), ce qui a pour conséquence d'atténuer la GVH (Schonle, Hartl et al. 2016).

La deuxième étape indispensable à l'activation des LT du donneur est la présence de signaux de costimulation (Zeiser, Socie et al. 2016). En leur absence, les LT deviennent anergiques ou meurent par apoptose. Le principal signal de costimulation consiste en l'interaction entre le récepteur CD28, membre de la superfamille des immunoglobulines exprimé de façon constitutive à la surface des LT, et les molécules CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2) présentes à la surface des CPA. A côté de l'interaction CD28/B7, un grand nombre de molécules de costimulation peuvent être surexprimées à la surface des LT activés au cours de la GVH, parmi lesquelles ICOS (CD278) (Hubbard, Eng et al. 2005, Taylor, Panoskaltsis-Mortari et al. 2005), CD40 ligand (CD154) (Blazar, Taylor et al. 1997), 4-1BB (CD137) (Blazar, Kwon et al. 2001), CD30 (Blazar, Levy et al. 2004) et OX40 (CD134) (Blazar, Sharpe et al.

2003). Le blocage de la plupart de ces molécules de costimulation inhibe très efficacement la GVH dans des modèles murins.

A l'opposé de ces signaux de costimulation, un certain nombre de molécules de co-inhibition peuvent être impliquées dans le contrôle de l'alloréactivité. L'expression de la plupart de ces molécules ou de leurs ligands est induite par des médiateurs pro-inflammatoires, relâchés au cours des dommages tissulaires causés par le conditionnement ou produits par les LT alloréactifs eux-mêmes. Par exemple, la molécule CTLA-4, dont l'expression est induite après activation des LT, est un récepteur de haute avidité entrant en compétition avec le CD28 pour se lier aux molécules CD80 et CD86 et qui déclenche un signal inhibiteur (Walunas, Lenschow et al. 1994). Un premier essai clinique de blocage de la costimulation dans le contexte de la GVH a montré que l'utilisation de l'abatacept, molécule associant le domaine extracellulaire de haute avidité de CTLA-4 à une extrémité de type immunoglobuline IgG1 prolongeant sa demi-vie, induisait une incidence faible de la GVH, sur un nombre certes très réduit de patients (n = 10) (Koura, Horan et al. 2013). Parmi les autres molécules co-inhibitrices impliquées dans le contrôle de la GVH, on peut citer programmed death 1 (PD-1) et ses ligands PD-L1 et PD-L2 (Blazar, Carreno et al. 2003), TIM3 et son ligand la galectine 9 (Veenstra, Taylor et al. 2012), BTLA (Sakoda, Park et al. 2011), LIGHT (TNFSF14) (Xu, Flies et al. 2007), LAG-3 (Sega, Leveson-Gower et al. 2014), TIGIT (Yu, Harden et al. 2009), B7-H3 (Veenstra, Flynn et al. 2015) et B7-H5 (Flies, Higuchi et al. 2015). Le ciblage de ces molécules inhibitrices en thérapeutique clinique est également intéressant dans un contexte où l'on souhaite stimuler l'alloréactivité, par exemple dans des situations de rechute post-allogreffe. Ainsi, l'ipilimumab, anticorps monoclonal (mAb) antagoniste anti-CTLA-4, a montré son efficacité clinique dans ce contexte (Bashey, Medina et al. 2009, Davids, Kim et al. 2016).

Au final, le déclenchement de la réaction allogénique dépend de la résultante de l'ensemble des signaux de costimulation et de co-inhibition. Les principales

molécules de costimulation et de co-inhibition impliquées dans la réaction allogénique sont représentées en **figure 6**.

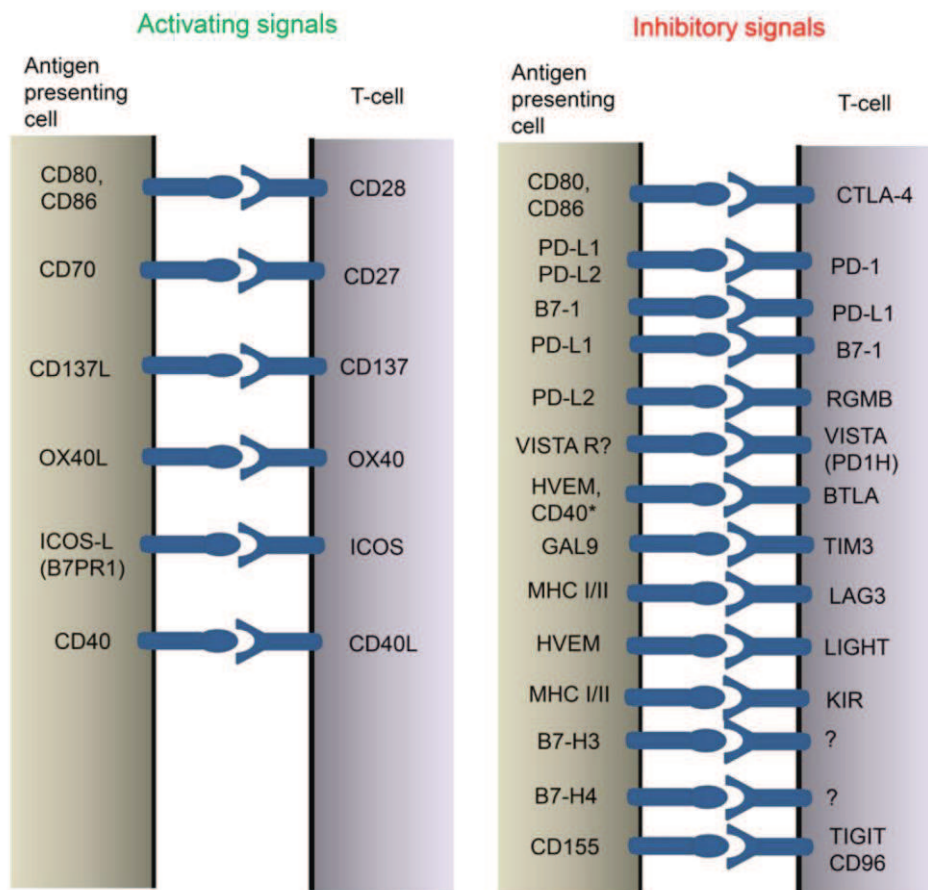


Figure 6 : Principaux couples ligand/récepteur impliqués dans la costimulation en fonction du caractère activateur ou inhibiteur des signaux qu'ils déclenchent.

A gauche : Principaux signaux activateurs. A droite : Principaux signaux inhibiteurs.

Source : Zeiser *et al.* (Zeiser, Socie *et al.* 2016).

Le troisième signal nécessaire à une activation persistante des LT allo-réactifs est fourni par des cytokines, essentiellement via leur fixation à la chaîne γ commune (γ_c

ou IL-2RG ou CD132). Comme son nom l'indique, cette dernière est partagée par de nombreux récepteurs cytokiniques et notamment ceux de l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15, soit les 3 principales cytokines impliquées dans ce troisième signal. Dans un modèle murin, le blocage du CD132 entraîne une diminution des signaux d'aval, notamment en ce qui concerne la voie JAK3, et prévient efficacement la GVH (Hechinger, Smith et al. 2015). De nombreuses autres cytokines ont comme dénominateur commun l'activation de JAK1 ou JAK2. De fait, le ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1 et JAK2, a montré son efficacité en prévention et/ou traitement de la GVH, chez la souris comme chez l'homme (Spoerl, Mathew et al. 2014, Carniti, Gimondi et al. 2015, Zeiser, Burchert et al. 2015). Le ciblage direct de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6, permet également de diminuer la GVH dans des modèles murins et dans une étude clinique préliminaire (Chen, Das et al. 2009, Tawara, Koyama et al. 2011, Kennedy, Varelias et al. 2014).

Phase effectrice

Après l'activation des LT naïfs par les 3 signaux décrits ci-dessus, ces derniers étant le plus souvent délivrés au niveau des organes lymphoïdes secondaires, les LT alloréactifs doivent être capables de migrer au niveau des tissus cibles de la GVH. Un certain nombre de chimiokines et récepteurs de chimiokines ont été impliqués dans ce processus, avec un rôle variable en fonction du contexte (type de conditionnement par exemple) et des tissus cibles considérés. Parmi ces molécules, le blocage du récepteur de chimiokines CCR5 a été particulièrement étudié et illustre bien les difficultés à tirer des conclusions claires et définitives sur le rôle précis d'une telle molécule dans la GVH. En effet, chez la souris, le blocage de CCR5 protège de la GVH dans un modèle de greffe sans irradiation des souris receveuses (Murai, Yoneyama et al. 1999), tandis qu'à l'inverse, on observe une GVH plus précoce et plus sévère quand ce blocage est réalisé après un conditionnement à base

d'irradiation (Welniak, Wang et al. 2004). Chez l'homme, on observe une même discordance entre les résultats de 2 essais cliniques conduits dans des contextes différents. En 2012, l'équipe de Reshef a montré que l'administration de maraviroc, un antagoniste de CCR5, en association avec la prophylaxie standard de la GVH, prévenait efficacement la survenue de la GVHa, principalement sous ses formes digestive et hépatique (Reshef, Luger et al. 2012). Quatre ans plus tard, l'étude de Hammond, utilisant la même molécule antagoniste, toujours dans des greffes à conditionnement atténué, montre des résultats opposés, à savoir une absence de protection de la GVH (Hammond, Heckman et al. 2016).

La phase effectrice proprement dite implique à la fois des acteurs cellulaires et des médiateurs solubles de l'inflammation, comme le TNF α , l'interféron- γ (IFN γ), l'IL-1 et l'oxyde nitrique, qui peuvent exercer leur propre effet cytotoxique direct (Ferrara and Deeg 1991, Welniak, Blazar et al. 2007). Les principaux effecteurs cellulaires de la GVHa sont les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les cellules NK (Ferrara, Levine et al. 2009). Le mécanisme de cytotoxicité utilisé par les CTL semble varier en fonction du tissu cible considéré. Ainsi, au niveau du foie, la cytotoxicité est essentiellement induite par la voie Fas/Fas-ligand, les hépatocytes exprimant fortement Fas, tandis qu'au niveau de la peau ou du tube digestif, les CTL utilisent préférentiellement le système perforine-granzyme (van den Brink and Burakoff 2002, Welniak, Blazar et al. 2007).

Concernant les médiateurs solubles de l'inflammation, leur production est stimulée au niveau des organes cibles de la GVHa que sont la peau et le tube digestif, notamment par le LPS qui « profite » des brèches causées au niveau des barrières cutanée et muqueuse pour aller activer des récepteurs de type TLR (Hill and Ferrara 2000, Iwasaki and Medzhitov 2004). Le rôle du TNF α est particulièrement intéressant, puisqu'il peut être produit à la fois par des cellules du receveur et du donneur et qu'il agit de 3 façons différentes à 3 moments clés au cours de la GVH :
1) il active les CPA et augmente la présentation par ces dernières d'allo-antigènes ;

2) il recrute les effecteurs cellulaires dans les organes cibles via l'induction de chimiokines inflammatoires ; 3) il induit directement des nécroses tissulaires, comme son nom l'indique (Piguet, Grau et al. 1987, Hill, Teshima et al. 2000, Brown, Lee et al. 2002).

Si la GVHa touche préférentiellement certains sites dans l'organisme, à savoir la peau, le tube digestif et le foie, les mécanismes physiopathologiques responsables d'une telle ségrégation anatomique sont longtemps restés obscurs. Une étude récente a mis en lumière une explication à ce phénomène (Michonneau, Sagoo et al. 2016). En effet, dans un modèle d'allogreffe reposant sur un mismatch d'antigène mineur d'histocompatibilité, les auteurs ont pu prouver que les CTL du donneur, responsables de la GVH et de l'effet GVL, détruisaient bien leurs cibles, c'est-à-dire les cellules exprimant leur antigène cognitif, au niveau du foie, mais pas dans les organes lymphoïdes (ganglions, rate, moelle osseuse). Cette différence était en rapport avec une plus grande expression de granzyme B par les CTL présents au niveau du foie et des autres organes cibles de la GVHa par rapport à ceux situés dans les organes lymphoïdes. Surtout, les auteurs ont pu faire la démonstration que cette différence phénotypique des CTL en fonction des organes n'était pas due à un processus de migration sélective, mais était plutôt déterminée par le microenvironnement spécifique à chaque organe. En l'occurrence, l'activité cytotoxique des CTL était modulée par une variation de l'expression des ligands de PD-1, dont PD-L1, en fonction des organes, associée à une augmentation de l'expression de PD-1 par les CTL. Ainsi, après allogreffe, PD-L1 est fortement exprimé par les CPA présentes au niveau des ganglions lymphatiques, mais pas par les CPA du foie. Ainsi, les manifestations de l'alloréactivité, à savoir la GVH et l'effet GVL, sont observées au niveau du foie mais pas au niveau des ganglions. Ces derniers peuvent donc constituer un site préférentiel de rechute pour l'hémopathie.

Classification de la GVHa

Classification de la GVHa chez l'homme

Afin de déterminer la sévérité de la GVHa chez chaque patient, pour choisir au mieux le traitement à mettre en place et surtout évaluer de façon précise la réponse à ce traitement, il est essentiel d'utiliser un score de sévérité reposant sur des critères clinico-biologiques à la fois pertinents, faciles à classer en différents stades de sévérité et si possible objectifs.

Un tel score existe depuis de nombreuses années et est largement utilisé par les différentes équipes de greffe à travers le monde. Publié initialement par Glucksberg en 1974 (Glucksberg, Storb et al. 1974), il a été révisé en 1975 (Thomas, Storb et al. 1975) puis à nouveau vingt ans plus tard (Przepiorka, Weisdorf et al. 1995). En pratique, pour chaque organe cible de la GVHa, le clinicien attribue un score allant de 0 à 4, en se basant sur des critères objectifs de jugement (**tableau 1**). En effet, pour la peau, ce score est déterminé par le pourcentage de la surface corporelle atteinte par la GVHa ; pour le foie, il dépend du dosage de la bilirubine totale effectué sur un prélèvement sanguin ; enfin, l'atteinte digestive est scorée en fonction du volume de selles émises par le patient en 24h.

En fonction des scores calculés pour chacun des 3 organes cibles mais aussi de l'appréciation plus subjective de l'état général du patient, un grade de sévérité global de la GVHa est déterminé, allant de I à IV (**tableau 1**). Ce score global peut-être recalculé à plusieurs reprises au cours du temps, ce qui en fait un outil d'évaluation dynamique de la GVHa. Par ailleurs, le score global maximal atteint par chaque patient est prédictif de la survie, ce qui confirme la pertinence de cette classification en pratique clinique.

A

Stade	Peau	Foie	Tube digestif
1	Rash maculo-papuleux < 25% de la surface cutanée	Bilirubinémie entre 34 et 50 µmol/L	Diarrhée > 500 mL/jour
2	Rash maculo-papuleux entre 25% et 50% de la surface cutanée	Bilirubinémie entre 51 et 102 µmol/L	Diarrhée > 1000 mL/jour
3	Erythrodermie généralisée	Bilirubinémie entre 103 et 255 µmol/L	Diarrhée > 1500 mL/jour
4	Erythrodermie généralisée avec formation de bulles et desquamation	Bilirubinémie > 255 µmol/L	Douleur abdominale sévère, avec ou sans iléus

B

Grade	Degré d'atteinte des organes cibles
I	Stade 1 à 2 cutané, sans atteinte hépatique ni digestive et sans altération de l'état général
II	Stade 1 à 3 cutané ; stade 1 hépatique et/ou digestif ; altération légère de l'état général
III	Stade 2 à 3 cutané ; stade 2 à 4 hépatique et/ou stade 2 à 3 digestif ; altération marquée de l'état général
IV	Similaire au grade III, avec atteinte d'organe de stade 2 à 4 et altération sévère de l'état général

Tableau 1 : Classification de la GVHa chez l'homme.

A : Evaluation du stade de sévérité pour chaque organe cible. B : Détermination du grade global de la GVHa.

Adapté de Przepiorka *et al.* (Przepiorka, Weisdorf *et al.* 1995).

A noter que l'IBMTR (International Bone Marrow Transplant Registry) a établi en 1997 un autre système de classement de la GVHa, très proche de celui de Glucksberg pour l'évaluation des atteintes cutanée, hépatique et digestive, mais

supposé moins subjectif car ne prenant pas en compte l'appréciation de l'état général du patient (Rowlings, Przepiorka et al. 1997). Ces 2 systèmes de classification de la GVHa ont été comparés de façon prospective dans une étude qui a montré leur concordance et leur quasi-équivalence en termes de prédiction de la survie, les principales différences consistant en une meilleure prédiction de la survie précoce (à J100 post-greffe) avec la classification de Glucksberg et un moindre biais d'évaluation par le clinicien (erreur de classement) avec la classification de l'IBMTR (Cahn, Klein et al. 2005).

Evaluation clinique de la GVHa chez la souris : principe, intérêt et limites des moyens actuellement utilisés

Il est important de rappeler qu'historiquement, l'allogreffe de CSH est un traitement qui a d'abord été développé dans des modèles murins, au cours des années 50 (Jacobson, Simmons et al. 1950, Lorenz, Uphoff et al. 1951, Congdon, Uphoff et al. 1952, Lorenz, Congdon et al. 1952). Dans ce contexte de guerre froide et d'utilisation récente de la bombe atomique à Hiroshima et Nagasaki, ce traitement avait alors pour objectif de protéger contre les séquelles liées à l'exposition aux irradiations. Pourtant, dès 1956, Barnes et Loutit ont émis l'hypothèse, et démontré, qu'une greffe de moelle osseuse pouvait aussi exercer un effet thérapeutique anti-leucémique (Barnes, Corp et al. 1956), ouvrant la voie aux premières greffes chez l'homme, réalisées par E.D. Thomas en 1957 chez 2 patients atteints de LAL (Thomas, Lochte et al. 1957).

Ainsi, la première description de ce qui allait être dénommé plus tard GVH a également été faite chez la souris (Barnes, Corp et al. 1956, Billingham 1959). Par la suite, afin de mieux comprendre la physiopathologie de la GVH, mais aussi et surtout afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques préventives et/ou

curatives, de nombreux modèles murins de GVH ont été élaborés. Parallèlement à leur mise en œuvre, s'est imposée la nécessité d'établir une description précise des manifestations cliniques de la GVH murine et de mettre au point des indicateurs permettant une évaluation de la sévérité de cette GVH, préalable indispensable à l'évaluation de l'efficacité des traitements testés.

Initialement, une façon très simple mais un peu grossière (car non spécifique) d'évaluer la sévérité de la GVH dans les modèles expérimentaux a consisté à suivre la courbe d'évolution pondérale des souris receveuses en post-greffe ainsi que leur survie (Blazar, Taylor et al. 1993). Les signes cliniques de la maladie étaient aussi recherchés, mais non gradés. Ils servaient donc uniquement à illustrer des différences entre les groupes de traitement à partir de souris représentatives. Ainsi, l'évaluation précise de la GVHa était alors principalement histologique et reposait sur l'appréciation des lésions au niveau de chaque organe cible par l'anatomopathologiste.

Si l'intérêt du suivi de la survie des souris greffées comme indicateur de la sévérité de la GVHa ne fait aucun doute, il est rapidement apparu nécessaire de développer un score d'évaluation clinique regroupant les principaux signes et symptômes de la GVHa chez la souris. Idéalement, un tel score devrait être simple à utiliser, fiable et efficace, reproductible, corrélé aux lésions histologiques de la GVHa et si possible prédictif de la survie des souris en cours d'expérimentation. Le premier score clinique de classement de la GVHa murine a été décrit par Cooke en 1996 (Cooke, Kobzik et al. 1996). Il repose sur l'évaluation de 5 critères cliniques, chacun étant noté de 0 à 2 en fonction de la sévérité de l'atteinte (**tableau 2**). Ces 5 critères sont : la perte de poids, la posture, l'activité, la texture du pelage et l'intégrité de la peau.

Critère	Grade 0	Grade 1	Grade 2
Perte de poids	< 10%	> 10% et < 25%	> 25%
Posture	Normale	Recroquevillement observé seulement au repos	Recroquevillement sévère, limitant la mobilisation
Activité	Normale	Légèrement ou modérément diminuée	Immobile, sauf à la stimulation
Texture du pelage	Normale	Légèrement ou modérément ébouriffée	Sévèrement ébouriffée/mauvais coiffage
Intégrité de la peau	Normale	Desquamation au niveau des pattes ou de la queue	Surfaces de peau dénudée facilement visibles

Tableau 2 : Système de gradation de la GVHa chez la souris décrit par l'équipe de Cooke.

Pour chaque critère clinique est attribué un score allant de 0 à 2 en fonction du degré de sévérité. Un score global sur 10 points est calculé en additionnant les scores déterminés pour chaque critère.

Adapté de Cooke *et al.* (Cooke, Kobzik et al. 1996).

Le score de Cooke a été repris et utilisé par de nombreuses équipes de recherche à travers le monde. Il a également servi de modèle pour l'élaboration de nouveaux (et nombreux) scores cliniques d'évaluation de la GVHa. Certains de ces scores sont uniquement dédiés à la GVHa cutanée (Anderson, McNiff et al. 2003). Les autres évaluent la GVHa de façon plus globale soit en rajoutant au score de Cooke un voire plusieurs critères supplémentaires, en général la diarrhée (Wilson, Cullup et al. 2009, Castor, Rezende et al. 2010, Lai, Chou et al. 2012), soit en le simplifiant légèrement en retirant un critère (Doisne, Huber et al. 2015), soit enfin en combinant les 2 approches (Budde, Kolb et al. 2014).

Il est important de préciser que tous ces systèmes de classification de la GVHa murine diffèrent aussi grandement dans la façon dont ils sont employés par les différentes équipes de recherches, en termes de fréquence d'utilisation (d'une seule

évaluation ponctuelle (Cooke, Kobzik et al. 1996, Doisne, Huber et al. 2015) à une évaluation quotidienne (Wilson, Cullup et al. 2009, Budde, Kolb et al. 2014)) et de recours ou non à des critères éthiques de sacrifice des souris. Ce recours est en effet très aléatoire selon les études, y compris quand le même score clinique est utilisé (Couturier, Lamarthee et al. 2013, Fu, Wang et al. 2015), et les critères de sacrifice retenus correspondent le plus souvent soit à un certain seuil de perte de poids (Doisne, Huber et al. 2015) soit à une certaine valeur du score clinique calculé pour chaque souris (Budde, Kolb et al. 2014).

Par ailleurs, le score de Cooke et ceux qui en dérivent sont critiquables sur plusieurs points. Tout d'abord, leur calcul est en grande partie subjectif (par exemple, la distinction entre un pelage modérément ou sévèrement ébouriffé est souvent difficile à apprécier et peut varier fortement d'un observateur à l'autre). Par conséquent, la reproductibilité de ces scores est douteuse et n'a en tout cas jamais été démontrée. Un système de classement plus simple, reposant sur une évaluation binaire de chacun des critères (1 point si présent, 0 point si absent), pourrait permettre d'éviter cet écueil. Une autre limite majeure du système de Cooke est l'absence d'évaluation directe (la perte de poids voire la diminution de l'activité pouvant être considérées comme des marqueurs indirects, mais très peu spécifiques) de l'atteinte digestive, qui est pourtant une manifestation clinique clé de la GVHa, à haute valeur pronostique. Ce manque a été comblé dans certains autres scores cliniques décrits depuis (Wilson, Cullup et al. 2009, Castor, Rezende et al. 2010, Lai, Chou et al. 2012, Budde, Kolb et al. 2014). Enfin, le principal intérêt de l'utilisation d'un système de gradation de la GVHa repose sur la pertinence clinique des différents grades ainsi définis, à savoir :

- leur corrélation aux lésions histologiques de GVHa (le système évalue-t-il efficacement ce qu'il est censé évaluer ?)

- leur valeur pronostique (les souris avec un score plus élevé sont-elles effectivement plus graves ? Ont-elles donc une survie moins bonne que les souris avec un score plus faible ?)

Or, à notre connaissance, aucun des différents systèmes de gradation de la GVHa chez la souris n'a fait la preuve d'une quelconque corrélation aux lésions histologiques de la maladie, ni d'une valeur pronostique robuste. De même, comme mentionné ci-dessus, aucun de ces scores cliniques n'a été évalué en termes de reproductibilité entre différents expérimentateurs, avec différents niveaux de pratique et d'expérience de l'évaluation clinique de la GVHa chez la souris. Par conséquent, il apparaît nécessaire, afin de mieux pouvoir étudier la GVHa expérimentale et évaluer de nouvelles approches thérapeutiques pour cette dernière, de développer des scores cliniques à la fois plus simples, plus reproductibles et plus efficaces.

Limites des modèles expérimentaux de GVHa

Si l'utilisation de modèles expérimentaux de la GVHa a considérablement facilité la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués au cours de cette réaction et permis l'exploration de stratégies thérapeutiques innovantes, il faut aussi avoir conscience des limites de ces modèles murins, limites qui doivent être prises en considération avant de tirer des conclusions définitives et d'extrapoler les résultats des études pré-cliniques à la GVHa observée chez l'homme. En 2009, Socié et Blazar ont ainsi identifié 5 limites principales des modèles expérimentaux de GVHa (Socié and Blazar 2009).

La première de ces limites est constituée par le conditionnement administré avant la greffe. Chez la souris, ce dernier repose essentiellement sur l'ICT seule, généralement administrée en grandes fractions voire sans fractionnement de dose et

à des débits de dose élevés et non habituellement utilisés chez les patients. A l'inverse, les modèles murins associant de la chimiothérapie à l'ICT ou reposant sur de la chimiothérapie seule, situation très courante en pratique clinique, sont rares.

La deuxième limite concerne de degré de compatibilité entre donneur et receveur. Une très large gamme de combinaisons a été utilisée chez la souris, allant des modèles reposant sur une incompatibilité d'antigène mineur d'histocompatibilité à des modèles complètement allogéniques, situation jamais rencontrée en clinique. Par ailleurs, de nombreuses lignées distinctes de souris intervenant dans ces modèles, ces derniers diffèrent aussi par leur contenu en Treg et sous-populations Th1, Th2 et Th17 et d'un point de vue physiopathologique. En effet, selon les modèles, les Teff impliqués dans la GVHa sont soit à prédominance CD4⁺, soit CD8⁺. Par conséquent, les conclusions tirées dans un modèle ne sont pas forcément applicables à un autre modèle ni à l'homme.

La troisième limite repose sur la source des cellules utilisées pour la greffe. Dans les modèles murins, afin de disposer d'une quantité suffisante de LT pour induire la GVH, des cellules extraites de la rate et/ou des ganglions des souris donneuses sont généralement ajoutées au greffon de moelle osseuse. Le contenu de ce greffon est donc différent de celui d'un greffon médullaire recueilli par aspiration en crête iliaque postérieure chez l'homme (et habituellement dilué par le sang) ou de CSH du sang périphérique recueillies après mobilisation par G-CSF.

Le quatrième point qui pose problème concerne le fait que les souris utilisées dans les modèles expérimentaux sont généralement élevées depuis leur naissance dans un environnement dépourvu d'agents pathogènes spécifiques, ce qui n'est bien évidemment pas le cas de l'homme. Or, le rôle des altérations du microbiote dans la physiopathologie de la GVHa est indiscutable (Zeiser, Socie et al. 2016). La flore microbienne, propre à chaque animalerie, ainsi que l'utilisation d'antibioprophylaxies peuvent moduler les réponses immunologiques au cours de la GVH et influencer sur les

effets du conditionnement. Par conséquent, l'extrapolation de données d'un laboratoire à un autre est compliquée et c'est encore plus vrai lorsqu'il s'agit de les extrapoler à l'homme.

Enfin, la cinquième limite des modèles expérimentaux de GVHa est constituée par l'âge des souris donneuses et receveuses. En effet, dans la majorité des cas, les modèles murins reposent sur l'utilisation de souris adultes jeunes, à la fois en ce qui concerne les donneuses et les receveuses. A l'inverse, chez l'homme, l'allogreffe de CSH est de plus en plus fréquemment proposée à des sujets âgés de plus de 50 ou 60 ans, parfois même au-delà de 70 ans. Or, l'âge du receveur est un facteur de risque classique de la GVH et est associé à une diminution de la thymopoïèse, une altération de la fonction des CPA, une diminution de la reconstitution immunitaire T périphérique et une sensibilité augmentée à l'irradiation.

Prophylaxie de la GVH

Méthotrexate + inhibiteur de calcineurine

Depuis maintenant 30 ans, le traitement standard prophylactique de la GVHa repose sur l'association de 2 immunosuppresseurs, le méthotrexate (MTX ; antagoniste des folates) et un inhibiteur de la calcineurine. Le méthotrexate a fait la preuve de son efficacité en prévention de la GVH dans des modèles précliniques, d'abord chez la souris (Uphoff 1958) puis chez le chien (Storb, Epstein et al. 1970), avant de devenir un standard en pratique clinique au cours des années 1970 (Thomas, Storb et al. 1975). La ciclosporine A (CsA), premier inhibiteur de la calcineurine, est apparu à la fin des années 1970 et a montré son efficacité dans le traitement de la GVHa (Powles, Barrett et al. 1978). Malheureusement, en monothérapie, la CsA ne prévient pas plus efficacement la GVHa que le MTX, ni chez le chien (Deeg, Storb et al.

1981), ni chez l'homme, comme en attestent les résultats de 3 essais cliniques prospectifs (Storb, Deeg et al. 1988).

Finalement, c'est l'association de ces 2 drogues qui s'est montrée la plus efficace, témoignant d'une synergie responsable d'une amélioration spectaculaire de la survie des animaux receveurs dans un modèle canin (Deeg, Storb et al. 1982). Ces résultats précliniques impressionnants ont conduit à la réalisation de 2 essais cliniques prospectifs chez l'homme, publiés en 1986, et montrant la supériorité de l'association MTX + CsA par rapport à chacune de ces drogues données en monothérapie, à la fois en prévention de la GVHa et en termes de survie des patients, établissant ainsi un nouveau standard de traitement (Storb, Deeg et al. 1986, Storb, Deeg et al. 1986). Le suivi à plus long terme de ces 2 essais a été publié en 2005 (Sorrow, Leisenring et al. 2005, Sorrow, Leisenring et al. 2005).

Au cours des années 1990, un nouvel inhibiteur de calcineurine est apparu, le tacrolimus (FK-506). Cependant, en monothérapie chez le chien, le tacrolimus ne fait pas mieux que le MTX ou la CsA, même lorsqu'il est associé à la prednisone (Storb, Raff et al. 1993, Yu, Seidel et al. 1997). Et si l'association MTX + tacrolimus a également conduit à des résultats précliniques impressionnants (Storb, Raff et al. 1993), 2 essais cliniques prospectifs, randomisés et multicentriques, comparant MTX + CsA à MTX + tacrolimus, l'un dans les greffes géno-identiques, l'autre dans les greffes phéno-identiques, n'ont pas permis d'établir la supériorité de l'association MTX + tacrolimus (Ratanatharathorn, Nash et al. 1998, Nash, Antin et al. 2000). En effet, même si l'incidence globale de la GVHa était à chaque fois plus faible dans le bras MTX + tacrolimus, la survie des patients était identique entre les 2 bras de traitement, et même un peu plus faible dans le bras tacrolimus pour ce qui est de l'étude consacrée aux greffes géno-identiques. Ainsi, le choix entre tacrolimus et CsA comme molécule associée au MTX en prophylaxie de la GVHa est variable selon les centres de greffe (de façon assez schématique, plutôt tacrolimus aux Etats-Unis et plutôt CsA en Europe).

Si l'association MTX + inhibiteur de calcineurine a une efficacité indiscutable en prophylaxie de la GVHa et est toujours considérée à ce jour comme un standard de traitement, elle est aussi responsable d'une certaine toxicité (complications infectieuses, insuffisance rénale, hypertension artérielle, etc...) potentiellement majorée par certaines interactions médicamenteuses et/ou co-médications. Le principal challenge dans les années à venir consistera donc à identifier de nouvelles thérapeutiques prophylactiques au moins aussi efficaces, mieux tolérées et permettant de diminuer l'incidence de la GVH, si possible sans impact négatif sur l'effet GVL ni sur la reconstitution immunitaire post-greffe.

Autres molécules efficaces

Un autre agent immunosuppresseur, le mycophénolate mofétil (MMF), agit également de façon synergique avec la CsA dans un modèle canin, à la fois pour prévenir la GVHa et améliorer la prise de greffe après conditionnement NMA (Storb, Yu et al. 1997, Yu, Seidel et al. 1998). Cette association est donc largement utilisée actuellement après conditionnement de type RIC ou NMA, mais n'a pas montré sa supériorité par rapport au standard MTX + CsA après MAC (Bolwell, Sobecks et al. 2004, Nash, Johnston et al. 2005).

Quant au SAL, son utilisation semble pertinente en association avec le standard MTX + inhibiteur de calcineurine en cas de greffe phéno-identique avec mismatch (Ayuk, Diyachenko et al. 2008, Kim, Min et al. 2009, Devillier, Furst et al. 2014). Dans le contexte d'une greffe phéno-identique matchée, 3 essais cliniques ont montré que le SAL pouvait réduire significativement l'incidence de la GVHa de grade III-IV, mais aucun n'a démontré un avantage en termes de survie des patients (Bacigalupo, Lamparelli et al. 2001, Wagner, Thompson et al. 2005, Finke, Bethge et al. 2009). A noter toutefois que les critères de matching dans 2 de ces études

n'étaient pas conformes aux standards actuels (typage sérologique pour les locus A et B et moléculaire pour DR β 1). Ces résultats ont été confirmés dans une méta-analyse publiée en 2012, qui incluait cependant des études conduites aussi bien avec des donneurs géno-identiques que phéno-identiques (Kumar, Mhaskar et al. 2012). Enfin, il convient de noter que le SAL est souvent inclus dans un certain nombre de schémas de conditionnement de type RIC, et dans ce cas, la prophylaxie de la GVHa peut reposer sur sa seule association à la ciclosporine, sans nécessité d'adjonction d'un autre agent immunosuppresseur (Slavin, Nagler et al. 1998).

Cyclophosphamide post-greffe : vers une révolution de la prophylaxie de la GVH ?

Le développement récent de l'utilisation du cyclophosphamide à forte dose en post-greffe (PT-Cy) dans les allogreffes haplo-identiques pourrait bien se généraliser à tous les types de greffe et venir « bousculer » dans les années à venir le standard actuel de la prophylaxie de la GVHa. La description de l'effet préventif du PT-Cy sur le rejet d'une greffe d'organe solide et l'importance du timing de son administration dans les 4 jours post-greffe ont été décrits dès les années 1960 (Berenbaum and Brown 1963, Berenbaum and Brown 1964). Ces données ont par la suite été confirmées dans le contexte de la prévention de la GVH chez la souris (Eto, Mayumi et al. 1991). Cependant, il aura fallu attendre les années 2000 pour que des premiers essais cliniques soient rapportés chez l'homme, dans le contexte des greffes haplo-identiques (O'Donnell, Luznik et al. 2002, Luznik, O'Donnell et al. 2008).

Le principe du PT-Cy repose sur le fait que, au contraire des lymphocytes alloréactifs, les CSH perfusées au moment de la greffe ne sont pas sensibles au cyclophosphamide, grâce à la forte quantité d'aldéhyde déshydrogénase qu'elles contiennent et qui leur permet de convertir le 4-hydroxycyclophosphamide en un

métabolite non alkylant. Les Treg jouent également un rôle important dans l'établissement d'un état de tolérance après PT-Cy (Luznik, O'Donnell et al. 2012).

Les résultats impressionnants rapportés avec l'utilisation du PT-Cy dans les greffes haplo-identiques (Luznik, O'Donnell et al. 2008, Kasamon, Luznik et al. 2010, Brunstein, Fuchs et al. 2011, Munchel, Kesserwan et al. 2011, Bashey, Zhang et al. 2013) ont non seulement contribué au développement récent de ce type de greffe et donc à l'augmentation des possibilités de trouver un donneur pour un certain nombre de patients, mais aussi à la conduite d'essais cliniques évaluant le PT-Cy dans les greffes phéno-identiques et géno-identiques (Luznik, Bolanos-Meade et al. 2010, Kanakry, Tsai et al. 2014). Un essai clinique randomisé de phase III est actuellement en cours dans les greffes avec donneur HLA-compatible, comparant le PT-Cy comme seule prophylaxie de la GVH versus le standard MTX + CsA (NCT01749111).

Traitement de la GVHa

Première ligne

Le traitement standard de première ligne de la GVHa de grade II-IV repose sur de la corticothérapie par méthylprednisolone à la dose 2 mg/kg/j (Martin, Rizzo et al. 2012), à l'exception notable de l'atteinte digestive haute isolée (anorexie, nausées, vomissements, dyspepsie), qui répond à des doses plus faibles de corticothérapie systémique (1 mg/kg/j de méthylprednisolone) associées à un traitement topique par beclométhasone (Hockenbery, Cruickshank et al. 2007). De même, une GVHa de grade I, correspondant à une atteinte cutanée isolée touchant moins de 50% de la surface corporelle, est volontiers traitée par des dermocorticoïdes seuls.

Globalement, ce traitement de première ligne permet d'obtenir 50 à 70% de réponses, dont 30 à 55% de réponses complètes (Martin, Rizzo et al. 2012). Ces résultats, bien que non négligeables, ne sont pas satisfaisants et il est clairement souhaitable de les améliorer. Dans ce but, des doses initiales plus élevées de corticoïdes (10 mg/kg/j) ont été testées, mais n'ont pas prouvé leur supériorité par rapport à la dose standard (Van Lint, Uderzo et al. 1998). Il a également été tenté d'améliorer le traitement de première ligne en associant une deuxième molécule d'emblée à la corticothérapie. Quatre molécules ont ainsi été testées dans une même étude randomisée de phase II : le MMF, l'etanercept (récepteur soluble anti-TNF α), le denileukin diftitox (molécule combinant l'IL-2 à la toxine diphtérique, entraînant donc la mort des cellules exprimant le récepteur à l'IL-2) et la pentostatine (analogue des purines) (Alousi, Weisdorf et al. 2009). L'association corticoïdes + MMF s'est révélée être la plus efficace et a donc été sélectionnée pour être testée au cours d'un essai de phase III contre l'association corticoïdes + placebo. Malheureusement, cet essai de phase III n'a montré aucun bénéfice de l'ajout du MMF à la corticothérapie (Bolanos-Meade, Logan et al. 2014).

A l'opposé de ces stratégies de renforcement du traitement de première ligne, et afin de limiter les nombreux effets indésirables liés à la corticothérapie, une tentative de réduction de la dose initiale de cette dernière a aussi été évaluée dans un essai randomisé de phase III. Celui-ci n'a certes pas montré d'impact défavorable sur la survie (dans les limites statistiques de l'étude dont ce n'était pas l'objectif principal), mais a en revanche révélé que chez les patients avec GVHa de grade ≥ 2 et atteinte cutanée prédominante, une plus faible dose initiale de corticoïdes était associée à un recours plus fréquent à un deuxième traitement immunosuppresseur (Mielcarek, Furlong et al. 2015).

Deuxième ligne et au-delà

Le traitement de deuxième ligne de la GVHa est moins clairement défini. Les molécules qui sont ou ont été les plus classiquement utilisées dans ce contexte sont le SAL, les anti-TNF α (etanercept, infliximab), le MMF, la photo-chimiothérapie extracorporelle, le méthotrexate, l'alemtuzumab, le sirolimus et les mAb anti-récepteur de l'IL-2 (basiliximab, daclizumab) (Martin, Rizzo et al. 2012). Aucun agent n'a clairement fait la preuve de sa supériorité par rapport aux autres. Le taux de réponses complètes après traitement de deuxième ligne de la GVHa se situe en moyenne aux alentours de 30 à 35% et la survie des patients pour lesquels un tel traitement a dû être initié est globalement mauvaise, de l'ordre de 50% à 6 mois. Plus récemment, une nouvelle molécule a montré des résultats préliminaires relativement prometteurs dans ce contexte : le ruxolitinib, inhibiteur de JAK1/2, qui permet d'obtenir un taux de réponse global > 80%, 46% de réponses complètes et une OS à 6 mois de 79% (Zeiser, Burchert et al. 2015).

Chapitre 3 : Lymphocytes T régulateurs (Treg)

Définition

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont une sous-population lymphocytaire T CD4⁺ naturellement présente dans le système immunitaire et indispensable à son homéostasie et au maintien d'un état de tolérance envers les antigènes du soi. Ces Treg sont capables d'exercer un effet suppresseur in vitro et in vivo sur l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices, comme la production de cytokines, d'un large panel de cellules du système immunitaire, au premier rang desquels les LT conventionnels CD4⁺ (Tconv), mais aussi les LT CD8⁺, les cellules NK et NKT, les lymphocytes B (LB) et les CPA (Sakaguchi, Miyara et al. 2010).

Ainsi, les Treg jouent un rôle majeur dans la protection vis-à-vis des maladies auto-immunes, de l'allergie et des désordres immunologiques en général, mais aussi pour l'installation et le maintien d'un état de tolérance dans le domaine des greffes allogéniques, que ce soit en transplantation d'organes solides ou de CSH, et pour la tolérance materno-fœtale durant la grossesse. Ils sont également impliqués en cancérologie, puisque certaines tumeurs peuvent recruter des Treg pour échapper à l'immunité anti-tumorale (Nishikawa and Sakaguchi 2010), et en infectiologie (Wohlfert and Belkaid 2008).

Historique

Si l'existence de cellules suppressives au sein du système immunitaire a été suspectée dès le début des années 1970 (Gershon and Kondo 1970), il a fallu

attendre 1995 pour que la population lymphocytaire T régulatrice et son rôle dans le maintien de la tolérance aux antigènes du soi mais aussi aux antigènes étrangers, soient clairement identifiés chez la souris par l'équipe de Shimon Sakaguchi (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995).

Cellules T suppressives

Les travaux fondateurs de Gershon et Kondo ont permis de montrer que certains LT, différents des T « helper », pouvaient freiner la réponse immunitaire. Ces LT suppresseurs ont ensuite été étudiés sur le plan phénotypique, par l'analyse des marqueurs Lyt-1 et Lyt-2, correspondant respectivement à CD5 et CD8. Ainsi, les LT suppresseurs étaient majoritairement Lyt-2⁺ et correspondaient donc aux LT CD8⁺, et en plus faible proportion Lyt-1⁺ Lyt-2⁻, équivalant aux LT CD4⁺, notamment en ce qui concerne ceux supprimant les réactions de type hypersensibilité retardée (Green, Flood et al. 1983). Les LT suppresseurs CD8⁺ exprimaient la molécule I-J, supposée être un facteur clé associé à leur fonction suppressive. Malheureusement, en 1983, l'étude du gène du CMH de la souris en biologie moléculaire a révélé que la région I-J, supposée coder la molécule I-J et être localisée au sein de ce gène, n'existait pas (Kronenberg, Steinmetz et al. 1983). Cette découverte a été un coup de frein terrible à la recherche sur les cellules T suppressives, cette dénomination allant jusqu'à être bannie du vocabulaire de certains immunologistes (Bloom, Salgame et al. 1992).

Par la suite, les phénomènes de suppression des réponses immunitaires impliquant des LT ont davantage été rattachés à une capacité de sécrétion de cytokines suppressives ou régulatrices qu'à une authentique fonction suppressive intrinsèque et propre à ces LT. C'est ainsi qu'ont été décrites dans les années 1990 les populations Tr1 (Groux, O'Garra et al. 1997), induite in vitro à partir de LT naïfs et sécrétant de l'IL-10, et Th3, sécrétant du TGFβ (Chen, Kuchroo et al. 1994).

Lymphocytes T CD4⁺ avec activité suppressive de l'auto-immunité

Parallèlement à l'étude des cellules T suppressives, qui reposait essentiellement sur l'induction expérimentale d'un état de tolérance ou de suppression vis-à-vis d'un antigène exogène particulier, une autre approche de la recherche sur les mécanismes suppresseurs du système immunitaire a consisté à étudier comment les maladies auto-immunes pouvaient se développer en échappant aux mécanismes naturels de tolérance au soi.

Ainsi, dès 1969, Nishizuka et Sakakura ont pu montrer que la thymectomie néonatale (réalisée entre J2 et J4 de vie) chez la souris conduisait à une destruction ovarienne (Nishizuka and Sakakura 1969), initialement supposée être en rapport avec un déficit en une prétendue hormone à tropisme ovarien, mais dont il a plus tard pu être montré qu'il s'agissait en réalité d'un mécanisme auto-immun, comme attesté par la présence, après thymectomie, de dégâts tissulaires inflammatoires au niveau d'autres organes et l'apparition d'auto-anticorps circulants tissus-spécifiques. Selon les souches de souris utilisées, il a ainsi été montré que la thymectomie pouvait induire le développement de lésions de thyroïdite, de gastrite, d'orchite, de prostatite ou de sialadénite (Kojima and Prehn 1981). Chez le rat, la thymectomie à l'âge adulte, suivie de séquences d'irradiation sublétales bihebdomadaires, conduit également au développement d'une thyroïdite auto-immune ou d'un diabète de type 1 en fonction des souches utilisées (Penhale, Farmer et al. 1973, Penhale, Stumbles et al. 1990, Fowell and Mason 1993).

Une étape fondamentale a été la démonstration que, dans les 2 modèles décrits ci-dessus, l'injection de LT provenant d'animaux syngéniques, et en particulier de LT CD4⁺ ou de thymocytes matures CD4⁺ CD8⁻, inhibait le développement des manifestations auto-immunes (Penhale, Irvine et al. 1976, Sakaguchi, Takahashi et al. 1982). A l'inverse, en cas de lésions auto-immunes établies, le transfert adoptif des LT CD4⁺ issus des souris malades à des souris syngéniques déficientes en LT

est capable d'induire les mêmes manifestations auto-immunes chez ces souris receveuses, les LT jouant alors un rôle de « helper » pour la production d'auto-anticorps ou d'effecteurs de la destruction tissulaire auto-immune à médiation cellulaire (Sakaguchi, Takahashi et al. 1982).

L'ensemble de ces résultats indique que le thymus normal produit constamment une population de LT CD4⁺ avec une activité suppressive vis-à-vis de l'auto-immunité. Ils suggèrent également qu'il pourrait exister 2 types de LT CD4⁺ en périphérie chez les souris et rats normaux et non traités : l'un potentiellement capable de déclencher des maladies auto-immunes et l'autre capable de les prévenir (Sakaguchi, Fukuma et al. 1985).

Lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ naturels : rôle dans la tolérance au soi

L'existence supposée de ces 2 sous-populations de LT CD4⁺ aux propriétés opposées a logiquement conduit les équipes de recherche à essayer de les distinguer en analysant l'expression différentielle de certaines molécules à leur surface. Ainsi, en 1985, l'équipe de Sakaguchi a pu montrer que la population suppressive de l'auto-immunité était comprise dans la fraction CD4⁺ CD5^{fort} (Sakaguchi, Fukuma et al. 1985). En effet, dans un modèle de transfert adoptif de LT CD4⁺ issus des splénocytes de souris BALB/c normales à des souris BALB/c « nude » athymiques et donc déficientes en LT de façon congénitale, on observe, en cas de déplétion ex vivo des cellules CD4⁺ CD5^{fort} avant transfert, le développement spontané de multiples manifestations auto-immunes chez les souris receveuses au bout de quelques mois. En revanche, le co-transfert de LT CD4⁺ non traités avec les LT CD4⁺ CD5^{faible} inhibe l'auto-immunité. Ces données ont ensuite été confirmées par d'autres équipes, en utilisant d'autres souches de souris (Sugihara, Izumi et al. 1988).

Selon le même principe, Powrie et Masson ont montré en 1990 chez des rats athymiques que la déplétion en cellules $CD4^+ CD45RB^{faible}$ avant transfert entraînait de multiples manifestations auto-immunes et une maladie systémique proche de la GVH (Powrie and Mason 1990). L'intérêt du marqueur CD45RB pour différencier les LT $CD4^+$ inducteurs de l'auto-immunité de ceux supprimant ces manifestations a par la suite été confirmé dans 2 autres études (Morrissey, Charrier et al. 1993, Powrie, Leach et al. 1993). Enfin, l'équipe de McKeever a quant à elle souligné l'importance du marqueur RT6.1 pour distinguer ces 2 sous-populations lymphocytaires T chez le rat (McKeever, Mordes et al. 1990).

Finalement, la recherche d'un marqueur de surface plus spécifique que CD5 et CD45RB pour définir la population T $CD4^+$ suppressive a conduit l'équipe de Sakaguchi à s'intéresser à la chaîne α du récepteur à l'IL-2, à savoir la molécule CD25, puisque les LT $CD25^+$ sont confinés à la fois dans les fractions $CD4^+ CD5^{fort}$ et $CD4^+ CD45RB^{faible}$ (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Les auteurs ont ainsi pu montrer que le transfert de splénocytes provenant de souris BALB/c sauvages, après déplétion en LT $CD4^+ CD25^+$, induisait chez les receveuses BALB/c nude athymiques des maladies auto-immunes prouvées sur les plans histologique et sérologique. Surtout, l'incidence de ces manifestations auto-immunes était plus élevée et le nombre d'organes atteints plus grand (estomac, thyroïde, ovaires, glandes surrénales, rein, articulations, glandes salivaires, îlots de Langerhans) qu'en cas de transfert de LT $CD5^{faible}$ ou $CD45^{fort}$ isolés à partir des mêmes splénocytes. Le co-transfert d'un faible nombre de LT $CD4^+ CD25^+$ avec les LT $CD25^-$ suffisait en revanche à prévenir l'auto-immunité. Sur le même principe, l'équipe de Sakaguchi a montré en 1996 que l'injection des LT $CD4^+ CD25^+$ peu après thymectomie néonatale prévenait le développement des manifestations auto-immunes (Asano, Toda et al. 1996). Enfin, la preuve que ces cellules naturellement anergiques et suppressives étaient produites au niveau du thymus a été apportée en 1999, toujours par la même équipe (Itoh, Takahashi et al. 1999).

Par ailleurs, l'équipe de Sakaguchi a également montré l'intérêt de cette population T CD4⁺ CD25⁺ au-delà du contexte des maladies auto-immunes. Pour cela, cette équipe a utilisé 2 modèles de réaction immunitaire ciblant des antigènes étrangers, en l'occurrence un modèle de greffe de peau allogénique et un modèle d'immunisation par des protéines xénogéniques. Dans les 2 cas, la reconstitution des souris nude athymiques par des LT CD4⁺ CD25⁻ majorait les réponses immunitaires dirigées contre la peau allogénique et les protéines xénogéniques, tandis que la reconstitution par des LT CD4⁺ CD25⁺ normalisait ces réponses (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995).

Au total, ces travaux pionniers et majeurs de Sakaguchi ont donc permis la caractérisation de la sous-population lymphocytaire T CD4⁺ CD25⁺ dotée d'une fonction suppressive, produite au niveau du thymus et impliquée dans la tolérance naturelle aux antigènes du soi et le contrôle des réponses immunitaires dirigées contre les antigènes du non soi. Cette population allait dorénavant être dénommée Treg. Il faudra en revanche attendre 2001 pour que les Treg humains CD4⁺ CD25^{fort} soient caractérisés (Baecher-Allan, Brown et al. 2001, Dieckmann, Plottner et al. 2001, Jonuleit, Schmitt et al. 2001, Levings, Sangregorio et al. 2001, Ng, Duggan et al. 2001).

Foxp3 : le régulateur clé de la lignée Treg

Découverte

L'étape majeure de la description phénotypique des Treg a été la découverte en 2001 du gène forkhead box P3 (Bennett, Christie et al. 2001, Brunkow, Jeffery et al. 2001, Wildin, Ramsdell et al. 2001), plus communément appelé *FOXP3*, puis la description en 2003 de son rôle fondamental dans le développement et la fonction de

ces cellules régulatrices (Fontenot, Gavin et al. 2003, Hori, Nomura et al. 2003, Khattri, Cox et al. 2003). Des mutations entraînant une perte de fonction du gène *FOXP3* ont initialement été décrites chez les patients atteints du syndrome IPEX et leur équivalent murin, correspondant aux souris de phénotype *Scurfy*. Le syndrome IPEX se caractérise par une dérégulation immunologique, une polyendocrinopathie et une entéropathie, liées à l'X. La conséquence de ces mutations de *FOXP3*, est un déficit en Treg fonctionnels à l'origine du développement des manifestations auto-immunes du syndrome IPEX.

Structure et fonction

La protéine Foxp3, qui est composée de 431 acides aminés et codée par 11 exons, est un facteur de transcription comportant à son extrémité C-terminale un domaine Forkhead, qui permet sa liaison à l'ADN et sa localisation dans le noyau (Brunkow, Jeffery et al. 2001, Lopes, Torgerson et al. 2006, Ziegler 2006). Comme les autres membres de la famille Foxp, Foxp3 agit à la fois comme un répresseur et un activateur transcriptionnel (Schubert, Jeffery et al. 2001, Wu, Borde et al. 2006, Marson, Kretschmer et al. 2007, Zheng, Josefowicz et al. 2007). L'extrémité N-terminale de Foxp3, en plus d'être nécessaire et suffisante à la médiation de son effet répresseur transcriptionnel (Lopes, Torgerson et al. 2006, Li and Greene 2007, Li, Samanta et al. 2007), contribue à la régulation épigénétique puisqu'elle correspond au site d'interaction entre Foxp3, les histones acétyltransférases (HAT) et les histones désacétylases (HDAC) (Li, Samanta et al. 2007).

Contrairement à la souris qui exprime une seule isoforme de Foxp3, il existe plusieurs isoformes chez l'homme, les principales étant Foxp3a, à savoir la protéine entière, et Foxp3b, une isoforme qui ne comprend pas l'exon 2 (Allan, Passerini et al. 2005). Si ces 2 isoformes sont exprimées à des niveaux équivalents, l'expression

ectopique de l'isoforme Foxp3b suffit à convertir des Tconv en Treg dotés de capacités suppressives (Allan, Passerini et al. 2005, Du, Huang et al. 2008). Contrairement à Foxp3a, qui peut être présent à la fois dans le noyau et le cytoplasme, l'expression de Foxp3b est confinée au noyau puisque cette isoforme est dépourvue du signal d'exportation nucléaire contenu dans l'exon 2 (Li, Samanta et al. 2006).

Régulation transcriptionnelle

En tant que facteur de transcription, Foxp3 va moduler l'expression de certains gènes clés conduisant au phénotype Treg. En l'occurrence, il est capable d'induire une répression de l'expression de l'IL-2, l'IL-4 et l'IFN γ , en interagissant avec d'autres facteurs de transcription, comme NFAT, NF- κ B et les facteurs de la famille Runx (Runx1, Runx2 et Runx3) (Bettelli, Dastrange et al. 2005, Wu, Borde et al. 2006, Ono, Yaguchi et al. 2007). A noter cependant que l'interaction directe entre Foxp3 et NFAT n'a jamais été clairement démontrée chez l'homme, contrairement à la souris (Schubert, Jeffery et al. 2001, Lopes, Torgerson et al. 2006).

Comme décrit plus haut, à côté de son effet répresseur transcriptionnel, Foxp3 peut également agir comme un activateur et induire l'expression d'autres gènes majeurs dans la détermination du phénotype Treg, à savoir les gènes *TNFRSF18*, codant GITR, *IL2RA*, codant le récepteur CD25, et *CTLA4* (Chen, Rowell et al. 2006, Wu, Borde et al. 2006, Camperio, Caristi et al. 2012).

Par ailleurs, la médiation des effets de Foxp3 dépend également de sa capacité à interagir avec d'autres facteurs de transcription (voir plus bas) et avec des protéines impliquées dans les modifications épigénétiques, comme les HAT ou les HDAC (Li, Samanta et al. 2007).

Modulation de la signalisation intracellulaire

L'un des principaux effets de Foxp3 est de moduler les cascades de signalisation intracellulaires en aval des récepteurs de surface. Ainsi, l'activité diminuée de la voie AKT/mTOR dans les Treg dépend de l'expression de Foxp3 (Han, Patterson et al. 2012). Une des conséquences de la diminution de la phosphorylation et donc de l'activité d'AKT dans les Treg après engagement du TCR ou du récepteur de l'IL-2 est la faible activité du complexe mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). Ce phénomène est amplifié par l'hyperphosphorylation d'une autre kinase, AMPK, qui inhibe mTORC1 (Laplante and Sabatini 2009, Michalek, Gerriets et al. 2011). Or, comme son nom l'indique, ce complexe peut être inhibé pharmacologiquement par la rapamycine, dont l'effet ciblera donc préférentiellement les Tconv, tout en épargnant relativement les Treg (Battaglia, Stabilini et al. 2006, Strauss, Czystowska et al. 2009, Lu, Qian et al. 2010). L'activité réduite d'AKT entraîne également une hypophosphorylation de Foxo, ce qui permet le maintien de l'expression de ce facteur dans le noyau, condition nécessaire à sa fixation sur le promoteur de Foxp3 et donc à la régulation (positive) de l'expression de Foxp3, formant ainsi une boucle de rétrocontrôle (Harada, Elly et al. 2010, Ouyang, Beckett et al. 2010).

Un autre effet de Foxp3 sur la signalisation intracellulaire est l'interruption du signal calcique induit par le TCR, qu'il entraîne de façon indirecte en interagissant avec NFAT (Wu, Borde et al. 2006, Vaeth, Schliesser et al. 2012). A l'inverse, la phosphorylation de STAT5, induite par l'IL-2, est augmentée dans les Treg (Zeiser and Negrin 2008).

Concernant l'expression des kinases, certaines sont réprimées dans les Treg par rapport aux Tconv, notamment CDK1, CDK6 et l'Aurora kinase B, toutes les 3 impliquées dans la progression du cycle cellulaire, ce qui contribuerait au phénotype hypo-prolifératif des Treg in vitro (Konig, Probst-Kepper et al. 2012). D'autres kinases, comme STK4 et STK10, impliquées dans l'adhésion et la migration

cellulaires et donc probablement importantes pour leur fonction suppressive in vivo, ont au contraire une expression augmentée dans les Treg. Toutefois, une régulation directe de l'expression de ces kinases par Foxp3 n'a pas encore été clairement prouvée.

Le recrutement de la kinase PKC θ dans la synapse immunologique est un évènement clé pour l'activation de NF- κ B et NFAT induite par le TCR (Isakov and Altman 2012). Or, ce processus est franchement diminué dans les Treg (Zanin-Zhorov, Ding et al. 2010). Les conséquences fonctionnelles de la faible activité de NF- κ B ainsi que le rôle de NFAT dans les Treg ne sont pas encore très clairs. En effet, si la sous-unité c-Rel de NF- κ B est essentielle pour le développement des Treg (Ruan, Kameswaran et al. 2009, Vang, Yang et al. 2010), son activité est également réprimée par sa liaison à Foxp3 (Loizou, Andersen et al. 2011). De même, si NFAT semble aussi jouer un rôle dans le développement des Treg (Oh-Hora, Komatsu et al. 2013), son activité est inhibée par Foxp3 dans les Treg matures, contrairement à ce qui se passe dans les Tconv (Wu, Borde et al. 2006, Vaeth, Schliesser et al. 2012). L'interaction de Foxp3 avec NF- κ B et NFAT passe entre autres par le récepteur nucléaire PPAR γ , qui est fortement exprimé par les Treg résidant dans le tissu adipeux (Cipolletta, Feuerer et al. 2012) et est capable d'inhiber les activités de NF- κ B et NFAT (Choi and Bothwell 2012).

Enfin, Foxp3 lui-même peut être phosphorylé, bien que la kinase responsable de cette phosphorylation ne soit pas encore connue (Nie, Zheng et al. 2013). Cette phosphorylation de Foxp3 serait essentielle pour la fonction des Treg.

Les principales perturbations des voies de signalisation dans les Treg en aval du complexe TCR/CD28 et du récepteur de l'IL-2 sont schématisées dans la **figure 7**.

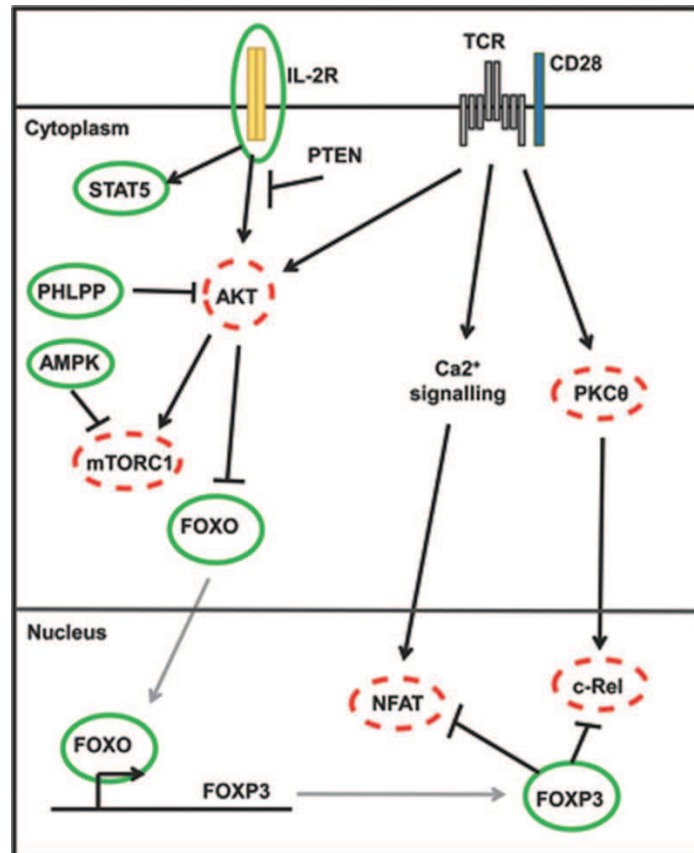


Figure 7 : Altération des voies de signalisation en aval du récepteur à l'IL-2 et du complexe TCR/CD28 dans les Treg.

En vert sont entourées les molécules dont l'expression ou l'activité est augmentée dans les Treg, tandis qu'en rouge sont entourées celles dont l'expression ou l'activité est diminuée. Les flèches noires pointues indiquent une activation et celles se terminant par une barre indiquent une inhibition. Les flèches grises indiquent un déplacement.

IL-2R : récepteur à l'IL-2 (CD25). Source : Vent-Schmidt *et al.* (Vent-Schmidt, Han et al. 2014).

Expression de Foxp3 au-delà des Treg

Si Foxp3 a été considéré pendant plusieurs années comme le facteur de transcription définissant la lignée Treg, on sait désormais que ce n'est pas tout à fait exact, puisque son expression n'est pas restreinte à la lignée T régulatrice (Allan, Crome et al. 2007, Ziegler 2007). En effet, les Tconv peuvent également exprimer

Foxp3, mais dans ce cas, il s'agit toujours d'une expression transitoire et à un niveau plus faible que dans les Treg (McMurphy, Di Nunzio et al. 2009). Surtout, l'expression transitoire de Foxp3 n'est pas suffisante pour conférer aux LT une fonction suppressive (Morgan, van Bilsen et al. 2005, Gavin, Torgerson et al. 2006, Allan, Crome et al. 2007, Tran, Ramsey et al. 2007, Broady, Yu et al. 2009), même si cela a été sujet à controverse (Pillai, Ortega et al. 2007, Zheng, Manzotti et al. 2008). Pour reprogrammer des Tconv en Treg en utilisant une méthode de thérapie génique, il faut en effet être capable d'induire une expression stable et à haut niveau de Foxp3 (Allan, Alstad et al. 2008). A l'inverse, le phénotype régulateur peut être rapidement éteint en stoppant l'expression de Foxp3 (Allan, Song-Zhao et al. 2008).

Interaction entre les « master regulators » Foxp3, T-bet, GATA-3 et ROR-γt

Contrairement à ce qui avait été initialement admis, la modulation du phénotype et de la fonction des Treg ne dépend pas exclusivement de Foxp3, mais peut faire intervenir également des facteurs de transcription classiquement associés à d'autres sous-types de la lignée T, comme T-bet pour les Th1 ou ROR-γt pour les Th17 (Vent-Schmidt, Han et al. 2014). Le niveau d'expression relatif de ces différents facteurs dits « master regulators » en anglais, va permettre de réguler plus finement le phénotype de chaque cellule et déterminer son caractère plus ou moins suppressif, ainsi que ses capacités migratoires et son potentiel de plasticité vers une autre lignée (Crome, Wang et al. 2010, Marwaha, Leung et al. 2012). Ces facteurs de transcription ne sont donc pas mutuellement exclusifs.

Le facteur de transcription T-bet régule l'expression des récepteurs de chimiokines et des cytokines associées à la lignée Th1, comme l'IFNγ ou CXCR3, et son expression réprime celle de Foxp3, prévenant ainsi le développement de Treg induits (Wei, Duramad et al. 2007). Pourtant, l'IFNγ joue un rôle important dans la prévention du

rejet d'allogreffe et de la GVH assurée par les Treg (Sawitzki, Kingsley et al. 2005, Koenecke, Lee et al. 2012). L'exposition de Treg à de l'IFN γ et/ou de l'IL-12, cytokines de polarisation Th1, leur confère des propriétés apparentées aux cellules Th1, comme un début d'expression de T-bet et de CXCR3, bien que ces cellules demeurent suppressives et capables de migrer vers les sites inflammatoires à médiation Th1 (Koch, Thomas et al. 2012). Cependant, dans certaines conditions, ces Treg « Th1-like » pourraient devenir pathogènes et contribuer à l'auto-immunité. De tels Treg producteurs d'IFN γ et dotés de capacités suppressives diminuées ont ainsi pu être isolés dans le sang de patients atteints de sclérose en plaque (SEP) ou de diabète auto-immun (Dominguez-Villar, Baecher-Allan et al. 2011, McClymont, Putnam et al. 2011).

De la même façon, il existe des données dans la littérature en faveur d'une coopération transcriptionnelle, plutôt qu'une simple compétition, entre Foxp3 et les facteurs de transcription associés à la lignée Th2 que sont GATA-3 et IRF4. En effet, le rôle de ces facteurs dans le bon fonctionnement des Treg a été démontré, notamment pour le contrôle des réponses inflammatoires de type Th2 (Zheng, Chaudhry et al. 2009, Wang, Su et al. 2011, Wohlfert, Grainger et al. 2011). Par ailleurs, les Treg murins comme humains sont également capables de se convertir en Th2 (Wan and Flavell 2007, Wang, Souabni et al. 2010, Hansmann, Schmidl et al. 2012). Là encore, l'équilibre entre tolérance et immunité est fragile, car si les Treg Th2-like sont essentiels pour contrôler les réponses Th2 (Kim, Kim et al. 2010), ils pourraient également jouer un rôle pathologique comme cela a été montré dans un modèle murin d'asthme allergique induit par le virus respiratoire syncytial (Krishnamoorthy, Khare et al. 2012).

Enfin, une co-expression et une coopération entre les facteurs de transcription Foxp3 et ROR- γ t (RORC2 chez l'homme), a aussi été observée. Par conséquent, grâce à cette interaction avec ROR- γ t, Foxp3 est capable de réguler également le développement des Th17 (Vent-Schmidt, Han et al. 2014). Le devenir fonctionnel de

l'interaction Foxp3/ROR- γ t est modulé par la concentration de TGF β (Zhou, Lopes et al. 2008). En effet, en présence d'une concentration élevée de TGF β , Foxp3 va exercer un effet suppresseur sur ROR- γ t et réprimer l'expression d'IL-17, favorisant le développement en Treg. A l'inverse, en cas de faible concentration en TGF β et en présence d'IL-6 et d'IL-21, on observe une expression des récepteurs à l'IL-17 et à l'IL-23, favorisant la différenciation en Th17.

L'origine des cellules Foxp3⁺ IL-17⁺ fait par ailleurs encore débat puisque des études ont montré qu'elles pourraient provenir soit de Treg ayant acquis la faculté de produire de l'IL-17 (Koenen, Smeets et al. 2008, Miyara, Wing et al. 2009), soit de cellules Th17 dont la production cytokinique est intrinsèquement régulée par Foxp3 (McMurchy, Gillies et al. 2013). Quoi qu'il en soit, par homologie avec les Treg Th1-like ou Th2-like, les Treg Th17-like auraient besoin de ces caractéristiques associées au phénotype Th17 pour migrer efficacement vers les sites inflammatoires à médiation Th17 et y exercer leur effet suppresseur (Chaudhry, Rudra et al. 2009, Duhén, Duhén et al. 2012), mais ils pourraient aussi perdre leurs capacités suppressives et jouer un rôle pathologique en sécrétant de l'IL-17 (Koenen, Smeets et al. 2008, Miyara, Wing et al. 2009).

Caractérisation phénotypique des Treg

CD4 et CD25

Comme nous l'avons vu plus haut, c'est l'étude de l'expression de la molécule CD25, qui a permis la première caractérisation phénotypique des Treg qui sont CD4⁺ et CD25⁺ de façon constitutive (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Chez la souris, les Treg représentent ainsi 5 à 10% des LT CD4⁺ (Rodriguez-Perea, Arcia et al. 2016). Chez l'homme, l'isolement des Treg parmi les cellules CD4⁺ sur la seule base du

marqueur CD25 est plus complexe, ce qui explique que leur caractérisation soit survenue assez tardivement après l'identification des Treg chez la souris, puisque seules les cellules exprimant fortement CD25 possèdent des capacités suppressives, ce qui représente seulement 1 à 2% des T CD4⁺ (Baecher-Allan, Brown et al. 2001). Plus récemment, l'amélioration de la caractérisation phénotypique des Treg humains a permis une réévaluation de cette proportion de Treg circulants chez l'homme, qui est estimée à 6% environ, soit un taux assez semblable à celui décrit chez la souris (Seddiki, Santner-Nanan et al. 2006, Rodriguez-Perea, Arcia et al. 2016).

Si le marqueur CD25 a permis la première description phénotypique des Treg, son expression n'est pas spécifique à cette sous-population lymphocytaire, puisque les Tconv peuvent aussi exprimer la chaîne α du récepteur à l'IL-2 après activation (Ortega, Robb et al. 1984). Il est donc rapidement apparu nécessaire d'identifier d'autres marqueurs de surface permettant de mieux caractériser la population Treg et si possible de faciliter son isolement par tri cellulaire.

CTLA-4 et GITR

Ainsi, au début des années 2000, deux nouveaux marqueurs ont été décrits à la surface des Treg : CTLA-4 (Read, Malmstrom et al. 2000, Salomon, Lenschow et al. 2000, Takahashi, Tagami et al. 2000) et GITR (McHugh, Whitters et al. 2002, Shimizu, Yamazaki et al. 2002).

CTLA-4 (ou CD152) est une molécule capable d'induire une inhibition de l'activation et de la prolifération des Tconv via sa fixation aux récepteurs CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) exprimés à la surface des CPA (Linsley, Brady et al. 1991). Il s'agit donc d'une molécule essentielle à la fonction suppressive des Treg, mais également d'un régulateur de leur homéostasie et de leur fréquence en conditions « steady-state »

(Tang, Teijaro et al. 2008). Initialement, il a été rapporté que les cellules CD4⁺ CD25^{+fort} exprimaient CTLA-4 de façon constitutive en intracellulaire (Baecher-Allan, Brown et al. 2001, Levings, Sangregorio et al. 2001). En fait, la proportion de Treg exprimant CTLA-4 en intracellulaire est très variable selon les études et dépend aussi en partie du tissu étudié. En effet, certains auteurs retrouvent une forte expression de CTLA-4 par les Treg, de l'ordre de 50 à 90% de ces cellules dans le sang périphérique de donneurs sains ou de nouveau-nés (Lim, Broxmeyer et al. 2006, Rueda, Wells et al. 2015), tandis que pour d'autres, cette proportion serait plutôt située entre 20 et 25% (Rodriguez-Perea, Arcia et al. 2016). En revanche, il semblerait que les Treg situés dans la muqueuse rectale expriment plus fortement CTLA-4. Chez la souris, ces pourcentages varient également avec le tissu étudié, de l'ordre de 50% pour les Treg situés dans les organes lymphoïdes secondaires contre seulement 25% dans le sang périphérique (McHugh, Whitters et al. 2002, Lages, Suffia et al. 2008). L'âge des souris étudiées a aussi une influence et est associé à une augmentation du pourcentage des Treg CTLA-4⁺.

GITR (CD357) est un membre de la superfamille des récepteurs au TNF jouant un rôle crucial dans le développement thymique des Treg, en augmentant la sensibilité de ces Treg à l'IL-2 (Mahmud, Manlove et al. 2014). Cependant, le rôle de GITR dans les Treg périphériques reste sujet à controverse, puisque sa stimulation conduirait selon les études soit à la prolifération de Treg fonctionnels (Liao, Nayak et al. 2010), soit à une diminution des capacités suppressives de ces Treg (Shimizu, Yamazaki et al. 2002). Il a également été montré récemment que GITR inhibait l'induction de cellules Foxp3⁺ au profit d'une polarisation Th9 via des modifications épigénétiques (Xiao, Shi et al. 2015). Environ 10 à 15% des Treg humains dans le sang périphérique expriment le marqueur GITR (Li, Mahesh et al. 2003, Rodriguez-Perea, Arcia et al. 2016), mais cette proportion s'élève à 40% dans la lamina propria de la muqueuse colique (Makita, Kanai et al. 2004). Chez la souris, GITR est exprimée par au moins 75 à 80% des Treg (Rodriguez-Perea, Arcia et al. 2016).

Si la description des marqueurs CTLA-4 et GITR a permis une meilleure caractérisation phénotypique des Treg, ils présentent la même limite que la molécule CD25, à savoir qu'ils ne sont pas spécifiques des Treg et peuvent aussi être exprimés par les Tconv après activation (Walunas, Lenschow et al. 1994, Shimizu, Yamazaki et al. 2002).

Foxp3

Comme évoqué plus haut, Foxp3 est probablement le meilleur marqueur actuel pour caractériser les Treg et faire la distinction entre ces Treg et les Tconv, même si son expression n'est pas strictement restreinte à la population T régulatrice. Cependant, comme il s'agit d'un facteur de transcription par définition intracellulaire et donc seulement accessible à un marquage après une étape de perméabilisation, son utilisation n'est pas possible pour faire du tri cellulaire.

CD127

La caractérisation phénotypique des Treg humains a été grandement facilitée par l'étude de la chaîne α du récepteur à l'IL-7, à savoir la molécule CD127, qui est exprimée faiblement à la surface des Treg, à la différence des Tconv (Liu, Putnam et al. 2006, Seddiki, Santner-Nanan et al. 2006). Ainsi, il est actuellement considéré que la meilleure façon d'isoler des Treg humains consiste à sélectionner les cellules CD4⁺ CD25⁺ et CD127^{faible/-} (Yu, Li et al. 2012), même si l'utilisation du marqueur CD127 a aussi ses limites puisqu'environ 15% des cellules CD25⁺ CD127^{faible/-} n'expriment pas Foxp3 (Liu, Putnam et al. 2006, Seddiki, Santner-Nanan et al. 2006) et qu'à l'inverse un peu moins de 10% des cellules CD25⁺ Foxp3⁺ conservent une

forte expression du CD127 (Seddiki, Santner-Nanan et al. 2006). De plus, le niveau d'expression de CD127 est variable, y compris chez des individus sains (Santegoets, Dijkgraaf et al. 2015), et peut être aussi diminué à la surface des Tconv dans un contexte d'activation chronique de ces Tconv, comme par exemple au cours d'une infection par le VIH, ou après leur activation in vitro (Alves, van Leeuwen et al. 2008, Del Pozo-Balado Mdel, Leal et al. 2010).

A l'heure actuelle, le panel minimal requis pour définir les Treg humains comprend donc les marqueurs CD3 (antigène commun aux LT), CD4, CD25, CD127 et Foxp3 (Santegoets, Dijkgraaf et al. 2015).

L'intégrine αE (CD103)

Chez l'homme, la proportion des Treg du sang périphérique exprimant le marqueur CD103⁺ varie selon les études de moins de 5% à 9% (Lim, Broxmeyer et al. 2006, Venken, Hellings et al. 2008, Rodriguez-Perea, Arcia et al. 2016). L'intégrine $\alpha E/\beta 7$ reconnaît la cadhérine épithéliale et caractérise une sous-population de Treg spécialisée dans les échanges avec l'environnement épithélial. Ces Treg CD103⁺ produisent de plus grandes quantités d'IL-10 et possèdent une plus forte capacité suppressive par rapport aux Treg CD103⁻ (Lehmann, Huehn et al. 2002). Chez la souris, la proportion des Treg issus des organes lymphoïdes secondaires exprimant le CD103 est plus importante, de l'ordre de 24% (McHugh, Whitters et al. 2002, Barthlott, Bosch et al. 2015, Yuan, Dee et al. 2015). Chez l'homme comme chez la souris, cette proportion de Treg CD103⁺ est augmentée dans la muqueuse digestive, notamment pour les Treg situés dans la lamina propria (jusqu'à 80% de cellules CD103⁺ chez la souris).

PD-1

La proportion de Treg humains exprimant PD-1 varie de 4% dans le sang périphérique à 17% dans la muqueuse rectale (Rodriguez-Perea, Arcia et al. 2016). Cependant, dans certaines conditions comme par exemple en cas d'infection virale chronique, cette expression peut être augmentée (Park, Park et al. 2015). Dans ce contexte, en se fixant à son ligand PD-L1 exprimé par les LT CD8⁺, PD-1 entraîne une inhibition de la prolifération et du relargage de cytokines pro-inflammatoires par ces cellules, ce qui constitue un nouveau mécanisme suppresseur des Treg, récemment identifié.

Par ailleurs, des travaux chez la souris ont montré qu'il existait une compartimentalisation de l'expression de PD-1, puisque 90% des Treg isolés à partir des rates et ganglions de souris n'expriment pas de façon significative PD-1 à leur surface, mais en revanche l'expriment en intracellulaire (Raimondi, Shufesky et al. 2006). Un tel phénotype a aussi été confirmé pour les Treg humain circulants. Toutefois, le niveau d'expression de PD-1 à la surface des Treg chez la souris reste controversé, puisque d'autres auteurs ont rapporté une expression par plus de 50% des Treg présents dans les tissus lymphoïdes (Rodriguez-Perea, Arcia et al. 2016). Cela pourrait s'expliquer entre autres par le fait que l'expression membranaire de PD-1 est majorée dans les LT activés, notamment après stimulation du TCR (Raimondi, Shufesky et al. 2006).

OX40 (CD134)

OX40 est une molécule de costimulation appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF qui est exprimée de façon constitutive à la surface des Treg, mais dont l'expression peut aussi être induite sur les Tconv après activation (McHugh,

Whitters et al. 2002). Cette molécule est exprimée par environ 10% des Treg humains (Rodriguez-Perea, Arcia et al. 2016), mais chez la souris, cette proportion grimpe jusqu'à 60% des Treg dans la rate des souris BALB/c et 80% des Treg présents dans la muqueuse colique (Abe, Ueha et al. 2008, Griseri, Asquith et al. 2010). Si OX40 a pour rôle de promouvoir la survie et la prolifération des Tconv et des LT CD8⁺ (Goulding, Tahiliani et al. 2011), sa fonction précise dans l'homéostasie des Treg reste controversée. En effet, certaines équipes ont montré que la voie de signalisation déclenchée par l'engagement d'OX40 stimulait la prolifération et la survie des Treg in vitro et in vivo (Takeda, Ine et al. 2004, Zheng, Wang et al. 2004, Elpek, Yolcu et al. 2007). A l'inverse, une autre étude a suggéré qu'OX40 n'avait aucun effet sur l'homéostasie des Treg (Vu, Xiao et al. 2007). De même, OX40 serait selon les études responsable d'une baisse des capacités suppressives des Treg (Valzasina, Guiducci et al. 2005, Vu, Xiao et al. 2007), ou nécessaire au maintien de cet effet suppresseur (Takeda, Ine et al. 2004). Par ailleurs, OX40 inhiberait fortement l'expression du gène *FOXP3* (Vu, Xiao et al. 2007).

ICOS

ICOS (CD278) est une molécule de costimulation et un marqueur d'activation des LT impliqué dans la promotion des réponses T effectrices, notamment Th1, Th2 et Th17, mais aussi des cellules T helper folliculaires (Simpson, Quezada et al. 2010, Crotty 2011). Cependant, des données plus récentes montrent également une implication d'ICOS dans le développement et la fonction suppressive des Treg. En effet, la signalisation par ICOS est nécessaire à l'effet suppresseur des Treg Foxp3⁺ dans certains modèles d'auto-immunité (Herman, Freeman et al. 2004, Prevot, Briet et al. 2010, Kornete, Sgouroudis et al. 2012). De plus, l'expansion des Treg après stimulation par leur antigène cognitif fait aussi intervenir ICOS (Burmeister, Lischke et al. 2008). Par ailleurs, l'expression de la molécule ICOS a été associée à la

production d'IL-10 par les LT CD4⁺ en général (Bonhagen, Liesenfeld et al. 2003) et permet d'identifier en particulier un sous-type de Treg exerçant leur effet suppresseur via la sécrétion d'IL-10 (Ito, Hanabuchi et al. 2008). ICOS permet enfin de contrôler l'expansion et la maintenance des Treg mais aussi leur production d'IL-10 au cours de certaines infections, notamment parasitaires (Redpath, van der Werf et al. 2013).

Les principaux marqueurs des Treg et leurs niveaux d'expression chez l'homme et la souris sont représentés dans le **tableau 3**.

Markers for Treg detection	Humans*		Mice [†]	
	PB [°]	RM*	LN	Spleen
CD4 ⁺ CD25 ⁺	14.5 ± 2.9	n.d.	14.3 ± 1.3	15.2 ± 0.4
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	6.4 ± 0.9	9.3 ± 4.1	11.2 ± 0.4	13 ± 2.6
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ CD25 ⁺	4.9 ± 1.1	7.5 ± 2.4	9.6 ± 0.3	10.2 ± 1
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ CD127 ^{low/-}	6.1 ± 1.1	7 ± 2.2	n.d.	n.d.
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/-}	6.0 ± 1.5	6.5 ± 3.2	n.d.	n.d.
Phenotype of CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ T _{regs}				
CD25	51.6 ± 9.1	45.4 ± 11.2	84.3 ± 2.5	82.7 ± 0.6
CTLA-4	23 ± 10.4	49.3 ± 13.4	n.d.	n.d.
GITR	10.3 ± 5.5	n.d.	75 ± 14.1	76.7 ± 8.7
CD103	9.3 ± 3.8	21.5 ± 10.7	n.d.	n.d.
PD-1	4.4 ± 3.7	16.8 ± 12	66.3 ± 14.6	65.5 ± 7.1
OX-40	n.d.	n.d.	62.8 ± 10.5	62.3 ± 3.8

Tableau 3 : Principaux marqueurs des Treg et leurs niveaux d'expression dans le sang et différents tissus chez l'homme et la souris.

Pour chaque marqueur est indiqué en pourcentage le niveau d'expression par la population Treg (moyenne +/- déviation standard) au niveau du sang périphérique et de la muqueuse rectale chez l'homme et des ganglions lymphatiques et de la rate chez la souris.

PB : sang périphérique; RM : muqueuse rectale; LN : ganglions lymphatiques; n.d. : non déterminé. Adapté de Rodríguez-Perea *et al.* (Rodríguez-Perea, Arcia et al. 2016).

Mécanismes d'action des Treg

L'identification des mécanismes par lesquels les Treg exercent leur effet suppresseur, ainsi que des différents acteurs cellulaires ou moléculaires impliqués dans cet effet, est une étape fondamentale pour la compréhension de l'établissement d'un état de tolérance et un préalable indispensable à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

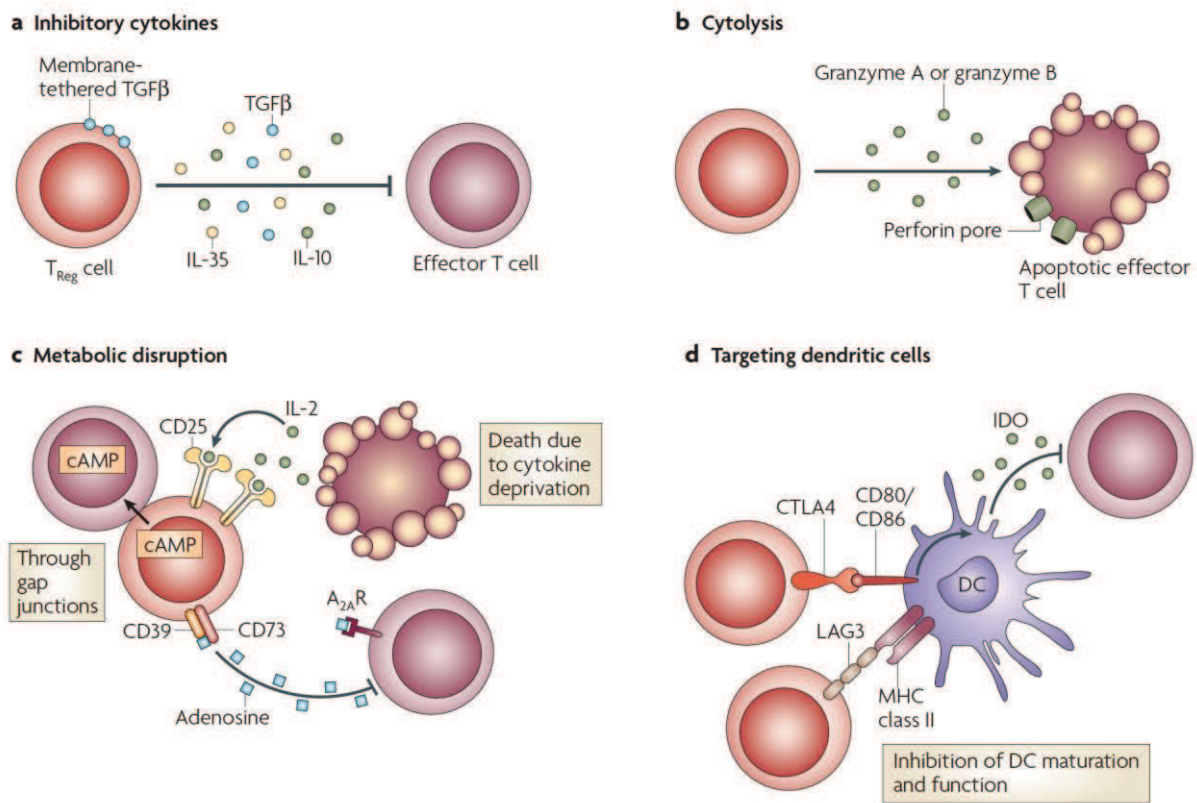


Figure 8 : Principaux mécanismes utilisés par les Treg pour exercer leur effet suppresseur.

(a) Sécrétion de cytokines inhibitrices; (b) Cytolyse; (c) Induction de perturbations métaboliques; (d) Ciblage des DC.

cAMP : adénosine monophosphate cyclique; MHC : complexe majeur d'histocompatibilité; IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase. Source : Vignali *et al.* (Vignali, Collison et al. 2008).

La médiation de l'effet suppresseur des Treg implique en effet une grande variété de mécanismes qui peuvent être schématiquement regroupés en 4 grandes catégories : la sécrétion de cytokines inhibitrices, la cytolysse, l'induction de perturbations métaboliques et enfin le ciblage des DC (**figure 8**).

Sécrétion de cytokines inhibitrices

Trois cytokines inhibitrices ont été associées à la médiation de l'effet suppresseur des Treg : l'IL-10, le TGF β et l'IL-35.

L'importance de l'IL-10 dans la fonction des Treg dépend en grande partie du modèle expérimental utilisé, de la maladie étudiée et de l'organe cible impliqué dans le processus pathologique. En effet, la production d'IL-10 par les Treg est essentielle pour la prévention des maladies inflammatoires de l'intestin dans les modèles murins (Asseman, Mauze et al. 1999), pour l'échappement des tumeurs à la réponse immunitaire anti-tumorale (Bergmann, Strauss et al. 2007, Loser, Apelt et al. 2007), pour la protection contre l'asthme et l'allergie (Hawrylowicz and O'Garra 2005, Joetham, Takeda et al. 2007), pour l'induction d'une tolérance materno-fœtale (Schumacher, Wafula et al. 2007) ou dans certains modèles d'hépatite (Erhardt, Biburger et al. 2007) ou d'encéphalite auto-immune (Mann, Maresz et al. 2007). A l'inverse, un déficit de production en IL-10 par les Treg ne s'associe pas au développement d'une auto-immunité systémique (Rubtsov, Rasmussen et al. 2008) et certaines études in vitro ont montré que l'IL-10 n'était pas essentielle pour la fonction suppressive des Treg (Takahashi, Kuniyasu et al. 1998, Dieckmann, Plottner et al. 2001).

Le rôle du TGF β dans la fonction des Treg a également été sujet à controverse, puisque comme pour l'IL-10, il a été montré dans un premier temps que cette

molécule n'était pas nécessaire pour que les Treg exercent leur effet suppresseur (Takahashi, Kuniyasu et al. 1998, Piccirillo, Letterio et al. 2002). Cependant, d'autres études in vitro et in vivo ont montré le contraire et souligné notamment l'importance du TGF β exprimé à la surface des Treg (Nakamura, Kitani et al. 2001, Green, Gorelik et al. 2003). Le TGF β produit par les Treg a aussi été associé au contrôle de la réponse immunitaire dirigée contre *Mycobacterium tuberculosis* (Kursar, Koch et al. 2007), à la suppression des réponses allergiques (Joetham, Takeda et al. 2007), à la prévention de la colite dans un modèle de maladie inflammatoire de l'intestin (Li, Wan et al. 2007) et à l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale (Hilchey, De et al. 2007, Strauss, Bergmann et al. 2007).

En 2007, une nouvelle cytokine inhibitrice a été découverte : l'IL-35, qui est exprimée de façon constitutive par les Treg, mais pas par les Tconv, y compris lorsque ceux-ci sont activés (Collison, Workman et al. 2007). Cette molécule est constituée de la sous-unité α de l'IL-12 associée à la sous-unité β de l'IL-27. Cette dernière est codée par le gène *EBI3* dont l'expression est régulée par le facteur de transcription Foxp3, d'où sa restriction aux Treg. Les Treg *Ebi3*^{-/-} ou *Il12 α* ^{-/-} ont une réduction significative de leur activité suppressive in vitro et ne sont plus capables in vivo de contrôler la prolifération des T effecteurs (Teff) et de guérir des lésions de colite dans un modèle de maladie inflammatoire de l'intestin. Par ailleurs, l'expression ectopique de l'IL-35 par des LT naïfs suffit à leur conférer une activité régulatrice, tandis que l'utilisation d'IL-35 recombinante permet de supprimer la prolifération des LT in vitro (Collison, Workman et al. 2007).

Suppression par cytolyse

Si l'induction d'une cytolyse via la sécrétion de granzyme est un mécanisme de cytotoxicité bien connu pour les cellules NK et les LT cytotoxiques CD8⁺, il n'est pas

restreint à ces deux types cellulaires chez l'homme et certains LT CD4⁺ peuvent également être dotés d'une telle activité cytotoxique. C'est notamment le cas des Treg naturels activés, qui sont capables de produire de la granzyme et de la perforine pour induire la mort cellulaire d'une cellule cible (Grossman, Verbsky et al. 2004).

Chez la souris, à l'inverse de l'homme, les T CD4⁺ ne sont pas cytolytiques. Pourtant, il a été montré que les Treg murins exprimaient la granzyme B (McHugh, Whitters et al. 2002, Herman, Freeman et al. 2004) et surtout que les Treg issus de souris déficientes pour la granzyme B avaient une diminution de leur capacité suppressive in vitro (Gondek, Lu et al. 2005). Ce mécanisme de suppression granzyme B-dépendant se caractérise par l'induction d'une apoptose des T CD4⁺ CD25⁻, indépendamment de la production de perforine.

Par ailleurs, cette mort cellulaire induite par les Treg via la sécrétion de granzyme B ne se limite pas aux LT, puisque d'autres cellules peuvent être ciblées, comme par exemple les LB, selon un mécanisme cette fois-ci partiellement dépendant de la perforine (Zhao, Thornton et al. 2006). Dans le microenvironnement tumoral, 5 à 30% des Treg expriment la granzyme B et peuvent tuer les cellules NK et les T CD8⁺ cytotoxiques anti-tumoraux selon le même mécanisme (Cao, Cai et al. 2007). Les Treg peuvent aussi cibler les DC, via la production de perforine (Boissonnas, Scholer-Dahirel et al. 2010).

Enfin, l'effet cytolytique des Treg peut passer par des molécules autres que celles impliquées dans le système perforine/granzyme. En effet, les Treg peuvent aussi induire l'apoptose des Tconv via la voie TRAIL-DR5 (Ren, Ye et al. 2007). Une autre étude a montré l'importance de la galectine-1, qui est surexprimée par les Treg murins et humains et dont le déficit entraîne une diminution de leur capacité suppressive (Garin, Chu et al. 2007). Une voie plus classique d'induction d'apoptose,

à savoir la voie Fas/Fas-ligand, a été impliquée plus récemment dans la suppression des T CD8⁺ (mais pas CD4⁺) par les Treg (Strauss, Bergmann et al. 2009).

Induction de perturbations métaboliques

Cette catégorie regroupe des mécanismes de suppression variés ayant tous comme caractéristique commune d'aboutir à l'apoptose des Tconv suite au déclenchement de perturbations des voies métaboliques nécessaires à leur survie.

Le premier de ces mécanismes consiste en une consommation de l'IL-2 rendue possible par l'expression forte et constitutive du CD25 par les Treg, ce qui entraîne, pour les Tconv situés à proximité de ces Treg, une privation en IL-2 et donc une mort par apoptose (Pandiyani, Zheng et al. 2007). Il est toutefois important de préciser que ce concept reste sujet à controverse, puisque plusieurs études ne soutiennent pas cette théorie (Duthoit, Mekala et al. 2005, Fontenot, Rasmussen et al. 2005, Oberle, Eberhardt et al. 2007). En dehors de ce simple mécanisme de consommation, l'appauvrissement en IL-2 à proximité immédiate des Tconv est probablement aussi facilité par le fait que les Treg sont capables d'inhiber la production d'IL-2 par ces mêmes Tconv et donc de freiner leur activation autocrine et paracrine (Thornton and Shevach 1998).

Un autre mécanisme suppresseur passant par des perturbations métaboliques réside dans la capacité des Treg à produire de l'adénosine. Cela est rendu possible par l'expression simultanée des récepteurs CD39 et CD73 à la surface des Treg, qui permettent la transformation d'ATP en AMP puis en adénosine (Kobie, Shah et al. 2006, Borsellino, Kleinewietfeld et al. 2007, Deaglio, Dwyer et al. 2007). L'adénosine extracellulaire peut alors se fixer sur le récepteur A_{2A}R sur les Tconv ce qui a pour effet d'induire une inhibition de leur fonction et notamment de leur production de

cytokines pro-inflammatoires (Romio, Reinbeck et al. 2011), mais aussi de favoriser la génération de Treg induits (iTreg) via l'inhibition de la synthèse d'IL-6 et la sécrétion de TGF β (Zarek, Huang et al. 2008). Il existe également un mécanisme indirect de suppression des Tconv par l'adénosine, puisque cette dernière peut aussi se fixer sur un récepteur à la surface des CPA et notamment des DC, ce qui entraîne un blocage de leur maturation et l'induction d'un phénotype tolérogène avec une diminution franche de la production d'IL-12 et de TNF α (Hasko, Szabo et al. 1996, Hasko, Kuhel et al. 2000, Wilson, Ross et al. 2009).

Les Treg sont enfin capables de transférer directement aux Teff de l'AMPc, second messenger puissamment inhibiteur de la prolifération et de la synthèse d'IL-2 par ces LT, à travers des jonctions lacunaires membranaires (« gap junctions ») (Bopp, Becker et al. 2007).

Ciblage des cellules dendritiques

Les Treg peuvent exercer un effet suppresseur indirect sur les Tconv, via leur interaction avec les DC dont ils peuvent moduler la maturation et la fonction, ce qui aura un retentissement sur l'activation des Tconv par ces mêmes DC. Nous avons déjà vu plus haut que les Treg pouvaient cibler ces DC via la synthèse d'adénosine ou en induisant leur mort cellulaire par la perforine. Cependant, l'effet des Treg sur les DC s'exerce principalement via l'interaction de molécules membranaires, avec 2 axes principaux : l'axe CTLA-4/CD80 ou CD86 et l'axe LAG-3/ CMH de classe II.

Comme déjà mentionné plus haut, la molécule CTLA-4 est exprimée de façon constitutive par les Treg et est nécessaire à la médiation d'une activité suppressive maximale par ces Treg in vivo (Read, Malmstrom et al. 2000). En cas de blocage du CTLA-4 par un mAb ou d'utilisation de Treg déficients pour le CTLA-4, on observe

une perte de la suppression exercée par ces Treg sur les Tconv via les DC (Serra, Amrani et al. 2003, Oderup, Cederbom et al. 2006). Par ailleurs, l'interaction CTLA-4/CD80 ou CD86 régule positivement la synthèse d'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les DC. Or, l'IDO est une molécule puissamment inhibitrice des Tconv, qui est capable de produire des métabolites pro-apoptotiques à partir du catabolisme du tryptophane (Fallarino, Grohmann et al. 2003, Mellor and Munn 2004). Il a également été décrit que les Treg pouvaient induire une répression de l'expression des molécules de costimulation (CD80 et CD86) à la surface des DC (Cederbom, Hall et al. 2000). Le mécanisme de cet effet a été élucidé en 2011 : par un processus de trans-endocytose, la molécule CTLA-4 exprimée à la surface des Treg est capable de capturer les molécules CD80 et CD86 et d'induire leur dégradation (Qureshi, Zheng et al. 2011).

LAG-3 (pour « lymphocyte activation gene 3 », également appelé CD223) est un homologue de la molécule CD4 doté d'une capacité de liaison de très haute affinité aux molécules du CMH de classe II. Comme CTLA-4, LAG-3 est nécessaire à l'effet suppresseur maximal des Treg (Huang, Workman et al. 2004). En se fixant aux molécules CMH de classe II exprimées par les DC immatures, elle empêche leur maturation et diminue leurs propriétés immunostimulatrices (Liang, Workman et al. 2008).

Il convient également de mentionner la neuropiline 1 (Nrp-1) qui, si elle ne module pas directement la maturation ou les capacités de costimulation des DC, permet d'augmenter la durée de la synapse immunologique entre les Treg et les DC immatures (Sarris, Andersen et al. 2008). Or, Nrp-1 est exprimée par la grande majorité des Treg mais pas par les T helper naïfs. Cela confère donc un avantage sélectif à ces Treg, qui vont pouvoir interagir de façon plus prolongée avec les DC immatures en l'absence de stimuli pro-inflammatoires et de signaux de danger.

Enfin, il est important de noter que si la plupart des études se sont focalisées sur l'action des Treg sur les DC, il a aussi été prouvé que les Treg humains étaient capables d'interagir avec la fonction d'autres CPA, notamment les monocytes/macrophages (Taams, van Amelsfort et al. 2005, Tiemessen, Jagger et al. 2007).

Mécanismes suppresseurs récemment élucidés

Deux nouveaux mécanismes par lesquels les Treg peuvent exercer leur effet suppresseur ont été plus récemment mis en évidence. Nous les évoquerons brièvement ici, puisqu'ils sont davantage détaillés dans d'autres sections de cette introduction. Tout d'abord, par l'expression membranaire de PD-1, les Treg sont capables d'induire la mort cellulaire, principalement des LT CD8⁺ exprimant PD-L1 (Park, Park et al. 2015). Par ailleurs, ils peuvent aussi libérer le récepteur au TNF α de type 2 (TNFR2) exprimé à leur surface et ainsi bloquer l'action pro-inflammatoire du TNF α soluble et notamment l'induction d'autres médiateurs de l'inflammation (van Mierlo, Scherer et al. 2008).

Treg naturels et Treg induits

Les Treg Foxp3⁺ peuvent être divisés en 2 grandes catégories, selon leur origine : les Treg naturels (nTreg), développés dans le thymus à partir de cellules T possédant un TCR de haute affinité pour les complexes CMH/peptide du soi, et les Treg adaptatifs ou induits (iTreg), générés en périphérie après stimulation antigénique in vivo (Lan, Fan et al. 2012).

Il existe par ailleurs 2 autres catégories de cellules suppressives induites proches des iTreg et que nous ne traiterons pas dans la suite de ce travail, à savoir les cellules Tr1, qui sont CD4⁺ et produisent de l'IL-10, et les cellules Th3, qui produisent du TGFβ (Okamura, Fujio et al. 2012). Les Tr1 et Th3 ont bien une fonction suppressive, mais elles sont en revanche Foxp3⁻.

Sélection thymique des nTreg

Comme évoqué ci-dessus, les nTreg sont sélectionnés et développés dans le thymus. A la différence de Tconv naïfs, les Treg naïfs sortant du thymus sont fonctionnellement matures (c'est-à-dire capables de prévenir l'auto-immunité et d'exercer in vitro leur effet supprimeur) et ont été préalablement stimulés par leur antigène cognitif, avant d'éventuellement le rencontrer à nouveau en périphérie (Sakaguchi, Takahashi et al. 1982, Itoh, Takahashi et al. 1999). Les thymocytes Foxp3⁺ et leurs précurseurs Foxp3⁻ sont soumis à la sélection positive puis à la sélection négative dans le thymus via leur interaction avec les complexes CMH/peptide du soi exprimés par les cellules stromales thymiques (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Il a ainsi été montré que les Treg possèdent des TCR avec une affinité plus forte pour les complexes CMH/peptide exprimés au niveau du thymus par rapport aux autres cellules T (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008), suggérant que les LT les plus auto-réactifs sont dirigés au cours de la sélection thymique vers la lignée Treg (**figure 9**). La protéine Aire, contrôlant l'expression par une partie des cellules épithéliales de la médullaire thymique d'antigènes spécifiques des tissus, comme l'insuline par exemple, joue un rôle fondamental dans le développement et la sélection des Treg spécifiques de ces antigènes, et le déficit en cette protéine Aire s'accompagne de manifestations d'auto-immunité (Aschenbrenner, D'Cruz et al. 2007).

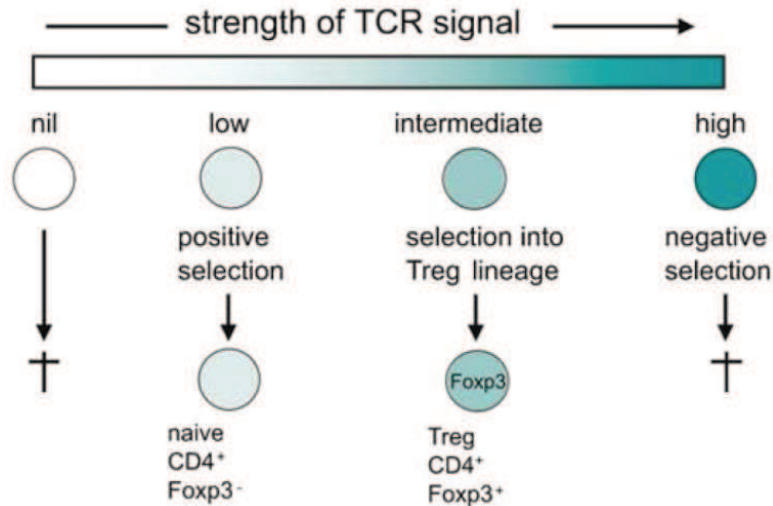


Figure 9 : Destinée des précurseurs thymiques en fonction de l'intensité du signal TCR déclenché lors de leur interaction avec les complexes CMH/peptide du soi.

L'absence d'avidité pour les antigènes du soi conduit à une mort cellulaire par négligence au stade de sélection positive. A l'opposé, une avidité trop importante induit également la mort cellulaire au stade de la sélection négative. Les thymocytes dirigés vers la lignée Treg ont une avidité intermédiaire entre celle, faible, permettant la sélection positive puis la différenciation en Tconv et celle, trop forte, conduisant à la délétion au cours de la sélection négative.

Adapté de Fazekas *et al.* (Fazekas de St Groth 2007).

L'intensité de l'interaction entre les molécules de costimulation et leurs ligands semble également jouer un rôle dans la sélection des nTreg, puisque les déficits en CD28, CD40, CD11a/CD18 (LFA1) ou CD80/CD86 conduisent tous à une diminution du nombre de Treg CD4⁺ CD25⁺ aussi bien dans le thymus qu'en périphérie (Sakaguchi 2005). Par ailleurs, comme montré dans la **figure 10**, si l'avidité de l'interaction entre les thymocytes et les cellules stromales semble déterminante pour leur différenciation en Treg, il apparaît en revanche que l'expression de Foxp3 n'est pas requise au stade initial de détermination de la lignée Treg dans le thymus, mais apparaît juste après celui-ci (Gavin, Rasmussen *et al.* 2007, Lin, Haribhai *et al.* 2007).

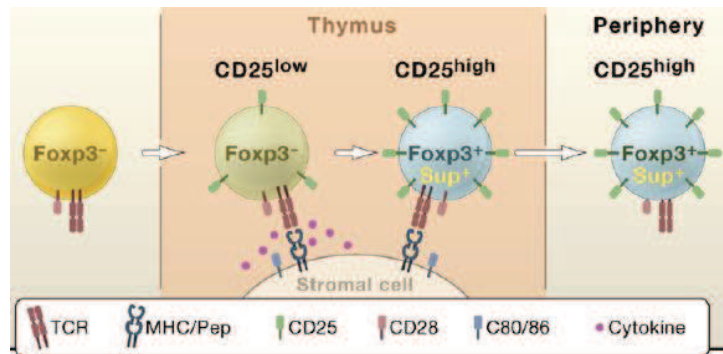


Figure 10 : Développement thymique des nTreg.

Les thymocytes Foxp3⁻ à un stade CD4⁺ CD8⁺ tardif ou CD4⁺ CD8⁻ précoce enclenchent le programme de différenciation en Treg quand ils reçoivent des signaux provenant de l'interaction entre leurs TCR et les complexes CMH/peptide du soi exprimés par les cellules stromales thymique, mais aussi entre leurs molécules accessoires (par exemple CD28) et leurs ligands (CD80/86) et/ou via des cytokines produites par les cellules stromales. L'expression de Foxp3, acquise suite à cette détermination de lignée, confère une activité suppressive (Sup⁺) et stabilise la fonction et le phénotype des Treg (notamment l'expression de CD25).

MHC/Pep : complexe CMH/peptide du soi. Source : Sakaguchi *et al.* (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008).

Induction de Treg en périphérie

Si la génération de nTreg semble répondre à un besoin de contrôler l'auto-immunité, la production d'iTreg pourrait résulter d'une stimulation à partir d'antigènes étrangers, provenant par exemple de la flore intestinale ou d'allergènes alimentaires ou de l'environnement (Curotto de Lafaille and Lafaille 2009).

In vitro, les iTreg peuvent être induits à partir de cellules CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ en présence d'IL-2 et de TGFβ (Horwitz, Zheng et al. 2008, Zhou, Wang et al. 2010, Zheng 2012) (**figure 11**). L'acide rétinoïque facilite également la différenciation des LT naïfs en Treg en présence de TGFβ, tout en inhibant l'induction de Th17 par l'IL-6 (Benson, Pino-Lagos et al. 2007, Coombes, Siddiqui et al. 2007, Mucida, Park et al. 2007, Sun, Hall et al. 2007).

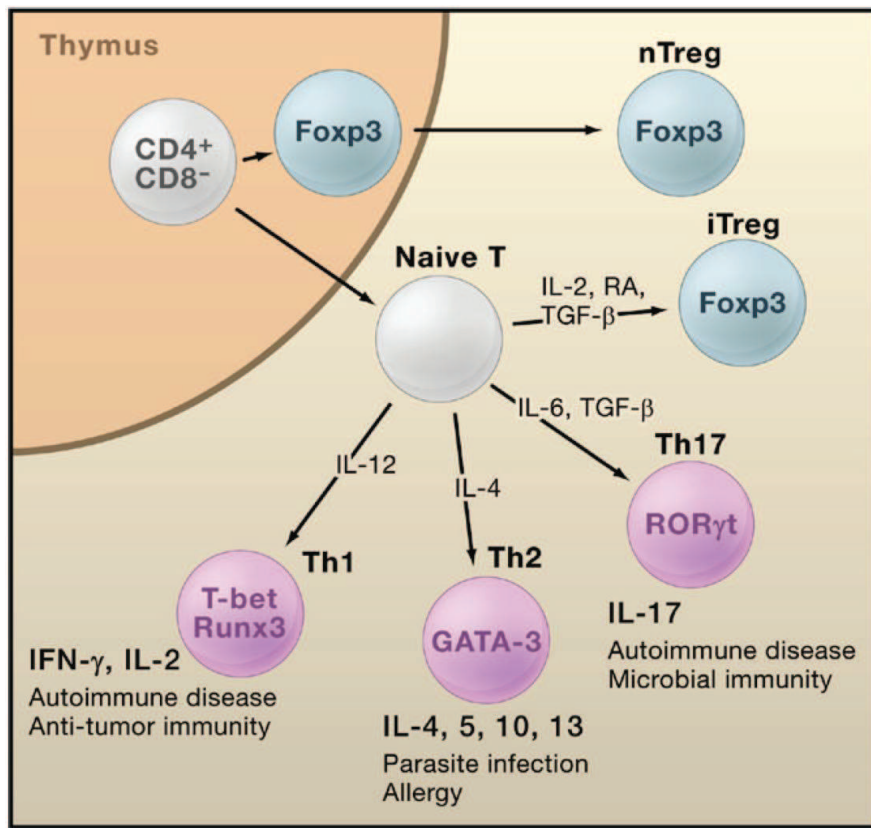


Figure 11 : Différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en différents sous-types de LT effecteurs ou en iTreg.

En fonction de l'environnement cytokinique dans lequel ils se trouvent, les LT CD4⁺ naïfs pourront se différencier soit en Th1, soit en Th2, soit en Th17, soit en iTreg. A l'inverse, les nTreg sont générés directement au niveau du thymus, organe dans lequel ils acquièrent l'expression de Foxp3. Les facteurs de transcription clés de chaque sous-type de différenciation des LT sont figurés à l'intérieur des cellules correspondantes. Sont également représentées les principales cytokines produites par chacun de ces sous-types cellulaires ainsi que les grands domaines physiologiques ou pathologiques dans lesquels ils sont impliqués.

RA : acide rétinoïque. Source : Sakaguchi *et al.* (Sakaguchi, Yamaguchi *et al.* 2008).

Différences fonctionnelles entre nTreg et iTreg

D'un point de vue fonctionnel, il existe des différences entre les nTreg et les iTreg, puisque par exemple, les nTreg inhibent les réponses B en tuant directement les LB,

alors que les iTreg exercent un effet suppresseur sur les LB sans les détruire (Lin, Chen et al. 2013).

Les nTreg sont par ailleurs dotés d'une certaine plasticité, puisque dans des conditions inflammatoires, notamment en présence d'IL-6, ils peuvent acquérir phénotype Th17 (Zheng, Wang et al. 2008, Lu, Wang et al. 2010, Kong, Lan et al. 2012). A l'inverse, les iTreg, bien qu'ils soient capables d'exprimer comme les nTreg des molécules associées au phénotype Th1 comme T-bet, CXCR3 et l'IFN γ en présence d'IL-22, ne montrent pas la même plasticité et sont plus stables dans des conditions inflammatoires, à la fois in vitro et in vivo (Koch, Tucker-Heard et al. 2009, McClymont, Putnam et al. 2011, Kong, Lan et al. 2012).

En revanche, le phénotype des nTreg, illustré par le niveau d'expression de Foxp3 et leur activité suppressive, est plus stable que celui des iTreg en cas de restimulation antigénique in vitro en l'absence de TGF β (Floess, Freyer et al. 2007). Or, la stabilité de l'expression de Foxp3 est conditionnée par les modifications épigénétiques survenant au niveau d'une région du promoteur de *FOXP3* riche en CpG, appelée TSDR (Treg-specific demethylated region) (Polansky, Schreiber et al. 2010). Ces modifications épigénétiques peuvent être utilisées pour différencier les nTreg des iTreg, puisque ces derniers sont majoritairement méthylés au niveau de TSDR, ce qui leur confère l'instabilité de leur phénotype, alors que les nTreg ont une région TSDR déméthylée (Floess, Freyer et al. 2007, Lal and Bromberg 2009, Lal, Zhang et al. 2009, McClymont, Putnam et al. 2011).

Helios et Nrp-1 : des marqueurs spécifiques des nTreg ?

Une façon plus simple de distinguer les nTreg des iTreg consiste à étudier les différences d'expression de marqueurs cellulaires entre ces 2 populations, qu'il

s'agisse de marqueurs membranaires ou intracellulaires. Ainsi, si les 2 populations expriment les marqueurs clés de la lignée Treg, comme CD25, Foxp3, GITR ou CTLA-4, les nTreg expriment plus fortement PD-1, Nrp-1, Helios (Ikzf2) et CD73 (Yadav, Louvet et al. 2012, Lin, Chen et al. 2013). Cependant, parmi ces marqueurs différemment exprimés, seuls Helios et Nrp-1 pourraient être spécifiques des nTreg.

Helios a en effet été reconnu en 2006 comme le premier marqueur spécifique des nTreg (Sugimoto, Oida et al. 2006). Ce facteur de transcription est exprimé par 100% des nTreg thymiques, tandis que les iTreg induits par le TGF β n'expriment pas Helios, ni in vitro ni in vivo (Lin, Chen et al. 2013). Ces données ont été confirmées par l'épigénétique, puisque les Treg Foxp3⁺ Helios⁺ ont une région TSDR totalement déméthylée alors que dans les Treg Foxp3⁺ Helios⁻, cette région est méthylée à hauteur de 45% (Kim, Bhairavabhotla et al. 2012). Cependant, des résultats plus récents ont clairement remis en cause ce statut de marqueur spécifique des nTreg attribué à Helios. En effet, l'équipe d'Akimova a montré que l'expression d'Helios pouvait être induite au cours de l'activation et la prolifération des LT et régressait dans des conditions de repos, à la fois en ce qui concerne les Treg humain et murins mais aussi les Tconv CD4⁺ et CD8⁺ (Akimova, Beier et al. 2011). Une autre équipe a également démontré qu'Helios pouvait être exprimé par les iTreg Foxp3⁺, à la fois in vitro et in vivo (Gottschalk, Corse et al. 2012). Enfin, l'équipe de Zabransky a rapporté que la stimulation de LT CD4⁺ naïfs in vitro par des microbilles anti-CD3/CD28 en présence d'IL-2 et de TGF β permettait d'obtenir au bout de 48 heures environ 30% de cellules Foxp3⁺ Helios⁺ (versus moins de 1% avant stimulation) (Zabransky, Nirschl et al. 2012). Ces iTreg Helios⁺ expriment plus fortement GITR et CD103 et sont dotés d'une fonction suppressive plus forte que les Treg conventionnels.

Nrp-1 est un récepteur pour des membres de la famille du VEGF (vascular endothelial growth factor) qui promeut l'angiogenèse et agit également comme un récepteur pour la famille de la sémaphorine (Rossignol, Pouyssegur et al. 2003). La

description initiale de Nrp-1 comme marqueur des Treg remonte à 2004 (Bruder, Probst-Kepper et al. 2004). Le niveau d'expression de Nrp-1 est élevé dans les Treg CD4⁺ CD25⁺ et corrélé à celui de Foxp3. Si Nrp-1 joue un rôle dans la fonction suppressive des Treg (voir plus haut), elle ne semble pas impliquée dans leur différenciation ni leur maturation (Corbel, Lemarchandel et al. 2007). Il a été montré que les Treg Nrp-1⁺ avaient des capacités suppressives supérieures aux Treg Nrp-1⁻ (Battaglia, Buzzonetti et al. 2008). Il est également apparu que Nrp-1 était un récepteur de haute affinité pour le TGFβ, dont la fixation promeut l'activité des Treg via une signalisation par la voie SMAD2/3 (Glinka and Prud'homme 2008, Glinka, Stoilova et al. 2011). Enfin, plus récemment, 2 papiers ont identifié Nrp-1 comme un marqueur permettant de distinguer les nTreg des iTreg, même si, comme pour Helios, il n'est pas totalement spécifique des nTreg puisqu'un faible niveau d'expression de Nrp-1 peut être détecté au sein d'une population d'iTreg (Weiss, Bilate et al. 2012, Yadav, Louvet et al. 2012).

L'interleukine 2 (IL-2) : une cytokine essentielle pour les Treg

La découverte des Treg ayant coïncidé avec la description de leur expression forte et constitutive du CD25, à savoir la chaîne α du récepteur à l'IL-2, un rôle de cette cytokine dans leur fonction a très vite été envisagé.

Rôle de l'IL-2 dans l'homéostasie du système immunitaire

L'IL-2 est une cytokine produite essentiellement par les Tconv activés, dont on a longtemps cru, du fait de ses effets sur la prolifération des LT in vitro, qu'elle était la cytokine majeure nécessaire à la prolifération et la différenciation de ces LT

(Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Pourtant, les souris déficientes pour l'IL-2 ne présentent pas d'altération sévère du développement et de la fonction des LT (Schorle, Holtschke et al. 1991, Malek and Bayer 2004). A l'inverse des Tconv, les Treg ne produisent pas d'IL-2, du fait, comme nous l'avons vu plus haut, d'une répression de la transcription de son gène par Foxp3 (Wu, Borde et al. 2006, Ono, Yaguchi et al. 2007), ce qui rend ces Treg hautement dépendants de l'IL-2 exogène. Ainsi, l'IL-2 joue un rôle majeur dans l'homéostasie du système immunitaire, comme schématisé dans la **figure 12**, puisqu'elle est au cœur d'une boucle de rétrocontrôle entre les Tconv et les Treg, qui fait également intervenir les CPA.

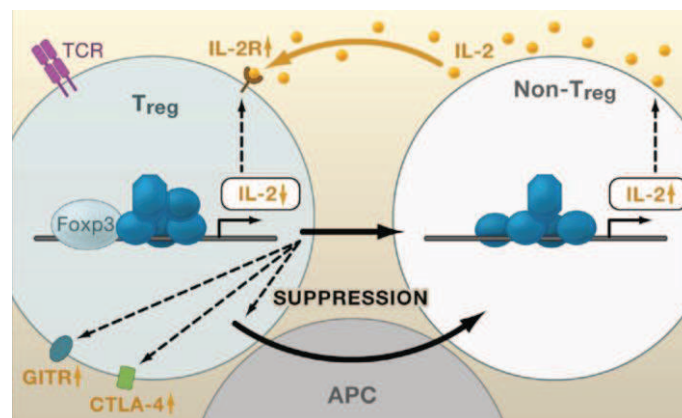


Figure 12 : Rôle de l'IL-2 dans l'homéostasie du système immunitaire.

Foxp3, en association avec d'autres facteurs de transcription et des co-activateurs ou co-répresseurs, réprime la transcription du gène de l'IL-2 dans les Treg, rendant ces cellules hautement dépendantes de l'IL-2 exogène (produite principalement par les LT activés non Treg) pour leur maintenance et leur fonction. Foxp3 active aussi l'expression de gènes codant des molécules associées au phénotype Treg, telles CD25, CTLA-4 et GITR, et confère une activité suppressive aux Treg, qui vont alors pouvoir inhiber directement la prolifération et l'activation des LT non Treg ou moduler la fonction des CPA activant ces mêmes LT non Treg.

APC : cellule présentatrice d'antigène; IL-2R : récepteur à l'IL-2 (CD25). Source : Sakaguchi *et al.* (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008).

Signalisation par le récepteur de l'IL-2

La médiation des effets de l'IL-2 sur les LT passe par sa fixation à son récepteur, constitué de 3 sous-unités : la chaîne α (ou CD25), la chaîne β (ou CD122), commune aux récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15, et la chaîne γ_c (ou CD132), commune aux récepteurs de l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21 (Malek and Bayer 2004). La fixation de l'IL-2 sur la chaîne α entraîne son association aux 2 autres sous-unités et donc la formation d'un hétérotrimère (**figure 13**). L'initiation de la transduction du signal est assurée par l'activité tyrosine kinase des molécules JAK1 et JAK3, associées respectivement à la chaîne β et à la chaîne γ_c , qui vont phosphoryler des résidus tyrosine au niveau des parties intracytoplasmiques des chaînes β et γ_c , mais aussi se phosphoryler entre elles. Le signal est ensuite transmis par l'adaptateur SHC, qui se fixe à l'extrémité de la chaîne β et active les voies des MAPK et de PI3K/AKT. Une autre voie passe par la phosphorylation de la molécule STAT5 (ou STAT3), entraînant sa dimérisation et sa translocation dans le noyau, où elle va pouvoir réguler l'expression de gènes cibles. L'ensemble de ces signaux aboutit à la prolifération et la survie cellulaires, ainsi qu'à la différenciation en cellules effectrices.

Rôle de l'IL-2 dans le développement, la fonction et la survie des Treg

Le rôle majeur de l'IL-2 dans le développement des Treg a été démontré dans plusieurs travaux et notamment dans les modèles de souris déficientes pour l'IL-2 évoqués plus haut, qui ont montré que ces souris développaient non seulement des manifestations auto-immunes et inflammatoires sévères de façon spontanée, mais avaient aussi une réduction franche du nombre de cellules CD4⁺ CD25⁺, bien que leur nombre global de LT soit normal, de même que les sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ (Schorle, Holschke et al. 1991, Suri-Payer, Amar et al. 1998).

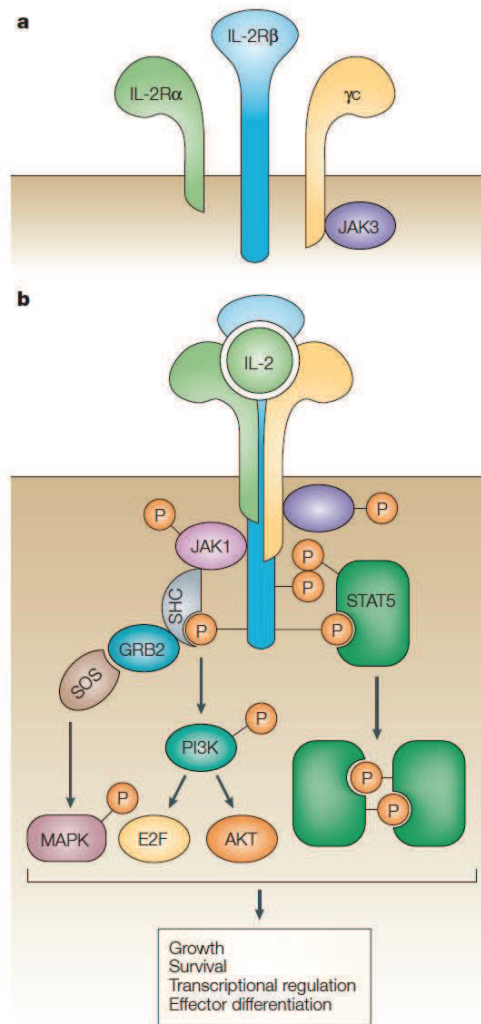


Figure 13 : Signalisation par le récepteur de l'IL-2.

(a) En l'absence d'IL-2, les 3 sous-unités du récepteur à l'IL-2 (les chaînes α , β et γ) ne sont pas pré-assemblées à la surface des LT les exprimant. (b) En présence d'IL-2, il y a formation d'un hétérotrimère conduisant à l'initiation de la transduction du signal grâce à l'activité tyrosine kinase des molécules JAK-1 et JAK-3. Les principales molécules impliquées dans les 3 grandes voies de signalisation ensuite activées (voie des MAP kinases, voie PI3K/AKT et voie STAT5), ainsi que leur état phosphorylé (P) ou non sont représentés.

IL-2R α : chaîne α du récepteur à l'IL-2; IL-2R β : chaîne β du récepteur à l'IL-2; γ c : chaîne γ commune. Source : Malek *et al.* (Malek and Bayer 2004).

A l'inverse, dans des modèles murins de moelle chimérique produisant conjointement des cellules déficientes ou non pour l'IL-2, on n'observe ni auto-

immunité ni inflammation et les Treg sont générés normalement (Almeida, Legrand et al. 2002). Par ailleurs, les souris déficientes pour la chaîne β du récepteur à l'IL-2 (CD122) sont atteintes des mêmes manifestations auto-immunes et inflammatoires que les souris déficientes en CD25 et ces manifestations peuvent être prévenues par l'injection de cellules CD4⁺ CD25⁺ (Willerford, Chen et al. 1995, Suzuki, Zhou et al. 1999, Malek, Yu et al. 2002). Le développement des Treg est également inhibé dans les souris porteuses de LT déficients en STAT5a et STAT5b, molécules impliquées dans la signalisation en aval de la chaîne β du récepteur à l'IL-2, comme mentionné plus haut (Burchill, Yang et al. 2007, Yao, Kanno et al. 2007). Chez l'homme, le déficit en CD25, qui s'accompagne de manifestations auto-immunes et allergiques sévères, n'est pas différenciable du syndrome IPEX et serait causé par une dysfonction ou un déficit en Treg (Caudy, Reddy et al. 2007).

Une preuve du rôle clé joué par l'IL-2 non pas seulement pour le développement mais aussi pour la survie des Treg a été apportée par la démonstration que la neutralisation de l'IL-2 circulante par un mAb anti-IL-2 administré à des souris immunocompétentes entraînait une baisse sélective des Treg chez ces souris, ce qui s'accompagnait de manifestations auto-immunes (Setoguchi, Hori et al. 2005). Il a aussi été prouvé que l'IL-2 était requise pour le maintien de l'expression de Foxp3 et de CD25 par les nTreg et entraînait une augmentation de leurs capacités suppressives, au moins in vitro (Fontenot, Rasmussen et al. 2005, Shevach, DiPaolo et al. 2006).

Enfin, in vitro comme in vivo, l'IL-2 entraîne une expansion de la lignée T régulatrice (Takahashi, Kuniyasu et al. 1998, Thornton, Piccirillo et al. 2004, Zorn, Nelson et al. 2006) et nous avons également vu plus haut qu'elle permettait la génération d'iTreg, conjointement avec le TGF β . L'ensemble de ces données démontre donc que l'IL-2 est un facteur clé pour le développement, la fonction et la survie des Treg.

Délinéation fonctionnelle et dynamique de différenciation des Treg humains

Treg au repos (rTreg) et Treg activés (aTreg)

Chez l'homme, les cellules $CD4^+ Foxp3^+$ peuvent aussi être divisées en 3 sous-populations en fonction de l'expression du marqueur CD45RA, associée à un phénotype naïf, et de l'intensité d'expression de Foxp3 (Miyara, Yoshioka et al. 2009). Les 3 sous-populations ainsi identifiées correspondent aux Treg au repos $CD45RA^+ Foxp3^{faible}$ (rTreg), aux Treg activés $CD45RA^- Foxp3^{fort}$ (aTreg) et aux cellules $CD45RA^- Foxp3^{faible}$ non Treg (**figure 14**). Si ces 3 sous-populations diffèrent donc de par leur phénotype, cette classification a surtout l'intérêt d'identifier des sous-populations distinctes sur le plan fonctionnel. En effet, si les rTreg et les aTreg sont dotés de capacités suppressives in vitro, ce n'est pas le cas des cellules $CD45RA^- Foxp3^{faible}$. En revanche, ces dernières produisent de grandes quantités d'IL-2 et/ou d'IFN γ et contiennent les cellules $Foxp3^+ ROR-\gamma t^+$ à potentiel de différenciation Th17.

Les rTreg prolifèrent après stimulation du TCR in vitro et ne sont donc pas anergiques. De plus, cette stimulation entraîne une augmentation de leur expression de Foxp3 et permet ainsi leur conversion en aTreg. Cette conversion des rTreg en aTreg a également été observée in vivo. D'ailleurs, la plupart des aTreg détectés in vivo proviennent de la conversion de rTreg suivant leur activation et leur prolifération plutôt que de cellules $CD4^+ Foxp3^-$. Les rTreg sont capables d'exercer leur effet suppresseur à la fois durant et après leur prolifération et leur conversion en aTreg. A l'inverse, les aTreg, qui correspondent à un stade terminal de différenciation, meurent après prolifération et après avoir exercé leur effet suppresseur. Les aTreg peuvent aussi supprimer la prolifération des rTreg selon un mécanisme de rétrocontrôle négatif. Quant aux cellules $CD45RA^- Foxp3^{faible}$, elles perdent leur expression de Foxp3 lorsqu'elles prolifèrent.

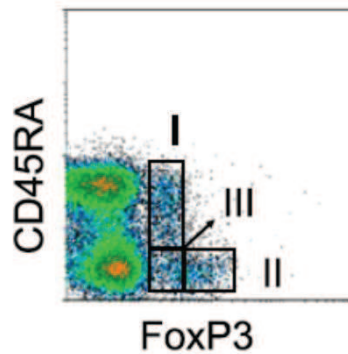


Figure 14 : Délimitation fonctionnelle des Treg en fonction de l'expression des marqueurs Foxp3 et CD45RA.

L'étude de l'expression des marqueurs Foxp3 et CD45RA sur les lymphocytes T CD4⁺ permet d'identifier 3 sous-populations cellulaires exprimant Foxp3. (I) Treg au repos CD45RA⁺ Foxp3^{faible}; (II) Treg activés CD45RA⁻ Foxp3^{fort}; (III) Cellules CD45RA⁻ Foxp3^{faible} non Treg.

Source : Miyara *et al.* (Miyara, Yoshioka et al. 2009).

La population des aTreg est caractérisée par l'expression de marqueurs associés aux cellules T CD4⁺ récemment activées, comme GITR, le récepteur Fas (CD95), CTLA-4 et bien sûr CD25 (Sakaguchi, Miyara et al. 2010). Le caractère hypo-répondeur des aTreg *in vitro*, initialement attribué à de l'anergie, semble en réalité davantage lié à une susceptibilité accrue à l'apoptose après activation et durant l'exercice de leur effet suppresseur (Fritzsching, Oberle et al. 2005, Ashley and Baecher-Allan 2009, Miyara, Yoshioka et al. 2009). De fait, les aTreg prolifèrent fortement *in vitro* et *in vivo*, comme démontré par des tests d'incorporation de glucose marqué au tritium, l'expression du marqueur de prolifération Ki67 et l'expansion clonale de Treg exprimant un TCR donné (Vukmanovic-Stejic, Zhang et al. 2006, Miyara, Yoshioka et al. 2009). Par ailleurs, pour exercer leur effet suppresseur *in vitro*, les aTreg doivent être restimulés par leur TCR (Baecher-Allan, Brown et al. 2001, Dieckmann, Plottner et al. 2001, Jonuleit, Schmitt et al. 2001, Levings, Sangregorio et al. 2001, Taams, Vukmanovic-Stejic et al. 2002). Bien que les aTreg expriment le marqueur CD45RO (dont l'expression est mutuellement exclusive de celle de CD45RA), classiquement associé au phénotype mémoire des

Tconv, aucune preuve n'a à ce jour été faite de l'existence de réponses mémoires des Treg, rendant le terme de « Treg mémoires » inapproprié (Sakaguchi, Miyara et al. 2010).

La proportion des différentes sous-populations de Treg varie en fonction de l'âge et du contexte physiologique ou pathologique (Miyara, Yoshioka et al. 2009) . Si les rTreg sont très majoritaires dans le sang de cordon, les aTreg sont facilement détectables chez l'adulte et leur proportion augmente avec l'âge. Chez les patients atteints de sarcoïdose, une granulomatose d'origine inconnue, la proportion des aTreg est considérablement augmentée et celle des rTreg diminuée. A l'inverse, dans le contexte d'une maladie auto-immune comme le lupus, ce sont les aTreg qui sont diminués et les rTreg augmentés. Il est également intéressant de noter que chez ces patients lupiques, la proportion des cellules non Treg CD45RA⁻ Foxp3^{faible} est aussi franchement augmentée.

Intérêt du marqueur HLA-DR

Les aTreg, également dénommés Treg effecteurs, peuvent à leur tour être divisés en 2 sous-populations en fonction de l'expression de HLA-DR (Sakaguchi, Miyara et al. 2010). Ce marqueur est exprimé par environ un tiers des Treg effecteurs présents dans le sang de sujets adultes (Baecher-Allan, Brown et al. 2001) et permet d'identifier une sous-population de aTreg au stade le plus terminal de leur différenciation en cellules effectrices. Les Treg HLA-DR⁺ sécrètent plus rapidement des cytokines et ont une activité suppressive plus puissante que ceux n'exprimant pas HLA-DR et correspondent in vitro à la différenciation de ces Treg HLA-DR⁻ après activation et expansion (Baecher-Allan, Wolf et al. 2006, Putnam, Brusko et al. 2009). L'évolution des Treg et des Tconv vers différents stades de différenciation et d'activation à partir de leur sortie du thymus, ainsi que l'expression des principaux

marqueurs caractérisant chacun de ces stades, sont schématisées dans la **figure 15**.

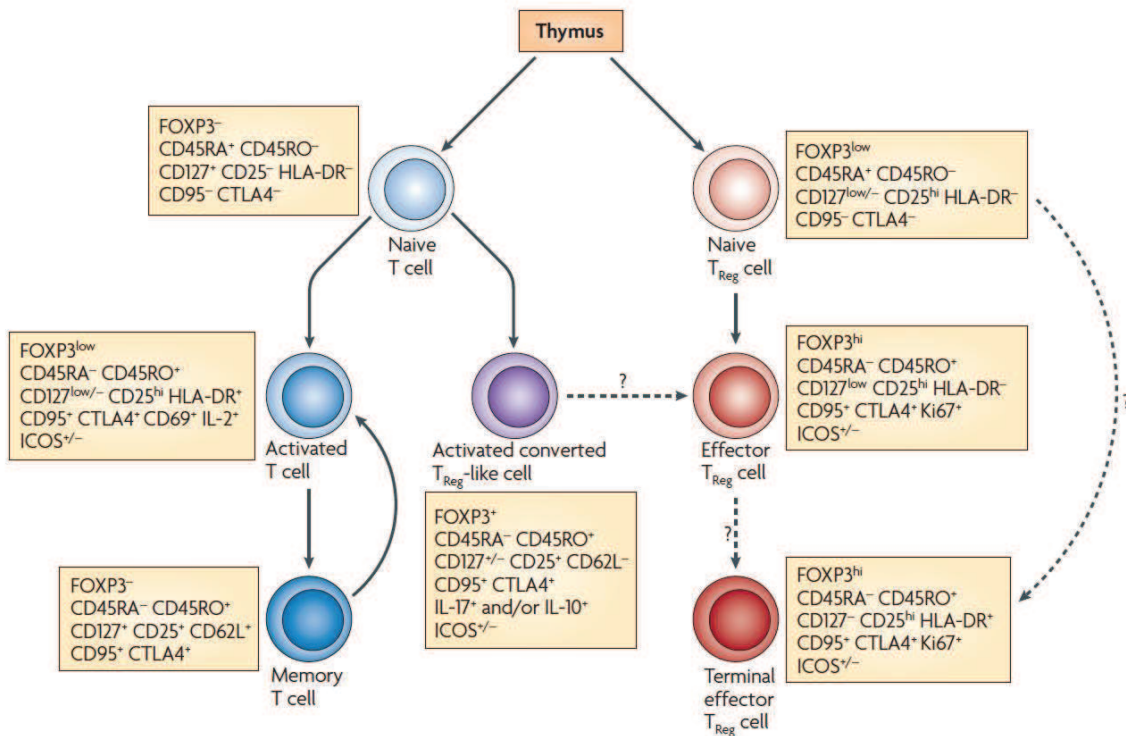


Figure 15 : Différenciation des lymphocytes T conventionnels et régulateurs.

Expression des marqueurs phénotypiques associés à chaque stade de différenciation des Tconv (cellules bleues, à gauche) et des Treg (cellules rouges, à droite). Ces 2 lignées cellulaires sont générées dans le thymus, d'où émigrent des cellules naïves CD45RA⁺. L'activation de ces cellules naïves en périphérie induit leur différenciation respectivement en Tconv activés puis mémoires et Treg effecteurs puis effecteurs terminaux (caractérisés principalement par l'expression de HLA-DR). Des cellules proches des Treg (« Treg-like »), provenant de la conversion de cellules initialement originaires de la lignée Tconv, participent aussi au compartiment des Treg CD45RA⁻ en périphérie et ont un profil d'expression des marqueurs de différenciation semblable aux Treg naturels.

Source : Sakaguchi *et al.* (Sakaguchi, Miyara *et al.* 2010).

Chapitre 4 : Immunothérapie de la GVHa reposant sur les Treg

Rôle des Treg pour contrôler les réactions allogéniques

L'importance des Treg dans le contrôle de l'alloréactivité a été décrite dès la découverte de ces cellules en 1995. En effet, l'équipe de Sakaguchi a montré qu'en l'absence des cellules T CD4⁺ CD25⁺, les souris rejetaient plus rapidement des greffes de peau (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Il a ensuite été prouvé dans des modèles gestationnels que les Treg étaient indispensables à la tolérance envers les allo-antigènes paternels, puisque des souris femelles lymphopéniques et reconstituées avec des populations T déplétées en Treg détruisaient les fœtus issus de leur accouplement avec des mâles allogéniques (Aluvihare, Kallikourdis et al. 2004). De même, le traitement de souris femelles par un mAb anti-CD25 juste avant l'accouplement avec des mâles allogéniques conduit au rejet des fœtus, alors que ce n'est pas le cas quand les 2 parents sont syngéniques (Darrasse-Jeze, Klatzmann et al. 2006).

Il a ensuite été montré que les Treg pouvaient prévenir le rejet de greffe et que cet effet était spécifique des allo-antigènes exprimés dans le greffon (Gregori, Casorati et al. 2001, Hara, Kingsley et al. 2001, Chiffolleau, Beriou et al. 2002, Graca, Cobbold et al. 2002, Graca, Thompson et al. 2002). En effet, les Treg prélevés chez une souris rendue tolérante à un greffon allogénique, grâce à des traitements immunosuppresseurs, et injectés à des souris naïves, rendait ces souris tolérantes aux mêmes allo-antigènes, sans nécessité d'adjoindre un quelconque traitement immunosuppresseur. Cette tolérance était bien spécifique, puisqu'en cas d'allogreffe à partir d'un troisième fond génétique, les souris ayant reçu les Treg étaient alors capables de rejeter les greffons.

Dans le contexte de l'allogreffe de CSH, le rôle des Treg dans l'induction de tolérance et la prise de greffe chez des souris recevant une irradiation subléthale suivie d'une injection de moelle allogénique a été démontré en utilisant aussi bien des Treg allo-spécifiques générés à partir de Treg du receveur cultivés en présence de CPA du donneur (Joffre, Gorsse et al. 2004), que des Treg polyclonaux provenant du donneur (Hanash and Levy 2005) ou des Treg provenant d'un fond génétique différent du donneur et du receveur, à condition dans ce dernier cas d'y associer un traitement par rapamycine (Steiner, Brunicki et al. 2006).

L'utilisation des Treg à des fins thérapeutiques peut s'appréhender globalement de 2 façons : soit en cherchant à stimuler directement leur prolifération et leur fonction in vivo, par injection d'une substance ciblant plus ou moins spécifiquement ces Treg et capable de déclencher de tels effets, soit en injectant directement des Treg, généralement après une phase d'expansion ex vivo, on parle alors de transfert adoptif. Les résultats de ces 2 stratégies thérapeutiques dans le traitement de la GVHa seront détaillés dans la suite de ce chapitre.

Traitement de la GVHa par injection d'IL-2 : résultats chez la souris

Le rôle clé de l'IL-2 pour la prolifération, la fonction et la survie des Treg a conduit à la conception de protocoles thérapeutiques reposant sur son administration afin d'induire une expansion des Treg in vivo. L'avantage de cette méthode est d'éviter les difficultés inhérentes à l'élaboration d'une stratégie de thérapie cellulaire reposant la production en quantités suffisantes de Treg humains en conditions de grade clinique (voir plus loin).

Propriétés immunorégulatrices de l'IL-2 à faible dose

L'utilisation de l'IL-2 comme un agent immunosuppresseur est relativement récente, puisqu'elle avait été initialement utilisée à fortes doses afin, au contraire, de stimuler les réponses immunitaires antivirales (chez des patients séropositifs pour le VIH) et anti-tumorales (chez des patients porteurs de mélanomes ou de carcinomes rénaux métastatiques) (Rosenberg, Yang et al. 1994, Levy, Durier et al. 2003, Ahmadzadeh and Rosenberg 2006, Weiss, Letimier et al. 2010). Pourtant, son administration à faible dose permet de contrôler les réactions auto-immunes et inflammatoires chroniques, probablement en stimulant la fonction des Treg (Koulmanda, Budo et al. 2007, Tang, Adams et al. 2008, Wilson, Pesce et al. 2008, Webster, Walters et al. 2009, Grinberg-Bleyer, Baeyens et al. 2010, Koreth, Matsuoka et al. 2011, Saadoun, Rosenzweig et al. 2011). Il a par exemple été montré que le traitement de souris NOD avec de faibles doses d'IL-2 prévenait le développement du diabète de type 1 et était même capable de corriger un diabète déjà établi (Tang, Adams et al. 2008, Grinberg-Bleyer, Baeyens et al. 2010). Dans ce dernier cas, l'IL-2 entraîne une expansion et une activation sélective de la population Treg dans le pancréas, sans affecter les Tconv pathogènes.

Prévention de la GVHa par l'IL-2 en monothérapie

L'utilisation de l'IL-2 dans des modèles murins pour prévenir la GVHa remonte pourtant au début des années 1990, c'est-à-dire avant même la découverte des Treg. Dans ces travaux pionniers conduits par l'équipe de David Sachs, l'administration d'IL-2 pendant 3 jours permettait de prévenir la GVH expérimentale tout en préservant l'effet GVL (Sykes, Romick et al. 1990, Sykes, Romick et al. 1990, Sykes, Abraham et al. 1993). Cependant, cette efficacité de l'IL-2 en monothérapie n'a pas été retrouvée par d'autres équipes (Shin, Baker et al. 2011, Perol, Martin et

al. 2014), que ce soit en cas d'administration de l'IL-2 au souris donneuses afin d'enrichir le greffon en Treg, ou en cas d'administration aux souris receveuses après la greffe. Cette absence d'efficacité était en rapport avec l'activation des Tconv suite à l'induction par l'IL-2 de l'expression du CD25 sur ces cellules. Par ailleurs, dans une expérience de xéno-GVH conduite par l'équipe de Piaggio, l'administration d'IL-2 à faible dose conduisait bien à une augmentation de la fréquence des Treg, mais ne permettait pas d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires par les Tconv, ni de prévenir la GVH (Perol, Martin et al. 2014).

La discordance entre les résultats de l'équipe de Sachs et ceux publiés plus récemment ne semble pas provenir d'une différence entre les doses utilisées par ces équipes, puisque dans le papier de l'équipe de Piaggio, un large panel de doses a été testé, comprenant à la fois la dose qui avait montré son efficacité dans le diabète auto-immun, mais aussi des doses plus faibles, tout aussi inefficaces, et des doses plus fortes, qui non seulement ne prévenaient pas la GVHa mais accéléraient son développement et la mortalité des souris. Un des facteurs pouvant expliquer les différences entre ces études est plus vraisemblablement le type de GVH étudié, puisqu'il s'agissait d'un modèle totalement allogénique dans les papiers de l'équipe de Sachs et d'un modèle parent dans F1, équivalent murin d'une greffe haplo-identique, dans l'étude de l'équipe de Piaggio. Un autre facteur pourrait être le fait que les IL-2 recombinantes humaines utilisées dans ces études ne provenaient pas du même fabricant.

Quant à la discordance entre l'efficacité de l'IL-2 à faible dose dans le diabète auto-immun et les résultats plus controversés obtenus dans la GVHa, elle résulte probablement du fait que le diabète est une maladie auto-immune et inflammatoire chronique, lentement progressive et surtout spécifique d'organe, tandis que la GVHa est une maladie systémique et hautement inflammatoire impliquant environ 10% de l'ensemble du répertoire T du donneur (Shlomchik 2007). Dans ce contexte précis, l'administration d'IL-2 augmente et prolonge l'expression du CD25 par les nombreux

LT alloréactifs activés, et cette expression forte leur permet d'entrer en compétition avec les Treg pour la fixation de l'IL-2, entraînant une perte de son action sélective sur la population Treg.

Association IL-2 + rapamycine

Si l'intérêt de l'IL-2 en monothérapie dans la GVHa semble donc pour le moins limité, son association à d'autres drogues, ciblant notamment les Tconv alloréactifs, pourrait être intéressante. Un des traitements immunosuppresseurs candidats à une telle association est la rapamycine. En effet, nous avons vu plus haut que la rapamycine, inhibant le complexe mTORC1 qui est faiblement activé dans les Treg, permettait d'avoir un effet suppresseur sur les Tconv sans altérer la fonction des Treg. L'association IL-2 + rapamycine a ainsi prouvé son efficacité en transplantation, notamment dans un modèle murin de greffe de peau allogénique (Pilon, Petillon et al. 2014). Dans le contexte de la GVHa, l'intérêt de cette association a également été montré (Shin, Baker et al. 2011, Satake, Schmidt et al. 2014). L'équipe de Negrin a notamment prouvé que l'administration d'IL-2 et de rapamycine entraîne 1) une augmentation du nombre de Treg du donneur, par expansion des nTreg et stimulation de la génération d'iTreg ; 2) une baisse des Tconv ; et 3) une amélioration de la survie des souris par baisse de la mortalité liée à la GVH. Cependant, il existe là encore des résultats contradictoires dans la littérature, puisque dans le modèle de xéno-GVH de l'équipe de Piaggio, l'association IL-2 + rapamycine est tout aussi inefficace que l'IL-2 seule (Perol, Martin et al. 2014).

Traitement de la GVH par injection d'IL-2 : résultats chez l'homme

Chez l'homme, le traitement par IL-2 à faible dose a été testé dans la GVH, mais il s'agissait alors de patients atteints de GVHc et non pas de GVHa (Koreth, Matsuoka et al. 2011). Les résultats de cette étude de phase I en escalade de dose conduite au Dana Farber Cancer Institute de Boston sont toutefois intéressants, puisqu'ils montrent que chez 29 patients atteints d'une GVHc cortico-résistante, le traitement par injections quotidiennes en sous-cutané de faibles doses d'IL-2 pendant 8 semaines permettait d'obtenir une réponse clinique objective (en l'occurrence une réponse partielle), observée au niveau de différents sites atteints par la GVHc, chez 12 patients sur les 23 évaluables (soit 52%). De plus, tous les patients traités ont présenté une augmentation du nombre de Treg dans le sang, avec un pic correspondant à plus de 8 fois la valeur avant traitement, sans que les Tconv ne soient affectés. Ainsi, le ratio Treg/Tconv a été augmenté en médiane jusqu'à 5 fois sa valeur basale. Ces augmentations du nombre de Treg et du ratio Treg/Tconv étaient durables tout au long du traitement par IL-2, puis déclinaient à l'arrêt de celui-ci. Les Treg ainsi stimulés in vivo exprimaient bien Foxp3 et étaient capables de supprimer des Tconv autologues in vitro. Par ailleurs, la dose de corticoïdes reçue par les patients a pu être diminuée en moyenne de 60%. Enfin, concernant la tolérance au traitement par IL-2, celle-ci était plutôt bonne jusqu'à une dose maximale de 1×10^6 UI/m²/jour.

Concernant les mécanismes responsables de l'efficacité de l'IL-2 dans la GVHc, ils correspondent à ceux qui étaient attendus avec un tel traitement, à savoir l'augmentation sélective de la prolifération des Treg, de leur exportation à partir du thymus et de leur résistance à l'apoptose, l'ensemble de ces processus conduisant à la restauration de leur homéostasie, qui est perturbée dans le contexte de la GVHc (Matsuoka, Koreth et al. 2013).

En 2016, l'équipe de Boston a publié une étude de phase II selon le même protocole, toujours dans la GVHc cortico-résistante, chez 35 nouveaux patients (Koreth, Kim et al. 2016). La durée du traitement a en revanche été allongée à 12 semaines, avec possibilité pour les patients répondeurs de poursuivre par la suite le traitement au long cours. Les résultats de cette étude confirment ceux observés au cours de la phase I, puisque 20 patients sur les 33 évaluables (61%) ont présenté une réponse clinique. Les données sur l'impact du traitement sur les populations Treg et Tconv sont également superposables à l'étude de 2011. En revanche, 2 facteurs ont pu être associés à une plus forte probabilité de réponse au traitement, à savoir une initiation plus précoce de celui-ci et un ratio Treg/Tconv plus élevé avant traitement et/ou 1 semaine après son initiation. Le traitement prolongé par IL-2 était par ailleurs bien toléré et associé à des réponses cliniques et immunologiques persistantes.

Il faut toutefois garder en tête que ces résultats, aussi encourageants soient-ils, ne présagent en rien d'une quelconque efficacité de l'IL-2 à faible dose dans la GVHa chez l'homme, puisque la GVHa et la GVHc sont deux entités distinctes, qui diffèrent notamment sur le plan physiopathologique, même si la plupart des traitements généralement utilisés dans la GVH ont fait la preuve de leur efficacité à la fois dans sa forme aiguë et dans sa forme chronique (corticoïdes, inhibiteurs de la calcineurine, mycophénolate mofétil, SAL, etanercept, alemtuzumab, photo-chimiothérapie extracorporelle, etc...) (Wolff, Schleuning et al. 2011, Martin, Rizzo et al. 2012). En l'occurrence, il n'existe à ce jour aucune étude de l'IL-2 à faible dose dans la GVHa chez l'homme.

Transfert adoptif de Treg dans la GVHa : résultats chez la souris

Preuve de principe et dissociation des effets GVH et GVL

Les premières études démontrant l'importance des Treg dans le contrôle de la GVHa ont été réalisées chez la souris et publiées à partir de 2002. Dans un premier temps, il a été montré que la déplétion des Treg naturellement présents dans le greffon avant injection de ce dernier accélérail la GVHa, aussi bien dans des modèles de greffe totalement allogéniques que semi-allogéniques (Cohen, Trenado et al. 2002, Hoffmann, Ermann et al. 2002, Taylor, Lees et al. 2002, Valzasina, Guiducci et al. 2005). A l'inverse, le fait d'injecter en plus du greffon des Treg du donneur fraîchement isolés prévenait efficacement la GVHa, à condition d'utiliser une forte dose de Treg, équivalente au nombre de LT du donneur présents dans le greffon (Cohen, Trenado et al. 2002, Hoffmann, Ermann et al. 2002). Par ailleurs, cette protection vis-à-vis de la GVHa semble être conférée uniquement par la sous-population de Treg CD62L⁺ (Ermann, Hoffmann et al. 2005).

Afin de préserver au maximum l'effet GVL, certaines équipes ont proposé d'injecter les Treg de façon décalée par rapport à la greffe, pour « laisser le temps » aux LT alloréactifs d'éradiquer les cellules leucémiques résiduelles tout en intervenant suffisamment tôt pour prévenir efficacement la GVHa (Jones, Murphy et al. 2003). Cependant, si une injection à J10 post-greffe est efficace dans un modèle de greffe avec mismatch d'antigène mineur d'histocompatibilité, il faut, en cas de modèle semi-allogénique (parent dans F1), pré-activer les Treg avant injection et ne les administrer pas plus tard que 2 jours après la greffe afin d'obtenir un résultat satisfaisant. Une autre équipe a démontré qu'il n'était pas forcément nécessaire de décaler dans le temps l'injection des Treg, puisque l'injection à J0 de Treg fraîchement isolés prévenait efficacement la GVH sans pour autant abroger l'effet GVL (Edinger, Hoffmann et al. 2003).

Expansion ex vivo

Dans l'optique d'une application thérapeutique chez l'homme, il apparaît clair, avec les techniques actuelles et au vu de la rareté des Treg dans le sang périphérique, qu'il semble illusoire de recueillir une quantité suffisante de Treg « frais » à partir d'un seul donneur pour envisager un transfert adoptif. Il est donc indispensable de passer au préalable par une phase d'expansion ex-vivo de ces Treg. Cette approche a donc été testée dans un premier temps chez la souris, et il a effectivement été montré qu'elle était faisable et que les Treg polyclonaux obtenus après stimulation par mAb anti-CD3 ou microbilles anti-CD3/CD28 en présence d'IL-2, et injectés à J0, prévenaient la GVHa (Taylor, Panoskaltis-Mortari et al. 2004, Xia, Kovochich et al. 2004, Trenado, Sudres et al. 2006), comme cela avait déjà été prouvé pour des Treg fraîchement isolés. Ici aussi, seule la sous-population de Treg CD62L⁺ était efficace pour exercer ce contrôle.

Importance de la spécificité antigénique des Treg

Une donnée importante à prendre en considération avant d'envisager une thérapie cellulaire par les Treg est la spécificité antigénique de ces Treg. En effet, il a été démontré que des Treg spécifiques des antigènes du receveur (rsTreg), obtenus à partir d'une population poly-spécifique de Treg par stimulation in vitro avec des CPA du receveur, étaient plus efficaces que des Treg polyclonaux pour prévenir la GVHa, tout en favorisant la reconstitution immunitaire post-greffe (Trenado, Charlotte et al. 2003, Trenado, Sudres et al. 2006, Gaidot, Landau et al. 2011). De même, dans le domaine des maladies auto-immunes ou des greffes d'organes solides, des Treg spécifiques sont bien plus efficaces que des Treg polyclonaux (Gregori, Casorati et al. 2001, Hara, Kingsley et al. 2001, Tang, Henriksen et al. 2004, Tarbell, Yamazaki et al. 2004, Sagoo, Ali et al. 2011). Cela est probablement lié au fait que pour

exercer un effet suppresseur maximal, les Treg doivent être activés par leur TCR (Takahashi, Kuniyasu et al. 1998, Thornton and Shevach 2000, Piccirillo and Shevach 2001, Shevach, McHugh et al. 2001), ce qui explique sans doute également le fait que les Treg obtenus après culture ont une fonction suppressive supérieure aux Treg fraîchement isolés. Après activation par leur TCR, les Treg exercent un effet suppresseur de proximité, dit « bystander », sur tous les Tconv, quelle que soit leur spécificité antigénique (Takahashi, Kuniyasu et al. 1998, Thornton and Shevach 2000, Shevach, McHugh et al. 2001).

Treg spécifiques d'un seul antigène exogène

Ce concept d'effet bystander a récemment connu un nouveau développement, puisque l'utilisation de Treg spécifiques d'un seul antigène sont capables, après leur activation in vivo par leur antigène cognitif, de prévenir efficacement une maladie systémique comme la GVHa (Martin, Gregoire et al. 2013). Le rationnel derrière cette étude repose sur la difficulté de trier les Treg avec une pureté élevée en conditions de grade clinique, faisant craindre, en cas de production de rsTreg, une contamination du produit de thérapie cellulaire par des Tconv alloréactifs à fort potentiel d'induction de GVH. L'idée est donc ici d'utiliser des Treg spécifiques d'un seul antigène dit exogène, c'est à dire exprimé ni chez le receveur ni chez le donneur. Ainsi, dans cette situation, les potentiels Tconv contaminants seraient inoffensifs, puisque non alloréactifs. Les Treg utilisés dans cette étude étaient des Treg spécifiques de l'antigène mâle HY (HY-Treg). Ces derniers ont été obtenus après culture en stimulant un pool de Treg polyclonaux CD62L⁺ avec des DC autologues CD8⁺ préalablement chargées avec le peptide HY, en présence d'IL-2. En utilisant un modèle de greffe semi-allogénique (parent dans F1), où les souris receveuses sont des mâles et les souris donneuses des femelles, les HY-Treg préviennent aussi efficacement la GVHa que des rsTreg. A l'inverse, dans le cas où

les souris receveuses et donneuses sont toutes des femelles et où donc l'antigène HY n'est pas exprimé, les HY-Treg ne peuvent pas être activés et ils ne protègent pas de la GVHa. En revanche, la simple administration du peptide HY durant les premiers jours post-greffe suffit à activer efficacement in vivo les HY-Treg, qui contrôlent alors parfaitement la GVHa. L'avantage de ce système est donc de pouvoir activer spécifiquement et à la demande, selon un système on/off, les Treg thérapeutiques.

Transfert adoptif de Treg dans la GVHa : essais cliniques

Contraintes liées à une telle stratégie chez l'homme

Bien que la thérapie cellulaire par transfert adoptif de Treg ait montré son efficacité pour contrôler la GVHa dans des modèles murins depuis maintenant 15 ans, plusieurs obstacles ont retardé son application clinique chez l'homme. Tout d'abord, nous avons vu que les études pré-cliniques ont montré que seule une forte dose de Treg injectée, proche de celle des Tconv, pourrait induire un état de tolérance. Par conséquent, compte tenu de la faible proportion des Treg dans le sang périphérique des donneurs, la production d'une quantité suffisante de Treg thérapeutiques implique de passer par une étape de purification ex vivo de ces Treg en conditions de grade clinique, c'est-à-dire par sélection magnétique sur colonne, puis généralement par une phase d'expansion, toujours ex vivo, des Treg ainsi purifiés. Malheureusement, le tri magnétique permet seulement de générer un produit de thérapie cellulaire enrichi en Treg, mais pas une population pure de Treg. Le pourcentage de pureté en Treg peut certes être amélioré au cours de la phase d'expansion, mais il se situe malgré tout généralement aux alentours de 60-70% (Brunstein, Miller et al. 2011, Di Ianni, Falzetti et al. 2011). Par conséquent, il existe un risque de contamination du produit de thérapie cellulaire par des Tconv à haut

potentiel alloréactif, ce qui pose bien évidemment problème dans ce contexte de prévention ou de traitement de la GVHa.

Une autre approche pourrait consister à induire une population Treg in vitro à partir de cellules $CD4^+ CD25^-$, mais dans ce cas, l'instabilité des iTreg, par rapport à des nTreg, concernant l'expression de Foxp3, le profil de méthylation de l'ADN, le phénotype et les capacités suppressives, pourrait mettre en péril l'efficacité de cette stratégie.

Etant données les contraintes énumérées ci-dessus, les premiers essais cliniques de transfert adoptif de Treg humains ont consisté en une injection précoce des Treg, soit juste avant, soit juste après l'injection des CSH (Brunstein, Miller et al. 2011, Di Ianni, Falzetti et al. 2011). En effet, dans ce contexte, l'environnement lymphopénique créé par le conditionnement de la greffe permet une expansion in vivo des Treg injectés et limite donc la problématique liée à la dose de cellules nécessaire pour obtenir une protection. De plus, en cas d'injection précoce, les potentiels Tconv contaminants posent moins de problème puisqu'ils permettent également de favoriser la prise de greffe et l'effet GVL.

Première expérience chez l'homme

Une exception notable aux principes énoncés ci-dessus concerne cependant le tout premier rapport de transfert adoptif de Treg humains après expansion ex vivo, publié en 2009 (Trzonkowski, Bieniaszewska et al. 2009). En effet, les 2 patients ainsi traités l'ont été de façon curative, c'est-à-dire après l'installation des lésions de GVH. De plus, les Treg ont dans cette étude été purifiés à partir des cellules mononucléées issus d'un don de sang (et non pas recueillies par cytophérèse), par sélection magnétique des cellules $CD4^+$ puis tri cellulaire par cytométrie en flux des cellules

CD4⁺ CD25^{fort} CD127⁻. Ces cellules étaient ensuite soumises à une phase d'expansion ex vivo en présence d'IL-2 pendant au maximum 3 semaines.

Le premier patient traité présentait une GVHc sévère et cortico-dépendante. Il a reçu une seule injection de Treg à la dose de 1×10^5 /kg (90% de ces cellules étant Foxp3⁺) ce qui a permis à la fois une amélioration clinique et une diminution significative des doses de médicaments immunosuppresseurs. Le second patient souffrait d'une GVHa sévère réfractaire à de multiples traitements et a reçu 3 injections consécutives, entraînant une amélioration clinique modérée et transitoire.

Etude de Brunstein et al.

En 2011 ont été publiés les 2 premiers essais cliniques évaluant le transfert adoptif de Treg après allogreffe pour prévenir la GVH. Le premier a été conduit par l'équipe de Brunstein (Brunstein, Miller et al. 2011). Il s'agit d'une étude de phase I en escalade de dose testant l'injection à J1 de la greffe (+/- une deuxième dose à J15) de Treg ayant subi au préalable une phase d'expansion ex vivo. Vingt-trois patients atteints d'hémopathies malignes de haut risque (8 LAM, 3 LAL, 8 lymphomes, 3 leucémies lymphoïdes chroniques et 1 leucémie prolymphocytaire) ont été inclus dans cette étude et tous sauf 1 ont reçu une greffe à partir de 2 USP, après un conditionnement associant de la fludarabine, du cyclophosphamide et de la TBI à 2 Gy. La prophylaxie de la GVHa reposait sur l'association mycophénolate mofétil + ciclosporine ou sirolimus et la greffe était donc suivie d'une injection de Treg à J1, avec pour 14 patients une 2^{ème} dose de Treg injectée à J15.

De façon remarquable, les Treg injectés dans cette étude provenaient d'une troisième USP, partiellement HLA-compatible avec le receveur (4/6 à 6/6), mais non nécessairement matchée avec les 2 USP utilisées pour la greffe de CSH. Les Treg

ont été obtenus après sélection magnétique sur colonne (CliniMACS) des cellules CD25⁺ présentes dans l'USP, puis culture de ces cellules pendant 18 jours en présence de billes recouvertes de mAb anti-CD3/anti-CD28 d'une part et d'IL-2 d'autre part. Après cette phase d'expansion, 75% des cellules étaient CD4⁺ CD25^{fort} et 64% étaient CD4⁺ CD127⁻ Foxp3⁺. Tous les produits de thérapie cellulaire ainsi générés étaient dotés d'une capacité suppressive in vitro.

Dix-sept patients (74%) ont reçu la dose de Treg prévue selon le protocole, les 5 autres ayant reçu une dose plus faible en raison d'une expansion insuffisante des Treg in vitro. Après injection de doses allant de 1 à 30 x 10⁵ Treg/kg, aucune toxicité entraînant une limitation de dose n'a été rapportée. La persistance in vivo des Treg injectés a été étudiée chez 7 patients, avec un pic à J+2 et une disparition après 14 jours. Par comparaison avec une cohorte historique de 108 patients traités avec le même conditionnement et la même prophylaxie de la GVH, mais n'ayant pas reçu de Treg, il n'a pas été observé d'augmentation de la fréquence des infections opportunistes (39% à J100), des rechutes (incidence cumulée = 32%), des non-prises de greffe (1 patient a dû recevoir une 2^{ème} greffe ; chimérisme mixte à J100 = 11%) et de la NRM (9% à J100). La DFS était également équivalente entre les 2 groupes. En revanche, les incidences de GVHa de grade II à IV et de GVHc étaient significativement plus basses dans la cohorte de patients ayant reçu des Treg (43% versus 61% et 14% versus 26% respectivement).

A noter cependant que, concernant le risque infectieux, l'équipe de Brunstein a finalement rapporté dans une nouvelle publication de 2013 qu'il y aurait potentiellement un risque augmenté d'infections virales précoces (principalement des virémies à HHV6), survenant dans les 30 jours suivant l'injection des Treg dérivés d'USP, du fait d'une suppression des réponses immunitaires (Brunstein, Blazar et al. 2013). Cependant, aucune augmentation du risque d'infection opportuniste à plus long terme n'a été observée.

Etude de Di Ianni et al.

L'étude de l'équipe de Di Ianni, publiée également dans Blood en 2011, a livré des résultats encore plus surprenants, puisqu'elle a rapporté des incidences de GVHa et GVHc extrêmement basses dans un contexte de greffes haplo-identiques avec injection de Tconv, certes à doses relativement faibles, mais sans aucune prophylaxie de la GVH autre que les Treg injectés (Di Ianni, Falzetti et al. 2011). Dans cet essai, 28 patients atteints d'hémopathies malignes (22 LAM, 5 LAL et 1 lymphome non-Hodgkinien de haut grade) ont reçu un conditionnement comprenant une TBI à 8 Gy, du thiotepa, de la fludarabine et du cyclophosphamide, suivi d'une injection de Treg « frais » à J-4 puis des cellules souches CD34⁺ et des Tconv (fraction négative d'un tri CliniMACS avec anti-CD19) à J0, ces 3 fractions cellulaires provenant toutes d'un seul et même donneur et étant injectées séparément. Encore une fois, les patients ne recevaient ni ciclosporine, ni aucun autre traitement immunosuppresseur après la greffe.

Concernant les doses de cellules reçues, elles étaient de 0.5×10^6 Tconv/kg et 2×10^6 Treg/kg pour les 4 premiers patients, puis 1×10^6 Tconv/kg et 2×10^6 Treg/kg pour les 17 suivants et enfin 2×10^6 Tconv/kg et 4×10^6 Treg/kg pour les 5 derniers patients. A noter que 2 patients n'ont pas reçu de Tconv en raison d'un niveau d'expression de Foxp3 < 50% dans la préparation de Treg. Dans cette étude, les Treg ont été obtenus à partir de cellules mononucléées du sang périphérique recueillies par cytophérèse, puis sélection des cellules CD8⁻ et CD19⁻ par séparation magnétique sur colonne CliniMACS et enfin sélection positive après tri CD25 sur une 2^{ème} colonne. Le produit cellulaire ainsi obtenu avait une pureté moyenne de 92.7% en cellules CD4⁺ CD25⁺, avec 33.6% de cellules CD25^{fort}, 69.2% Foxp3⁺ et 16.6% CD127⁺. La capacité suppressive moyenne était de 67%.

Concernant les résultats de cette étude, une bonne prise de greffe, avec chimérisme de type donneur durable, a été observée chez 26 patients sur 28. Seulement 2 de

ces 26 patients évaluable ont présenté une GVHa de grade ≥ 2 , et après un suivi médian de 11.2 mois, aucun patient n'a présenté de manifestations de GVHc. Le second objectif principal de cette étude était d'étudier la reconstitution immunitaire post-greffe. Par comparaison avec une cohorte historique de greffes haplo-identiques dites « standard », la reconstitution des populations T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques dirigées contre *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, le CMV, l'adénovirus, le virus herpès simplex, le virus de la varicelle et du zona et le toxoplasme était significativement plus précoce dans la cohorte de patients ayant reçu des Treg. Il a également été observé une incidence plus faible des réactivations à CMV et aucun patient n'a présenté de maladie à CMV. Le transfert adoptif de Treg n'avait pas non plus d'impact négatif sur la reconstitution des populations NK, qui était même plus rapide, en particulier en ce qui concerne les clones NK alloréactifs. Enfin, concernant la survie des patients, 13 sont décédés, essentiellement de causes infectieuses, un seul a rechuté et la DFS après un suivi médian de 12 mois est de 46.1%.

Résultats plus récents

En 2014, l'équipe italienne de Pérouse a rapporté une actualisation de sa cohorte de patients adultes atteints de LAM ou LAL de haut risque et greffés en haplo-identique avec injection de Treg à J-4 et de CSH et Tconv à J0, dans le but d'étudier tout particulièrement si le co-transfert de Treg et de Tconv prévenait efficacement ou non la rechute leucémique post-greffe, autrement dit, si l'action protectrice vis-à-vis de la GVH s'accompagnait bien d'une préservation de l'effet GVL (Martelli, Di Ianni et al. 2014). Sur les 43 patients (33 LAM, 10 LAL) ainsi traités, 25 ont reçu le conditionnement décrit dans la publication de 2011 de Di Ianni (dont 24 ont déjà été rapportés dans ce même papier); les 18 suivants ont reçu un conditionnement légèrement différent dans le but de réduire le risque de complications extra-

hématologiques et notamment de maladie veino-occlusive du foie. Les doses moyennes de cellules reçues étaient de 9.7×10^6 CD34⁺/kg, de 2.5×10^6 Treg/kg et de 1.1×10^6 Tconv/kg. Après un suivi médian de 46 mois, seulement 2 patients sur les 41 évaluables (5%) ont rechuté de leur hémopathie. Par comparaison avec une cohorte de contrôle historique de 114 greffes haplo-identiques dont les caractéristiques des patients et le conditionnement reçu étaient globalement équivalents à ceux inclus dans l'étude, l'incidence cumulée de rechute était significativement plus faible dans la cohorte ayant reçu des Treg et des Tconv (5% versus 21%, $P = 0.03$). Surtout, en analyse multivariée, le fait d'avoir reçu l'immunothérapie adoptive était le seul facteur associé à une réduction du risque de rechute. Concernant les autres paramètres évalués en post-greffe, 95% des patients ont obtenu un chimérisme 100% donneur et l'incidence de la GVHa de grade ≥ 2 était de 15% (équivalente à la cohorte historique), confirmant les excellents résultats observés dans l'étude de 2011. Un seul patient a développé des lésions de GVHc. Quant à la reconstitution immunitaire spécifique anti-infectieuse, elle était améliorée par rapport aux greffes haplo-identiques historiques.

L'équipe de Brunstein a quant à elle publié une nouvelle étude en 2016, selon le même protocole que celle de 2011, à la différence près que, dans le but d'augmenter la dose de Treg injectés, les cellules CD25⁺ sélectionnées à partir d'USP étaient soumises à une phase d'expansion en présence de cellules K562 modifiées (appelées KT64/86) pour exprimer le récepteur Fc de haute affinité (CD64) et le CD86, ligand naturel du CD28 (Brunstein, Miller et al. 2016). En effet, la même équipe avait préalablement montré qu'une seule restimulation des Treg par des APC exprimant le CD64 et le CD86 conduisait à une expansion franche de ces Treg, qui dans le même temps conservaient leur niveau d'expression de Foxp3 et une puissante capacité suppressive (Hippen, Merkel et al. 2011). On sait par ailleurs que dans les modèles murins, un ratio Treg/Tconv d'au moins 1:1 est nécessaire pour prévenir de façon significative la survenue de la GVHa. Or, après double greffe de sang de cordon, cela implique une dose de Treg au moins égale à 15×10^6 /kg, c'est-

à-dire bien plus que les doses injectées dans l'étude de 2011. Onze patients ont été traités par injection de Treg obtenus selon le protocole décrit ci-dessus (2 patients avec une dose de 3×10^6 Treg/kg ; 4 patients à 10×10^6 Treg/kg ; 1 patient à 30×10^6 Treg/kg ; 4 patients à 100×10^6 Treg/kg) et comparés à une cohorte concomitante de 22 patients traités de façon identique mais n'ayant pas reçu d'injection de Treg. Il est intéressant de noter que la dose de Treg la plus faible utilisée dans cette étude correspond à la dose la plus forte injectée dans l'étude de 2011. Les cellules injectées étaient en médiane à 97% $CD4^+ CD25^+$ et à 87% $CD4^+ Foxp3^+ CD127^-$. Concernant la tolérance du traitement, aucune toxicité dose-limitante n'a été observée, y compris à 100×10^6 Treg/kg. De façon intéressante, le fait d'augmenter la dose de Treg s'est traduit par une augmentation du pic de Treg in vivo à J3, mais pas par une persistance plus prolongée de ces Treg dans le sang des receveurs, puisque comme précédemment rapporté dans l'étude de 2011, les Treg injectés n'étaient plus détectable après J14. Les résultats de cette étude en termes d'incidence de GVH sont très encourageants, puisque seulement 9% des patients ayant reçu des Treg ont développé une GVHa de grade II-IV à J100, contre 45% dans la cohorte contrôle ($P = 0.05$). Après un suivi médian de 20 mois et 28 mois respectivement pour les survivants des cohortes Treg et contrôle, aucun patient n'a développé de GVHc dans le groupe Treg contre 14% dans le groupe contrôle. Aucune différence n'a été observée entre les 2 groupes en ce qui concerne (i) la récupération hématologique post-greffe, que ce soit pour les polynucléaires neutrophiles (PNN) ou les plaquettes, (ii) la prise de greffe et (iii) la densité d'infections bactériennes, virales et fongiques avant J100. En revanche, la récupération des cellules $CD4^+$ et d'un sous-type de lymphocytes naïfs $CD4^+ CD45RA^+ CCR7^+$ était plus rapide chez les patients ayant reçu des Treg. Concernant le risque de rechute, dont on pouvait légitimement craindre qu'il soit plus important après injection de Treg, les résultats sont similaires entre les 2 groupes de traitement (33% pour la cohorte Treg versus 40% pour la cohorte contrôle), de même que la NRM, la DFS à 1 an et l'OS à 1 an.

Il convient enfin de signaler également la communication, au dernier congrès de l'association américaine d'hématologie en décembre 2016, d'un nouvel essai clinique de transfert adoptif de Treg dans la GVH, même si le contexte est ici différent puisqu'il s'agit d'une intervention thérapeutique (et non préventive), la première rapportée à ce jour chez l'homme, et qu'il concerne uniquement des patients atteints de GVHc et non de GVHa (Johnston, Armstrong et al. 2016). Dans cet essai de phase I, 10 patients souffrant de GVHc cortico-résistante ou cortico-dépendante après allogreffe géno-identique ont été inclus. Les Treg du donneur ont été enrichis par sélection immuno-magnétique des cellules CD25⁺ à partir du produit de 2 cytophères consécutives, puis purifiés par cytométrie en flux à haute vitesse permettant d'isoler la population CD4⁺ CD127^{faible}. L'essai a été conduit en escalade de dose, avec 3 doses testées : 1 x 10⁵ Treg/kg, 5 x 10⁵ Treg/kg et 1.5 x 10⁶ Treg/kg. La quantité médiane de Treg isolés à partir de chaque donneur était de 1.9 x 10⁸ cellules, avec une pureté allant de 87% à plus de 99%. La fonction suppressive de ces Treg a été validée in vitro. Aucun effet indésirable en rapport avec la perfusion des Treg n'a été observé, notamment aucune exacerbation de GVHc ni déclenchement de GVHa. Six patients sur les 10 inclus ont présenté une amélioration ou une stabilité de leurs lésions de GVHc, les 4 autres ayant dû démarrer un nouveau traitement immunosuppresseur dans les 2 mois suivant l'injection des Treg en raison d'une absence de réponse ou d'une progression de leur maladie. Tous les patients étaient en vie après un suivi > 150 jours post-injection des Treg. Ces résultats, obtenus après une seule et unique injection de Treg frais du donneur jusqu'à une dose de 1.5 x 10⁶ cellules/kg, permettant de passer outre la phase d'expansion de ces Treg ex vivo. L'efficacité de ce protocole pourrait par ailleurs être renforcée par une répétition des injections de Treg, éventuellement combinée à l'administration d'IL-2 à faible dose.

Chapitre 5 : L'axe TNF α /récepteur au TNF α de type 2 (TNFR2) et son rôle dans la fonction des Treg

Le TNF α et ses récepteurs

Comme son nom l'indique, le tumor necrosis factor alpha (TNF α) a été découvert lors de l'étude de la régression de tumeurs induite par le LPS. L'équipe d'O'Malley a ainsi montré que cette régression n'était pas liée à un effet direct du LPS, mais rendue possible par l'induction d'un facteur sérique, qu'ils ont nommé tumor necrotizing factor (O'Malley, Achinstein et al. 1962), renommé par la suite tumor necrosis factor (Carswell, Old et al. 1975). Le TNF α est une molécule produite par les cellules du système immunitaire, dont les LB, les LT, les NK, les macrophages et les DC (Aggarwal 2003). Cette cytokine pléiotropique est impliquée dans un très grand nombre de processus pathologiques, puisqu'elle est capable d'induire l'apoptose, la prolifération cellulaire, l'inflammation, une immunomodulation, la réplication virale, l'allergie, l'arthrite, le choc septique, l'insulino-résistance ou des manifestations auto-immunes, ces effets dépendant entre autres choses du type cellulaire ciblé (Aggarwal 2000).

Le TNF α peut se fixer sur 2 types de récepteurs cellulaires : le récepteur au TNF α de type 1 (TNFR1, également appelé TNFR60) et le récepteur au TNF α de type 2 (TNFR2, également appelé TNFR80) (Hohmann, Remy et al. 1989, Brockhaus, Schoenfeld et al. 1990). Si l'expression du TNFR1 est ubiquitaire, celle du TNFR2 est restreinte aux cellules endothéliales et du système immunitaire. Il a également été montré que le TNF α soluble, qu'il soit monomérique ou trimérique, pouvait se fixer à la fois sur TNFR1 et TNFR2, mais que s'il était capable d'activer ainsi TNFR1, il n'induisait en revanche qu'un signal faible voire absent via TNFR2, qui est préférentiellement activé par le TNF α lié à la membrane cellulaire (Grell, Douni et al.

1995, Grell, Wajant et al. 1998). Cette différence s'explique en partie par une plus grande affinité du TNFR1 pour le TNF α soluble et par le fait que la formation d'agrégats de complexes TNF/TNFR2 à la surface cellulaire soit probablement nécessaire à la transduction du signal (Mukai, Nakamura et al. 2010). Par ailleurs, il existe aussi des formes solubles des récepteurs au TNF α , probablement du fait de la libération dans le milieu extracellulaire des parties extra-membranaires des récepteurs TNFR1 et TNFR2, après leur clivage (Diez-Ruiz, Tilz et al. 1995). La concentration sérique de ces récepteurs solubles semble corrélée à l'intensité de la stimulation par le TNF α et est déclenchée par l'administration de TNF α à des patients (Lantz, Malik et al. 1990).

Différences fonctionnelles entre les récepteurs TNFR1 et TNFR2

D'un point de vue fonctionnel, TNFR1 induit des signaux pro-apoptotiques tandis que TNFR2 stimulerait plutôt la prolifération et la survie cellulaires (Aggarwal 2003). En effet, l'une des différences structurelles entre ces 2 récepteurs est l'existence d'un domaine de mort cellulaire dans la partie intra-cytoplasmique de TNFR1, capable de fixer TRADD et FADD. Dans les LT, l'activation de TRADD et de FADD conduit à l'activation de caspases et à la mort cellulaire (Faustman and Davis 2013). Une autre voie apoptotique qui peut être ainsi déclenchée est l'activation de RIP par TRADD. A l'inverse, la partie intra-cytoplasmique de TNFR2 possède un domaine de liaison à TRAF2, qui à son tour peut se lier à TRAF1, TRAF3, cIAP1 et cIAP2 (Rothe, Wong et al. 1994, Rothe, Sarma et al. 1995). Ces protéines activent ensuite d'autres molécules de signalisation, aboutissant au final à l'activation de NF- κ B (qui est libéré de son inhibiteur I κ B α), MAPK et AP-1, qui induisent la survie cellulaire. Il existe cependant aussi des arguments pour penser que les 2 types de récepteurs au TNF α coopèrent pour la transduction du signal (Weiss, Grell et al. 1998, Mukhopadhyay,

Suttles et al. 2001). Les principales voies de signalisation déclenchées par les récepteurs TNFR1 et TNFR2 sont schématisées dans la **figure 16**.

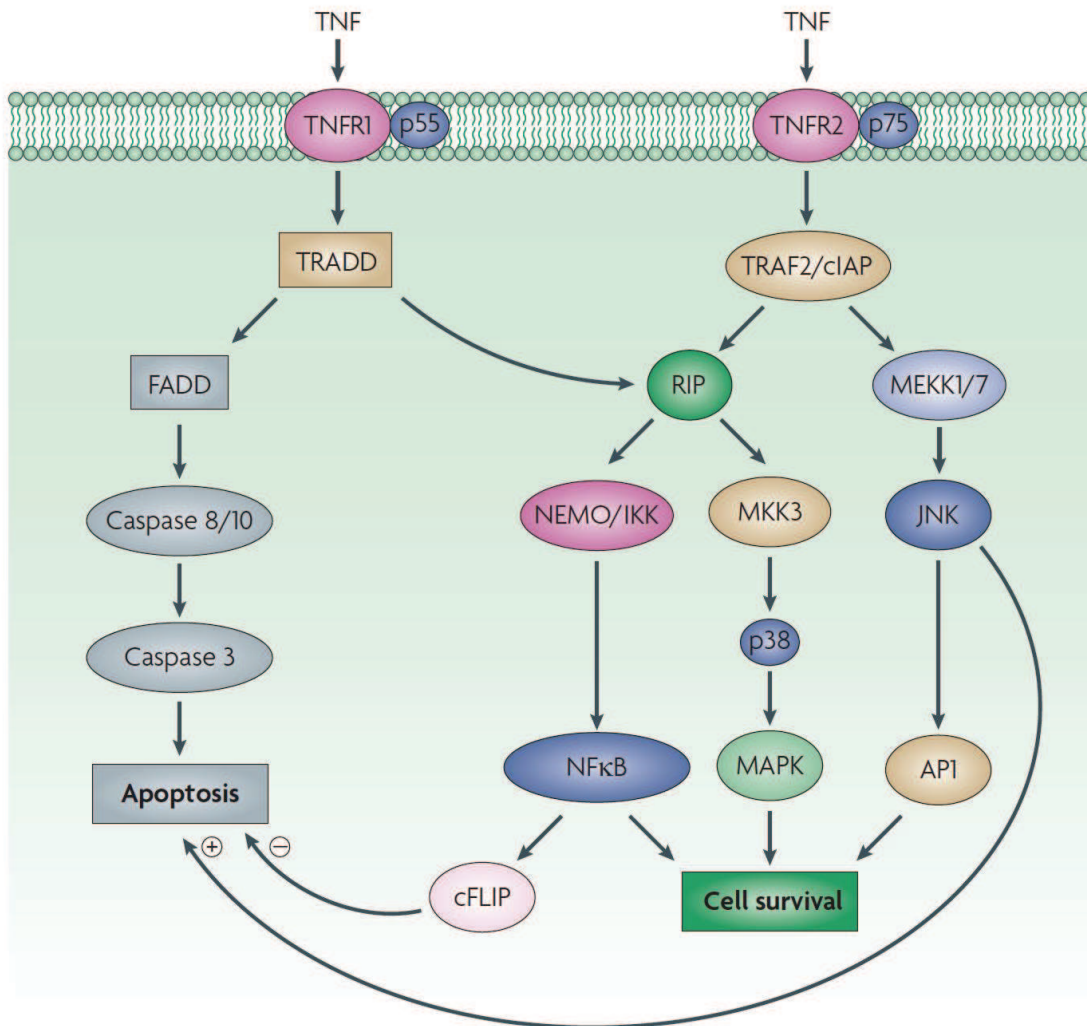


Figure 16 : Signalisation induite par le TNF via TNFR1 et TNFR2.

Généralement, une signalisation exclusive via TNFR1 entraîne l'activation d'une cascade d'activation de médiateurs intracellulaires conduisant à l'apoptose. Ce phénomène dépend du type cellulaire, de l'état d'activation de la cellule et du cycle cellulaire. A l'inverse, une signalisation exclusive via TNFR2, en particulier dans les LT fortement activés, induit le déclenchement de voies de survie cellulaire pouvant aussi résulter in fine en une prolifération cellulaire.

Source : Faustman *et al.* (Faustman and Davis 2010).

Quoi qu'il en soit, si le rôle de TNFR1 dans la médiation de l'effet cytotoxique induit par le TNF α est connu depuis de nombreuses années, la fonction biologique précise de TNFR2 est restée plus longtemps énigmatique (Aggarwal 2003). On sait désormais que TNFR2 est impliqué dans la protection vis-à-vis des maladies auto-immunes, des maladies cardiaques, des affections démyélinisantes et neurodégénératives et des maladies infectieuses (Faustman and Davis 2013). Ainsi, un traitement par agoniste de TNFR2 détruit sélectivement les clones T autoréactifs, sans atteindre les LT « sains », dans le sang de patients atteints de diabète de type 1 ou d'autres maladies auto-immunes (Ban, Zhang et al. 2008). De même, dans un modèle d'infarctus du myocarde chez la souris, TNFR2 favorise la réparation et la régénération tissulaire, tandis que TNFR1 joue un rôle délétère (Wang, Crisostomo et al. 2008). Concernant les maladies neurologiques, il a par exemple été montré dans un modèle murin d'ischémie rétinienne que TNFR2 était associé à une neuroprotection alors que TNFR1 promouvait le neurodégénération (Fontaine, Mohand-Said et al. 2002).

Le TNF α : une molécule également immunosuppressive ?

Le TNF α est reconnu comme une cytokine majeure de l'inflammation et nous avons vu plus haut qu'elle jouait notamment un rôle très important dans la physiopathologie de la GVHa, en étant impliquée à différentes étapes clés (Xun, Thompson et al. 1994, Hill, Crawford et al. 1997). Ce rôle physiopathologique prépondérant est à l'origine de l'utilisation des anti-TNF α pour le traitement de la GVH (Martin, Rizzo et al. 2012).

Cependant, il existe aussi dans la littérature un certain nombre d'éléments faisant suspecter l'existence de propriétés immunosuppressives paradoxales du TNF α . En effet, dans le modèle murin « classique » du diabète auto-immun, l'injection de TNF α

aux souris NOD a un effet paradoxal sur les Treg et le développement du diabète en fonction de l'âge des souris traitées (Yang, Tisch et al. 1994, Wu, Hua et al. 2002). En effet, en cas d'injection du TNF α en période néonatale, ce dernier accélère la survenue et augmente la fréquence du diabète tout en réduisant le nombre de Treg dans le thymus et la rate des souris traitées, alors qu'il conduit à l'effet exactement inverse en cas d'administration à des souris âgées de 4 à 5 semaines. Un effet protecteur vis-à-vis du diabète chez des souris NOD adultes a également été retrouvé dans autre étude où les souris recevaient des injections répétées d'un agoniste du TNF α (Jacob, Aiso et al. 1990). Dans un autre modèle murin de maladie auto-immune, le traitement par TNF α retarde le développement de la néphropathie lupique et améliore la survie des souris (NZB x NZW) F1 (Jacob and McDevitt 1988, Gordon, Ranges et al. 1989). Par ailleurs, les Treg expriment le récepteur TNFR2 (Annunziato, Cosmi et al. 2002), ce qui signifie que le TNF α pourrait stimuler leur prolifération et leur survie.

L'effet anti-inflammatoire paradoxal du TNF α , qui permet de protéger contre des pathologies auto-immunes, semble survenir notamment en cas d'exposition chronique, ce qui suggère que la dose et la durée d'exposition au TNF α pourraient moduler son effet sur les Tconv comme sur les Treg (Cope, Liblau et al. 1997, Zganiacz, Santosuosso et al. 2004, Zakharova and Ziegler 2005).

Des données cliniques viennent aussi corroborer ces observations puisqu'il a été rapporté qu'un certain nombre de pathologies auto-immunes pouvaient se développer chez les patients recevant un traitement par anti-TNF α (Ramos-Casals, Brito-Zeron et al. 2008). Par exemple, des exacerbations cliniques et radiologiques de SEP ou le déclenchement de telles manifestations chez des patients ne souffrant pas de SEP au préalable ont été observés sous anti-TNF α (van Oosten, Barkhof et al. 1996, Mohan, Edwards et al. 2001). Des exacerbations ou le développement de lésions de psoriasis ont aussi été rapportés (Ko, Gottlieb et al. 2009, Sfikakis 2010). De plus, jusqu'à 80% des patients sous anti-TNF α développent des anticorps anti-

nucléaires et pour certains d'entre eux un authentique lupus (De Bandt, Sibilis et al. 2005, De Rycke, Baeten et al. 2005). Enfin, l'induction de lésions de vascularite a aussi été observée (Ramos-Casals, Brito-Zeron et al. 2008).

TNFR2 et Treg

Implication des Treg dans l'effet anti-inflammatoire paradoxal du TNF α : rôle du récepteur TNFR2

L'observation de cet effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur paradoxal du TNF α a poussé l'équipe de Chen à émettre l'hypothèse que les Treg pourraient éventuellement être impliqués dans ce mécanisme, et ce d'autant plus qu'il a été montré que les thymocytes humains CD4⁺ CD25⁺ exprimaient de façon constitutive TNFR2 (Annunziato, Cosmi et al. 2002). Cette hypothèse a été validée en plusieurs étapes (Chen, Baumel et al. 2007). Dans un premier temps, les auteurs ont pu apporter la preuve que les Treg de la souris, aussi bien au repos qu'après activation, expriment fortement le récepteur TNFR2, à un niveau bien supérieur à celui des Tconv (32% versus 8% au repos et 47% versus 33% après stimulation du TCR). En revanche, l'expression de TNFR1 est pratiquement indétectable à la surface des Treg comme des Tconv, quel que soit leur état d'activation. Cette expression préférentielle de TNFR2 (mais pas de TNFR1) par les Treg a depuis été confirmée par d'autres études, comme illustré en **figure 17** (Okubo, Mera et al. 2013). Ensuite, l'équipe de Chen a montré que l'inhibition de la prolifération des Tconv par les Treg, bien qu'initialement abrogée en présence de TNF α , était restaurée en cas d'exposition plus prolongée. Le TNF α était par ailleurs capable de lever l'état l'anergie caractéristique des Treg en réponse à la stimulation de leur TCR et de provoquer à l'inverse leur expansion. Les Treg qui ont proliféré en présence de TNF α et d'IL-2 expriment également plus fortement CD25 et Foxp3, ont un niveau de

phosphorylation de STAT5 plus élevée et une capacité suppressive augmentée. Cette augmentation de l'expression de Foxp3 par les Treg en présence de TNF α est spécifique, car non retrouvée avec d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β ou l'IL-6. Enfin, ces données ont été confirmées in vivo dans un modèle murin de péritonite polymicrobienne (la ponction et ligation caecale), qui mime un sepsis humain et est caractérisé par une élévation rapide des concentrations sériques de TNF α . Après ponction et ligation caecale chez des souris sauvages, on observe, comme attendu dans un tel contexte septique (Monneret, Debard et al. 2003, Venet, Pachot et al. 2004), une augmentation significative des Treg spléniques à J1 et J2, alors que ce n'est pas le cas lorsque des souris TNFR2^{-/-} sont utilisées.

Il semble par ailleurs que l'importance de l'axe TNF α /TNFR2 ne soit pas équivalente entre les nTreg et les iTreg. En effet, une étude a montré que seuls les nTreg avaient besoin du signal TNF pour exercer leur fonction in vivo (Housley, Adams et al. 2011). Ce phénomène pourrait expliquer la variabilité des réponses observées avec les traitements anti-TNF α dans différentes maladies, en fonction du rôle prépondérant joué par les nTreg ou les iTreg dans ces processus pathologiques.

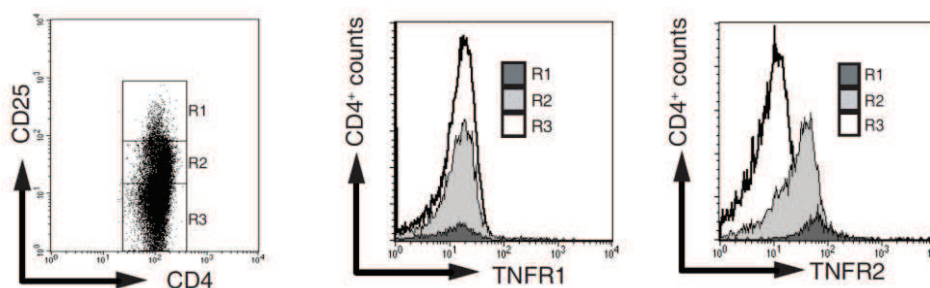


Figure 17 : TNFR2 est préférentiellement exprimé par les Treg par rapport aux Tconv.

A gauche : L'étude de l'expression du CD25 par les cellules CD4⁺ permet d'identifier 3 sous-populations cellulaires. R1 : cellules CD4⁺ CD25^{fort}, correspondant aux Treg; R2 : cellules CD4⁺ CD25^{faible}; R3 : cellules CD4⁺ CD25⁻. Au milieu : L'expression de TNFR1 est identique et faible dans les 3 sous-types cellulaires. A droite : L'expression de TNFR2 est plus forte au niveau des Treg.

Source : Okubo *et al.* (Okubo, Mera et al. 2013).

L'expression de TNFR2 permet de caractériser les Treg les plus suppresseurs et est corrélée à l'expression de Foxp3

En 2008, la même équipe publie une nouvelle étude davantage focalisée sur l'association entre l'expression de TNFR2 par les Treg et leurs capacités suppressives (Chen, Subleski et al. 2008). Cette étude montre que TNFR2 est exprimé préférentiellement par les Treg présentant un phénotype « mémoire » et activé (c'est-à-dire CD45RB^{faible} CD62L^{faible} et CD44^{fort}), sous-population exprimant fortement les marqueurs CD69, CD103, GITR et CTLA-4 et dotée des capacités suppressives les plus fortes, tandis que les Treg naïfs (CD45RB^{fort} CD62L^{fort} et CD44^{faible}) n'expriment pas TNFR2. In vitro, les cellules CD4⁺ CD25⁺ TNFR2⁺, qui représentent environ 30 à 40% des Treg, ont une capacité suppressive extrêmement forte, encore supérieure à celle des cellules CD4⁺ CD25⁺ CD103⁺. Pourtant, CD103 était jusque-là reconnu comme le marqueur définissant la sous-population de Treg avec la fonction suppressive la plus forte (Lehmann, Huehn et al. 2002). De façon encore plus surprenante, les cellules CD4⁺ CD25⁻ TNFR2⁺, habituellement non reconnues comme des Treg, exercent un effet suppresseur modéré mais supérieur à celui des cellules CD4⁺ CD25⁺ et TNFR2⁻. Au total, TNFR2 est donc un marqueur permettant d'identifier les Treg présentant un phénotype activé et dotés des capacités suppressives les plus fortes.

Chez l'homme, il existe une corrélation entre l'expression de Foxp3 et celle de TNFR2 (Chen, Subleski et al. 2010). Environ 85% des cellules CD4⁺ Foxp3⁺ du sang périphérique expriment TNFR2 à un niveau élevé d'intensité de fluorescence moyenne (MFI), contre seulement 20% pour les cellules Foxp3⁻. Cette corrélation est également soutenue par le fait que même les populations CD4⁺ CD25^{faible} Foxp3⁺ et CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ expriment TNFR2 à des niveaux très supérieurs à leurs équivalents Foxp3⁻. Notons enfin que dans la population CD4⁺ CD25^{fort} Foxp3⁺, correspondant classiquement aux Treg fonctionnels, près de 100% des cellules

expriment TNFR2 (97.4-100%), avec le niveau de MFI le plus élevé observé dans cette étude.

Il en résulte que TNFR2 pourrait être un excellent marqueur de substitution à Foxp3, dans l'optique de faire du tri cellulaire, à la manière de ce qui avait été prouvé pour la faible expression de CD127 (Seddiki, Santner-Nanan et al. 2006). En effet, le pourcentage de cellules exprimant Foxp3 est équivalent dans les populations CD4⁺ CD25⁺ TNFR2⁺ et CD4⁺ CD25⁺ CD127^{faible/-} (Chen, Subleski et al. 2010). En se basant sur ce phénotype CD4⁺ CD25⁺ TNFR2⁺ pour définir la population Treg, on observe chez des donneurs sains qu'elle représente environ 5 à 12% des LT CD4⁺ du sang périphérique, soit un pourcentage légèrement supérieur à ce qui avait été jusqu'à présent décrit chez l'homme et davantage superposable aux taux observés chez la souris (Rodriguez-Perea, Arcia et al. 2016).

Enfin, après stimulation du TCR, les cellules CD4⁺ CD25⁺ TNFR2⁺ sont anergiques et inhibent fortement la prolifération et la production d'IFN γ par les Tconv, ce que ne sont pas capables de faire les cellules CD4⁺ CD25⁺ TNFR2⁻ et CD4⁺ CD25⁻ TNFR2⁺, ce qui confirme que la co-expression des marqueurs CD25 et TNFR2 doit être utilisée pour identifier au mieux les Treg humains fonctionnels (Chen, Subleski et al. 2010).

Sécrétion de TNFR2 soluble : un nouveau mécanisme suppresseur des Treg

Le récepteur TNFR2 pourrait par ailleurs jouer un rôle direct dans l'action anti-inflammatoire des Treg et constituer un nouveau mécanisme d'action davantage ciblé sur les médiateurs impliqués dans les réponses inflammatoires de la phase aiguë que sur l'inhibition de la prolifération des LT proprement dite. Il a en effet été prouvé, à la fois chez la souris et chez l'homme, qu'après activation des Treg par

stimulation de leur TCR, ces derniers étaient capables de libérer le TNFR2 exprimé à leur surface (van Mierlo, Scherer et al. 2008). Ce TNFR2 soluble peut alors fixer le TNF α et inhiber ainsi son action pro-inflammatoire, à la manière de ce que ferait de façon plus artificielle un traitement par etanercept. Cette capacité de production de TNFR2 soluble par les Treg est environ 50 fois plus importante que celle observée chez les cellules CD4⁺ CD25⁻ et apparaît dissociée de leur action suppressive sur les Tconv. En effet, les Treg provenant de souris TNFR2-KO ne sont plus capables de bloquer l'action du TNF α in vitro, alors qu'ils conservent leur fonction inhibitrice de la prolifération des Tconv. Ces résultats ont été confirmés in vivo, dans une expérience de stimulation de la production d'IL-6 par injection de LPS chez la souris, dont on sait qu'elle est modulée par le TNF α . Dans cette expérience, les Treg provenant de souris sauvages inhibent bien la production d'IL-6 en réponse à l'injection de LPS alors que ce n'est pas le cas des Treg provenant de souris TNFR2-KO.

Rôle du TNF α dans la stabilité phénotypique des Treg et boucle d'amplification

TNFR2 joue également un rôle important dans la stabilité phénotypique et fonctionnelle des Treg, notamment après stimulation du TCR et/ou dans un environnement inflammatoire (Chen, Wu et al. 2013). En effet, le TNF α est capable de maintenir le niveau d'expression de Foxp3 dans ces contextes, et cet effet est aboli en cas d'utilisation d'un mAb anti-TNFR2 (mais pas anti-TNFR1) ou de Treg déficients pour TNFR2.

Par ailleurs, le TNF α est lui-même capable d'augmenter, en association avec l'IL-2, l'expression des membres de la superfamille des récepteurs au TNF que sont TNFR2, 4-1BB et OX40 à la surface des Treg, ce qui constitue une boucle d'amplification de ses effets sur cette population suppressive (Nagar, Jacob-Hirsch et al. 2010, Hamano, Huang et al. 2011). En effet, à côté du rôle déjà démontré de

TNFR2, l'induction de l'expression de 4-1BB et OX40 pourrait promouvoir à son tour la prolifération des Treg, tout en maintenant voire en majorant leurs puissantes capacités suppressives.

L'association TNF α + IL-2 est par ailleurs capable de convertir des Treg initialement TNFR2⁻ en Treg TNFR2⁺, ou autrement dit, de convertir des Treg non fonctionnels en Treg fonctionnels (Hamano, Huang et al. 2011). Cela est rendu possible par l'induction de l'expression de TNFR2 à la surface des Treg par l'IL-2, puis son amplification par le TNF α . Ces effets de l'association TNF α + IL-2 semblent spécifiques de la lignée Treg et ne sont pas observés si l'on traite de la même façon une population de Tconv. De plus, le TNF α est aussi capable de stimuler l'expression de TNFR2 et de Foxp3 par les Treg indépendamment de l'IL-2 (Hamano, Huang et al. 2011).

Controverse

L'effet du TNF α sur les Treg reste cependant sujet à controverse. En effet, certaines études montrent que chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR), un traitement par anti-TNF α , en l'occurrence l'infliximab, permettait 1) de restaurer la capacité des Treg à transmettre un phénotype suppresseur aux Tconv et à inhiber leur prolifération et leur production de cytokines ; 2) de diminuer l'apoptose spontanée des Treg observée chez ces patients ; 3) de restaurer une forte expression de FoxP3 par les Treg ; 4) d'augmenter significativement le nombre de Treg circulants chez les patients répondant au traitement (Ehrenstein, Evans et al. 2004, Toubi, Kessel et al. 2005, Valencia, Stephens et al. 2006). D'autres études conduites sur des Treg humains ont montré que le TNF α inhibait l'action suppressive des Treg in vitro, ce qui s'associait à une diminution de l'expression de Foxp3 ou à

son inactivation (Valencia, Stephens et al. 2006, Nagar, Jacob-Hirsch et al. 2010, Zanin-Zhorov, Ding et al. 2010, Nie, Zheng et al. 2013).

Ces résultats pourraient toutefois avoir été biaisés par le fait d'avoir conduit ces tests de suppression en présence de TNF α , plutôt que d'avoir pré-incubé les Treg avec cette cytokine (Nagar, Jacob-Hirsch et al. 2010, Zanin-Zhorov, Ding et al. 2010). Or le TNF α a un effet de co-stimulation propre sur les Tconv, les rendant probablement davantage résistants à l'effet suppresseur des Treg. Il reste bien une étude ayant montré une perte de l'action suppressive des Treg après pré-exposition au TNF α (Nie, Zheng et al. 2013), mais ces résultats n'ont pas pu être reproduits par 2 équipes qui ont beaucoup travaillé sur l'importance de l'axe TNF α /TNFR2 dans les Treg et qui s'accordent à dire que le TNF α n'inhibe pas la capacité suppressive des Treg humains (Zaragoza, Chen et al. 2016). Quant au fait que l'un des effets à long terme des traitements anti-TNF α soit une augmentation du nombre de Treg associée à une majoration de leur fonction suppressive (Ehrenstein, Evans et al. 2004, Nadkarni, Mauri et al. 2007), cela pourrait passer une augmentation de la différenciation des iTreg plutôt que par une action directe du TNF α sur les nTreg (Nadkarni, Mauri et al. 2007).

Nous avons vu plus haut que si TNFR2 était préférentiellement exprimé par les Treg, il pouvait l'être également, à un moindre niveau, par les Tconv. Il est par conséquent intéressant d'étudier aussi les conséquences de l'expression de TNFR2 par ces Tconv. Cela a été fait dans une étude publiée en 2010, qui a montré que l'expression de TNFR2 par les cellules CD4⁺ Foxp3⁻ n'était pas associée à l'induction de propriétés suppressives chez ces cellules (Chen, Hamano et al. 2010). En revanche, elle leur confère une résistance à l'action suppressive des Treg, ce qui va dans le sens de l'hypothèse, soulevée ci-dessus, d'une résistance accrue des Tconv à l'action suppressive des Treg lorsque les tests de suppression sont réalisés en présence de TNF α .

Treg et Tconv : vers une interaction bidirectionnelle ?

L'importance de l'interaction TNF α /TNFR2 pour stimuler la prolifération et les capacités suppressives des Treg pourrait suggérer qu'il existe peut-être un dialogue entre Tconv et Treg. En effet, si les nombreux mécanismes par lesquels les Treg peuvent exercer un effet suppresseur sur les Tconv ont été largement étudiés jusqu'ici, on ne peut pas en dire autant des éventuels mécanismes par lesquels les Tconv pourraient influencer sur les Treg. La relation entre Treg et Tconv a donc pendant longtemps été conçue comme étant à sens unique.

Or, une étude a montré que les Tconv, et plus particulièrement les Teff impliqués dans des mécanismes inflammatoires pathologiques, pouvaient de façon paradoxale stimuler la prolifération et les capacités suppressives des Treg (Grinberg-Bleyer, Saadoun et al. 2010). En effet, dans un modèle murin de diabète auto-immun, si l'injection de Teff spécifiques des îlots de Langerhans induit bien un diabète, leur co-transfert avec des Treg également îlots-spécifiques est associé à une protection vis-à-vis de la maladie, du fait d'une stimulation par ces Teff, au niveau du pancréas et de ses ganglions drainants, de la prolifération et des capacités suppressives des Treg. Si cette fonction helper des Teff CD4⁺ n'est pas dépendante de l'IL-2, elle semble en revanche impliquer des membres de la famille du TNF et est notamment partiellement dépendante du TNF α .

Les aspects mécanistiques d'un tel « boost » ont été davantage étudiés dans une nouvelle étude de la même équipe, publiée en 2015 (Baeyens, Saadoun et al. 2015). Pour qu'il puisse s'exercer, il faut que les Teff comme les Treg soient activés par leurs antigènes cognitifs, que ceux-ci soient identiques ou non. De plus, les médiateurs de ce boost diffèrent en fonction du contexte inflammatoire dans lequel il survient. Dans des conditions inflammatoires légères, il implique essentiellement le TNF α , OX40L et les DC plasmacytoïdes, tandis qu'en cas de forte inflammation, sa

médiation est assurée par le TNF α et l'IL-2. Enfin, si les Treg prolifèrent déjà activement d'eux-mêmes, on n'observe pas de boost additionnel par les Teff.

Il est également intéressant de noter que ce phénomène de boost a aussi été observé entre les LT CD8⁺ et les Treg, puisque dans un modèle d'infection virale au virus Friend, les Teff CD8⁺ sont capables de stimuler la prolifération et l'activation des Treg V β 5⁺ spécifiques de super-antigènes viraux et que cet effet passe par l'interaction entre le TNF α exprimé à la surface de ces Teff CD8⁺ et le récepteur TNFR2 exprimé par les Treg (Myers, Joedicke et al. 2013, Joedicke, Myers et al. 2014).

OBJECTIFS

Première partie : Mise au point et validation d'un nouveau système d'évaluation clinique de la GVHa chez la souris

Le premier objectif de ce travail de thèse, préalable indispensable à la réalisation d'expériences modifiant potentiellement le cours naturel de la GVHa chez la souris, a consisté à développer un nouveau système de gradation clinique de la GVHa murine, permettant autant que possible de surmonter les principales limites des systèmes d'évaluation actuellement à disposition.

Pour cela, nous avons décidé de reprendre le score clinique développé par l'équipe de Cooke (Cooke, Kobzik et al. 1996) et de le simplifier en évaluant chaque critère de façon binaire (absent ou présent) et en substituant le critère « activité », jugé trop peu spécifique, trop variable au cours du temps et trop subjectif dans son évaluation, par le critère « diarrhée », correspondant à une atteinte clinique majeure de la GVHa, non incluse dans le système de Cooke bien qu'associée à un fort impact pronostique au moins dans la GVHa humaine, et dont l'évaluation est finalement assez simple à condition d'être justement faite de façon dichotomique.

Dans le but de prouver sa pertinence quel que soit le degré de compatibilité entre les souris donneuses et receveuses, nous avons ensuite testé notre nouveau système de gradation clinique dans différents modèles d'allogreffe de CSH chez la souris : incompatibilité mineure, modèle semi-allogénique (équivalent d'une greffe haplo-identique chez l'homme) ou modèle complètement allogénique (incompatibilité majeure totale).

Nous avons également cherché à évaluer la présence d'une éventuelle corrélation entre le score clinique déterminé grâce à notre système pour chaque souris

receveuse et la sévérité des lésions histologiques de GVHa observées dans différents organes cibles après sacrifice de cette même souris.

Un autre objectif était d'essayer de démontrer que notre nouveau score clinique était capable à un instant t de prédire efficacement la survie des souris greffées, quel que soit le traitement que ces souris auraient pu éventuellement recevoir au préalable pour prévenir la GVHa.

Enfin, le dernier objectif de la première partie de ce travail de thèse a été de tester la reproductibilité de notre score clinique simplifié en faisant évaluer en aveugle et au cours du temps, par 3 expérimentateurs différents et n'ayant pas le même niveau d'entraînement, des souris greffées dans 2 combinaisons génétiques distinctes.

Seconde partie : Etude du rôle de l'axe TNF α /TNFR2 dans le contrôle de GVHa par les Treg

La seconde partie de ce travail de thèse avait pour objectif d'étudier l'importance de l'interaction entre le TNF α , notamment celui produit par les LT du donneur, et le récepteur TNFR2 exprimé par les Treg dans le contrôle de la GVHa par ces Treg.

En effet, les démonstrations récentes de l'importance du récepteur TNFR2 pour la prolifération et les capacités suppressives des Treg d'une part (Chen, Baumel et al. 2007, Chen, Subleski et al. 2008), et de la capacité des Teff à stimuler également, dans un modèle de diabète auto-immun et via la sécrétion de TNF α , la prolifération et la fonction suppressive des Treg d'autre part (Grinberg-Bleyer, Saadoun et al. 2010), nous ont conduit à émettre l'hypothèse que l'effet protecteur conféré par ces Treg dans des modèles murins de GVHa était peut-être dépendant de l'interaction entre le TNF α , en particulier celui produit par les LT alloréactifs du donneur, et le TNFR2.

Notre objectif a donc été ici de tester l'impact du blocage de l'interaction entre le TNF α et le récepteur TNFR2 exprimé par les Treg dans notre modèle, précédemment décrit (Martin, Gregoire et al. 2013), de contrôle de la GVHa par des HY-Treg. Afin de renforcer la robustesse de nos résultats, nous avons choisi de bloquer cette interaction de 3 façons différentes :

- En utilisant des Treg déficients pour le récepteur TNFR2
- En utilisant un mAb bloquant anti-TNFR2
- En utilisant des LT provenant de souris donneuses déficientes pour le TNF α (dans ce dernier cas, seul l'effet du TNF α produit par les LT du donneur est donc évalué)

OBJECTIFS

Outre l'impact de ce blocage sur la survie des souris et sur le développement de lésions cliniques de GVHa, nous avons également cherché à déterminer son effet sur le phénotype des Treg et Tconv in vivo, notamment en ce qui concerne le niveau d'expression de certains marqueurs comme Foxp3 et CD25 pour les Treg et la capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires pour les Tconv.

RESULTATS

Premier article

« Simple, reproducible and efficient clinical grading system for murine models of acute graft-versus-host disease »

Article soumis à Biology of Blood and Marrow Transplantation en janvier 2017

Avoir à disposition un outil fiable pour évaluer la GVHa dans les modèles expérimentaux est un préalable indispensable à la conduite d'une recherche pré-clinique de bonne qualité dans ce domaine, afin d'élucider les mécanismes physiopathologiques de cette maladie et, surtout, de tester de nouvelles approches thérapeutiques.

Si, chez l'homme, il existe depuis de nombreuses années une classification pronostique de la GVHa reposant sur la détermination assez objective de stades de sévérité pour 3 critères clinico-biologiques, l'évaluation clinique de la GVHa chez la souris a reposé initialement sur des critères assez peu spécifiques, bien que pertinents, comme la courbe d'évolution pondérale en post-greffe ou la survie des souris receveuses, puis sur des scores cliniques pas toujours simples à utiliser en pratique courante et dont en tout cas aucun n'a réellement fait la preuve de sa performance (valeur pronostique et corrélation aux lésions histologiques de la maladie) ni de sa reproductibilité.

Dans ce premier article, nous proposons donc un nouveau score clinique d'évaluation de la GVHa expérimentale reposant sur l'appréciation assez simple, car dichotomique, de 4 paramètres visuels combinée à l'évaluation objective de la perte pondérale des souris receveuses. Nous démontrons que ce nouveau système de gradation est la fois prédictif de la survie, corrélié à la sévérité des lésions

histologiques de GVHa et reproductible. Nous validons également la pertinence de cet outil dans diverses combinaisons génétiques entre souris donneuses et receveuses.

Simple, reproducible and efficient clinical grading system for murine models of acute graft-versus-host disease

Sina Naserian,^{1,2*} Mathieu Leclerc,^{1,2,3*} Allan Thiolat,^{1,2} Caroline Pilon,^{1,2,4} Cindy Le Bret,⁵ Yazid Belkacemi,⁵ Sébastien Maury,^{1,2,3} Frédéric Charlotte,⁶ José L. Cohen^{1,2,4}

1. Université Paris-Est, UMR_S955, UPEC, F-94000, Créteil, France

2. Inserm, U955, Equipe 21, F-94000, Créteil, France

3. APHP, Service d'hématologie clinique, Hôpital Henri Mondor 94010 Créteil, France.

4. UPEC, APHP, Inserm, CIC Biothérapie, Hôpital Henri Mondor 94010 Créteil, France.

5. UPEC, APHP, Service d'oncologie-radiothérapie, Hôpital Henri Mondor 94010 Créteil, France.

6. APHP, Hôpital Pitié Salpêtrière, service d'anatomopathologie, Paris, France

* S. Naserian and M. Leclerc contributed equally to this paper and are first co-authors

Running title: Clinical grading system for experimental acute GVHD

Correspondence to: José L. Cohen

Tel (+33)1 49814475; fax (+33) 1 48 99 33 45,

E-mail address: jose.cohen@inserm.fr

Abstract (words)

Acute graft-versus-host disease (aGVHD) represents a challenging complication after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). Despite the intensive pre-clinical research in the field of prevention or treatment of aGVHD, and the presence of a well-established clinical grading system to evaluate human aGVHD, such a valid tool is still lacking for the evaluation of murine aGVHD. Indeed, several scoring systems have been reported, but none of them has been properly evaluated and they share some limitations: they incompletely reflect the disease, rely on severity stages that are distinguished by subjective criteria and are not easy to discriminate, which could render each assessment more time-consuming, and their reproducibility among different experimenters is uncertain. Consequently, clinical murine aGVHD description is often based merely on animal weight loss and mortality. Here, we propose a simple scoring system of aGVHD relying on the binary (yes or no) evaluation of 5 important visual parameters that reflect the complexity of the disease without the need to sacrifice the mice. We show that this scoring system is consistent with the histological staging of aGVHD across several donor/recipient mice combinations. This system is also predictive of the survival of recipient mice when used early after transplant, and is highly reproducible between experimenters.

Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is the treatment of choice for many malignant hematological disorders, such as acute leukemias or the myelodysplastic syndrome (Thomas, Storb et al. 1975). Although this cell-based therapy allows for a good prevention of disease relapse through the eradication of residual leukemic cells by donor T cells, the so-called graft-versus-leukemia effect (GVL) (Horowitz, Gale et al. 1990), the harmful counterpart of GVL, known as graft-versus-host disease (GVHD), is responsible for the destruction of the recipient's normal cells and tissues, and is a major cause of post-transplant morbidity and mortality. GVHD accounts for 15-30% of deaths after allo-HSCT and its incidence can be as high as 60-80% of transplant recipients in case of one-antigen HLA mismatched unrelated donor (Ferrara, Levine et al. 2009). Acute GVHD (aGVHD) usually occurs during the first 3 months after transplant and typically affects 3 target organs: skin, intestinal tract, and liver.

To improve the outcome of patients suffering from aGVHD, or even prevent its occurrence, many preclinical studies, mainly conducted in mice, have focused on this disease over the past decades. The indispensable prerequisite to properly assess the efficacy of a therapeutic approach of aGVHD, is to be able to efficiently and easily evaluate and grade the intensity and/or severity of this condition throughout the experiment. For the assessment of human aGVHD, a simple and efficient clinical grading system has been widely used for decades (Przepiorka, Weisdorf et al. 1995).

Regarding murine aGVHD, the situation is less clear. A rapid analysis of the literature reveals at least two approaches: aGVHD is either described merely through animal weight curve evolution and mortality, or evaluated according to a multiplicity of clinical scoring systems that have usually been adapted/modified in each laboratory from the one originally described by Cooke *et al.* in 1996 (Cooke, Kobzik *et al.* 1996). To our knowledge, none of these many grading systems that have been described (Cooke, Kobzik *et al.* 1996, Anderson, McNiff *et al.* 2003, Mutis, van Rijn *et al.* 2006, Wilson, Cullup *et al.* 2009, Castor, Rezende *et al.* 2010, Lai, Chou *et al.* 2012, Budde, Kolb *et al.* 2014, Doisne, Huber *et al.* 2015) (table 1), has been properly evaluated in terms of reproducibility, consistency with histological findings, prediction of survival, and validity in multiple donor/recipient mice genetic combinations. Moreover, most of them share several drawbacks. First of all, even though symptoms related to gut aGVHD, mainly diarrhea, are a major clinical feature of this disease in humans and mice, reflecting a high degree of severity, most of the murine clinical grading systems, including the one reported by Cooke *et al.*, do not include a specific evaluation of these symptoms. The main reason for this absence is the fact that these scores were usually developed to capture differences in severity for each clinical parameter and one can easily figure out that quantitating daily stool volume or frequency in mice would be virtually impossible. However, stating for each mouse if diarrhea is present or not is quite easy, by simple examination of the anal area or emission of liquid stool at manipulation. Another reason mentioned to explain the lack of diarrhea evaluation is the fact that some of the other clinical parameters evaluated in the scores, such as weight loss, hunching or activity, could probably reflect cachexia and be associated with gut aGVHD. However, these clinical signs are not

specific at all and seem to be more related to a poor clinical condition, whatever the cause of this weakness. The second limitation of clinical grading systems of murine aGVHD, could be the separation of each item into several severity stages, usually scored from 0 to 2. Although, this was originally intended to increase the ability to easily distinguish different stages for each item, just like in the human grading system, it seems that the distinction between the three severity stages is often hard to make, and could impact on the reproducibility of the evaluation between 2 different observers. This is probably due to the fact that, unlike human grading system, most of the items in murine scoring systems are not separated into different stages according to objective measurements, but rather thanks to a subjective assessment of their intensity. Finally, the use of a more simple, i.e. binary evaluation of each item (“yes or no”), apart from being less subjective, could also be less time-consuming as compared to a stratified classification.

Therefore, we developed and tested an adaptation of the murine clinical grading system described by Cooke *et al.* (Cooke, Kobzik *et al.* 1996), based on the binary evaluation (absence = 0 or presence = 1) of five essential signs and symptoms of the disease (Table 1) over time. This tool allows us to overcome all the above-mentioned limitations of the currently used grading systems. Moreover, we show that it is highly reproducible, consistent with histological features of the disease and applicable through a wide variety of genetic combinations. It is also a powerful predictor of mice survival.

Materials and Methods

Mice

Wild-type BALB/c (H-2^d), DBA2 (D2, H-2^d), C57BL/6 (B6, H-2^b), C3H (H-2^k), B6C3HF1 (B6xC3H, H-2^{kb}) and B6D2F1 (B6xD2, H-2^{bd}) mice were purchased from Harlan Laboratories (Gannat, France) and Charles River Laboratories (Saint-Germain-Nuelles, France). Mice were housed under specific pathogen-free conditions. All experimental protocols were approved by the local ethics committee (authorization N° 11/12/12-5B) and are in compliance with European Union guidelines.

GVHD and transplantation models

Eight-to-twelve weeks-old recipient B6C3F1, B6D2F1, C3H or D2 female mice received a 10-Gray irradiation followed by retro-orbital infusion of 10×10^6 bone marrow (BM) cells (B6 or BALB/c) + 2×10^6 CD3⁺ (B6 or BALB/c) conventional T cells (Tconv). BM and T cell suspensions were prepared using leg bones and splenocytes as previously described (Cohen, Trenado et al. 2002, Gaidot, Landau et al. 2011, Martin, Gregoire et al. 2013).

Acute GVHD grading

Acute GVHD clinical score was calculated 3 times a week. Each of the 5 following parameters was scored 0 (if absent) or 1 (if present): weight loss > 10% of initial weight, hunching posture, skin lesions, dull fur, and diarrhea attested by liquid stool production at time of mice manipulation or its presence at the anal area. Dead mice received a total score of 5 until the end of experiment. Mice were sacrificed in case of weight loss > 30% of initial weight or upon reaching the maximal clinical grade (i.e. 5/5).

Histology

After mice death or sacrifice, small and large bowel, liver, lung and skin samples were fixed in 4% formaldehyde solution and embedded in paraffin. For each organ, 5- μ m sections were stained with H&E for histological examination. One pathologist analyzed the slides in a blinded fashion to assess the intensity of GVHD. Six parameters were scored for small and large bowel according to a zero to five point scale described by Hill et al. (surface colonocyte lesions or villous blunting, crypt regeneration, crypt epithelial cell apoptosis, crypt loss, lamina propria inflammation, and mucosal ulceration) ¹⁶; seven parameters for the liver according a zero to three point scale (portal inflammation, bile ducts lesions, periportal necrosis, endothelialitis, lobular necro-inflammatory activity, zonal necrosis, sinusoidal lymphocytosis) ¹⁶; three parameters for the lung according to a zero to three point scale described by Cooke *et al.* (periluminal lymphocytic sheaths, alveolar/interstitial lymphocytic infiltrates, the percentage of involved tissue) (Cooke, Kobzik et al. 1996); three

parameters for the skin according to a zero to three point scale described by Ferrara *et al.* (basal cell layer vacuolization, epidermal and follicular dyskeratosis, and epidermal and dermal lymphocytic infiltrate) ^(Ferrara, Guillen et al. 1986). Scores of each item were added together to provide a total score for each organ.

Statistical analysis

Prism (GraphPad Software) was used for statistical analysis. Kaplan-Meier survival curves were compared using the log-rank test. For analysis of aGVHD clinical grading curves, the area under curve (AUC) was calculated for each mouse then t-test or one-way ANOVA with post-hoc analysis were performed depending on the number of compared variables.

Results

The clinical grading system is consistent with the histological evaluation of aGVHD

Three different models of mismatched BM transplantation were performed: fully-allogeneic (B6 → C3H females); semi-allogeneic (B6 → B6C3F1 females); and minor-antigen mismatch (BALB/c → D2 females). Recipient mice were lethally irradiated and then received freshly isolated BM cells with CD3⁺ Tconv_s at day 0 in order to induce aGVHD. In the fully or semi-allogeneic combinations in our hands, all mice died with characteristic clinical signs of aGVHD by day 30 and 45, respectively (not shown). When donors and recipients differed for minor antigens, the defining clinical signs of aGVHD mainly included hunching posture, skin lesions, and dull fur, but not weight loss or diarrhea. Mice had to be sacrificed at day 45 due to prostrated posture and consequently for ethic reasons. Clinical scores of aGVHD were calculated three times per week according to the Materials and Methods section, starting from day 10 after transplant. Indeed, we estimated that clinical signs occurring before day 10 were mostly induced by the conditioning regimen rather than by aGVHD. Of note, in mice transplanted with BM alone, we never detected any clinical signs of GVHD and 100% of them survived until day 60 (n=25). In order to correlate the clinical observations with the histopathological signs of the disease, mice showing different grades of aGVHD were sacrificed (i.e. at different time points) and target organs of aGVHD (skin, lung, liver, small intestine and colon) (Markey, MacDonald et al. 2014) were examined by a blinded pathologist to assess the intensity of aGVHD as illustrated (Figure 1a). When we looked at each target organ,

in the fully allogeneic combination, we observed a clear correlation between clinical scores and histopathological scores in the liver, lung, small intestine, and colon. Regarding the skin, the histopathological scores were constantly high, irrespective of the clinical score (Supplementary Figure S1). In the semi-allogeneic combination, a good correlation was observed in the skin, and colon, and to a lesser degree in the liver and lung (Supplementary Figure S2). In aGVHD due to minor antigen disparities between donors and recipients, we observed quite modest signs of aGVHD in all studied target organs (Supplementary Figure S3). Importantly, when summing up the scores of all target organs of aGVHD for each mouse, we observed a complete correlation between our new clinical grading system and the histological scores in all of the three combinations (Figure 1b, c and d) or in a mix of mice regardless of their genetic background (Figure 1e). Such a correlation was observed for high, moderate, or low histologic aGVHD characterization i.e. the higher the clinical score, the higher the histological score. These data suggest that our grading system provides a complete and precise evaluation of the clinical lesions of aGVHD. This grading scale can be applied all along the duration of the experiment and the disease, in a complete and constant correlation with its histological counterpart.

The clinical grading system is predictive of mice survival

To assess the capacity of our grading system to predict mice survival after allo-HSCT, we used our experimental model in which aGVHD was prevented by transfer of therapeutic donor regulatory T cells (Treg) (Martin, Gregoire et al. 2013). In a

retrospective meta-analysis, we merged clinical (Figure 2a) and survival (Figure 2b) data from 10 independent experiments in which 93 mice received (i) donor BM cells + Tconvs (GVHD control group) or (ii) donor BM cells + Tconvs + Tregs (treatment 1) or (iii) donor BM cells + Tconvs + Tregs + an additional treatment that inhibited Treg effect (treatment 2), as previously reported (Leclerc, Naserian et al. 2016). We evaluated the survival of mice according to their clinical score of aGVHD calculated at day 20 (mice with a clinical score of 5 or dead before day 20 were excluded) post-transplant, irrespective of their assigned treatment. This time cut-off point was selected because, as shown by our previous experiments using this model, the first symptoms of aGVHD usually start to develop around day 15. Our results reveal a remarkable increase in the probability of survival for mice with grade 0 or 1 at day 20 as compared with those graded 2 or more (Figure 2). Importantly, these two curves perfectly differentiate mice that received therapeutic Treg (86% of mice graded 0 or 1 at day 20) from mice that did not or that received the inhibitory treatment. These results prove that our clinical grading system is a simple tool that efficiently predicts survival of mice early after transplant.

The clinical grading system is reproducible among experimenters

One of the main drawbacks of the currently used grading systems is that by dividing each criterion into several severity stages according to mostly subjective parameters, the global score calculated for each mouse is highly dependent on the experimenter and its reproducibility is at least uncertain. To test the reproducibility of our approach,

we selected two models of semi-allogeneic BM transplantation (B6 → B6C3F1 females and B6 → B6D2F1 females) and performed four independent experiments. Three separate experimenters, of whom two were completely blinded, graded the mice three times a week using our clinical grading system. Experimenter 1 was the first author of this manuscript whereas both experimenters 2 and 3 had limited or no experience in grading aGVHD. A fourth experimenter trained experimenters 2 and 3 to score aGVHD. Our results show very similar clinical scores over time in both genetic combinations, with a degree of concordance that even seemed to increase as aGVHD lesions got fully established, suggesting the high reproducibility of our grading system (Figure 3).

Discussion

The clinical grading system developed by Cooke *et al.* in 1996 (Cooke, Kobzik *et al.* 1996) can be considered as the reference of murine aGVHD assessment, having been used directly or with minor adaptations by multiple research teams worldwide during the last 2 decades, in a multiplicity of aGVHD models and mice combinations. However, neither the reproducibility of this grading system and its derivatives, nor its correlation to histological findings and capacity to predict survival has ever been properly tested. We also believe that it could be improved in terms of ease of use, reproducibility and completeness of the clinical features assessed.

The key point of the adaptation of Cooke's scoring system that we propose is its simplicity (yes or no) that facilitates the reproducibility among different experimenters. To our knowledge, this is the first time that the reproducibility of a murine clinical grading system has been properly tested and demonstrated. Of course, one could argue that using this scoring system 3 times per week could be time-consuming. We used this frequency in order to strongly validate the relevance of our system over time, but we recommend using it once to twice a week in routine practice.

We also demonstrated that our grading system strongly correlates with histological scoring, regardless of allogeneic diversities or genetic background of the mice. This also renders the complete evaluation of aGVHD possible via visual parameters that neatly reflect the complexity of the disease without the need to sacrifice the mice. Interestingly, as observed in this work, the disease can reach different target organs depending on the genetic combination that is used (see Supplementary Figures 1-3);

yet our grading system appears unaffected by these disparities. Rather, as illustrated by the minor antigen mismatch BALB/c → D2 combination, it enabled us to collect further clinical information in a combination in which weight loss and survival of recipient mice, the two mostly used criteria, were not affected by aGVHD. Additionally, when applying this scoring system at day 20 post-transplant without considering the treatment administered to recipient mice, we were able to establish a strong predictive factor for survival.

In conclusion, we report a new clinical grading system for murine aGVHD, adapted from the one described by Cooke *et al.* (Cooke, Kobzik *et al.* 1996), in order to overcome some of its limitations. For the first time, we show that such a scoring system, apart from being simple, is highly reproducible, correlated to the severity of histological lesions of aGVHD and predictive of survival. If adopted by other research teams, we believe this comprehensive and transversal grading system could be used as an accurate tool to compare results acquired by different teams and become a new standard for murine aGVHD evaluation.

Acknowledgements

Mathieu Leclerc was supported by a “*Poste d’Accueil Inserm*”, Sina Naserian by the “*Région Ile de France, DIM Biothérapie*” then by the *Département Hospitalo-Universitaire “Virus-Immunité-Cancer*”. This work was partly supported by *Association Française contre les Myopathies, Agence de la Biomédecine, Association de Recherche contre les Hémopathies Malignes, Fondation pour la Recherche Médicale* (Victor et Erminia Mesclé prize), and *Fondation Ramsay Générale de Santé* (Cellular Therapy and Regenerative Medicine prize).

Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest to declare

References

- 1 Thomas, E. *et al.* Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N Engl J Med* **292**, 832-843 (1975).
- 2 Horowitz, M. M. *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 555-562. (1990).
- 3 Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P. & Holler, E. Graft-versus-host disease. *Lancet* **373**, 1550-1561 (2009).
- 4 Przepiorka, D. *et al.* 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* **15**, 825-828 (1995).
- 5 Cooke, K. R. *et al.* An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* **88**, 3230-3239 (1996).
- 6 Anderson, B. E. *et al.* Memory CD4⁺ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J Clin Invest* **112**, 101-108 (2003).
- 7 Budde, H. *et al.* Modified extracorporeal photopheresis with cells from a healthy donor for acute graft-versus-host disease in a mouse model. *PLoS One* **9**, e105896, doi:10.1371/journal.pone.0105896 (2014).
- 8 Castor, M. G. *et al.* The CCL3/macrophage inflammatory protein-1alpha-binding protein evasin-1 protects from graft-versus-host disease but does not modify graft-versus-leukemia in mice. *J Immunol* **184**, 2646-2654, doi:10.4049/jimmunol.0902614 (2010).
- 9 Doisne, J. M., Huber, C. M., Okkenhaug, K. & Colucci, F. Immunomodulation of Selective Naive T Cell Functions by p110delta Inactivation Improves the Outcome of Mismatched Cell Transplantation. *Cell reports*, doi:10.1016/j.celrep.2015.01.002 (2015).
- 10 Lai, H. Y., Chou, T. Y., Tzeng, C. H. & Lee, O. K. Cytokine profiles in various graft-versus-host disease target organs following hematopoietic stem cell transplantation. *Cell transplantation* **21**, 2033-2045, doi:10.3727/096368912X653110 (2012).

- 11 Mutis, T. *et al.* Human regulatory T cells control xenogeneic graft-versus-host disease induced by autologous T cells in RAG2^{-/-}gammac^{-/-} immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* **12**, 5520-5525 (2006).
- 12 Wilson, J. *et al.* Antibody to the dendritic cell surface activation antigen CD83 prevents acute graft-versus-host disease. *J Exp Med* **206**, 387-398, doi:10.1084/jem.20070723 (2009).
- 13 Cohen, J. L., Trenado, A., Vasey, D., Klatzmann, D. & Salomon, B. L. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* **196**, 401-406. (2002).
- 14 Gaidot, A. *et al.* Immune reconstitution is preserved in hematopoietic stem cell transplant co-administered with regulatory T cells for GVHD prevention. *Blood* **117** 2975-2983 (2011).
- 15 Martin, G. H. *et al.* In vivo activation of transferred regulatory T cells specific for third-party exogenous antigen controls GVH disease in mice. *Eur J Immunol* **43**, 2263-2272, doi:10.1002/eji.201343449 (2013).
- 16 Ferrara, J., Guillen, F. J., Sleckman, B., Burakoff, S. J. & Murphy, G. F. Cutaneous acute graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens in a murine model: histologic analysis and correlation to clinical disease. *The Journal of investigative dermatology* **86**, 371-375 (1986).
- 17 Markey, K. A., MacDonald, K. P. & Hill, G. R. The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice. *Blood* **124**, 354-362, doi:10.1182/blood-2014-02-514745 (2014).
- 18 Leclerc, M. *et al.* Control of GVHD by regulatory T cells depends on TNF produced by T cells and TNFR2 expressed by regulatory T cells. *Blood* **128**, 1651-1659, doi:10.1182/blood-2016-02-700849 (2016).

Table 1. Main references for aGVHD grading

Name and Date	Criteria	Points for each criteria	Total points	Frequency	Time of sacrifice
Kenneth R. Cooke et al 1996 (ref 8)	Weight loss, Posture, Activity, Fur texture, Skin integrity	0 to 2	10	Weekly weighting + scoring at the time of analysis	At the end of experiment
Britt E. Anderson et al 2003 (ref 5)	Skin ulcers with different size of alopecia, The site of skin lesion	Skin ulcers less than 1 cm ² = 1, between 1 and 2 cm ² = 2, more than 2 cm ² = 3 + 0.3 points for each site of skin disease (ears, tails, paws)	3.9	Every 3 days	At the end of experiment
Tuna Mutis et al 2006 (Xeno GVHD) (ref 11)	Weight loss, mobility, General appearance	0 to 2 for mobility 0, normal fur; 1, ruffled fur; 2, ruffled fur + red swollen skin; 3, ruffled fur + red swollen skin + patchy alopecia)	5 + weight loss was >10%	Weekly	Weight loss was >10%, and the scores for general appearance and mobility at least 1
John Wilson et al 2009 (ref 12)	Weight loss, Posture, Activity, Fur texture, Skin integrity, diarrhea	0 to 2	12	Daily	Overall score ≥5
Marina G. M. Castor Et al 2010 (ref 7)	Weight loss, Posture, Activity, Fur texture, skin integrity, diarrhea, and occult blood in feces	0 to 2	14	Every 2 days	At the end of experiment
Hsiu-Yu Lai et al 2012 (ref 10)	Weight loss, Posture, Activity, Fur texture, Skin integrity, Diarrhea	0 to 2 For diarrhea No (0) or yes (1)	11	Twice a week	At the end of experiment
Holger Budde et al 2014 (ref 6)	Posture, Activity, Fur/Skin and Diarrhea	0 to 2	8	Daily	Overall score = 6
Jean-Marc Doisne et al 2015 (ref 9)	Weight loss, Posture, Activity, and Fur texture	0 to 2	8	At the time of sacrifice	20% or 25% of weight loss depending on the protocol
Naserian S. et al 2016	Weight loss, Hunched posture, Fur texture, Skin integrity, Diarrhea	No =0 Yes=1	5	3 times per week	1) Weight loss more than 30% and/or 2) overall score of
Parameters taken into account for each type of clinical grading					

Figure 1

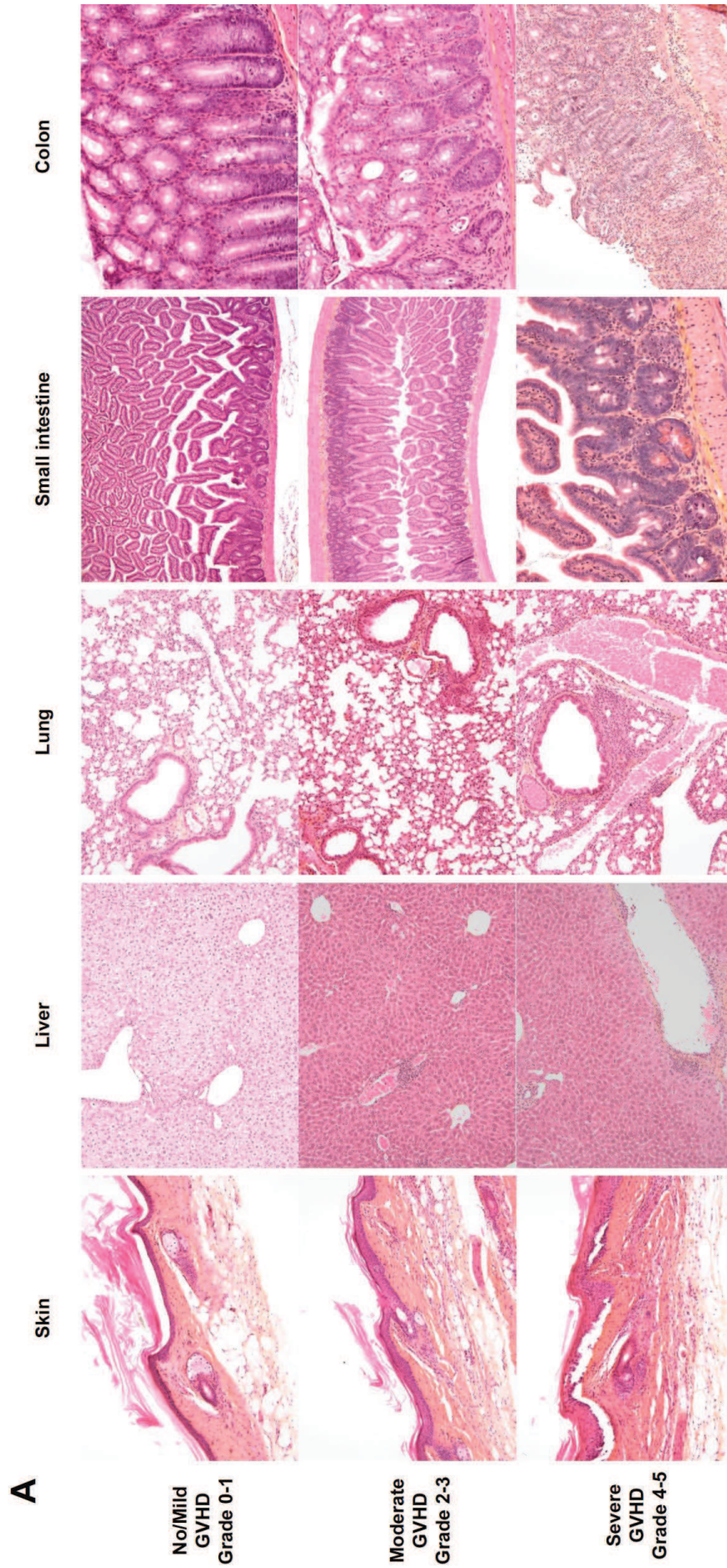


Figure 1

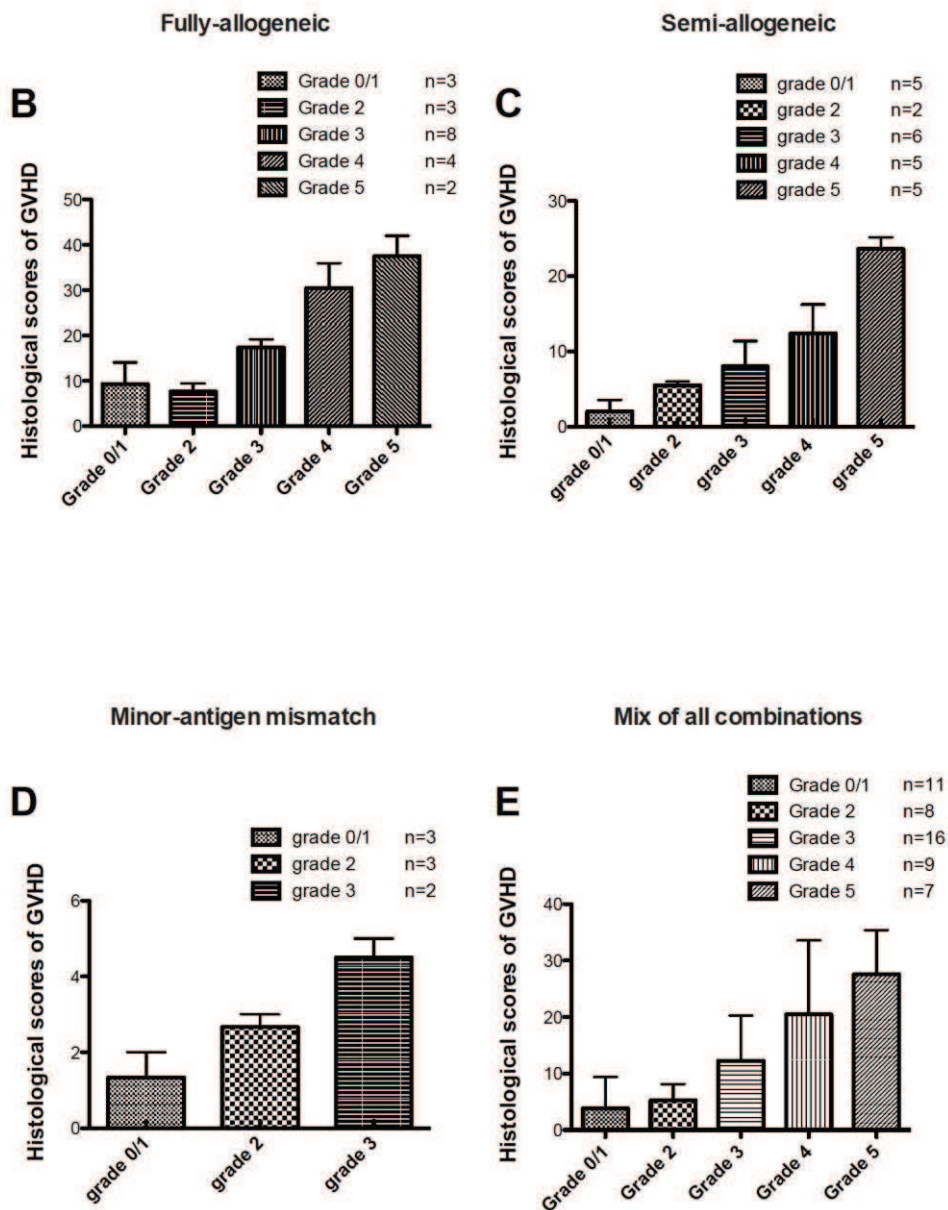


Figure 1. Correlation between clinical and histological scores of aGVHD. **(A)** Histopathological examination of aGVHD was assessed by a blinded pathologist in the skin (x100), liver (x100), lung (x100), small intestine (x25, x25, x100) and colon (x100) of transplanted animals, as illustrated in correlation with the clinical grade of transplanted animals. **(B, C and D)** Clinical grade (x axis) and histological grade corresponding to the sum of scores calculated for each target organ (y axis) are represented. **(E)** Correlation between clinical and histological scores of GVHD after compiling all the data in all the donor-recipient genetic combinations.

Figure 2

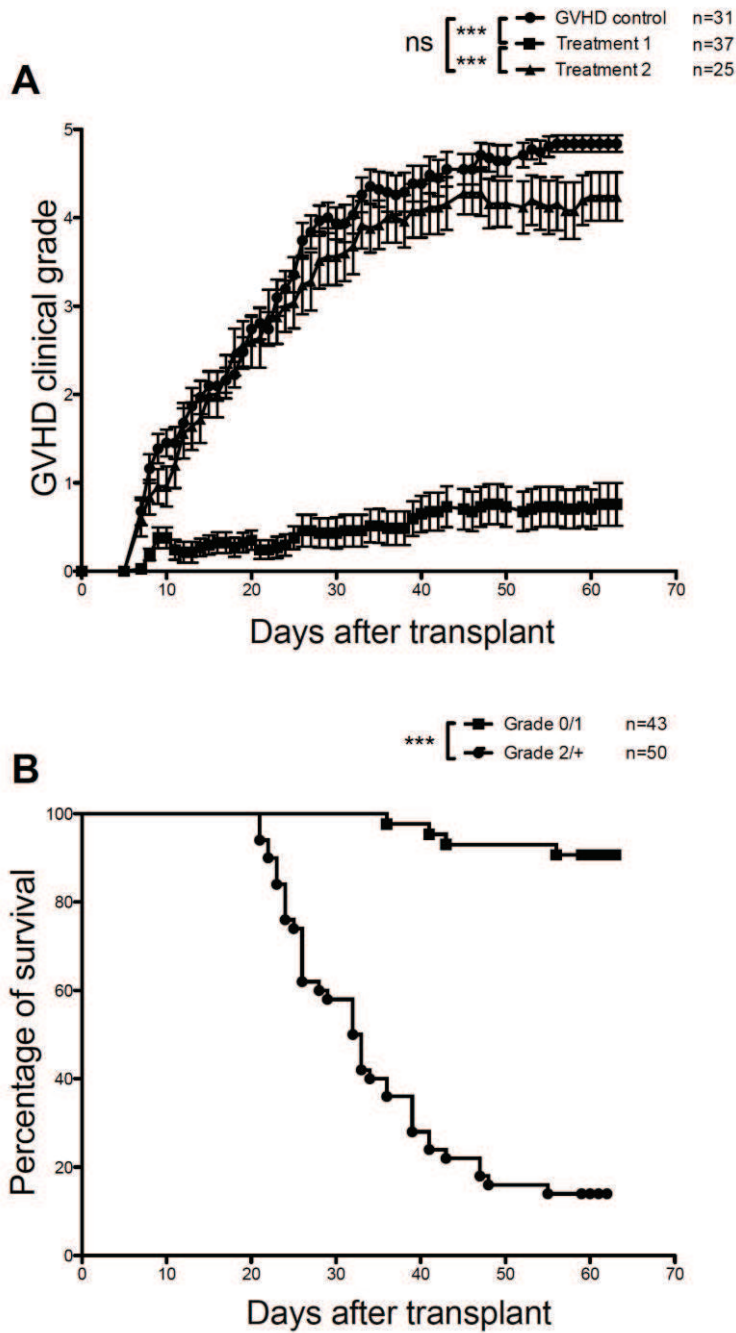


Figure 2. Retrospective meta-analysis from 10 independent experiments. **(A)** Evolution of clinical scores over time for each group of recipient mice. **(B)** Survival curves established for mice displaying no or mild (grade 0-1) versus moderate to severe (grade 2-5) clinical aGVHD at day 20 post-transplant. Survival and clinical scoring data were compiled from 10 aGVHD experiments including 97 transplanted mice.

Figure 3

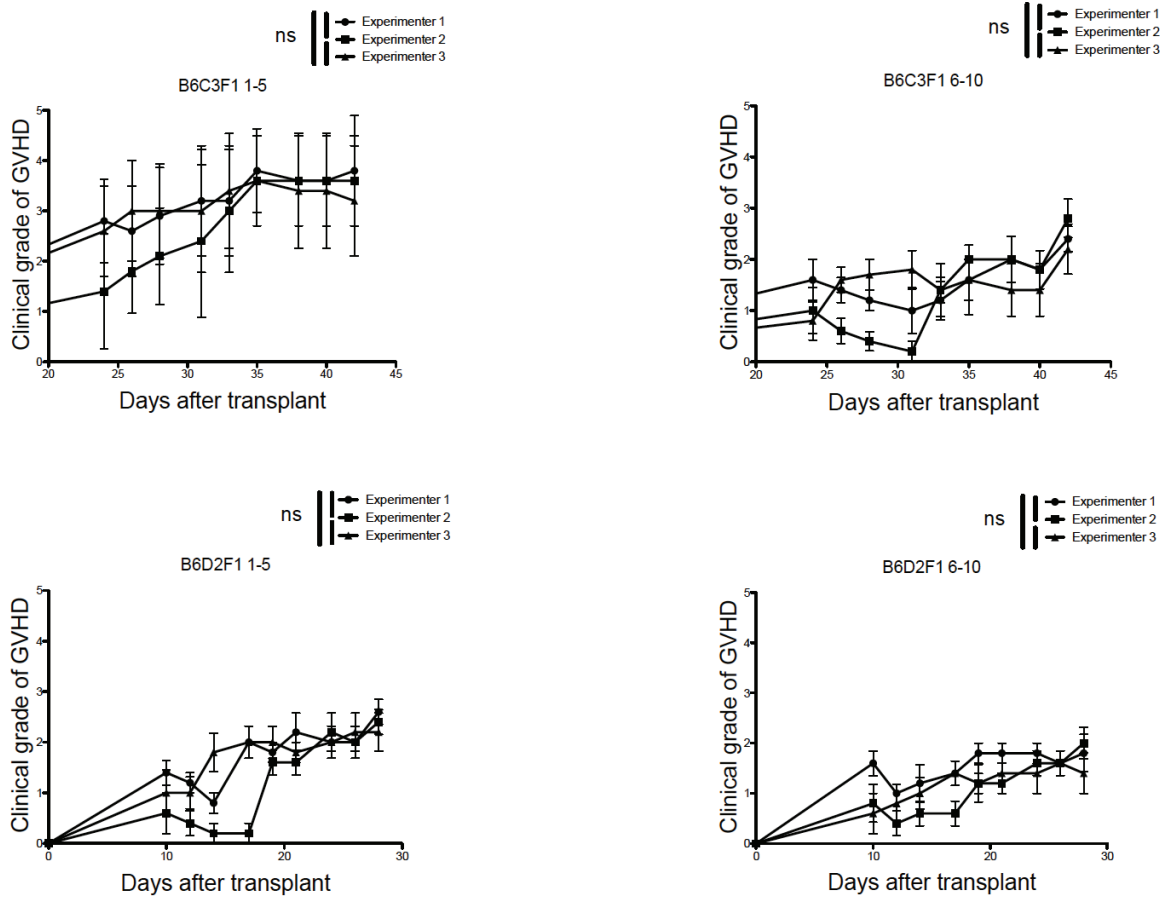
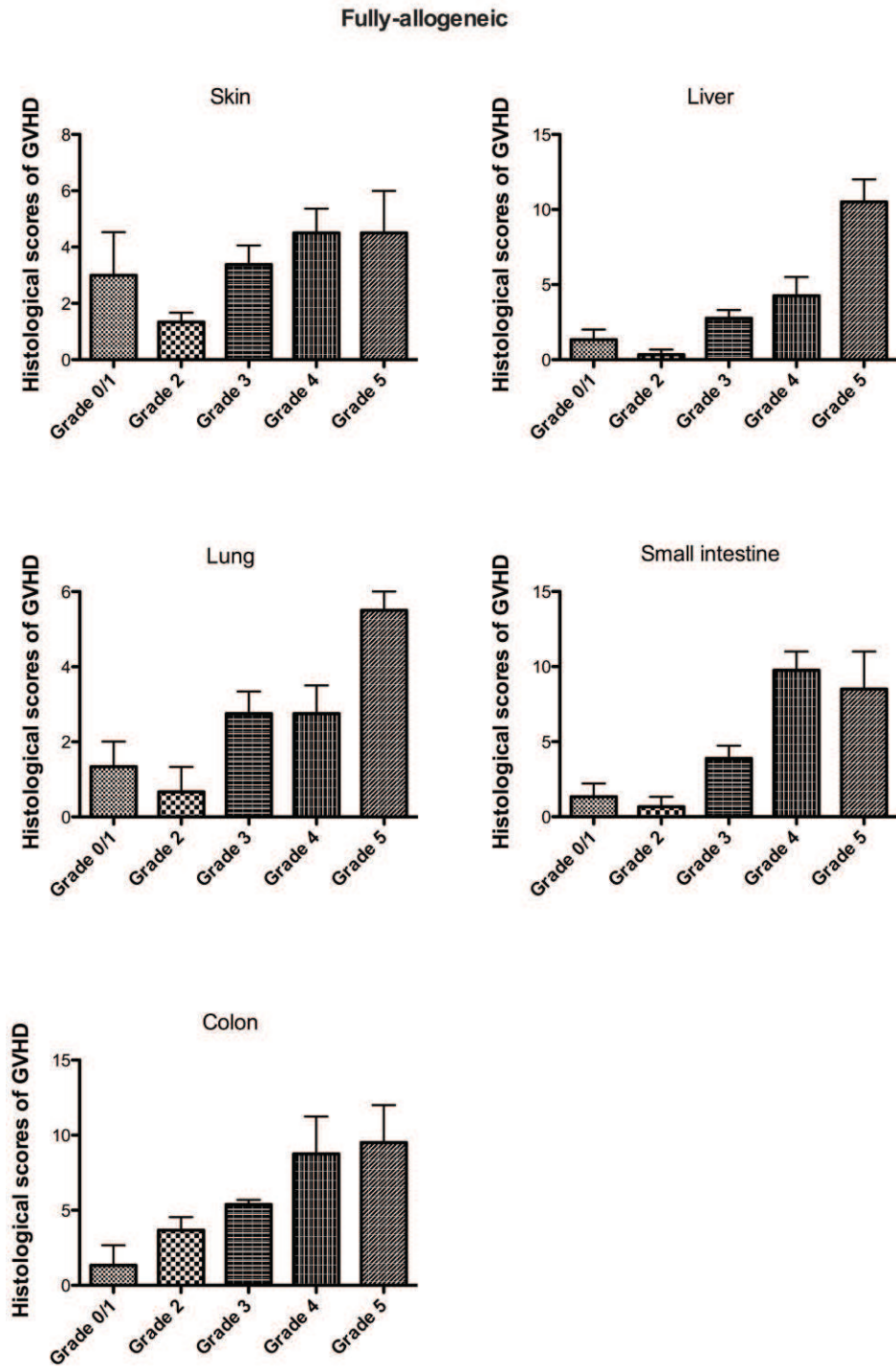
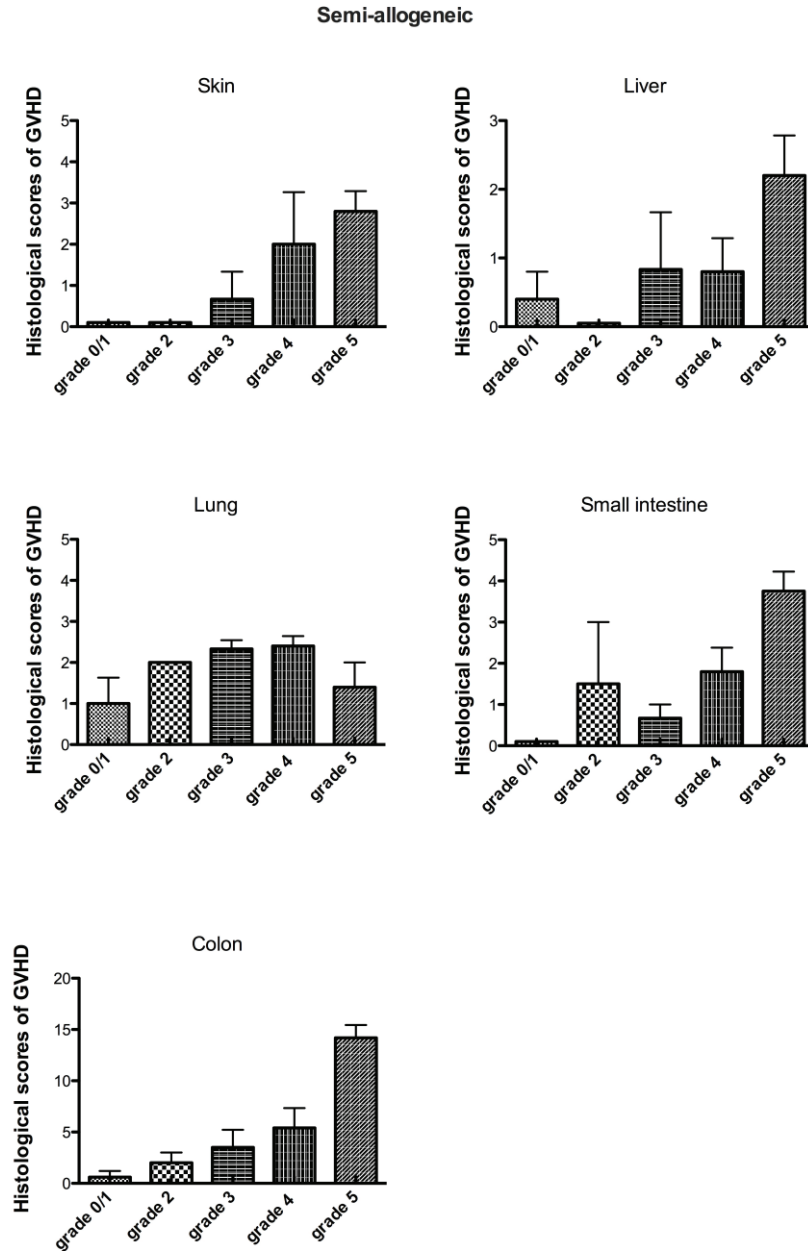


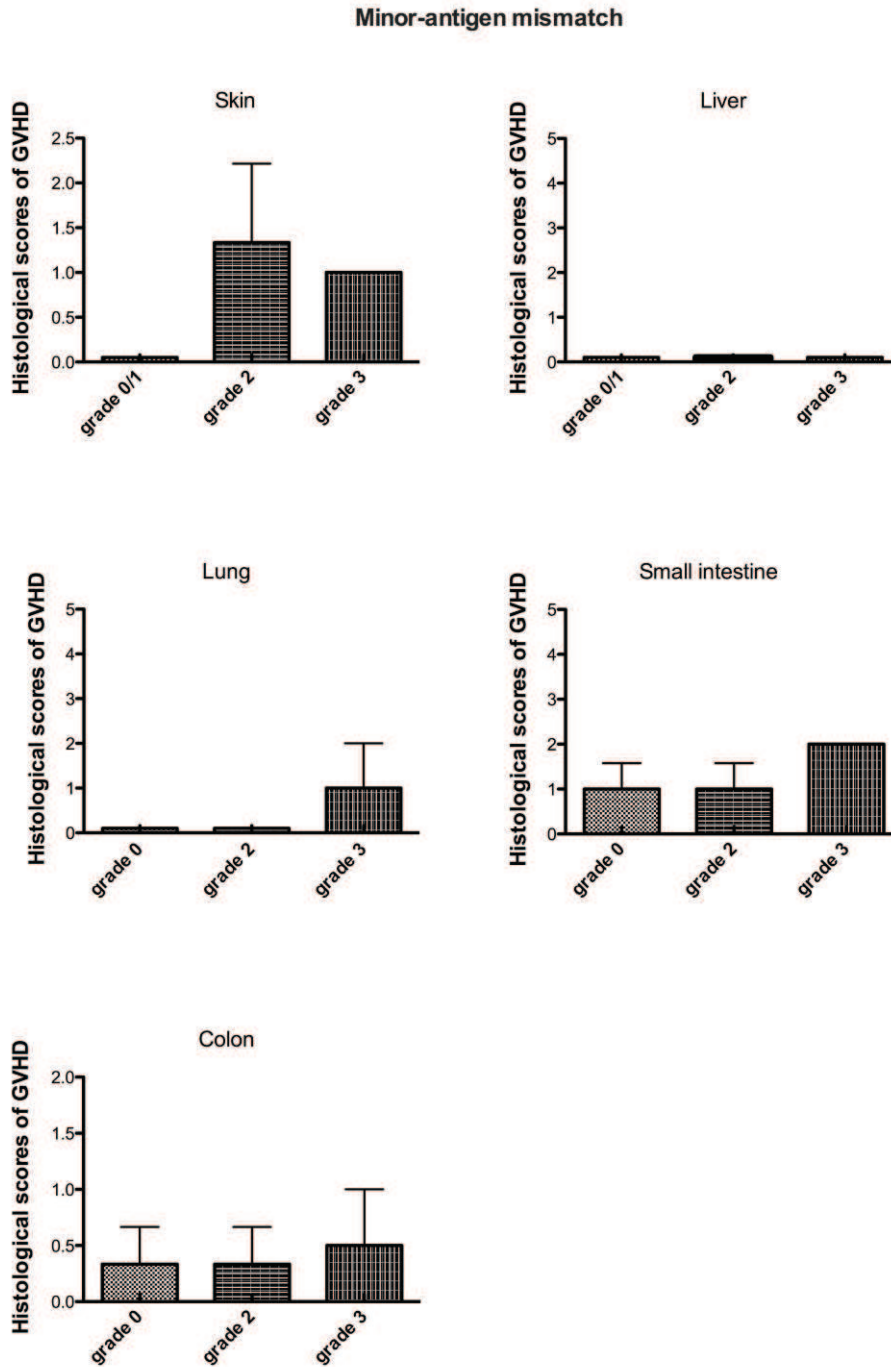
Figure 3. Reproducibility of the grading system among different experimenters. Three different experimenters independently scored aGVHD during 20 days in 4 independent experiments performed in two different genetic combinations.



Supplemental figure 1. Correlation between clinical and histological scores of GVHD in fully allogeneic BMT. Histopathological scores of GVHD were assessed by a pathologist in a blinded fashion in skin, liver, lung, small intestine and colon of transplanted animals. Clinical grade (x axis) and histological grade (y axis) for each organ are represented.



Supplemental figure 2. Correlation between clinical and histological scores of GVHD in semi-allogeneic BMT. Histopathological scores of GVHD were assessed by a pathologist in a blinded fashion in skin, liver, lung, small intestine and colon of transplanted animals. Clinical grade (x axis) and histological grade (y axis) for each organ are represented.



Supplemental figure 3. Correlation between clinical and histological scores of GVHD in minor Ag disparity BMT. Histopathological scores of GVHD were assessed by a pathologist in a blinded fashion in skin, liver, lung, small intestine and colon of transplanted animals. Clinical grade (x axis) and histological grade (y axis) for each organ are represented.

Second article

« Control of GVHD by regulatory T cells depends on TNF produced by T cells and TNFR2 expressed by regulatory T cells »

Article publié dans le volume 128, numéro 12 de Blood daté du 22 septembre 2016

Les Treg sont capables de contrôler la GVHa en supprimant les réponses T alloréactives. En revanche, les potentiels effets des LT du donneur sur les Treg ne sont pas connus. Il a été suggéré dans un modèle de diabète auto-immun que les Teff pouvaient paradoxalement stimuler via la production de TNF α la prolifération et les capacités suppressives des Treg, formant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif. Nous avons testé cette hypothèse dans le contexte particulier de réaction allogénique systémique qu'est la GVHa.

Pour cela, nous avons utilisé 3 méthodes distinctes de blocage de l'interaction entre le TNF α et son récepteur de type 2 (TNFR2) exprimé préférentiellement par les Treg, à savoir l'administration de Treg n'exprimant pas TNFR2, le traitement des souris receveuses par un mAb bloquant anti-TNFR2 ou l'injection de Tconv ne produisant pas de TNF α . Dans les 3 modèles, nous avons pu montrer que l'effet protecteur des Treg était aboli en cas de perte du signal TNF, notamment celui fourni par les LT du donneur. Ce phénomène a été observé quel que soit le type de Treg étudié (Treg polyclonaux endogènes du donneur, Treg thérapeutiques spécifiques d'un seul antigène exogène ou spécifiques d'antigènes du receveur).

Les résultats de notre étude indiquent que l'axe TNF α /TNFR2 régule in vivo la fonction des Treg dans le contexte de la GVHa. Le ciblage de TNFR2 pourrait donc être un moyen efficace de moduler l'effet de ces Treg après allogreffe de CSH, soit

pour les stimuler grâce à l'utilisation d'un agoniste, et ainsi prévenir ou traiter la GVH, soit au contraire pour les inhiber dans le but d'augmenter la réponse allogénique, dans le cas des rechutes post-allogreffe notamment.

Enfin, nos résultats améliorent également notre compréhension des mécanismes complexes régulant la fonction des Treg et ouvrent la voie à la modulation de l'effet de ces cellules régulatrices dans d'autres contextes, tels l'auto-immunité ou la cancérologie.

TRANSPLANTATION

Control of GVHD by regulatory T cells depends on TNF produced by T cells and TNFR2 expressed by regulatory T cells

Mathieu Leclerc,^{1,2,*} Sina Naserian,^{1,2,*} Caroline Pilon,¹⁻³ Allan Thiolat,^{1,2} Gaëlle H. Martin,^{1,2} Charlotte Pouchy,⁴ Claude Dominique,⁵ Yazid Belkacemi,^{1,5} Frédéric Charlotte,⁶ Sébastien Maury,^{1,2,7} Benoit L. Salomon,⁴ and José L. Cohen¹⁻³

¹Université Paris-Est, Unité mixte de recherche S955, Université Paris Est Créteil, Créteil, France; ²INSERM, U955, Équipe 21, Créteil, France; ³Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP), Hôpital H. Mondor-A. Chenevier, Centre d'Investigation Clinique Biothérapie, Créteil, France; ⁴Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM, Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Paris, France; ⁵APHP, Hôpital H. Mondor-A. Chenevier, Service d'oncologie-radiothérapie, Créteil, France; ⁶APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service d'anatomo-pathologie, Paris, France; and ⁷APHP, Hôpital H. Mondor-A. Chenevier, Service d'hématologie clinique, Créteil, France

Key Points

- In vivo Treg effect depends on TNF α produced by T cells.
- TNF/TNFR2 interaction represents a novel immune checkpoint therapy to modulate alloreactivity after allo-HCT.

Therapeutic CD4⁺Foxp3⁺ natural regulatory T cells (Tregs) can control experimental graft-versus-host disease (GVHD) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HCT) by suppressing conventional T cells (Tconvs). Treg-based therapies are currently tested in clinical trials with promising preliminary results in allo-HCT. Here, we hypothesized that as Tregs are capable of modulating Tconv response, it is likely that the inflammatory environment and particularly donor T cells are also capable of influencing Treg function. Indeed, previous findings in autoimmune diabetes revealed a feedback mechanism that renders Tconvs able to stimulate Tregs by a mechanism that was partially dependent on tumor necrosis factor (TNF). We tested this phenomenon during

alloimmune response in our previously described model of GVHD protection using antigen specific Tregs. Using different experimental approaches, we observed that control of GVHD by Tregs was fully abolished by blocking TNF receptor type 2 (TNFR2) or by using TNF-deficient donor T cells or TNFR2-deficient Tregs. Thus, our results show that Tconvs exert a powerful modulatory activity on therapeutic Tregs and clearly demonstrate that the sole defect of TNF production by donor T cells was sufficient to completely abolish the Treg suppressive effect in GVHD. Importantly, our findings expand the understanding of one of the central components of Treg action, the inflammatory context, and support that targeting TNF/TNFR2 interaction represents an opportunity to efficiently modulate alloreactivity in allo-HCT to either exacerbate it for a powerful antileukemic effect or reduce it to control GVHD. (*Blood*. 2016;128(12):1651-1659)

Introduction

Acute graft-versus-host disease (GVHD) is one of the major causes of morbidity and mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HCT). In murine models, cell therapy using CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) was shown to efficiently prevent GVHD¹⁻³ without hampering immune reconstitution⁴ or the graft-versus-leukemia (GVL) effect.^{5,6} The efficacy and reproducibility of this therapy in preclinical models over the past 15 years by different groups in different mouse models using murine or human polyclonal or antigen-specific Treg cells led to the development of clinical trials with promising preliminary results.⁷⁻⁹ The mechanisms enabling this action rely on the ability of Tregs to directly act on conventional T cells (Tconvs).^{4-6,10} Here, we hypothesize that as Tregs are capable of modulating Tconv response, likewise Tconvs also modulate Treg action, resulting in an effective feedback mechanism.

Tumor necrosis factor (TNF) constitutes a likely candidate for mediating the effect of Tconvs on Tregs for several reasons: (1) This cytokine is abundantly produced during the cytokine storm following

allo-HCT.¹¹ (2) In the setting of autoimmunity, TNF was previously shown to boost proliferation and suppressive activity of Tregs by signaling through its type 2 receptor (TNFR2).¹²⁻¹⁵ This was observed in mice and humans, both in healthy individuals and type 1 diabetes patients.¹⁶⁻¹⁸ (3) Tregs express higher levels of TNFR2 compared with Tconvs, and Tregs expressing the highest level of TNFR2 are most suppressive in mice and humans.^{12,13,15}

The role of TNF/TNFR2 interaction in the control of GVHD by Tregs has not been studied. Addressing this question may help us to better understand the physiopathology of the disease. It is also relevant in regard to anti-TNF treatment that is sometimes administered to patients with severe GVHD. The activation of TNF receptor type 1 (TNFR1) could be associated with increased inflammation and tissue damage in allo-HCT¹⁹ and blocking this pathway could ameliorate GVHD by reducing cell death of gastrointestinal cells. Thus, one may hypothesize that anti-TNF treatment would have a beneficial effect by blocking TNFR1 triggering but a

Submitted February 18, 2016; accepted July 27, 2016. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, August 9, 2016; DOI 10.1182/blood-2016-02-700849.

*M.L. and S.N. contributed equally to this study and are joint first authors.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2016 by The American Society of Hematology

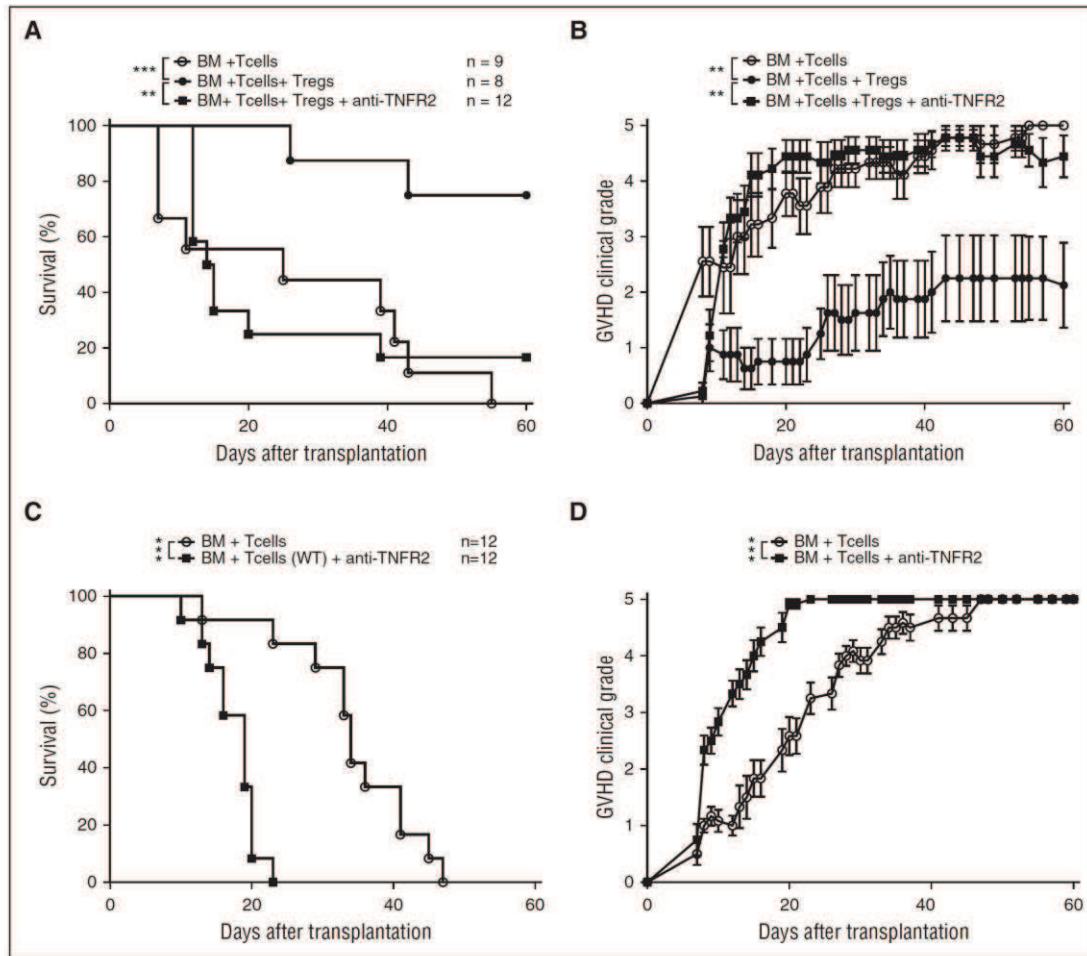


Figure 1. TNF α /TNFR2 disruption using anti-TNFR2 blocking mAb abolishes protective effect of Treg after allo-HCT. (A-B) [B6 x C3H]F1 female mice underwent total body irradiation (TBI) followed by transplantation with B6 BM cells plus T cells or with B6 BM cells plus T cells supplemented with HY-Tregs. HY peptide was administered at day 0, 1, 3, and 6, and mice were treated or not with anti-TNFR2 administered at day 0, 2, and 4. The experiment was performed twice, and the resulting survival (A) and clinical score (B) data were pooled and compared among the 3 groups of mice. (C-D) Experimental groups were constituted of mice grafted with B6 BM cells plus T cells treated or not with anti-TNFR2 administered at day 0, 2, and 4. The experiment was performed twice, and the resulting survival (C) and clinical score (D) data were pooled. Mice were euthanized in case of weight loss >30% of initial weight or maximal clinical grade (ie, 5/5). Kaplan-Meier survival curves were compared using log-rank test. For analysis of GVHD clinical grading curves, AUC was calculated for each mouse, and then Student *t* test or 1-way ANOVA with post hoc analysis was performed depending on number of comparatives. ns, nonsignificant. **P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .001.

detrimental effect by blocking TNFR2 triggering on Tregs, the latter phenomenon being assessed in this work. Here, we explored the hypothesis that in the context of Treg-based therapy of GVHD, Tconvs regulate Tregs via TNFR2 signaling. Using 3 different experimental approaches to prevent TNF/TNFR2 interaction, we showed that the suppression of GVHD obtained by transfer of Tregs strongly depended on TNFR2 expressed by Tregs and TNF produced by Tconvs.

Methods

Mice

Wild-type (WT) C57BL/6 (B6 H-2^b) and B6C3HF1 (H-2^{ksb}) mice were purchased from Harlan Laboratories (Gannat, France) and Charles River

Laboratories (Saint-Germain-Nuelles, France). TNF^{-/-} and TNFRs1b^{-/-} (TNFR2^{-/-}) mice were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). All mice were on a C57BL/6 background. Mice were housed under specific pathogen-free conditions. All experimental protocols were approved by the local ethics committee (authorization number 11/12/12-5B) and are in compliance with European Union guidelines.

Treg preparation

Tregs were prepared as previously described.²⁰ Briefly, spleens and lymph nodes from C57BL/6 female mice were collected and mechanically dilacerated. Cell suspension was stained with biotin-coupled anti-CD25 monoclonal antibody (mAb) (7D4; BD Biosciences, San Diego, CA), followed by anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec, Paris, France), and CD25⁺ cells were positively selected through magnetic large selection column (Miltenyi Biotec). Selected cells were stained with the following mAb's: CD4-fluorescein isothiocyanate (FITC; eBioscience, San Diego, CA), CD62L-phycoerythrin (PE; eBioscience), CD25-biotin (BD Biosciences), and streptavidin-PE-Cy5

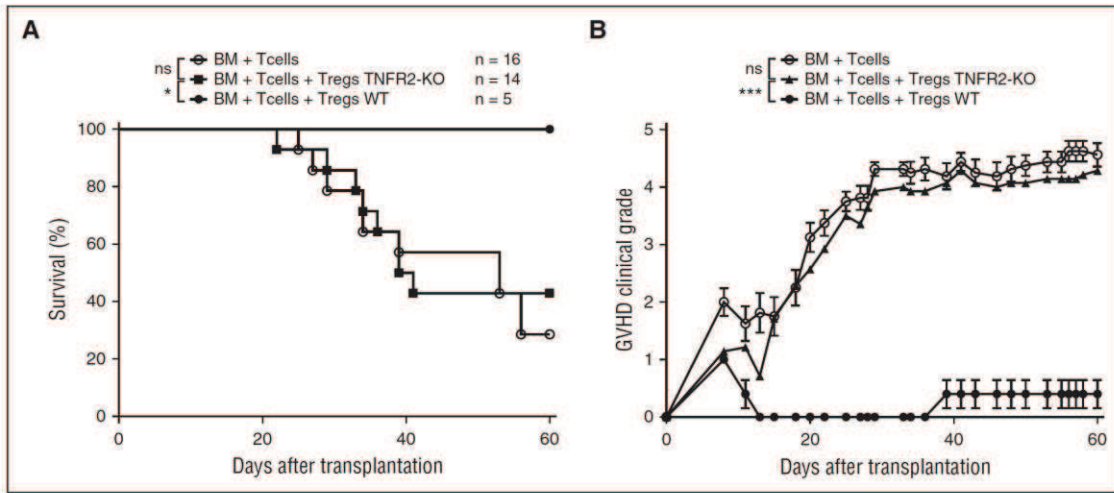


Figure 2. TNF α /TNFR2 disruption using TNFR2-KO Tregs abolishes the protective effect of Treg after allo-HCT. [B6 x C3H]F1 female mice underwent TBI followed by transplantation with B6 BM cells plus T cells or with B6 BM cells plus T cells supplemented with HY-Tregs produced from WT B6 or from TNFR2-deficient mice in order to prevent GVHD. HY peptide was administered at day 0, 1, 3, and 6. The experiment was performed twice, and the resulting survival and clinical score data were pooled. Kaplan-Meier survival curves (A) and curves of evolution of GVHD clinical score (B) over time were compared between the 3 groups of mice. * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$.

(eBioscience). CD4⁺ CD25^{high} CD62L^{high} cells were then sorted using a MoFlo Legacy (Beckman Coulter, Villepinte, France), with a purity of 99%. For HY-Treg preparation, cells were cultured for 3 to 4 weeks in the presence of recombinant murine interleukin-2 (IL-2) (10 ng/mL; PeproTech, Neuilly-sur-Seine, France) and weekly stimulated with CD8⁺ dendritic cells previously loaded with the HY peptide (10 μ g/mL, N-15-S, NY; PolyPeptide, Strasbourg, France) in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (20 ng/mL; PeproTech). CD8⁺ dendritic cells were isolated from splenocytes of C57BL/6 mice, as previously described.²⁰ For recipient-specific (rs)-Treg preparation, cells were cultured for 3 to 4 weeks in the presence of recombinant murine IL-2 and weekly stimulated with irradiated total splenocytes from C3H female mice, as previously described.^{6,10}

GVHD and transplantation models

Eight- to 12-week-old recipient B6C3HF1 female mice received a 10 Gy irradiation followed by retro-orbital infusion of 10×10^6 bone marrow (BM) cells + 2×10^6 CD3⁺ T cells, with or without HY-Treg cells in a 1:1 ratio (ie, 2×10^6 HY-Treg cells). BM and T-cell suspensions were prepared using leg bones and splenocytes, respectively, as previously described. All infused cells were isolated from female C57BL/6 mice (semi-allogeneic model). As recipient and donor mice were females, HY-Treg cells were activated *in vivo* by repeated retro-orbital infusions of 100 μ g of the HY peptide (at D0, D1, D3, and D6), as previously described.²⁰ For rs-Treg experiments, mice were transferred with rs-Treg cells in a 1:1 ratio.

Antibody treatment

Anti-TNFR2 (TR75-54.7) mAb was purchased from Bio X Cell (West Lebanon, NH). Recipient mice were treated with 3 intraperitoneal injections of 500 μ g of the antibody on days 0, 2, and 4.

GVHD clinical grading

GVHD clinical score was calculated 2 to 3 times per week. Each of the 5 following parameters was scored 0 (if absent) or 1 (if present): weight loss >10% of initial weight, hunching posture, skin lesions, dull fur, and diarrhea. Dead mice received a global score of 5. Mice were euthanized in case of weight loss >30% of initial weight or maximal clinical grade (ie, 5/5).

Histopathological examination

Livers, lungs, skin, and small and large bowel samples were preserved in Bouin's fixative and embedded in paraffin. For these organs, 5- μ m-thick sections were stained with hematoxylin and eosin for histological examination as previously described.^{6,10} Briefly, 1 pathologist analyzed slides in a blinded fashion to assess the intensity of GVHD. GVHD lesions in each sample were scored according to a semiquantitative scoring system described by Hill et al with minor modifications.²¹

Flow cytometry

Two weeks after transplantation (ie, at D13, D0 being the date of transplantation and Treg cell injection), recipient mice were euthanized and their spleens collected. Because of the low proportion of Treg cells among splenocytes and the low overall spleen cellularity at D13, cell suspensions obtained for each spleen were enriched in CD4⁺ and CD8⁺ cells after labeling with anti-CD4 and anti-CD8 microbeads (Miltenyi Biotec) and positive magnetic selection through large selection columns (Miltenyi Biotec). Selected cells were then stained with the following mAb's: CD4-FITC, CD4-allophycocyanin and CD4-Viobule (Miltenyi Biotec), Foxp3-PE-Cy5 and Foxp3-V450 (eBioscience), CD25-PE-Cy7 (eBioscience), CD62L-PE (eBioscience), inducible T-cell costimulator (ICOS)-PE (eBioscience), cytotoxic T lymphocyte associated protein 4 (CTLA4)-biotin (followed by streptavidin-PE-Cy7; eBioscience), interferon γ (IFN γ)-PE (Miltenyi Biotec), TNF α -FITC (Miltenyi Biotec), and CD8 α -FITC (eBioscience). Intracellular Foxp3 staining was performed according to the manufacturer's instructions, using the Foxp3 staining buffer set from eBioscience. For intracellular cytokine staining, cells were restimulated with 1 μ g/mL PMA (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and 0.5 μ g/mL Ionomycin (Sigma Aldrich) for 5 h, in the presence of GolgiPlug (1 μ L/mL; BD Biosciences). Events were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software vX.0.7 (FlowJo LLC, Ashland, OR).

Statistical analysis

Prism (GraphPad Software) was used for statistical analysis. Kaplan-Meier survival curves were compared using log-rank test. For analysis of GVHD clinical grading curves, area under curve (AUC) was calculated for each mouse, and then Student *t* test or 1-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc analysis was performed depending on the number of comparatives. For cytometry analysis, we have normalized the mean fluorescence intensity (MFI) values with T-cell + Treg-cell control group. Then we used unpaired, 2-tailed Student *t* tests for generation of *P* values.

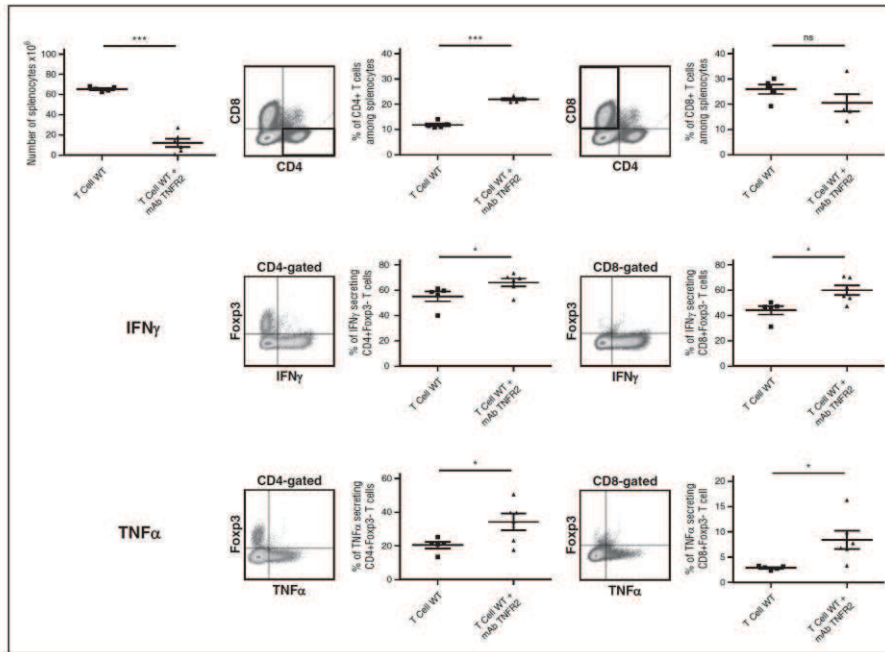


Figure 3. TNF α /TNFR2 disruption using anti-TNFR2 blocking mAb increases inflammatory cytokine production by donor CD4 and CD8 T cells. [B6 x C3H]F1 female mice underwent TBI followed by transplantation with B6 BM cells plus T cells treated or not with anti-TNFR2 administered at day 0, 2, and 4. Mice were euthanized, and donor CD4⁺ and CD8⁺ T cells were analyzed at day 14 posttransplantation in the spleen of grafted animals. Mean absolute numbers of splenocytes and percentage of CD4⁺ and CD8⁺ donor T cells are determined as well as intracellular IFN γ and TNF α production. Each plot represents a mouse; Student *t* test analysis was performed to compare the anti-TNFR2 mAb effect on T cells. **P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .001.

Results

TNFR2 plays a pivotal role in Treg-mediated prevention of GVHD

To assess the role of TNF on GVHD protection by Treg administration, we first used our recently described model in which the disease was

prevented by transfer in female recipients of donor Tregs specific for the exogenous (ie, nondonor, nonrecipient) HY antigen at time of HCT, followed by their *in vivo* reactivation by HY peptide immunization.²⁰ In a semi-allogeneic condition C57BL/6 \rightarrow [B6xC3H]F1 of BM transplantation, GVHD protection at 1:1 Treg/Tconv ratio strictly depends on HY immunization. We evaluated the role of TNFR2 in Treg-mediated GVHD protection using a blocking anti-TNFR2 mAb

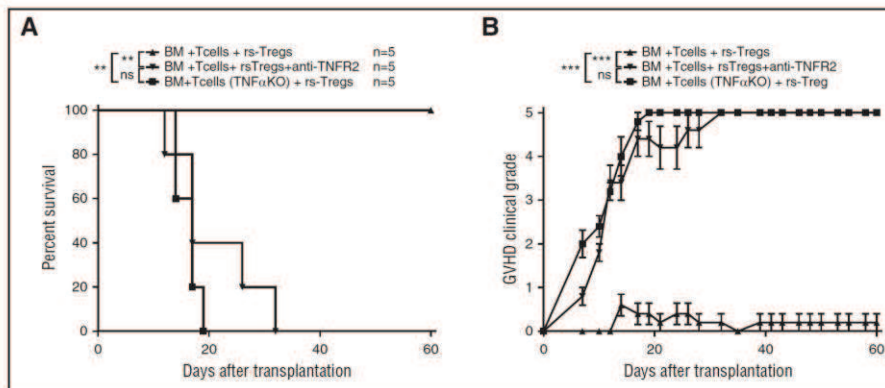


Figure 4. TNF α /TNFR2 disruption and its effect on GVHD do not depend on the antigen specificity of therapeutic Tregs. (A-B) [B6 x C3H]F1 female mice underwent TBI followed by transplantation with (1) B6 BM cells plus 2×10^6 T cells or (2) B6 BM cells plus 2×10^6 T cells supplemented with 2×10^6 rs-Tregs or (3) BM cells plus 2×10^6 T cells collected from TNF α -deficient mice supplemented with 2×10^6 rs-Tregs. HY peptide was administered at day 0, 1, 3, and 6, and mice were treated or not with anti-TNFR2 administered at day 0, 2, and 4. The resulting survival (A) and clinical score (B) data were compared among the 3 groups of mice. Mice were euthanized in case of weight loss >30% of initial weight or maximal clinical grade (ie, 5/5). Kaplan-Meier survival curves were compared using log-rank test. For analysis of GVHD clinical grading curves, AUC was calculated for each mouse, and then 1-way ANOVA with post hoc analysis was performed. **P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .001.

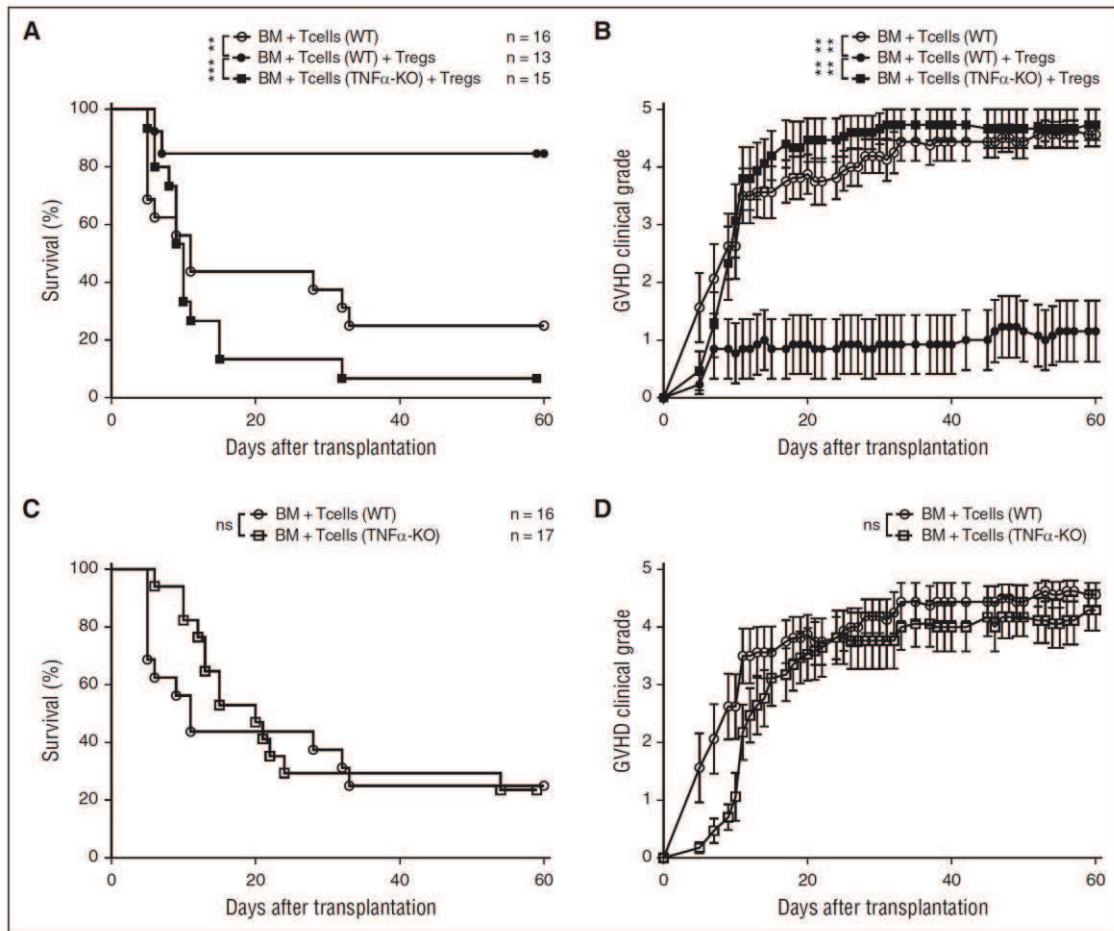


Figure 5. TNF α /TNFR2 disruption using TNF α -KO donor T cells abolishes protective effect of Treg after allo-HCT. (A-B) [B6 x C3H]F1 female mice underwent TBI followed by transplantation with B6 BM cells plus T cells or with B6 BM cells plus T cells supplemented with HY-Tregs or B6 BM cells plus T cells collected from TNF α -deficient mice instead of WT B6 mice and supplemented with HY-Tregs. HY peptide was administered at day 0, 1, 3, and 6. The experiment was performed 4 times, and the resulting survival (A) and clinical score (B) data were pooled and compared among the 3 groups of mice. (C-D) Experimental groups were constituted of mice grafted with B6 BM cells plus T cells or T cells collected from TNF α -deficient mice instead of WT B6 mice. The experiment was performed twice, and the resulting survival (C) and clinical score (D) data were pooled. Mice were euthanized in case of weight loss >30% of initial weight or maximal clinical grade (ie, 5/5). Kaplan-Meier survival curves were compared using log-rank test. For analysis of GVHD clinical grading curves, AUC was calculated for each mouse, and then Student *t* test or 1-way ANOVA with post hoc analysis was performed depending on number of comparatives. **P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .001.

(Figure 1A-B). Mice transferred with Tconvs developed severe GVHD that was prevented by the cotransfer of HY-Tregs. The beneficial effect of Treg administration was fully abolished in mice that were treated with the blocking anti-TNFR2 mAb. These latter mice displayed high clinical GVHD scores and decreased survival, as compared with HY-Treg-treated control mice. In order to assess whether a higher Treg/Tconv ratio could overcome the disadvantage because of TNFR2 blockade, we reproduced the same experiment doubling the number of HY-Treg infused in recipient mice (2:1 Treg/Tconv ratio). Even with this increased number of therapeutic Tregs, blocking TNFR2 fully abolished the Treg-dependent GVHD protection (supplemental Figure 1, available on the *Blood* Web site).

We then used TNFR2-deficient HY-specific Tregs, obtained from TNFR2-knockout (KO) mice, to confirm that the Treg control of GVHD by TNFR2 was mediated by TNFR2 expression by Tregs. Whereas TNFR2-sufficient control Tregs fully protected from GVHD, TNFR2-deficient Tregs completely failed to prevent the disease

(Figure 2). Survival of the mice and clinical scores of GVHD were identical in mice receiving donor Tconvs alone and mice receiving donor Tconvs and TNFR2-deficient Tregs.

We then assess the role of TNFR2 in Treg-mediated protection in another transplant setting. Tregs naturally present in the donor T-cell inoculum were present in sufficient number to attenuate GVHD because their depletion accelerated the disease.¹⁻³ Here, we observed that blocking TNFR2 led to a similar GVHD aggravation. Indeed, in mice grafted with BM cells and whole T cells containing Tregs at physiological level, administration of the blocking anti-TNFR2 mAb induced an accelerated GVHD (Figure 1C-D). Histological analyses performed at day 14 confirmed the exacerbated GVHD in the liver (*P* < .001) and a trend to an increase of GVHD for the small intestine and the colon of anti-TNFR2-treated mice (supplemental Figure 2). Surprisingly, we observed a reduced GVHD in the skin of grafted animals after anti-TNFR2 mAb treatment. This could be explained by the distinct biological feature of cutaneous Tregs vs Tregs of

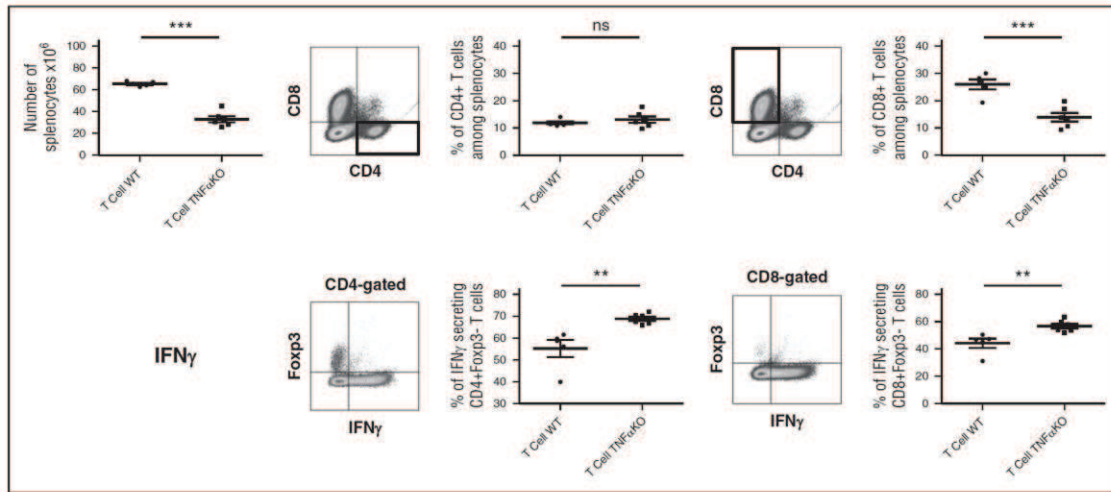


Figure 6. TNF α /TNFR2 disruption using TNF α -KO donor T cells increases inflammatory cytokine production by donor CD4 and CD8 T cells. [B6 x C3H]F1 female mice underwent TBI followed by transplantation with B6 BM cells plus T cells or T cells collected from TNF α -deficient mice instead of WT B6 mice. Mice were euthanized, and donor CD4⁺ and CD8⁺ T cells were analyzed at day 14 posttransplantation in the spleen of grafted animals. Mean absolute numbers of splenocytes and percentage of CD4⁺ and CD8⁺ donor T cells are determined as well as intracellular IFN γ and TNF α production. Each plot represents a mouse; Student *t* test analysis was performed to compare mice transferred with WT or TNF α -deficient donor T cells. **P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .001.

other tissues, including a specific pattern of homing receptors as recently reviewed,²² which may modify their sensitivity to TNF/TNFR2 signaling.

The number of splenocytes collected at day 14 importantly varied between the 2 groups of mice. Whereas spleens of mice grafted with T cells contain $65.4 \times 10^6 \pm 2.2$ cells, this number fell sharply to $12.3 \times 10^6 \pm 9.6$ in mice treated with anti-TNFR2 mAb, probably reflecting an accelerated GVHD. We next evaluated the effect of blocking TNFR2 on cytokine production in the spleen of mice developing GVHD after transfer of WT donor T cells. Mice treated with the anti-TNFR2 mAb had an increase in IFN γ and TNF α production in both CD4 and CD8 donor T cells (Figure 3).

In order to reinforce the robustness of our observations, we used a third transplant setting consisting of infusing Tregs that were rendered specific for recipient-type alloantigen (namely, rs-Treg) instead of HY-Treg to prevent GVHD. Whereas GVHD was prevented by rs-Treg administration, this protective effect was fully abolished when using anti-TNFR2 mAb (Figure 4).

Thus, using 2 different approaches (anti-TNFR2 mAb and TNFR2-deficient Tregs) and different types of Tregs (Tregs of the T-cell inoculum, therapeutic HY-Tregs, or rs-Tregs), we demonstrate that the control of GVHD by Tregs is TNFR2 dependent.

TNF produced by Tconvs is critical for the control of GVHD by Tregs

TNF can be produced by multiple cell types after allo-HCT. Because donor T cells are key actors of GVHD and one of the major TNF producers,¹¹ we evaluated whether GVHD prevention by Tregs would be maintained when using TNF α -deficient donor T cells collected from TNF α -deficient mice. We first compared GVHD in mice transferred with TNF α -deficient and TNF-sufficient whole donor T cells in the absence of additional therapeutic Tregs. Both groups developed a similar clinical GVHD (Figure 5C-D). However, histological and biological analyses performed at day 14 showed that mice receiving TNF α -deficient T cells developed a more severe GVHD compared

with mice transferred with TNF-sufficient T cells. Histological scores in the liver and small intestine were higher in the former mice compared with the latter mice (supplemental Figure 3). Also, numbers of splenocytes were reduced in mice transferred with TNF α -deficient T cells compared with TNF α -sufficient T cells. This was associated with an increase in IFN γ production in both CD4 and CD8 donor T cells in mice receiving TNF α -deficient T cells (Figure 6).

We then assessed whether GVHD protection by therapeutic HY-specific Tregs was maintained when donor T cells were TNF deficient. Although the cotransfer of HY-specific Tregs protected from GVHD in mice receiving TNF-sufficient T cells, this beneficial Treg effect was entirely lost with TNF α -deficient donor T cells (Figure 5A-B). Actually, we even observed that mice grafted with TNF α -deficient donor T cells supplemented with Tregs experienced an even greater degree of GVHD (trends in an accelerated mortality) compared with mice receiving only TNF α -deficient donor T cells. The loss of GVHD protection by Tregs when TNF-deficient T cells were transferred was confirmed when therapeutic rs-Tregs were injected in place of HY-Tregs (Figure 4). Thus, TNF α produced specifically by donor T cells is required for the Treg suppressive effect in GVHD.

After allo-HCT, TNF/TNFR2 blockade reduces Foxp3 and activation marker expression on Tregs

To analyze by what mechanism the control of GVHD by Tregs depends on TNF/TNFR2 interaction, we measured the proportion and activation markers of Tregs in the spleen collected at day 13 in mice grafted with HY-Tregs and either WT T cells treated with anti-TNFR2 mAb or TNF-deficient T cells. First, the expression level of Foxp3 was significantly reduced when TNF/TNFR2 interaction was inhibited in both settings, whereas Treg proportions remained unchanged (Figure 7A-B). This lower Foxp3 expression among whole Tregs was characterized by a reduced proportion of Foxp3^{high}-expressing cells and an increased proportion of Foxp3^{int}-expressing cells in both experimental models (supplemental Figure 4). A likely explanation would be that, in the absence of TNFR2 signaling in Tregs,

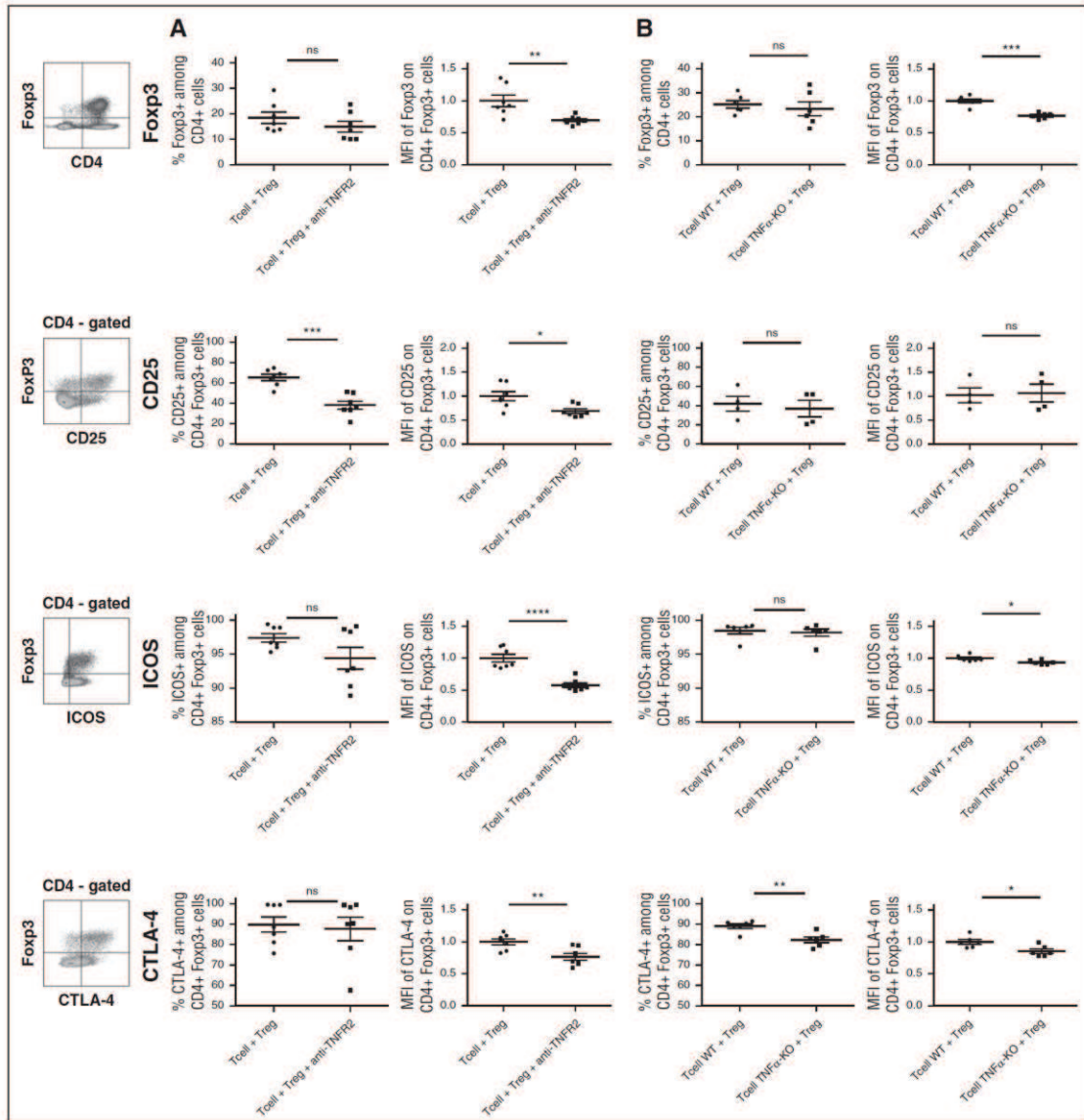


Figure 7. Blockade of the TNF α /TNFR2 interaction reduces Foxp3 and activation markers expressions in Tregs used to prevent GVHD. GVHD experiments were reproduced using “anti-TNFR2” mAb treatment (A) or T cells collected from TNF α -deficient mice (B). Splenocytes from grafted animals were harvested at day 13 posttransplantation and enriched in CD4⁺ and CD8⁺ T cells through positive magnetic selection using large selection columns (Miltenyi Biotec). Depending on the marker evaluated, Tregs were stained with CD4-FITC, CD4-allophycocyanin or CD4-Vioblu, Foxp3-PE-Cy5 or Foxp3-V450, and CD25-PE-Cy7, ICOS-PE, CTLA4-biotin. Intracellular Foxp3 staining was performed using the Foxp3 staining buffer set from eBioscience. Cells were gated on CD4⁺ Foxp3⁻ T cells except for the percentage of Foxp3 (up), which is gated on CD4⁺ T cells. For each marker, the strategy of gating is indicated on the left of the figure. Each dot represents a single mouse. For each group of mice, horizontal lines represent mean value and standard error of the mean. MFI values are represented as ratio of the measured value for each sample to the mean value of the control group (ie, the group of mice receiving BM cells plus T cells and Treg cells). We have normalized the MFI values with T-cell + Treg control group. Then we used unpaired, 2-tailed Student *t* tests for generation of *P* values. **P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .001; *****P* < .0001.

Foxp3 would be downmodulated, suggesting that TNF stabilized Foxp3 expression in Tregs. We further analyzed the expression of CD25, the α chain of the IL-2 receptor constitutively expressed at the Treg cell surface membrane. We observed a dramatic decrease of the percentage of CD25⁺ cells and CD25 expression level among Tregs when anti-TNFR2 mAb was administered to grafted mice. Because in experimental allo-HCT CD25 expression is upregulated by IL-2,²³ these results suggest that TNF α increased IL-2 responsiveness of

Tregs in this context. Finally, we evaluated the expression of ICOS and CTLA4, which are important molecules in Treg biology. In both models of inhibition of TNF/TNFR2 interaction, ICOS and CTLA-4 expressions were reduced compared with controls, with a more pronounced effect in mice treated with the anti-TNFR2 mAb than mice grafted with TNF α -deficient T cells (Figure 7), probably reflecting the more complete abrogation of TNF signaling in the presence of the mAb.

Discussion

Here, we describe in the context of alloreactive immune responses a novel feedback mechanism by which Tconvs boost Treg activation. Indeed, we clearly demonstrate that the protection of GVHD by Tregs in allo-HCT strictly depends on TNF produced by effector T cells and TNFR2 expressed by Tregs. We believe our findings are solid because they rely on 3 different experimental approaches (blocking TNFR2 mAb, TNFR2-deficient Tregs, and TNF α -deficient Tconvs) and using 3 types of protective Tregs (polyclonal Tregs present at physiological level in the T-cell inoculum, therapeutic HY-Tregs, and therapeutic rs-Tregs). If a similar phenomenon exists in human, TNF-TNFR2 interaction would be critical in the control of GVHD by Tregs in allo-HCT performed either in routine or in clinical trials when therapeutic Tregs are injected.

These findings are in accordance with recent reports showing that, in the context of autoimmune diabetes, effector T-cell activation was able to boost Treg cell expansion, favoring disease control, a phenomenon partly dependent on TNF.^{14-16,24} Our results extend, in an allo-HCT setting, the observation that Tconvs exert a powerful boost of Treg activity. We also demonstrate for the first time that the sole defect of TNF production by donor T cells was sufficient to completely abolish the Treg suppressive effect in GVHD. Our findings expand our understanding of the diverse and complex effects of inflammation on Treg biology. Indeed, it was shown that some inflammatory factors, such as IL-6 or IL-4, promoted Foxp3 downmodulation and Treg instability.^{25,26} To the contrary, our study suggests that another inflammatory factor, TNF, maintained a high level of Foxp3 in Tregs in an inflamed environment. This is consistent with previous data in the context of autoimmune diseases in mice¹⁶ and with our recent findings that TNF increased Foxp3 expression in human Tregs in vitro.²⁷

These results shed light on the conflicting data regarding the effect of anti-TNF drugs. These agents are widely used in the treatment of various autoimmune diseases. However, they are not efficient in all patients, and there are numerous reports describing paradoxical exacerbation of the initial disease or the occurrence of new autoimmune syndromes.²⁸⁻³¹ Similarly, a number of clinical studies failed to demonstrate efficacy for anti-TNF treatment in preventing or treating GVHD.^{32,33} Our results support that the potential benefit of anti-TNF drugs in GVHD patients may also be counteracted by the inhibition of Treg function, thus promoting a vigorous alloreactive T-cell response.

Finally, we believe that our results pave the way for a novel immune checkpoint therapy to modulate alloreactivity after allo-HCT. Indeed,

the TNF/TNFR2 signaling pathway represents a potential target for modulating alloreactivity. We previously observed that ex vivo Treg depletion from donor lymphocyte infusions could improve the GVL effect.^{34,35} TNF inhibition could also potentiate the GVL effect of donor lymphocyte infusions by blocking Treg effect with a much more simple and direct procedure. On the other hand, the alloreactivity could be strongly reduced to control GVHD by using TNFR2 agonist molecules in order to expand Tregs ex vivo.¹⁷ Indeed, it was recently observed that serum of recipient animals during acute GVHD induced Treg activation and enhanced their suppressive function through a TNF-dependent mechanism without inhibiting the GVL effect.³⁶ These 2 aspects remain to be confirmed both in experimental GVHD and in xeno-GVHD induced by human cells. This represents a potential therapeutic strategy to tailor the intensity of the alloreactive response to the particular need over the course of the patient disease.

Acknowledgments

The authors are indebted to Dan Avi Landau for critical reading of the manuscript.

M.L. was supported by a "poste d'accueil Inserm," S.N. by the "région Ile de France, DIM Biothérapie," and the département hospitalo-universitaire "Virus Immunité Cancer." This work was supported by Association Française contre les Myopathies, Agence de la Biomédecine, Association de Recherche contre les hémopathies malignes, Fondation pour la recherche médicale (Victor et Erminia Mesclé price) et Fondation Ramsay Générale de Santé (Cellular Therapy and Regenerative Medicine price).

Authorship

Contribution: M.L., S.N., B.L.S., and J.L.C. conceived the study and wrote the manuscript; M.L., S.N., C. Pilon, C.D., Y.B., and F.C. performed experiments; and M.L., S.N., C. Pilon, A.T., G.H.M., C. Pouchy, F.C., S.M., B.L.S., and J.L.C. analyzed the data.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

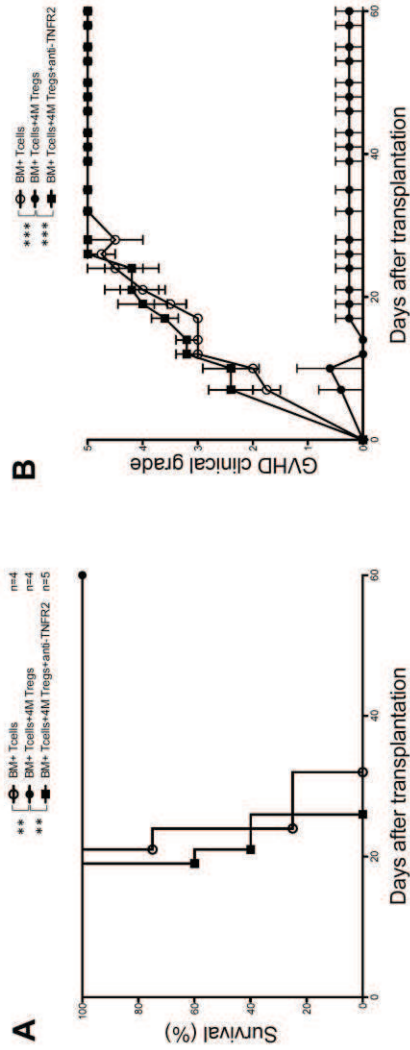
Correspondence: José L. Cohen, Hôpital Henri Mondor, 53 Av du Mal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France; e-mail: jose.cohen@inserm.fr.

References

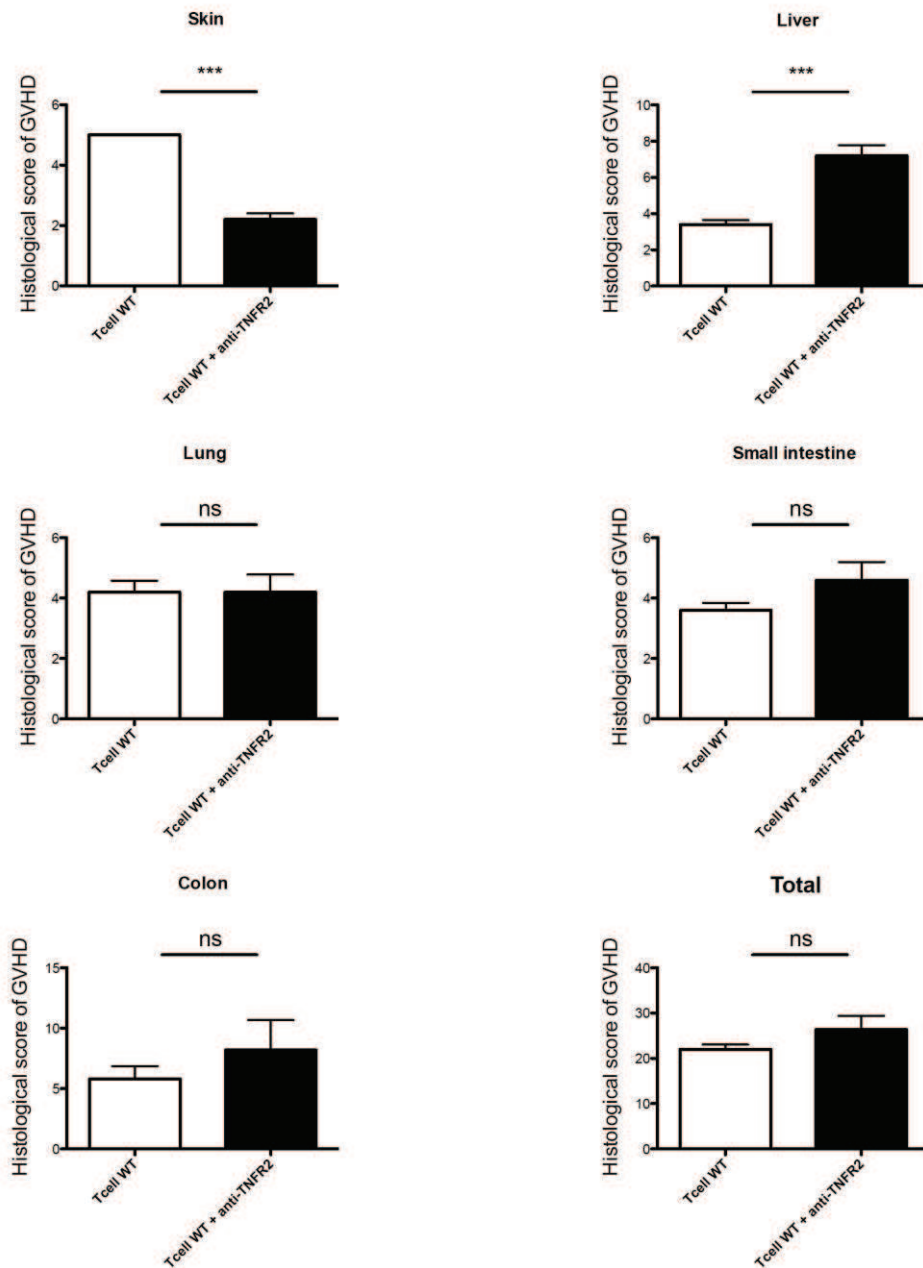
1. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 2002;196(3):401-406.
2. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med*. 2002;196(3):389-399.
3. 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(10):3493-3499.
4. Gaidot A, Landau DA, Martin GH, et al. Immune reconstitution is preserved in hematopoietic stem cell transplantation coadministered with regulatory T cells for GVHD prevention. *Blood*. 2011;117(10):2975-2983.
5. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. 2003;9(9):1144-1150.
6. Trenado A, Charlotte F, Fisson S, et al. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest*. 2003;112(11):1688-1696.
7. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2011;117(3):1061-1070.
8. Brunstein CG, Miller JS, McKenna DH, et al. Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood*. 2016;127(8):1044-1051.
9. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 2011;117(14):3921-3928.
10. Trenado A, Sudres M, Tang Q, et al. Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells. *J Immunol*. 2006;176(2):1266-1273.
11. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550-1561.
12. Chen X, Bäuml M, Männel DN, Howard OM, Oppenheim JJ. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function

of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2007;179(1):154-161.

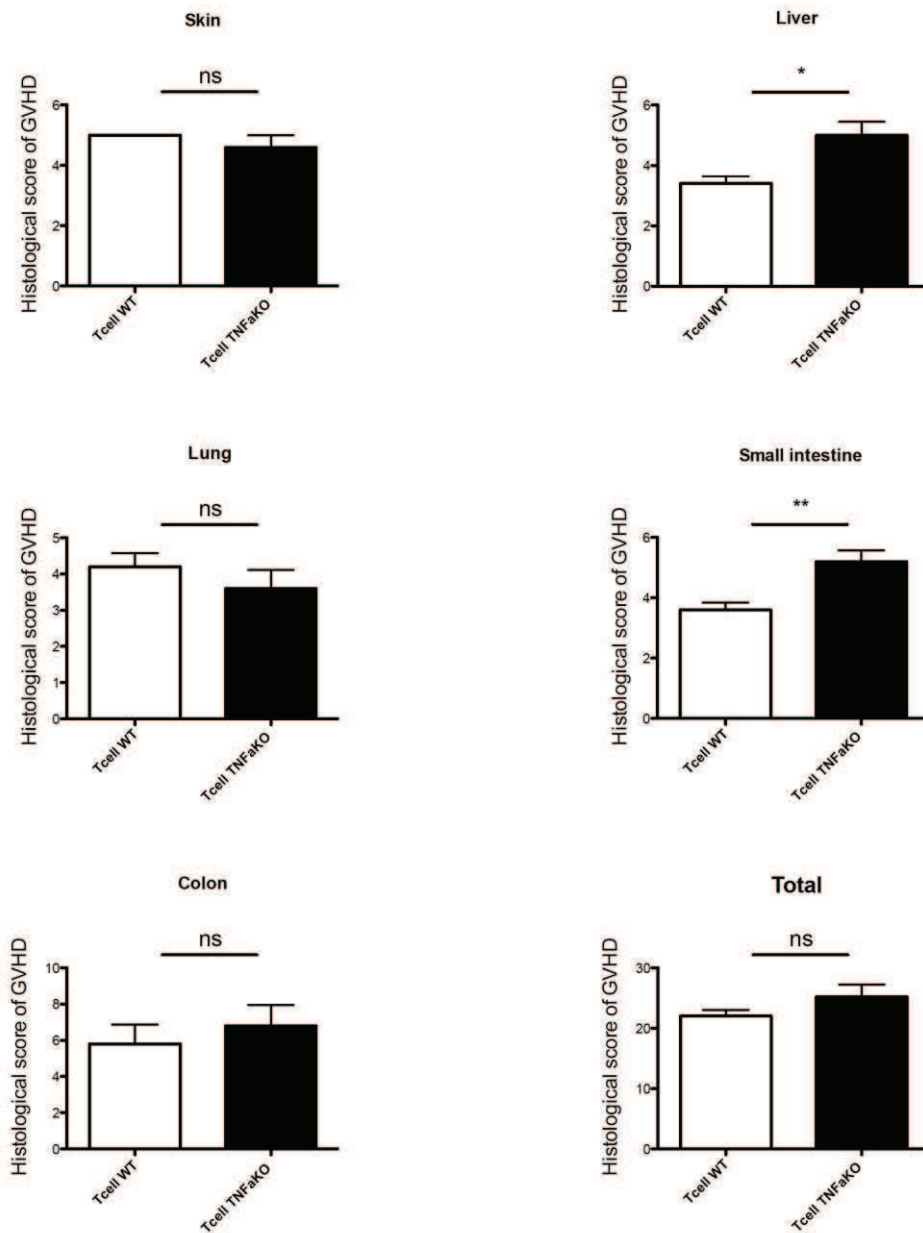
13. Chen X, Subleski JJ, Kopf H, Howard OM, Männel DN, Oppenheim JJ. Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J Immunol.* 2008;180(10):6467-6471.
14. Baeyens A, Saadoun D, Billiard F, et al. Effector T cells boost regulatory T cell expansion by IL-2, TNF, OX40, and plasmacytoid dendritic cells depending on the immune context. *J Immunol.* 2015;194(3):999-1010.
15. Grinberg-Bleyer Y, Saadoun D, Baeyens A, et al. Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J Clin Invest.* 2010;120(12):4558-4568.
16. Chen X, Wu X, Zhou Q, Howard OM, Netea MG, Oppenheim JJ. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T cell phenotype in the inflammatory environment. *J Immunol.* 2013;190(3):1076-1084.
17. Okubo Y, Mera T, Wang L, Faustman DL. Homogeneous expansion of human T-regulatory cells via tumor necrosis factor receptor 2. *Sci Rep.* 2013;3:3153.
18. Okubo Y, Torrey H, Butterworth J, Zheng H, Faustman DL. Treg activation defect in type 1 diabetes: correction with TNFR2 agonism. *Clin Transl Immunology.* 2016;5(1):e56.
19. Chopra M, Brandl A, Siegmund D, et al. Blocking TWEAK-Fn14 interaction inhibits hematopoietic stem cell transplantation-induced intestinal cell death and reduces GVHD. *Blood.* 2015;126(4):437-444.
20. Martin GH, Grégoire S, Landau DA, et al. In vivo activation of transferred regulatory T cells specific for third-party exogenous antigen controls GVH disease in mice. *Eur J Immunol.* 2013;43(9):2263-2272.
21. Hill GR, Cooke KR, Teshima T, et al. Interleukin-11 promotes T cell polarization and prevents acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest.* 1998;102(1):115-123.
22. Panduro M, Benoist C, Mathis D. Tissue Tregs. *Annu Rev Immunol.* 2016;34:609-633.
23. Pérol L, Martin GH, Maury S, Cohen JL, Piaggio E. Potential limitations of IL-2 administration for the treatment of experimental acute graft-versus-host disease. *Immunol Lett.* 2014;162(2, pt B):173-184.
24. Housley WJ, Adams CO, Nichols FC, et al. Natural but not inducible regulatory T cells require TNF-alpha signaling for in vivo function. *J Immunol.* 2011;186(12):6779-6787.
25. Feng Y, Arvey A, Chinen T, van der Veeken J, Gasteiger G, Rudensky AY. Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the Foxp3 locus. *Cell.* 2014;158(4):749-763.
26. Laurence A, Amarnath S, Mariotti J, et al. STAT3 transcription factor promotes instability of nTreg cells and limits generation of iTreg cells during acute murine graft-versus-host disease. *Immunity.* 2012;37(2):209-222.
27. Zaragoza B, Chen X, Oppenheim JJ, et al. Suppressive activity of human regulatory T cells is maintained in the presence of TNF. *Nat Med.* 2016;22(1):16-17.
28. Ko JM, Gottlieb AB, Kerbleski JF. Induction and exacerbation of psoriasis with TNF-blockade therapy: a review and analysis of 127 cases. *J Dermatolog Treat.* 2009;20(2):100-108.
29. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Cuadrado MJ, Khamashta MA. Vasculitis induced by tumor necrosis factor-targeted therapies. *Curr Rheumatol Rep.* 2008;10(6):442-448.
30. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Soto MJ, Cuadrado MJ, Khamashta MA. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22(5):847-861.
31. Robinson WH, Genovese MC, Moreland LW. Demyelinating and neurologic events reported in association with tumor necrosis factor alpha antagonism: by what mechanisms could tumor necrosis factor alpha antagonists improve rheumatoid arthritis but exacerbate multiple sclerosis? *Arthritis Rheum.* 2001;44(9):1977-1983.
32. Couriel DR, Saliba R, de Lima M, et al. A phase III study of infliximab and corticosteroids for the initial treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(12):1555-1562.
33. Hamadani M, Hofmeister CC, Jansak B, et al. Addition of infliximab to standard acute graft-versus-host disease prophylaxis following allogeneic peripheral blood cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(7):783-789.
34. Maury S, Lemoine FM, Hicheri Y, et al. CD4+CD25+ regulatory T cell depletion improves the graft-versus-tumor effect of donor lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Transl Med.* 2010;2(41):41ra52.
35. Maury S, Redjoul R, Cabanne L, Vigouroux S, Legros L, Cohen JL. Regulatory T-cell depletion in donor lymphocyte infusions for hematological malignancies: long-term outcomes from a prospective study. *Br J Haematol.* 2014;166(3):452-455.
36. Pierini A, Strober W, Moffett C, et al. TNF α priming enhances CD4+FoxP3+ regulatory T-cell suppressive function in murine GvHD prevention and treatment. *Blood.* 2016;128(6):866-871.



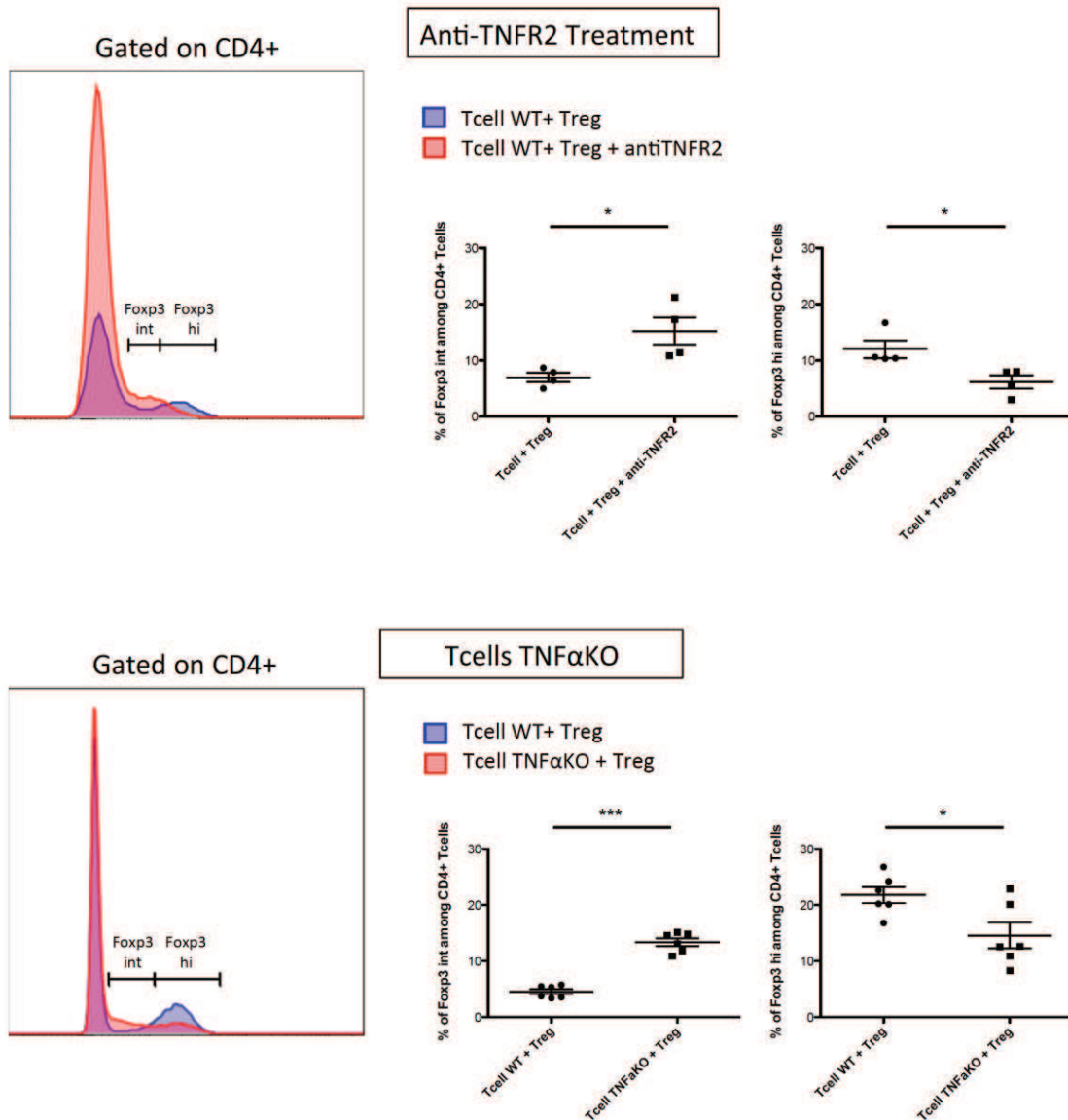
Supplemental figure 1. TNF α /TNFR2 disruption and its effect on GVHD does not depend on the Treg/Tconv ratio. (A and B): [B6 x C3H]F1 female mice underwent TBI followed by transplantation with B6 BM cells plus T cells or with B6 BM cells plus 2×10^6 T cells supplemented with 4×10^6 HY-Tregs. HY peptide was administered at day 0, 1, 3 and 6 and mice were treated or not with anti-TNFR2 administered at day, 0, 2 and 4. The resulting survival (A) and clinical score (B) data were compared among the three groups of mice. Mice were sacrificed in case of weight loss > 30% of initial weight or maximal clinical grade (i.e. 5/5). Kaplan-Meier survival curves were compared using log-rank test. For analysis of GVHD clinical grading curves, Area Under Curve (AUC) was calculated for each mouse then one-way ANOVA with post-Hoc analysis was performed. ns: non significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.001$.**



Supplemental figure 2. Effect of TNF α /TNFR2 disruption using anti-TNFR2 blocking mAb on histo-pathological signs of GVHD. [B6 x C3H]F1 female mice underwent TBI followed by transplantation with B6 BM cells plus T cells treated or not anti-TNFR2 administered at day, 0, 2 and 4. Mice were sacrificed and target organs of GVHD were analyzed at day 14 post-transplantation. T-test analysis was performed to compare anti-TNFR2 mAb treated mice to GVHD control mice. ns: non significant; *: P < 0.05; **: P < 0.01; ***: P < 0.001.



Supplemental figure 3. Effect of TNF α /TNFR2 disruption using TNF α KO donor T cells on histopathological signs of GVHD. [B6 x C3H]F1 female mice underwent TBI followed by transplantation with B6 BM cells plus T cells treated or not anti-TNFR2 administered at day 0, 2 and 4. Mice were sacrificed and target organs of GVHD were analyzed at day 14 post-transplantation. T-test analysis was performed to compare mice grafted with TNF KO donor T cells to GVHD control mice. ns: non significant; *: P < 0.05; **: P < 0.01; ***: P < 0.001.



Supplemental figure 4: Blockade of the TNF α /TNFR2 interaction reduces Foxp3 expression in Tregs used to prevent GVHD. GVHD experiments were reproduced using (up) anti-TNF mAb treatment or (down) T cells collected from TNF α -deficient mice. Splenocytes from grafted animals were harvested at day 13 post-transplantation and enriched in CD4⁺ and CD8⁺ cells through positive magnetic selection using large selection columns (Miltenyi Biotec). Cells were then gated on CD4⁺ cells. MFI values are represented as ratio of the measured value for each sample to the mean value of the control group (i.e. the group of mice receiving BM cells plus T cells and T reg cells). We have normalized the Mean Fluorescence Intensity (MFI) values with T cell + Treg control group. Then, we compared Foxp3^{high}, Foxp3^{int} and Foxp3^{low} expression on CD4⁺ cells. We used unpaired, two-tailed Student's t tests for generation of p-values. ns: non significant; *: P < 0.05; **: P < 0.01; ***: P < 0.001; ****: P < 0.0001.

DISCUSSION

Un nouveau standard pour la gradation de la GVHa chez la souris ?

Au cours de ce travail de thèse, nous avons donc développé un nouveau système de gradation clinique de la GVHa murine (**tableau 4**). Conformément aux objectifs que nous nous étions fixés, nous avons pu démontrer pour la première fois qu'un tel système d'évaluation était :

- Fortement corrélé aux lésions histologiques de cette maladie au niveau de divers organes cibles, y compris, dans le cas du poumon, en ce qui concerne un organe dont l'atteinte n'est pas directement évaluée cliniquement
- Un puissant outil de prédiction de la survie des souris greffées, puisque son utilisation à J20 post-greffe dans un modèle semi-allogénique (parent dans F1) permet de séparer les souris en 2 groupes, l'un avec une survie de 90% à 2 mois de la greffe et l'autre avec une survie inférieure à 20% à J60
- Reproductible puisque les scores calculés en aveugle et de façon indépendante par différents observateurs montrent un haut niveau de concordance

Les perspectives ouvertes par un tel outil sont nombreuses. D'une part, la forte corrélation aux lésions histologiques de la GVHa, et ce quel que soit le degré de compatibilité ou le fond génétique des souris donneuses et receveuses, permet une évaluation complète et fiable des lésions de GVHa de façon simple, car purement

visuelle, et sans avoir besoin de sacrifier les souris receveuses. Ce score clinique pourrait donc permettre à l'avenir de réduire le recours à l'anatomopathologie et donc le sacrifice précoce de souris en cours d'expérimentation pour évaluer de façon fiable la GVHa.

Critère	Absent	Présent
Perte de poids > 10%	0 point	1 point
Posture recroquevillée	0 point	1 point
Lésions cutanées	0 point	1 point
Diarrhée	0 point	1 point
Pelage ébouriffé	0 point	1 point

Tableau 4 : Nouveau score clinique d'évaluation de la GVHa chez la souris, développé au cours de ce travail de thèse.

Le score global sur 5 points est obtenu en additionnant les scores déterminés pour chaque critère. Les souris obtenant un score de 5 ou ayant perdu au moins 30% de leur poids initial sont sacrifiées. Les souris décédées (« naturellement » ou par sacrifice) sont scorées 5 jusqu'à la fin de l'expérience.

Par ailleurs, si l'atteinte préférentielle de certains organes cibles de la GVHa semble être influencée par la combinaison génétique utilisée, ce n'est pas le cas de notre système de gradation clinique, qui évalue la GVH de façon globale. Ce système apporte également une plus-value par rapport à l'évaluation plus simple, mais classiquement utilisée, de la GVHa par les seules courbes d'évolution pondérale et de survie. En effet, la GVHa moins létale et moins sévère généralement observée dans certaines combinaisons génétiques avec mismatch d'antigène mineur d'histocompatibilité, ne s'accompagne pas toujours de variations significatives des courbes d'évolution pondérale et de survie des souris greffées. Or, même dans ce contexte, les scores cliniques déterminés avec notre système de gradation diffèrent entre les souris receveuses.

La capacité de notre score clinique à prédire la survie des souris receveuses montre surtout sa puissance et sa pertinence, bien que l'intérêt de ce pouvoir prédictif en tant que tel soit moindre dans des modèles expérimentaux qu'en pratique clinique. Pourtant, le fait d'établir un score définissant différents niveaux de sévérité n'a de sens et d'intérêt que si ces différents stades sont effectivement corrélés au pronostic. Or, à notre connaissance, cela n'avait jamais été montré avec les scores cliniques d'évaluation de la GVHa murine développés jusqu'à présent. Dans notre étude, certaines souris receveuses avaient reçu un traitement protecteur de la GVHa par injection de Treg et la simple ségrégation en fonction du score clinique calculé à J20 a permis de faire apparaître 86% de ces souris dans le groupe ayant des lésions minimales ou absentes (score de 0 ou 1).

La notion de reproductibilité de l'évaluation est fondamentale pour tout système de classification ou de gradation. Chez l'homme, le score clinique d'évaluation de la GVHa présente l'avantage de reposer essentiellement sur des critères objectifs de mesure d'un paramètre clinique ou biologique pour distinguer les différents stades de sévérité attribuables pour chaque critère : la surface corporelle atteinte, le taux de bilirubinémie et le volume quotidien des selles émises par le patient, avec pour chacun de ces items des valeurs seuils définissant les différents stades. Seule l'appréciation de l'état général du patient est plus subjective, bien qu'elle soit aussi assez simple à déterminer. Chez la souris, à l'inverse, en dehors de la mesure du poids des receveuses, l'ensemble des critères utilisés dans les différents scores cliniques décrits jusqu'à présent reposent sur une appréciation subjective. Il est par exemple délicat de faire la distinction entre un pelage modérément ou sévèrement ébouriffé et il est aisé de comprendre qu'une telle détermination est sujette à un haut niveau de variabilité entre différents expérimentateurs. Ainsi, notre besoin d'établir un nouveau score clinique d'évaluation de la GVHa murine est réellement né des difficultés rencontrées en utilisant ceux déjà existant, notamment en termes de reproductibilité.

Pour remédier à cela, nous avons donc choisi de simplifier l'évaluation de chaque paramètre du score en déterminant uniquement si chaque critère était présent ou

non. En plus d'être moins sujet à variation, le calcul du score est alors beaucoup plus simple et donc plus rapide à effectuer. Surtout, nous avons pu apporter la preuve de la reproductibilité de cette méthode en la faisant appliquer par 3 expérimentateurs différents, dont 2 avaient une expérience limitée voire nulle dans le domaine de l'évaluation de la GVHa murine et intervenaient en aveugle. Il est par ailleurs intéressant d'observer que, pour chaque expérience, la concordance entre les évaluations des différents observateurs semble s'accroître au cours du temps, au fur et à mesure que les lésions de GVHa s'installent de façon plus franche et plus stable.

Bien évidemment, notre proposition de score reste imparfaite et présente elle aussi certaines limites. Tout d'abord, comme ceux précédemment publiés, notre score n'évalue pas directement l'atteinte hépatique de la GVHa, bien qu'il soit corrélé au degré de sévérité de l'atteinte hépatique en histologie, au moins dans une combinaison totalement allogénique. Chez l'homme, l'atteinte hépatique, pourtant associée à un certain degré de gravité comme en témoigne l'impact du stade hépatique sur le grade global de la GVHa (un stade 1 hépatique isolé correspond à un grade II global, et un stade 2 isolé correspond à un grade III), est assez peu parlante cliniquement, ou en tout cas associée à assez peu de signes cliniques spécifiques en dehors d'un ictère cutanéomuqueux surtout marqué dans les stades avancés. Chez la souris, c'est encore plus compliqué et l'évaluation de la GVHa hépatique sur des seuls critères cliniques paraît illusoire. Pour les équipes souhaitant travailler plus spécifiquement dans ce domaine, notre score clinique ne permettra donc pas d'éviter le recours à l'anatomopathologie ou éventuellement à des analyses biologiques.

Par ailleurs, si l'on regarde organe par organe et non de façon globale, la corrélation entre l'évaluation clinique de la GVHa et les lésions histologiques est dans certains cas imparfaite, notamment en ce qui concerne le poumon. Cela dit, concernant ce dernier, il faut aussi garder en tête qu'il ne s'agit pas, contrairement aux autres organes analysés en histologie, d'un site classique d'atteinte clinique de la GVHa. A l'inverse, d'après nos résultats, l'organe où la corrélation entre les stades clinique et

histologique semble la plus forte est clairement le côlon et le fait d'avoir intégré l'évaluation de la diarrhée dans notre système de gradation n'y est probablement pas étranger.

Une autre critique qui peut être faite à notre score clinique est le relatif manque de spécificité de la plupart des critères évalués. En effet, en dehors de la peau et de la diarrhée, pour laquelle contrairement à l'homme il n'y a ici que peu d'autres causes possibles en dehors de la GVHa, les souris étant élevées dans un environnement dépourvu d'agents pathogènes spécifiques et ne recevant pas d'autre traitement que celui testé, les autres paramètres inclus dans notre score (perte de poids, posture recroquevillée et dans une moindre mesure l'atteinte du pelage) reflètent davantage une altération de l'état général plutôt que d'authentiques lésions de GVHa.

Le corollaire de ce constat est qu'un certain nombre d'autres facteurs peuvent conduire à l'apparition d'un ou plusieurs de ces signes, au premier rang desquels l'irradiation reçue lors du conditionnement à la greffe. En effet, à la dose de 10 Gy, cette dernière s'accompagne systématiquement d'une perte de poids, généralement supérieure à 10% mais allant parfois jusqu'à 20% voire plus, avec un nadir généralement situé aux alentours de J3 puis une phase de récupération aboutissant à un retour au poids initial entre J5 et J10, mais parfois plus tardivement. Cette perte de poids s'accompagne volontiers d'une baisse d'activité avec posture recroquevillée au repos mais parfois aussi à la marche, et plus rarement d'atteinte des poils voire de la peau. C'est pour cette raison que nous avons choisi au cours de nos expériences de ne commencer à grader les souris receveuses qu'à partir de J10. Cependant, dans certaines combinaisons génétiques et notamment en cas de modèle totalement allogénique, les signes de GVHa peuvent apparaître dès J10 et il peut donc quand même y avoir une période de recouvrement entre les effets de l'irradiation et de la GVHa sur ces manifestations cliniques, rendant délicate l'évaluation de la GVHa durant cette période.

Enfin, il peut également être reproché à ce travail le fait qu'au cours des expériences utilisées rétrospectivement pour déterminer le caractère prédictif sur la survie du

score calculé à J20 post-greffe, les expérimentateurs n'évaluaient pas les souris en aveugle, mais connaissaient au contraire le groupe de traitement de chacune d'elle. Cela introduit donc un biais de jugement qui peut avoir eu un impact sur la détermination de ces scores.

Malgré les limites évoquées ci-dessus, nous pensons que notre score d'évaluation clinique de la GVHa murine est à la fois le plus simple à utiliser et le plus performant des scores cliniques décrits à ce jour. Il a donc à notre sens le potentiel pour devenir le nouveau standard de la gradation de la GVHa expérimentale, à condition, bien évidemment, d'être adopté assez massivement par les différentes équipes de recherche travaillant sur la GVHa à travers le monde, comme cela avait pu être le cas pour le score développé par l'équipe de Cooke (Cooke, Kobzik et al. 1996), cité près de 200 fois dans la littérature. Si cela venait à se produire, nous pensons qu'il pourrait constituer un outil fiable et performant pour harmoniser les pratiques entre les différentes équipes de recherche et favoriser l'interprétation voire la comparaison des résultats obtenus dans différents laboratoires.

Ciblage de TNFR2 : Une nouvelle immunothérapie ?

Importance de l'interaction TNF α /TNFR2 pour le contrôle de la GVHa par les Treg

Nos résultats démontrent clairement le rôle fondamental joué par l'axe TNF α /TNFR2 dans le contrôle de la GVHa par les Treg. En effet, en bloquant l'interaction entre le TNF α et TNFR2 de 3 façons différentes, en utilisant respectivement un mAb bloquant anti-TNFR2, des Treg déficients pour TNFR2 ou des Tconv ne produisant pas de TNF α , nous avons pu montrer qu'à chaque fois, l'effet protecteur des Treg était aboli (**figure 18**).

Cette perte de protection n'était pas compensée par l'utilisation d'un ratio Treg/Tconv plus élevé et concernait aussi bien les Treg thérapeutiques administrés à J0 pour prévenir la GVHa, que les Treg naturellement présents au sein de l'inoculum de LT injectés pour la déclencher. En effet, par analogie avec ce qui avait été observé dans les expériences de déplétion des LT en Treg avant injection, le traitement des souris receveuses par un anti-TNFR2 en l'absence de toute administration de Treg thérapeutiques conduit également à une accélération de la GVHa et au développement de lésions histologiques plus sévères, notamment au niveau du foie et du tube digestif. Enfin, l'efficacité du blocage de TNFR2 ne semble pas non plus être dépendante de la spécificité antigénique des Treg utilisés, puisqu'elle est observée aussi bien avec des HY-Treg, spécifiques d'un seul antigène exogène, qu'avec des rsTreg, population oligoclonale des Treg spécifiques des antigènes du receveur.

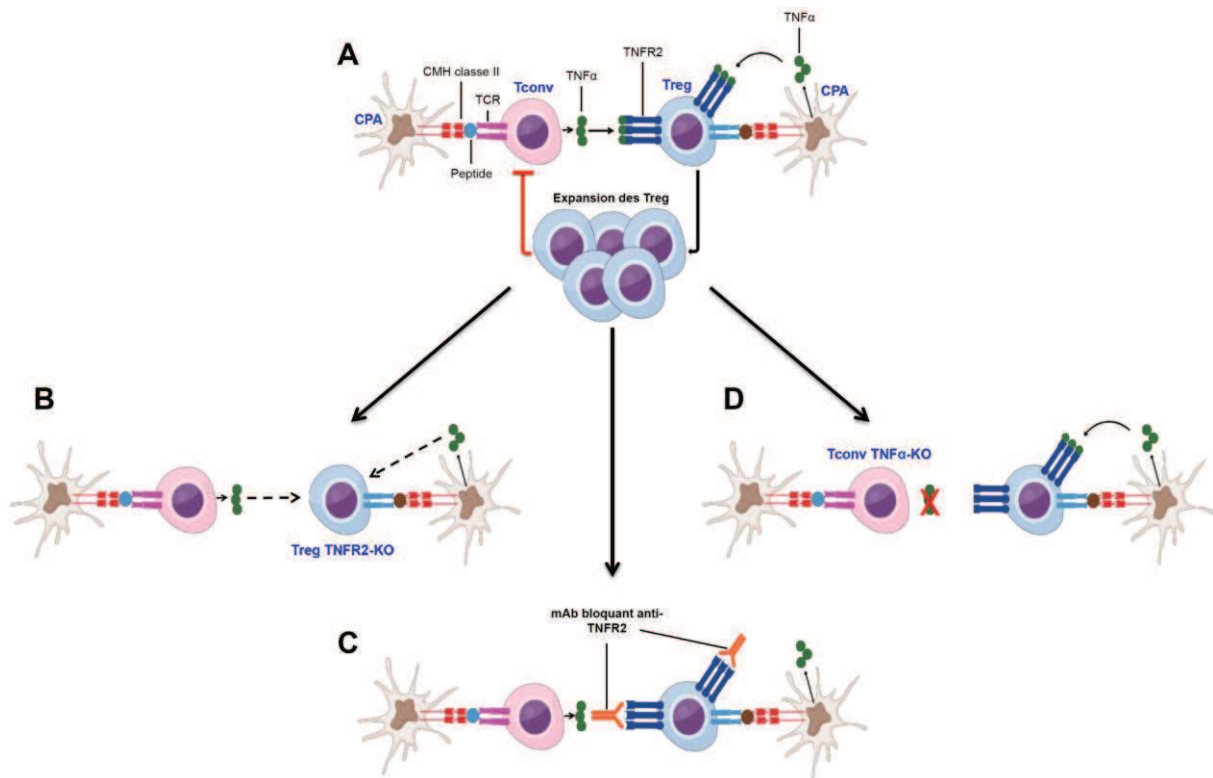


Figure 18 : Effet de l'interaction entre Tconv et Treg impliquant le couple TNF α /TNFR2 et blocage de cet axe selon 3 méthodes différentes.

A : Les Tconv et les Treg sont chacun activés via leur TCR par une CPA présentant un complexe CMH/peptide. Le TNF α produit, entre autres, par les Tconv et les CPA peut se fixer sur le récepteur TNFR2 préférentiellement exprimé par les Treg, ce qui conduit à leur expansion et stimule leur activité suppressive. Ces Treg vont alors pouvoir à leur tour supprimer l'activation et la prolifération des Tconv. B : Les Treg n'exprimant pas le récepteur TNFR2 ne peuvent plus fixer le TNF α . C : L'utilisation d'un mAb bloquant anti-TNFR2 va empêcher la fixation du TNF α sur le récepteur TNFR2, sans l'activer. D : L'absence de production de TNF α par les seuls Tconv du donneur suffit à inhiber l'effet suppressif des Treg sur ces mêmes Tconv.

Treg TNFR2-KO : Treg « knock-out » pour le gène codant TNFR2; mAb : anticorps monoclonal; Tconv TNF α -KO : Tconv « knock-out » pour le gène codant le TNF α . Adapté de Bilate *et al.* (Bilate and Lafaille 2010).

Outre son effet sur la survie des souris et sur le développement de lésions cliniques et/ou histologiques de GVHa, nous avons démontré que le blocage de l'interaction TNF α /TNFR2 entraînait également des modifications phénotypiques des Treg et des Tconv. En effet, concernant les Tconv (aussi bien CD4 $^+$ que CD8 $^+$), le traitement par mAb anti-TNFR2 conduit à une augmentation de leur capacité de production de

cytokines pro-inflammatoires, notamment de TNF α et d'IFN γ . En cas d'utilisation de Tconv TNF α -KO, on observe aussi une augmentation de la production d'IFN γ par les LT CD4 $^+$ et CD8 $^+$. Cet effet est donc vraisemblablement le reflet de la levée du frein exercé par les Treg sur ces Tconv, même si un effet additif propre de l'anticorps sur la faible proportion de Tconv TNFR2 $^+$ ne peut être formellement exclu. Quant aux Treg, le blocage de l'axe TNF α /TNFR2 entraîne une diminution de leur niveau d'expression de Foxp3 sans modifier la proportion de ces Treg dans la rate des souris receveuses, suggérant que le TNF α est nécessaire à la stabilisation de l'expression de Foxp3 par les Treg. Ces données sont en accord avec les résultats produits par d'autres équipes, qui démontrent qu'en présence de TNF α , les Treg expriment plus fortement Foxp3 (Chen, Baumel et al. 2007, Pierini, Strober et al. 2016, Zaragoza, Chen et al. 2016). L'effet du blocage de l'axe TNF α /TNFR2 sur le phénotype des Treg ne se limite cependant pas à l'expression de Foxp3, puisqu'il entraîne également une diminution de l'expression d'autres marqueurs associés à leur état d'activation et/ou à leur fonction suppressive, tels CD25, ICOS et CTLA-4.

Les Tconv sont capables de réguler in vivo la fonction des Treg

De façon remarquable, nous avons pu démontrer dans un modèle où les souris recevaient pourtant comme conditionnement une ICT à forte dose, traitement clairement associé au déclenchement d'un orage cytokinique et donc à une production massive de TNF α , qu'en bloquant la seule production de cette cytokine par les LT du donneur, l'effet protecteur des Treg était aboli. Par conséquent, le TNF α produit plus spécifiquement par les Tconv inducteurs de la GVHa est nécessaire à la bonne fonction suppressive des Treg.

Ainsi, nos résultats démontrent dans le contexte d'une réaction immunitaire allogénique ce qui avait déjà été évoqué dans l'auto-immunité (Grinberg-Bleyer, Saadoun et al. 2010), à savoir qu'il existe bel et bien un « dialogue » entre les Teff et les Treg et que par conséquent les Teff sont aussi capables d'agir sur les Treg et de

moduler leur fonction. Si à cet égard, l'axe TNF α /TNFR2 semble jouer un rôle majeur, nous avons vu en introduction que d'autres couples ligand/récepteur pouvaient être impliqués, notamment OX40L/OX40 et IL-2/récepteur à l'IL-2 (Baeyens, Saadoun et al. 2015).

Ce concept novateur élargit notre champ de connaissance sur les facteurs régulant la fonction des Treg et révolutionne la conception de l'interaction entre Treg et Tconv, puisque jusqu'aux premiers travaux de l'équipe de Benoît Salomon (Grinberg-Bleyer, Saadoun et al. 2010), cette dernière avait toujours été perçue comme étant à sens unique. Les résultats produits par nos 2 équipes démontrent pourtant bien l'existence d'une boucle de rétrocontrôle par laquelle les Tconv pathogènes impliqués dans l'auto-immunité ou la réaction allogénique sont capables de stimuler les Treg qui vont à leur tour exercer un effet suppresseur sur ces Tconv.

Par ailleurs, ce travail illustre les mécanismes complexes et divers, voire paradoxaux, par lesquels l'environnement inflammatoire influe sur la biologie des Treg. En effet, s'il a été montré que certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-4 ou l'IL-6 entraînent une instabilité des Treg et une dérégulation de l'expression de Foxp3 (Laurence, Amarnath et al. 2012, Feng, Arvey et al. 2014), nous apportons la preuve que d'autres cytokines, comme le TNF α , peuvent avoir l'effet inverse.

TNFR2 : la clé des résultats contrastés observés avec les anti-TNF α dans le traitement de la GVH ?

Le rôle majeur joué par le TNF α dans la physiopathologie de la GVHa, notamment pour l'activation des CPA du receveur, l'induction de chimiokines pro-inflammatoires permettant le recrutement des effecteurs cellulaires au niveau des organes cibles, mais aussi du fait de sa capacité à induire de la nécrose tissulaire, a logiquement conduit à l'utilisation des anti-TNF α , à savoir l'etanercept (protéine de fusion associant la fraction p75 du récepteur soluble au TNF au fragment Fc d'une

immunoglobuline de type IgG1) et l'infliximab (mAb chimérique anti-TNF α), dans le traitement de la GVHa dès le début des années 2000 (Andolina, Rabusin et al. 2000, Kobbe, Schneider et al. 2001). Pourtant, plus de quinze ans plus tard, l'enthousiasme suscité par ces traitements anti-TNF α est pour le moins retombé, du fait de l'absence de bénéfice de l'ajout de ces molécules au traitement standard de la GVHa, que ce soit en prophylaxie (Hamadani, Hofmeister et al. 2008) ou en curatif (Alousi, Weisdorf et al. 2009, Couriel, Saliba et al. 2009) et de l'absence d'amélioration du taux de réponse et de la survie par rapport aux traitements de 2^{ème} ligne déjà existant (Xhaard, Rocha et al. 2012). Seul l'etanercept semble véritablement garder une place en 2^{ème} ligne pour certains équipes, dans le traitement des GVHa digestives corticorésistantes (Busca, Locatelli et al. 2007), même s'il existe là encore des études montrant des résultats plus contrastés (Park, Lee et al. 2014).

Nos résultats semblent indiquer que le bénéfice potentiel des traitements anti-TNF α dans la GVHa pourrait être compensé par l'effet délétère de ces traitements sur la fonction des Treg, ce qui expliquerait au moins en partie le caractère relatif de leur efficacité dans cette indication. Plusieurs études se sont intéressées à l'expression du TNFR1 soluble chez les patients traités par anti-TNF α pour une GVHa et ont montré qu'une baisse du niveau d'expression du TNFR1 soluble était associée à une réponse au traitement (Uberti, Ayash et al. 2005, Levine, Paczesny et al. 2008, Choi, Stiff et al. 2012). En revanche, nous n'avons pas connaissance d'une étude rapportant l'évolution du niveau d'expression de TNFR2 dans un tel contexte. Les résultats de ce travail de thèse montrent qu'il serait particulièrement intéressant d'étudier cette expression de TNFR2, au niveau des Treg comme des Tconv, notamment en comparant son niveau avant traitement et son évolution sous traitement entre les patients répondeurs et non répondeurs aux anti-TNF α .

TNFR2 : une cible pour stimuler spécifiquement les Treg

Le rôle déterminant joué par la fixation du TNF α sur le récepteur TNFR2 pour stimuler la prolifération et les capacités suppressives des Treg combiné au fait que le récepteur TNFR2 a une expression bien plus restreinte que TNFR1 et est justement exprimé préférentiellement par les Treg par rapport aux Tconv (Annunziato, Cosmi et al. 2002, Aggarwal 2003, Chen, Baumel et al. 2007, Chen, Subleski et al. 2008), ouvre la voie au ciblage de TNFR2 pour stimuler spécifiquement les Treg in vitro et surtout in vivo. Cela semble d'autant plus intéressant qu'en ciblant uniquement les Treg TNFR2⁺, on provoque une expansion sélective des Treg dotés des capacités suppressives les plus fortes (Chen, Subleski et al. 2008) et les plus stables sur le plan phénotypique dans un environnement inflammatoire (Chen, Wu et al. 2013). Il est donc légitime d'en espérer une plus grande efficacité dans le contexte d'une thérapie cellulaire pour traiter une maladie très inflammatoire comme la GVHa.

In vitro, le ciblage de TNFR2 peut s'envisager de 2 façons : soit en utilisant directement du TNF α (Chen, Baumel et al. 2007), soit en développant des agonistes de TNFR2. La seconde solution présente l'avantage de ne pas cibler également TNFR1, dont l'expression est ubiquitaire et donc présente aussi au niveau des LT en général et des Treg en particulier, bien qu'à un niveau nettement inférieur à celui de TNFR2. Par ailleurs, le fait que le récepteur TNFR2 ait plus d'affinité pour le TNF α membranaire que soluble (Grell, Douni et al. 1995) pourrait aussi renforcer l'interaction préférentielle du TNF α ajouté au milieu de culture avec TNFR1. Pour ces raisons, le développement de méthodes de prolifération ex vivo des Treg humains via l'utilisation d'un agoniste de TNFR2 a connu un essor récent.

Le premier protocole ainsi rapporté a été publié en 2013 (Okubo, Mera et al. 2013). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé un agoniste de TNFR2 associé à de l'IL-2, de la rapamycine et des anticorps anti-CD3 et CD28. Cette combinaison s'est montrée plus efficace que la même stratégie sans l'agoniste de TNFR2. En effet, si dans les 2 cas les Treg CD25^{fort} étaient presque à 100% positifs pour les marqueurs CTLA-4, TNFR2, CD62-L et Fas et négatifs pour CD127, la population de Treg

obtenue avec l'agoniste de TNFR2 était plus homogène sur le plan phénotypique, notamment en ce qui concerne l'expression des marqueurs de surface HLA-DR, ICOS, CD45RO et les récepteurs de chimiokine CXCR3, CCR4, CCR6 et CCR7. En particulier, HLA-DR, dont nous avons vu en introduction que son expression par les Treg était associée à des capacités suppressives augmentées et correspondait à un stade terminal de différenciation en Treg effecteurs, est l'un des marqueurs dont l'expression était la plus stimulée par l'agoniste de TNFR2. En outre, dans cette étude, les Treg cultivés en présence de l'agoniste étaient bien ceux qui exerçaient l'effet suppresseur le plus puissant sur les LT CD8⁺, mais aussi ceux qui exprimaient le moins le facteur de transcription T-bet et les cytokines pro-inflammatoires TNF α et IFN γ . Enfin, cette étude a également permis de valider la supériorité d'un agoniste de TNFR2 par rapport au TNF α pour obtenir de façon optimale une expansion de Treg fortement suppresseurs.

En 2016, deux nouvelles équipes, celle de Chopra en Allemagne et celle de He en Hollande, ont démontré la possibilité de faire proliférer des Treg humains in vitro en utilisant un agoniste de TNFR2, avec ou sans rapamycine (Chopra, Biehl et al. 2016, He, Landman et al. 2016). A nouveau, par rapport aux méthodes classiques d'expansion des Treg avec mAb anti-CD3 et anti-CD28 en présence d'IL-2 +/- rapamycine, qui conduisent à l'obtention d'une population de Treg généralement hétérogène et n'empêchent pas la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ et l'IL-17A, l'utilisation d'un agoniste de TNFR2 semble permettre d'obtenir une population plus homogène de Treg, au phénotype stable et aux plus fortes capacités suppressives (He, Landman et al. 2016). Ces Treg présentent une hypométhylation du gène *FOXP3* et ont une faible capacité de production de cytokines pro-inflammatoires.

Au total, comme illustré en **figure 19**, les méthodes d'expansion ex vivo des Treg par l'utilisation d'un agoniste de TNFR2 pourraient permettre d'obtenir un produit de thérapie cellulaire de meilleure qualité qu'avec les méthodes actuelles, car à la fois plus riche en Treg (environ 2 fois plus d'après l'étude de l'équipe de Faustman (Okubo, Mera et al. 2013)), mais aussi contenant une population plus homogène de

Treg aux fortes capacités suppressives, et pourraient donc à la fois faciliter la production de quantités suffisantes de Treg pour une application thérapeutique chez l'homme et améliorer encore les résultats déjà prometteurs de la thérapie cellulaire par les Treg dans la GVHa (Brunstein, Miller et al. 2011, Di Ianni, Falzetti et al. 2011).

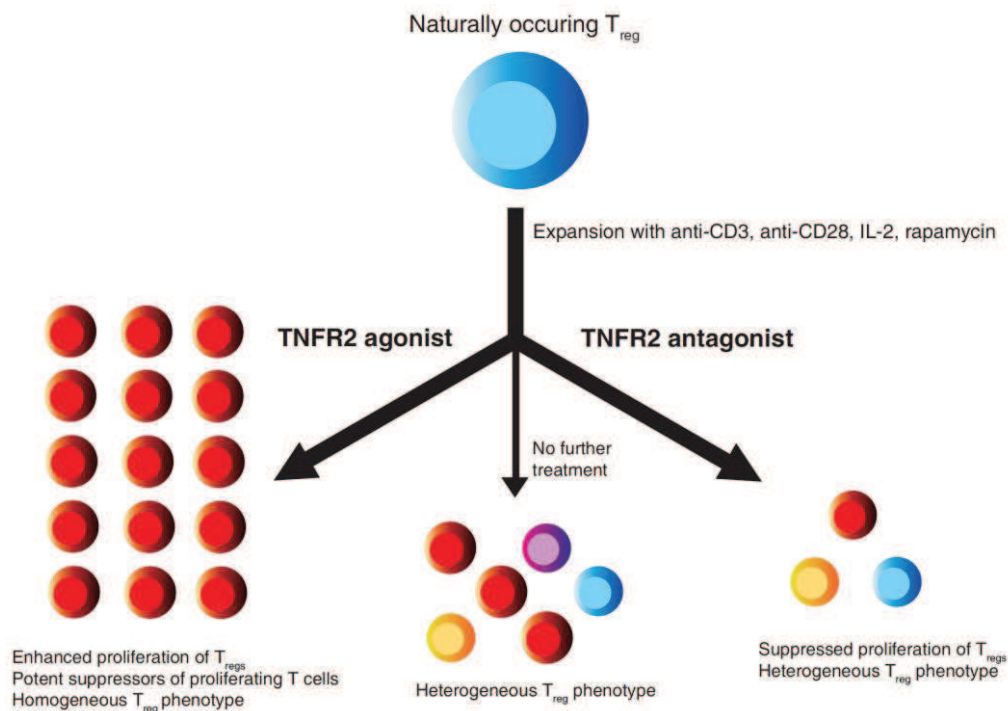


Figure 19 : Optimisation de l'expansion ex vivo des Treg humains grâce à un agoniste de TNFR2.

Trois protocoles d'expansion ex vivo des Treg humains sont ici schématisés. Le protocole standard comprend une stimulation par anti-CD3 et anti-CD28 en présence d'IL-2 et de rapamycine (flèche du milieu). Les 2 autres protocoles correspondent à l'ajout soit d'un agoniste de TNFR2 (flèche de gauche), soit d'un antagoniste de TNFR2 (flèche de droite). Si l'antagoniste de TNFR2 conduit à une moins bonne prolifération des Treg par rapport au protocole standard, l'agoniste entraîne lui à la fois une expansion supérieure des Treg mais aussi une plus grande homogénéité de leur phénotype, caractérisé par une capacité suppressive plus forte.

Source : Okubo *et al.* (Okubo, Mera et al. 2013).

Concernant la stimulation *in vivo* des Treg par le TNFR2, l'avantage de cette méthode réside dans le fait, comme cela avait été montré avec l'IL-2 à faible dose (Koreth, Matsuoka et al. 2011, Saadoun, Rosenzweig et al. 2011), de pouvoir éventuellement traiter de façon efficace certaines réactions auto ou allo-immunes par les Treg sans avoir recours au transfert adoptif de ces cellules, ni donc à une phase d'expansion *ex-vivo*. Or, nous avons vu en introduction qu'un tel transfert adoptif était beaucoup plus compliqué à mettre en place en conditions de grade clinique, sans compter le caractère chronophage de la phase d'expansion *ex vivo*. Ici encore, le fait de cibler spécifiquement les Treg les plus suppresseurs et les plus stables sur le plan phénotypique, pourrait améliorer les résultats déjà observés avec l'expansion *in vivo* des Treg via l'injection d'IL-2 à faible dose.

Ciblage de TNFR2 dans la GVHa et les maladies auto-immunes

Les résultats prometteurs de l'expansion *ex-vivo* des Treg par un agoniste de TNFR2 appellent de leur vœux la réalisation d'études pré-cliniques *in vivo* avant une éventuelle application chez l'homme. A cet égard, 2 études publiées en 2016 ont rapporté des premiers résultats très encourageants chez la souris dans le contexte de la GVHa.

Tout d'abord, celle de Chopra *et al.*, déjà évoquée plus haut, dont les résultats sont remarquablement complémentaires des nôtres (Chopra, Biehl et al. 2016). En effet, si nous avons démontré qu'un blocage de l'interaction entre le TNF α et le récepteur TNFR2 exprimé par les Treg induisait une perte de l'effet protecteur conféré par ces Treg dans la GVHa expérimentale, l'équipe de Chopra montre à l'inverse que le traitement de souris receveuses par un agoniste de TNFR2 permet une expansion *in vivo* des Treg et prolonge efficacement la survie de ces souris en diminuant la sévérité des lésions de GVHa qu'elles développent.

Pour cela, les auteurs ont dans un premier temps conçu un agoniste de TNFR2, dénommé STAR2. Ce dernier correspond à un variant du TNF murin organisé en nonamère et rendu spécifique de TNFR2 par la substitution de 2 acides aminés empêchant sa fixation à TNFR1. Ils ont ensuite pu montrer in vitro que STAR2 permettait bien d'induire une expansion et une activation des Treg, mais pas des Tconv. Cette activation était objectivée par l'expression des marqueurs CD103, ICOS, CD69 et CD44. Quant à l'expansion des Treg provoquée par STAR2, elle était équivalente à celle déclenchée en présence d'IL-2, mais aussi indépendante de cette dernière. En revanche, ces 2 molécules n'ont pas montré d'effet additif sur la prolifération des Treg. La stimulation par STAR2 ne modifie par ailleurs pas les capacités suppressives des Treg et n'induit pas la conversion de Tconv naïfs en iTreg. Enfin, en vue de l'application potentielle de sa stratégie chez l'homme, l'équipe de Chopra a également développé un équivalent humain de STAR2, qui permet de faire proliférer les Treg humains in vitro, comme mentionné plus haut.

Ensuite, les auteurs ont testé STAR2 in vivo chez la souris et ont confirmé les résultats observés in vitro, à savoir que STAR2 induisait une expansion sélective des Treg et l'expression de marqueurs d'activation par ces cellules, sans effet indésirable constaté sur la production de cytokines pro-inflammatoires. Dans un modèle murin de GVHa totalement allogénique (FVB [H-2^q] → C57BL/6 [H-2^b]), le traitement des souris receveuses par STAR2 avant la greffe augmente leur survie de 16 jours en médiane pour les souris non traitées à plus de 40 jours pour les souris traitées. Cet allongement de la survie s'accompagne d'une amélioration des autres paramètres d'évaluation de la GVHa murine, à savoir de la perte de poids, du score clinique et du score histologique des lésions de GVHa. Cet effet protecteur de STAR2 administré en pré-greffe est rendu possible par la radiorésistance spécifique des Treg par rapport aux autres cellules du système immunitaire. Il est aussi aboli en cas d'utilisation de souris receveuses déficientes pour TNFR2 ou après élimination sélective des Treg des souris receveuses avant la greffe. Enfin, il est associé à une préservation de l'effet GVL et ne semble pas perturber la reconstitution immunitaire anti-CMV après la greffe.

Le seconde étude, publiée par l'équipe de Robert Negrin (Pierini, Strober et al. 2016), a consisté à incuber des Treg thérapeutiques pendant une courte durée en présence de TNF α et d'IL-2. Ce régime préparatif des Treg augmente leur niveau d'expression de Foxp3, mais aussi de marqueurs d'activation ou associés à leur fonction suppressive, comme CD25, CD69, CTLA-4, LAG-3, CD62L, le TGF β et l'IL-10. Cet effet activateur du TNF α semblait bien spécifique des Treg et n'était pas observé avec les Tconv CD4⁺ Foxp3⁻. Le second effet du TNF α observé sur les Treg in vitro est une augmentation de leur pouvoir prolifératif. Mais là où cette étude est particulièrement intéressante, c'est quand les Treg ainsi préparés ex vivo sont ensuite utilisés pour du transfert adoptif. En effet, ils permettent d'améliorer les scores cliniques des souris receveuses dans un modèle murin de GVHa, de leur faire prendre du poids et d'allonger leur survie, et ce dès un ratio très déséquilibré de 1 Treg pour 10 Tconv, alors que ce n'est pas le cas pour des Treg n'ayant pas été pré-incubés avec le TNF α . Ce résultat est d'autant plus intéressant en termes d'application thérapeutique potentielle chez l'homme qu'il permet donc d'envisager une thérapie cellulaire efficace en utilisant un nombre plus restreint de cellules. Or la difficulté à obtenir un nombre suffisant de Treg est justement une des barrières au développement de stratégies de transfert adoptif chez l'homme.

Par ailleurs, les auteurs ont aussi montré que le conditionnement des LT provenant des souris donneuses par incubation avec du TNF α avant leur injection aux souris receveuses, conduit lui aussi à une GVHa moins sévère qu'avec des LT non pré-incubés, probablement par un effet du TNF α sur les Treg présents parmi les LT des donneuses, puisque cet effet bénéfique du TNF α est perdu en cas de déplétion préalable des LT en Treg. Enfin, cette étude a également pu montrer que l'effet bénéfique sur la GVHa du « priming » des Treg par le TNF α ne s'accompagnait pas d'une perte de l'effet GVL.

Au total, la mise en perspective des résultats de notre étude et de celles de Chopra et Pierini témoigne donc d'une efficacité in vivo du ciblage du récepteur TNFR2 exprimé par les Treg, au moins dans le domaine de la réaction allogénique complexe qu'est la GVHa. La confirmation de ces données dans des modèles de xéno-GVHa,

permettant l'évaluation préclinique in vivo sur des cellules humaines, pourrait ouvrir la voie à la réalisation de premiers essais cliniques de phase I chez l'homme, et ce d'autant plus qu'un agoniste humain du TNFR2 a déjà été développé par l'équipe de Chopra et a montré son efficacité in vitro (Chopra, Biehl et al. 2016). Si un tel traitement s'avérait bien toléré et aussi efficace que suggéré dans les modèles expérimentaux, son développement pourrait révolutionner la prévention et/ou le traitement de la GVHa.

Bien évidemment, le ciblage du récepteur TNFR2 a également un fort potentiel thérapeutique dans le champ des maladies auto-immunes, pour lesquelles le rôle physiopathologique des Treg et leur efficacité pour contrôler ces maladies n'est plus à démontrer (Lourenco and La Cava 2011). Ainsi, la PR, le lupus érythémateux systémique, la SEP, le diabète auto-immun mais aussi les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont autant d'exemples de pathologies pour lesquelles un traitement par un agoniste de TNFR2 pourrait avoir un intérêt et mériterait en tout cas d'être testé.

Intérêt du blocage spécifique de TNFR2 pour le traitement des rechutes post-allogreffe

En allogreffe de CSH, le principal effet thérapeutique de la procédure reposant, surtout en cas de conditionnement RIC ou NMA, sur l'effet GVL, on peut dans certaines situations chercher à non pas freiner l'alloréactivité, comme on l'a vu jusqu'ici dans le contexte de la GVH, mais au contraire à la stimuler. C'est notamment le cas dans les rechutes post-allogreffe ou en cas de chimérisme mixte persistant ou de début de rejet de la greffe.

Ainsi, l'une des options thérapeutiques souvent employées pour traiter et parfois prévenir les rechutes après allogreffe, consiste à réinjecter au patient des lymphocytes de son donneur (Castagna, Sarina et al. 2016). Ce traitement,

communément appelé DLI pour « donor lymphocyte infusion », n'est pas sans risque puisque ce « boost » de l'alloréactivité s'accompagne parfois logiquement de manifestations de GVH (sur un versant aigu et/ou chronique) et peut entraîner plus rarement une aplasie du greffon. Pour éviter une trop forte toxicité pouvant être fatale, les DLI sont généralement administrées en escalade de dose.

Le rôle des Treg comme frein à l'efficacité d'une telle stratégie a été suggéré par l'observation que le contenu des produits de thérapie cellulaire reçus par des patients ayant obtenu une réponse durable après DLI était moins riche en Treg que celui de patients n'ayant pas présenté une telle réponse (Hicheri, Bouchekioua et al. 2008). Il a donc ensuite été envisagé, afin d'augmenter l'efficacité des DLI, de procéder à une déplétion en Treg des cellules mononuclées du sang périphérique prélevées chez le donneur avant leur réinjection au patient. Cette approche a montré sa faisabilité et son efficacité d'abord chez des patients dits « réfractaires à l'alloréactivité » c'est-à-dire ayant reçu au moins une DLI standard au préalable et n'ayant présenté à aucun moment depuis l'allogreffe des signes cliniques de GVH (Maury, Lemoine et al. 2010), puis en première ligne de traitement de la rechute post-greffe, avec ou sans traitement cytoréducteur préalable (Nikiforow, Kim et al. 2016). Elle semble d'autant plus efficace qu'une déplétion des Treg endogènes est également réalisée via l'administration d'une chimiothérapie lymphopénisante au patient avant la réinjection (Maury, Lemoine et al. 2010).

Dans cette optique, les résultats de notre travail nous permettent d'envisager une approche alternative visant soit à incuber préalablement les cellules du donneur avec un mAb antagoniste de TNFR2, soit à administrer directement un tel mAb aux patients en rechute, de façon combinée ou non à une DLI, afin d'inhiber in vivo la fonction des Treg endogènes et/ou exogènes. Le récepteur TNFR2 peut ainsi être vu comme un nouveau point de contrôle du système immunitaire (« immune checkpoint ») dont l'inhibition pourrait lever le frein exercé par les Treg et stimuler les réponses immunitaires, en particulier allogéniques mais aussi anti-tumorales, au même titre que pour les anti-PD-1 et les anti-CTLA-4, dont certains ont justement

montré leur efficacité dans les rechutes post-allogreffe (Bashey, Medina et al. 2009, Davids, Kim et al. 2016, Yared, Hardy et al. 2016).

Intérêt du blocage spécifique de TNFR2 pour le traitement du cancer

Etant donné le rôle fondamental joué par les Treg dans l'échappement des tumeurs aux réponses immunitaires anti-tumorales (Nishikawa and Sakaguchi 2010), le champ d'application d'un blocage spécifique de TNFR2 pourrait s'étendre bien au-delà des simples rechutes d'hémopathies post-allogreffe et concerner la cancérologie en général. Certains types de tumeurs semblent plus particulièrement sensibles aux traitements visant à stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale, notamment le mélanome métastatique (Larkin, Chiarion-Sileni et al. 2015, Postow, Chesney et al. 2015, Robert, Long et al. 2015), le cancer pulmonaire non à petites cellules (Brahmer, Reckamp et al. 2015, Gettinger, Horn et al. 2015), le carcinome à cellules rénales (Motzer, Escudier et al. 2015) ou, en hématologie, le lymphome de Hodgkin (Ansell, Lesokhin et al. 2015, Younes, Santoro et al. 2016). Le traitement par anti-TNFR2 pourrait donc avoir un intérêt notamment dans ces cancers-là, mais aussi dans d'autres cancers pour lesquels il a été montré que le nombre de Treg infiltrant la tumeur et/ou la diminution du ratio $LT\ CD8^+/Treg$ au sein de la tumeur étaient associés à un plus mauvais pronostic, comme les cancers du sein, de l'estomac et de l'ovaire (Nishikawa and Sakaguchi 2010).

De même, un certain nombre d'autres cancers comme ceux de la tête et du cou, du foie, du pancréas et du tube digestif ont été associés à une augmentation de la proportion de Treg présents dans le sang périphérique ou à un nombre important de Treg infiltrant la tumeur elle-même ou ses ganglions de drainage. Par conséquent, dans ces cancers aussi, il existe un rationnel pour l'utilisation d'un traitement ciblant les Treg, tel qu'un antagoniste de TNFR2.

Si les immunothérapies ciblant PD-1 et CTLA-4 sont en train de littéralement révolutionner le traitement du cancer, et en particulier celui du mélanome métastatique, en améliorant la survie des patients d'une façon spectaculaire et quasi-inédite à ce jour, le traitement par anti-TNFR2 pourrait donc lui aussi rejoindre cet arsenal thérapeutique des immunothérapies ciblées du cancer (**figure 20**) et est en tout cas porteur de promesses qui méritent d'être investiguées à l'avenir. Une étude publiée en 2013 est venue étayer cette possibilité (Chopra, Riedel et al. 2013). En effet, les auteurs ont pu montrer dans un modèle expérimental de métastases pulmonaires de mélanome induites par le TNF α que la formation et le développement de ces métastases étaient favorisés par le recrutement de Treg au niveau du poumon. En revanche, en l'absence d'expression de TNF α ou de TNFR2 par les cellules du système immunitaire, on observait une diminution de la croissance des métastases, qui s'accompagnait d'un infiltrat cellulaire moins riche en Treg au niveau des poumons. Ces données suggèrent un rôle de l'activation des Treg par le TNF α via son interaction avec le récepteur TNFR2 pour créer un environnement tolérogène au niveau des sites métastatiques et empêcher ainsi le système immunitaire de contrôler le développement et la croissance des métastases tumorales.

Plus récemment, une équipe de Taiwan a apporté la preuve que le TNF α pouvait non seulement induire, via TNFR2, une expansion des Treg effecteurs impliqués dans la suppression des LT CD8⁺ anti-tumoraux, mais était aussi capable d'augmenter l'activité suppressive de ces Treg vis-à-vis des effecteurs de l'immunité anti-tumorale (Chang, Lin et al. 2015). Par ailleurs, dans un contexte de lymphodéplétion induite par le cyclophosphamide, dont il a été prouvé qu'elle favorise la ré-expansion rapide des Treg supprimant l'immunité anti-tumorale, comme observé aussi après irradiation (Baba, Watanabe et al. 2012), l'utilisation d'un anti-TNF α permet de prévenir la résurgence rapide des Treg effecteurs et d'inhiber fortement la croissance tumorale. Cette étude soutient donc également l'intérêt d'un blocage spécifique de l'interaction TNF α /TNFR2 pour inhiber les Treg effecteurs et augmenter les réponses immunitaires anti-tumorales.

Enfin, dans une étude très récente, de l'équipe de Faustman a testé pour la première fois *in vitro* l'effet d'un traitement par mAb antagoniste de TNFR2 sur l'immunité anti-tumorale, dans le but d'inhiber spécifiquement les Treg (Torrey, Butterworth et al. 2017). Dans des expériences de culture de LT CD4⁺, ils ont montré dans un premier temps qu'un tel traitement inhibait la prolifération des Treg et la libération de TNFR2 soluble, et favorisait l'expansion des Teff. Par ailleurs, l'effet des mAb antagonistes de TNFR2 semble plus spécifique des Treg intra-tumoraux, puisqu'ils entraînaient la mort cellulaire des Treg isolés dans le liquide d'ascite de patientes atteintes de cancers de l'ovaire d'une façon plus marquée que pour les Treg issus de donneurs sains. A l'inverse, la prolifération des Teff provenant de ces tumeurs est plus importante en présence d'anti-TNFR2 que celle de Teff issus de sujets sains.

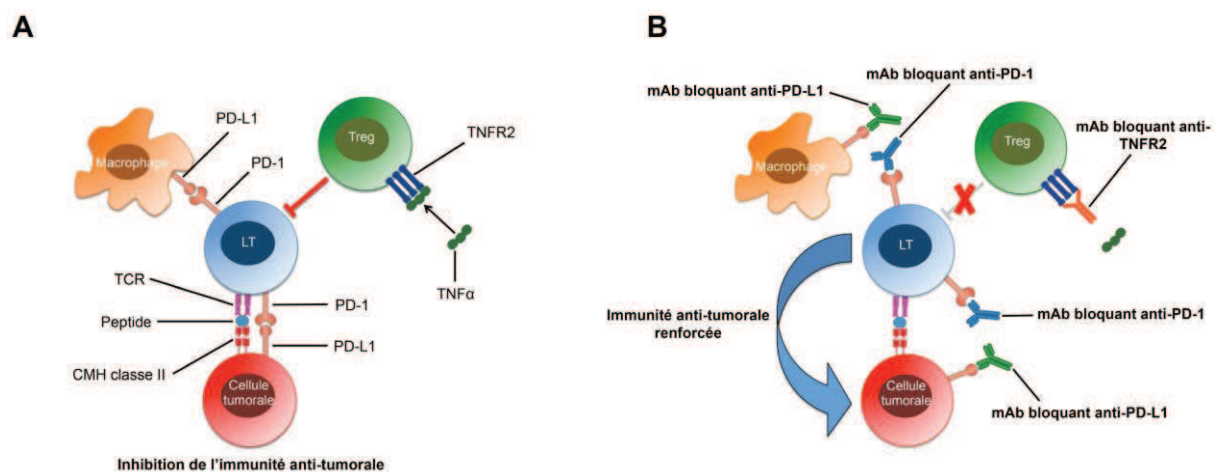


Figure 20 : Stimulation de l'immunité anti-tumorale par le blocage des points de contrôle du système immunitaire ou par l'inhibition de l'effet des Treg via un anti-TNFR2.

A : L'immunité anti-tumorale est inhibée à la fois par les Treg et par les points de contrôle du système immunitaire, telle l'interaction entre PD-1 et PD-L1, comme illustré ici, mais aussi CTLA-4. PD-1 est exprimé par les LT anti-tumoraux et son ligand PD-L1 par les cellules tumorales et certaines cellules du système immunitaire comme les macrophages. B : Le blocage de l'axe PD-1/PD-L1, grâce à l'utilisation de mAb bloquants anti-PD-1 ou anti-PD-L1, renforce l'immunité anti-tumorale. Le même phénomène pourrait être observé en inhibant la stimulation des Treg par leur récepteur TNFR2 grâce à un mAb bloquant anti-TNFR2, ce qui permettrait de lever le frein exercé par ces Treg sur les LT anti-tumoraux.

mAb : anticorps monoclonal.

Ciblage de TNFR2 : une équation à plusieurs inconnues ?

Si nous avons vu en introduction que l'effet du TNF α sur la fonction suppressive des Treg était encore sujet à controverse, certaines équipes ayant démontré qu'il diminuait leurs fonctions suppressives au lieu de les augmenter (Valencia, Stephens et al. 2006, Nagar, Jacob-Hirsch et al. 2010), il semblerait que ce soit aussi le cas dans le contexte particulier du rôle joué par ces Treg pour contrôler l'immunité anti-tumorale, même si la littérature à ce sujet est encore assez pauvre. En effet, une étude récente, a montré que l'utilisation d'un agoniste, et non pas d'un antagoniste, de TNFR2 était une immunothérapie particulièrement prometteuse dans le cancer (Williams, Mistry et al. 2016). Si cette étude confirme bien la pertinence du ciblage de TNFR2 pour stimuler l'immunité anti-tumorale, ses résultats vont exactement à l'opposé de ceux mentionnés plus haut et des perspectives ouvertes par nos travaux. En effet, dans l'étude rapportée par l'équipe de Williams, le traitement des souris par un agoniste de TNFR2 dans un modèle de tumeur colorectale inhibe la croissance tumorale, augmente l'infiltrat de LT CD8⁺ au sein des tumeurs ainsi que le ratio Teff CD8⁺/Treg et stimule la production d'IFN γ et l'expression d'ICOS par ces cellules T CD8⁺.

Comment, dès lors, s'y retrouver avec des résultats aussi contradictoires ? La clé pourrait résider dans le rôle joué par les autres types cellulaires exprimant TNFR2 en dehors des Treg et leur importance relative dans ces différents modèles, notamment en ce qui concerne les cellules NK (Xu, Chakrabarti et al. 2007, Almishri, Santodomingo-Garzon et al. 2016) et les LT CD8⁺. En l'occurrence, dans le papier de l'équipe de Williams, les cellules NK comme les LT CD8⁺ présents au sein de la tumeur exprimaient TNFR2, bien qu'à un niveau moindre par rapport aux Treg, alors que ce n'était pas le cas par exemple des LT CD8⁺ présents dans la rate de ces mêmes souris ou de souris saines. Par conséquent un effet direct de l'agoniste sur ces cellules effectrices infiltrant la tumeur peut avoir contribué à l'effet anti-tumoral observé.

Par ailleurs, comme le TNF α lui-même est capable d'induire une augmentation de l'expression de TNFR2 à la surface des Treg (Hamano, Huang et al. 2011), l'effet du ciblage de TNFR2 pourrait varier aussi en fonction du contexte plus ou moins inflammatoire dans lequel un tel ciblage est envisagé. En effet, si dans une maladie très inflammatoire comme la GVHa, le niveau d'expression de TNFR2 par les Treg est alors très élevé (proche de 100%, données personnelles non publiées), ce n'est peut-être pas toujours le cas dans certains cancers et dans ce cas le ciblage préférentiel de la population Treg via TNFR2 pourrait être perdu au profit d'autres populations cellulaires. Une étude récente est en faveur d'un tel effet différentiel de l'axe TNF α /TNFR2 sur les Treg en fonction du contexte inflammatoire. Dans ce travail, les auteurs ont montré que le mAb anti-TNF α adalimumab était capable de promouvoir, de façon paradoxale, l'expression du TNF α membranaire par les monocytes et son interaction avec TNFR2 exprimé par les Treg de patients souffrant de PR, conduisant à une expansion de ces Treg fonctionnels capables de supprimer la réponse Th17 et la production d'IFN γ (Nguyen and Ehrenstein 2016). De façon remarquable, cet effet de l'adalimumab n'était en revanche pas retrouvé avec des Treg provenant de donneurs sains, sans doute en raison d'un niveau d'expression plus faible du TNF α membranaire sur les monocytes et de TNFR2 sur les Treg dans un contexte non inflammatoire. De même, si l'etanercept était utilisé à la place de l'adalimumab, on n'observait pas non plus d'expansion des Treg provenant de patients atteints de PR, probablement du fait d'une moindre avidité de l'etanercept pour le TNF α membranaire exprimé par les monocytes. Par conséquent, l'effet d'un traitement anti-TNF α sur les Treg peut aussi varier en fonction de la molécule utilisée.

Un facteur de complexité supplémentaire pouvant influencer l'effet des traitements ciblant TNFR2 est le fait que dans un certain nombre de tumeurs hématologiques, comme la leucémie lymphoïde chronique, le lymphome folliculaire (Hui, Satkunam et al. 2006), le myélome multiple (Rauert, Stuhmer et al. 2011), le lymphome B diffus à grandes cellules (Nakayama, Yokote et al. 2014) ou le lymphome de Hodgkin (Nakayama, Yokote et al. 2014), les cellules tumorales elles-mêmes peuvent exprimer (fortement dans le cas du lymphome de Hodgkin) TNFR2. Par conséquent,

il ne peut être exclu qu'un traitement ciblant TNFR2 ait un effet propre et direct sur ces cellules tumorales. D'ailleurs, cette expression de TNFR2 par les cellules tumorales ne semble pas non plus limitée aux hémopathies, puisqu'elle a aussi été rapportée dans certains cancers solides comme le carcinome rénal à cellules claires (Al-Lamki, Wang et al. 2016), le cancer du côlon (Hamilton, Simmons et al. 2011) et le cancer de l'ovaire (Torrey, Butterworth et al. 2017). Dans le papier récent de l'équipe de Faustman déjà évoqué plus haut, les auteurs ont même pu montrer que la culture d'une lignée cellulaire de cancer de l'ovaire exprimant TNFR2 en présence de mAb antagoniste de TNFR2 conduisait à la mort des cellules tumorales de façon dose-dépendante (Torrey, Butterworth et al. 2017), ce qui semble confirmer la possibilité d'un effet anti-tumoral direct de cet anticorps.

Conclusion

En conclusion, les facteurs influant sur les effets du ciblage de TNFR2 en thérapeutique humaine sont probablement beaucoup plus complexes et nombreux qu'il n'y paraît et varient vraisemblablement selon le contexte physiopathologique étudié (auto-immunité, GVH, oncologie...). Quoi qu'il en soit, les données que nous rapportons, confrontées à celles déjà présentes dans la littérature, plaident fortement en faveur de l'intérêt d'une stimulation des Treg via TNFR2, que ce soit ex vivo pour produire une population de Treg à la fois plus riche, plus homogène et plus suppressive, mais aussi directement in vivo par injection d'un agoniste, au moins dans le contexte de la GVHa. Ils ouvrent également la voie au ciblage de TNFR2 par un antagoniste dans le domaine des rechutes post-allogreffe ou en oncologie, même si la variabilité des mécanismes alors impliqués ainsi que les effets sur différents types cellulaires en fonction du contexte particulier de chaque tumeur méritent d'être davantage étudiés et éclaircis au cours de futures études pré-cliniques.

REFERENCES

- Abe, J., S. Ueha, J. Suzuki, Y. Tokano, K. Matsushima and S. Ishikawa (2008). "Increased Foxp3(+) CD4(+) regulatory T cells with intact suppressive activity but altered cellular localization in murine lupus." Am J Pathol **173**(6): 1682-1692.
- Aggarwal, B. B. (2000). "Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB." Ann Rheum Dis **59 Suppl 1**: i6-16.
- Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **3**(9): 745-756.
- Ahmadzadeh, M. and S. A. Rosenberg (2006). "IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients." Blood **107**(6): 2409-2414.
- Akimova, T., U. H. Beier, L. Wang, M. H. Levine and W. W. Hancock (2011). "Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation." PLoS One **6**(8): e24226.
- Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Al-Lamki, R. S., J. Wang, J. Yang, N. Burrows, P. H. Maxwell, T. Eisen, A. Y. Warren, S. Vanharanta, S. Pacey, P. Vandenabeele, J. S. Pober and J. R. Bradley (2016). "Tumor necrosis factor receptor 2-signaling in CD133-expressing cells in renal clear cell carcinoma." Oncotarget **7**(17): 24111-24124.
- Allan, S. E., A. N. Alstad, N. Merindol, N. K. Crellin, M. Amendola, R. Bacchetta, L. Naldini, M. G. Roncarolo, H. Soudeyans and M. K. Levings (2008). "Generation of potent and stable human CD4+ T regulatory cells by activation-independent expression of FOXP3." Mol Ther **16**(1): 194-202.
- Allan, S. E., S. Q. Crome, N. K. Crellin, L. Passerini, T. S. Steiner, R. Bacchetta, M. G. Roncarolo and M. K. Levings (2007). "Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production." Int Immunol **19**(4): 345-354.
- Allan, S. E., L. Passerini, R. Bacchetta, N. Crellin, M. Dai, P. C. Orban, S. F. Ziegler, M. G. Roncarolo and M. K. Levings (2005). "The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs." J Clin Invest **115**(11): 3276-3284.
- Allan, S. E., G. X. Song-Zhao, T. Abraham, A. N. McMurchy and M. K. Levings (2008). "Inducible reprogramming of human T cells into Treg cells by a conditionally active form of FOXP3." Eur J Immunol **38**(12): 3282-3289.
- Almeida, A. R., N. Legrand, M. Papiernik and A. A. Freitas (2002). "Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers." J Immunol **169**(9): 4850-4860.

REFERENCES

- Almishri, W., T. Santodomingo-Garzon, T. Le, D. Stack, C. H. Mody and M. G. Swain (2016). "TNFalpha Augments Cytokine-Induced NK Cell IFNgamma Production through TNFR2." J Innate Immun **8**(6): 617-629.
- Alousi, A. M., D. J. Weisdorf, B. R. Logan, J. Bolanos-Meade, S. Carter, N. Difronzo, M. Pasquini, S. C. Goldstein, V. T. Ho, B. Hayes-Lattin, J. R. Wingard, M. M. Horowitz and J. E. Levine (2009). "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 **114**(3): 511-517.
- Aluvihare, V. R., M. Kallikourdis and A. G. Betz (2004). "Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus." Nat Immunol **5**(3): 266-271.
- Alves, N. L., E. M. van Leeuwen, I. A. Derks and R. A. van Lier (2008). "Differential regulation of human IL-7 receptor alpha expression by IL-7 and TCR signaling." J Immunol **180**(8): 5201-5210.
- Alyea, E. P., D. J. DeAngelo, J. Moldrem, J. M. Pagel, D. Przepiorka, M. Sadelin, J. W. Young, S. Giralt, M. Bishop and S. Riddell (2010). "NCI First International Workshop on The Biology, Prevention and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: report from the committee on prevention of relapse following allogeneic cell transplantation for hematologic malignancies." Biol Blood Marrow Transplant **16**(8): 1037-1069.
- Anasetti, C., B. R. Logan, S. J. Lee, E. K. Waller, D. J. Weisdorf, J. R. Wingard, C. S. Cutler, P. Westervelt, A. Woolfrey, S. Couban, G. Ehninger, L. Johnston, R. T. Maziarz, M. A. Pulsipher, D. L. Porter, S. Mineishi, J. M. McCarty, S. P. Khan, P. Anderlini, W. I. Bensinger, S. F. Leitman, S. D. Rowley, C. Bredeson, S. L. Carter, M. M. Horowitz, D. L. Confer, Blood and Marrow Transplant Clinical Trials (2012). "Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors." N Engl J Med **367**(16): 1487-1496.
- Anderson, B. E., J. McNiff, J. Yan, H. Doyle, M. Mamula, M. J. Shlomchik and W. D. Shlomchik (2003). "Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease." J Clin Invest **112**(1): 101-108.
- Andolina, M., M. Rabusin, N. Maximova and G. Di Leo (2000). "Etanercept in graft-versus-host disease." Bone Marrow Transplant **26**(8): 929.
- Annunziato, F., L. Cosmi, F. Liotta, E. Lazzeri, R. Manetti, V. Vanini, P. Romagnani, E. Maggi and S. Romagnani (2002). "Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes." J Exp Med **196**(3): 379-387.
- Ansell, S. M., A. M. Lesokhin, I. Borrello, A. Halwani, E. C. Scott, M. Gutierrez, S. J. Schuster, M. M. Millenson, D. Cattray, G. J. Freeman, S. J. Rodig, B. Chapuy, A. H. Ligon, L. Zhu, J. F. Grosso, S. Y. Kim, J. M. Timmerman, M. A. Shipp and P. Armand

REFERENCES

(2015). "PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma." N Engl J Med **372**(4): 311-319.

Appelbaum, F. R. (2015). "Hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia with minimal residual disease." Best Pract Res Clin Haematol **28**(2-3): 133-140.

Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi and S. Sakaguchi (1996). "Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation." J Exp Med **184**(2): 387-396.

Aschenbrenner, K., L. M. D'Cruz, E. H. Vollmann, M. Hinterberger, J. Emmerich, L. K. Swee, A. Rolink and L. Klein (2007). "Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells." Nat Immunol **8**(4): 351-358.

Ashley, C. W. and C. Baecher-Allan (2009). "Cutting Edge: Responder T cells regulate human DR+ effector regulatory T cell activity via granzyme B." J Immunol **183**(8): 4843-4847.

Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman and F. Powrie (1999). "An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation." J Exp Med **190**(7): 995-1004.

Ayuk, F., G. Diyachenko, T. Zabelina, J. Panse, C. Wolschke, T. Eiermann, T. Binder, B. Fehse, R. Erttmann, H. Kabisch, U. Bacher, N. Kroger and A. R. Zander (2008). "Anti-thymocyte globulin overcomes the negative impact of HLA mismatching in transplantation from unrelated donors." Exp Hematol **36**(8): 1047-1054.

Baba, J., S. Watanabe, Y. Saida, T. Tanaka, T. Miyabayashi, J. Koshio, K. Ichikawa, K. Nozaki, T. Koya, K. Deguchi, C. Tan, S. Miura, H. Tanaka, J. Tanaka, H. Kagamu, H. Yoshizawa, K. Nakata and I. Narita (2012). "Depletion of radio-resistant regulatory T cells enhances antitumor immunity during recovery from lymphopenia." Blood **120**(12): 2417-2427.

Bacigalupo, A., T. Lamparelli, P. Bruzzi, S. Guidi, P. E. Alessandrino, P. di Bartolomeo, R. Oneto, B. Bruno, M. Barbanti, N. Sacchi, M. T. Van Lint and A. Bosi (2001). "Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO)." Blood **98**(10): 2942-2947.

Baecher-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman and D. A. Hafler (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol **167**(3): 1245-1253.

Baecher-Allan, C., E. Wolf and D. A. Hafler (2006). "MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells." J Immunol **176**(8): 4622-4631.

REFERENCES

- Baeyens, A., D. Saadoun, F. Billiard, A. Rouers, S. Gregoire, B. Zaragoza, Y. Grinberg-Bleyer, G. Marodon, E. Piaggio and B. L. Salomon (2015). "Effector T cells boost regulatory T cell expansion by IL-2, TNF, OX40, and plasmacytoid dendritic cells depending on the immune context." J Immunol **194**(3): 999-1010.
- Ban, L., J. Zhang, L. Wang, W. Kuhlreiber, D. Burger and D. L. Faustman (2008). "Selective death of autoreactive T cells in human diabetes by TNF or TNF receptor 2 agonism." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(36): 13644-13649.
- Barnes, D. W., M. J. Corp, J. F. Loutit and F. E. Neal (1956). "Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication." Br Med J **2**(4993): 626-627.
- Barthlott, T., A. J. Bosch, C. Berkemeier, R. Nogales-Cadenas, L. T. Jeker, M. P. Keller, A. Pascual-Montano and G. A. Hollander (2015). "A subpopulation of CD103(pos) ICOS(pos) Treg cells occurs at high frequency in lymphopenic mice and represents a lymph node specific differentiation stage." Eur J Immunol **45**(6): 1760-1771.
- Bashey, A., B. Medina, S. Corringham, M. Pasek, E. Carrier, L. Vrooman, I. Lowy, S. R. Solomon, L. E. Morris, H. K. Holland, J. R. Mason, E. P. Alyea, R. J. Soiffer and E. D. Ball (2009). "CTLA4 blockade with ipilimumab to treat relapse of malignancy after allogeneic hematopoietic cell transplantation." Blood **113**(7): 1581-1588.
- Bashey, A., X. Zhang, C. A. Sizemore, K. Manion, S. Brown, H. K. Holland, L. E. Morris and S. R. Solomon (2013). "T-cell-replete HLA-haploidentical hematopoietic transplantation for hematologic malignancies using post-transplantation cyclophosphamide results in outcomes equivalent to those of contemporaneous HLA-matched related and unrelated donor transplantation." J Clin Oncol **31**(10): 1310-1316.
- Battaglia, A., A. Buzzonetti, G. Monego, L. Peri, G. Ferrandina, F. Fanfani, G. Scambia and A. Fattorossi (2008). "Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer." Immunology **123**(1): 129-138.
- Battaglia, M., A. Stabilini, B. Migliavacca, J. Horejs-Hoeck, T. Kaupper and M. G. Roncarolo (2006). "Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients." J Immunol **177**(12): 8338-8347.
- Beelen, D. W., A. Elmaagacli, K. D. Muller, H. Hirche and U. W. Schaefer (1999). "Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial." Blood **93**(10): 3267-3275.

REFERENCES

- Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance and H. D. Ochs (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet **27**(1): 20-21.
- Bensinger, W. I., P. J. Martin, B. Storer, R. Clift, S. J. Forman, R. Negrin, A. Kashyap, M. E. Flowers, K. Lilleby, T. R. Chauncey, R. Storb and F. R. Appelbaum (2001). "Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers." N Engl J Med **344**(3): 175-181.
- Benson, M. J., K. Pino-Lagos, M. Roseblatt and R. J. Noelle (2007). "All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation." J Exp Med **204**(8): 1765-1774.
- Berenbaum, M. C. and I. N. Brown (1963). "Prolongation of Homograft Survival in Mice with Single Doses of Cyclophosphamide." Nature **200**: 84.
- Berenbaum, M. C. and I. N. Brown (1964). "Dose-Response Relationships for Agents Inhibiting the Immune Response." Immunology **7**: 65-71.
- Bergmann, C., L. Strauss, R. Zeidler, S. Lang and T. L. Whiteside (2007). "Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment." Cancer Immunol Immunother **56**(9): 1429-1442.
- Betelli, E., M. Dastrange and M. Oukka (2005). "Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(14): 5138-5143.
- Bilate, A. M. and J. J. Lafaille (2010). "Can TNF-alpha boost regulatory T cells?" J Clin Invest **120**(12): 4190-4192.
- Billingham, R. E. (1959). "Reactions of grafts against their hosts." Science **130**(3381): 947-953.
- Billingham, R. E. (1966). "The biology of graft-versus-host reactions." Harvey Lect **62**: 21-78.
- Blaise, D., M. Kuentz, C. Fortanier, J. H. Bourhis, N. Milpied, L. Sutton, J. P. Jouet, M. Attal, P. Bordigoni, J. Y. Cahn, J. M. Boiron, M. P. Schuller, J. P. Moatti and M. Michallet (2000). "Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle." J Clin Oncol **18**(3): 537-546.
- Blazar, B. R., B. M. Carreno, A. Panoskaltsis-Mortari, L. Carter, Y. Iwai, H. Yagita, H. Nishimura and P. A. Taylor (2003). "Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN-gamma-dependent mechanism." J Immunol **171**(3): 1272-1277.

REFERENCES

- Blazar, B. R., B. S. Kwon, A. Panoskaltsis-Mortari, K. B. Kwak, J. J. Peschon and P. A. Taylor (2001). "Ligation of 4-1BB (CDw137) regulates graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia, and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients." J Immunol **166**(5): 3174-3183.
- Blazar, B. R., R. B. Levy, T. W. Mak, A. Panoskaltsis-Mortari, H. Muta, M. Jones, M. Roskos, J. S. Serody, H. Yagita, E. R. Podack and P. A. Taylor (2004). "CD30/CD30 ligand (CD153) interaction regulates CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease." J Immunol **173**(5): 2933-2941.
- Blazar, B. R., A. H. Sharpe, A. I. Chen, A. Panoskaltsis-Mortari, C. Lees, H. Akiba, H. Yagita, N. Killeen and P. A. Taylor (2003). "Ligation of OX40 (CD134) regulates graft-versus-host disease (GVHD) and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients." Blood **101**(9): 3741-3748.
- Blazar, B. R., P. A. Taylor, A. Panoskaltsis-Mortari, J. Buhlman, J. Xu, R. A. Flavell, R. Korngold, R. Noelle and D. A. Valleria (1997). "Blockade of CD40 ligand-CD40 interaction impairs CD4+ T cell-mediated alloreactivity by inhibiting mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation." J Immunol **158**(1): 29-39.
- Blazar, B. R., P. A. Taylor, D. C. Snover, S. N. Sehgal and D. A. Valleria (1993). "Murine recipients of fully mismatched donor marrow are protected from lethal graft-versus-host disease by the in vivo administration of rapamycin but develop an autoimmune-like syndrome." J Immunol **151**(10): 5726-5741.
- Bloom, B. R., P. Salgame and B. Diamond (1992). "Revisiting and revising suppressor T cells." Immunol Today **13**(4): 131-136.
- Boissonnas, A., A. Scholer-Dahirel, V. Simon-Blancal, L. Pace, F. Valet, A. Kissenpfennig, T. Sparwasser, B. Malissen, L. Fetler and S. Amigorena (2010). "Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes." Immunity **32**(2): 266-278.
- Bolanos-Meade, J., B. R. Logan, A. M. Alousi, J. H. Antin, K. Barowski, S. L. Carter, S. C. Goldstein, E. O. Hexner, M. M. Horowitz, S. J. Lee, J. E. Levine, M. L. MacMillan, P. J. Martin, A. M. Mendizabal, R. Nakamura, M. C. Pasquini, D. J. Weisdorf, P. Westervelt and V. T. Ho (2014). "Phase 3 clinical trial of steroids/mycophenolate mofetil vs steroids/placebo as therapy for acute GVHD: BMT CTN 0802." Blood **124**(22): 3221-3227; quiz 3335.
- Bolwell, B., R. Sobecks, B. Pohlman, S. Andresen, L. Rybicki, E. Kuczkowski and M. Kalaycio (2004). "A prospective randomized trial comparing cyclosporine and short course methotrexate with cyclosporine and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis in myeloablative allogeneic bone marrow transplantation." Bone Marrow Transplant **34**(7): 621-625.

REFERENCES

- Bonhagen, K., O. Liesenfeld, M. J. Stadecker, A. Hutloff, K. Erb, A. J. Coyle, M. Lipp, R. A. Kroczyk and T. Kamradt (2003). "ICOS+ Th cells produce distinct cytokines in different mucosal immune responses." Eur J Immunol **33**(2): 392-401.
- Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit and E. Schmitt (2007). "Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression." J Exp Med **204**(6): 1303-1310.
- Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M. L. Dell'Acqua, P. M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke and K. Falk (2007). "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression." Blood **110**(4): 1225-1232.
- Brahmer, J., K. L. Reckamp, P. Baas, L. Crino, W. E. Eberhardt, E. Poddubskaya, S. Antonia, A. Pluzanski, E. E. Vokes, E. Holgado, D. Waterhouse, N. Ready, J. Gainor, O. Aren Frontera, L. Havel, M. Steins, M. C. Garassino, J. G. Aerts, M. Domine, L. Paz-Ares, M. Reck, C. Baudalet, C. T. Harbison, B. Lestini and D. R. Spigel (2015). "Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer." N Engl J Med **373**(2): 123-135.
- Broadly, R., J. Yu and M. K. Levings (2009). "ATG-induced expression of FOXP3 in human CD4(+) T cells in vitro is associated with T-cell activation and not the induction of FOXP3(+) T regulatory cells." Blood **114**(24): 5003-5006.
- Brockhaus, M., H. J. Schoenfeld, E. J. Schlaeger, W. Hunziker, W. Lesslauer and H. Loetscher (1990). "Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(8): 3127-3131.
- Brown, G. R., E. Lee and D. L. Thiele (2002). "TNF-TNFR2 interactions are critical for the development of intestinal graft-versus-host disease in MHC class II-disparate (C57BL/6J-->C57BL/6J x bm12)F1 mice." J Immunol **168**(6): 3065-3071.
- Bruder, D., M. Probst-Kepper, A. M. Westendorf, R. Geffers, S. Beissert, K. Loser, H. von Boehmer, J. Buer and W. Hansen (2004). "Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells." Eur J Immunol **34**(3): 623-630.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler and F. Ramsdell (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.
- Brunstein, C. G., B. R. Blazar, J. S. Miller, Q. Cao, K. L. Hippen, D. H. McKenna, J. Curtsinger, P. B. McGlave and J. E. Wagner (2013). "Adoptive transfer of umbilical

cord blood-derived regulatory T cells and early viral reactivation." Biol Blood Marrow Transplant **19**(8): 1271-1273.

Brunstein, C. G., E. J. Fuchs, S. L. Carter, C. Karanes, L. J. Costa, J. Wu, S. M. Devine, J. R. Wingard, O. S. Aljitiawi, C. S. Cutler, M. H. Jagasia, K. K. Ballen, M. Eapen and P. V. O'Donnell (2011). "Alternative donor transplantation after reduced intensity conditioning: results of parallel phase 2 trials using partially HLA-mismatched related bone marrow or unrelated double umbilical cord blood grafts." Blood **118**(2): 282-288.

Brunstein, C. G., J. S. Miller, Q. Cao, D. H. McKenna, K. L. Hippen, J. Curtsinger, T. Defor, B. L. Levine, C. H. June, P. Rubinstein, P. B. McGlave, B. R. Blazar and J. E. Wagner (2011). "Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics." Blood **117**(3): 1061-1070.

Brunstein, C. G., J. S. Miller, D. H. McKenna, K. L. Hippen, T. E. DeFor, D. Sumstad, J. Curtsinger, M. R. Verneris, M. L. MacMillan, B. L. Levine, J. L. Riley, C. H. June, C. Le, D. J. Weisdorf, P. B. McGlave, B. R. Blazar and J. E. Wagner (2016). "Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect." Blood **127**(8): 1044-1051.

Budde, H., S. Kolb, L. Salinas Tejedor, G. Wulf, H. M. Reichardt, J. Riggert and T. J. Legler (2014). "Modified extracorporeal photopheresis with cells from a healthy donor for acute graft-versus-host disease in a mouse model." PLoS One **9**(8): e105896.

Burchill, M. A., J. Yang, C. Vogtenhuber, B. R. Blazar and M. A. Farrar (2007). "IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells." J Immunol **178**(1): 280-290.

Burmeister, Y., T. Lischke, A. C. Dahler, H. W. Mages, K. P. Lam, A. J. Coyle, R. A. Kroczek and A. Hutloff (2008). "ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells." J Immunol **180**(2): 774-782.

Busca, A., F. Locatelli, F. Marmont, C. Ceretto and M. Falda (2007). "Recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor fusion protein as treatment for steroid refractory graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Am J Hematol **82**(1): 45-52.

Cahn, J. Y., J. P. Klein, S. J. Lee, N. Milpied, D. Blaise, J. H. Antin, V. Leblond, N. Ifrah, J. P. Jouet, F. Loberiza, O. Ringden, A. J. Barrett, M. M. Horowitz, G. Socie, C. Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie, I. Dana Farber Cancer and R. International Bone Marrow Transplant (2005). "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 **106**(4): 1495-1500.

REFERENCES

- Camperio, C., S. Caristi, G. Fanelli, M. Soligo, P. Del Porto and E. Piccolella (2012). "Forkhead transcription factor FOXP3 upregulates CD25 expression through cooperation with RelA/NF-kappaB." PLoS One **7**(10): e48303.
- Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms and T. J. Ley (2007). "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance." Immunity **27**(4): 635-646.
- Carniti, C., S. Gimondi, A. Vendramin, C. Recordati, D. Confalonieri, A. Bermema, P. Corradini and J. Mariotti (2015). "Pharmacologic Inhibition of JAK1/JAK2 Signaling Reduces Experimental Murine Acute GVHD While Preserving GVT Effects." Clin Cancer Res **21**(16): 3740-3749.
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore and B. Williamson (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-3670.
- Castagna, L., B. Sarina, S. Bramanti, P. Perseghin, J. Mariotti and L. Morabito (2016). "Donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation." Transfus Apher Sci **54**(3): 345-355.
- Castor, M. G., B. Rezende, C. B. Resende, A. L. Alessandri, C. T. Fagundes, L. P. Sousa, R. M. Arantes, D. G. Souza, T. A. Silva, A. E. Proudfoot, M. M. Teixeira and V. Pinho (2010). "The CCL3/macrophage inflammatory protein-1alpha-binding protein evasin-1 protects from graft-versus-host disease but does not modify graft-versus-leukemia in mice." J Immunol **184**(5): 2646-2654.
- Caudy, A. A., S. T. Reddy, T. Chatila, J. P. Atkinson and J. W. Verbsky (2007). "CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes." J Allergy Clin Immunol **119**(2): 482-487.
- Cederbom, L., H. Hall and F. Ivars (2000). "CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells." Eur J Immunol **30**(6): 1538-1543.
- Chang, L. Y., Y. C. Lin, J. M. Chiang, J. Mahalingam, S. H. Su, C. T. Huang, W. T. Chen, C. H. Huang, W. J. Jeng, Y. C. Chen, S. M. Lin, I. S. Sheen and C. Y. Lin (2015). "Blockade of TNF-alpha signaling benefits cancer therapy by suppressing effector regulatory T cell expansion." Oncoimmunology **4**(10): e1040215.
- Chaudhry, A., D. Rudra, P. Treuting, R. M. Samstein, Y. Liang, A. Kas and A. Y. Rudensky (2009). "CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner." Science **326**(5955): 986-991.
- Chen, C., E. A. Rowell, R. M. Thomas, W. W. Hancock and A. D. Wells (2006). "Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation." J Biol Chem **281**(48): 36828-36834.

REFERENCES

- Chen, X., M. Baumel, D. N. Mannel, O. M. Howard and J. J. Oppenheim (2007). "Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells." J Immunol **179**(1): 154-161.
- Chen, X., R. Das, R. Komorowski, A. Beres, M. J. Hessner, M. Mihara and W. R. Drobyski (2009). "Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease." Blood **114**(4): 891-900.
- Chen, X., R. Hamano, J. J. Subleski, A. A. Hurwitz, O. M. Howard and J. J. Oppenheim (2010). "Expression of costimulatory TNFR2 induces resistance of CD4+FoxP3- conventional T cells to suppression by CD4+FoxP3+ regulatory T cells." J Immunol **185**(1): 174-182.
- Chen, X., J. J. Subleski, R. Hamano, O. M. Howard, R. H. Wiltrot and J. J. Oppenheim (2010). "Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood." Eur J Immunol **40**(4): 1099-1106.
- Chen, X., J. J. Subleski, H. Kopf, O. M. Howard, D. N. Mannel and J. J. Oppenheim (2008). "Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells." J Immunol **180**(10): 6467-6471.
- Chen, X., X. Wu, Q. Zhou, O. M. Howard, M. G. Netea and J. J. Oppenheim (2013). "TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment." J Immunol **190**(3): 1076-1084.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler and H. L. Weiner (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." Science **265**(5176): 1237-1240.
- Chiffolleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J. P. Soulillou and M. C. Cuturi (2002). "Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment." J Immunol **168**(10): 5058-5069.
- Choi, J. M. and A. L. Bothwell (2012). "The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases." Mol Cells **33**(3): 217-222.
- Choi, S. W., C. L. Kitko, T. Braun, S. Paczesny, G. Yanik, S. Mineishi, O. Krijanovski, D. Jones, J. Whitfield, K. Cooke, R. J. Hutchinson, J. L. Ferrara and J. E. Levine (2008). "Change in plasma tumor necrosis factor receptor 1 levels in the first week after myeloablative allogeneic transplantation correlates with severity and incidence of GVHD and survival." Blood **112**(4): 1539-1542.
- Choi, S. W., P. Stiff, K. Cooke, J. L. Ferrara, T. Braun, C. Kitko, P. Reddy, G. Yanik, S. Mineishi, S. Paczesny, D. Hanauer, A. Pawarode, E. Peres, T. Rodriguez, S. Smith and J. E. Levine (2012). "TNF-inhibition with etanercept for graft-versus-host

REFERENCES

disease prevention in high-risk HCT: lower TNFR1 levels correlate with better outcomes." Biol Blood Marrow Transplant **18**(10): 1525-1532.

Chopra, M., M. Biehl, T. Steinfatt, A. Brandl, J. Kums, J. Amich, M. Vaeth, J. Kuen, R. Holtappels, J. Podlech, A. Mottok, S. Kraus, A. L. Jordan-Garrote, C. A. Bauerlein, C. Brede, E. Ribechini, A. Fick, A. Seher, J. Polz, K. J. Ottmuller, J. Baker, H. Nishikii, M. Ritz, K. Mattenheimer, S. Schwinn, T. Winter, V. Schafer, S. Krappmann, H. Einsele, T. D. Muller, M. J. Reddehase, M. B. Lutz, D. N. Mannel, F. Berberich-Siebelt, H. Wajant and A. Beilhack (2016). "Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD via host T reg cell expansion." J Exp Med **213**(9): 1881-1900.

Chopra, M., S. S. Riedel, M. Biehl, S. Krieger, V. von Krosigk, C. A. Bauerlein, C. Brede, A. L. Jordan Garrote, S. Kraus, V. Schafer, M. Ritz, K. Mattenheimer, A. Degla, A. Mottok, H. Einsele, H. Wajant and A. Beilhack (2013). "Tumor necrosis factor receptor 2-dependent homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental metastasis." Carcinogenesis **34**(6): 1296-1303.

Cipolletta, D., M. Feuerer, A. Li, N. Kamei, J. Lee, S. E. Shoelson, C. Benoist and D. Mathis (2012). "PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells." Nature **486**(7404): 549-553.

Cohen, J. L., A. Trenado, D. Vasey, D. Klatzmann and B. L. Salomon (2002). "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease." J Exp Med **196**(3): 401-406.

Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg and D. A. Vignali (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature **450**(7169): 566-569.

Congdon, C. C., D. Uphoff and E. Lorenz (1952). "Modification of acute irradiation injury in mice and guinea pigs by injection of bone marrow; a histopathologic study." J Natl Cancer Inst **13**(1): 73-107.

Cooke, K. R., L. Kobzik, T. R. Martin, J. Brewer, J. Delmonte, Jr., J. M. Crawford and J. L. Ferrara (1996). "An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin." Blood **88**(8): 3230-3239.

Coombes, J. L., K. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Carcamo, J. Hall, C. M. Sun, Y. Belkaid and F. Powrie (2007). "A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism." J Exp Med **204**(8): 1757-1764.

Cope, A. P., R. S. Liblau, X. D. Yang, M. Congia, C. Laudanna, R. D. Schreiber, L. Probert, G. Kollias and H. O. McDevitt (1997). "Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T cell receptor signaling." J Exp Med **185**(9): 1573-1584.

REFERENCES

- Corbel, C., V. Lemarchandel, V. Thomas-Vaslin, A. S. Pelus, C. Agboton and P. H. Romeo (2007). "Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation." Dev Comp Immunol **31**(11): 1082-1094.
- Couriel, D. R., R. Saliba, M. de Lima, S. Giralt, B. Andersson, I. Khouri, C. Hosing, C. Ippoliti, E. J. Shpall, R. Champlin and A. Alousi (2009). "A phase III study of infliximab and corticosteroids for the initial treatment of acute graft-versus-host disease." Biol Blood Marrow Transplant **15**(12): 1555-1562.
- Couturier, M., B. Lamarthee, J. Arbez, J. C. Renauld, C. Bossard, F. Malard, F. Bonnefoy, M. Mohty, S. Perruche, P. Tiberghien, P. Saas and B. Gaugler (2013). "IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect." Leukemia **27**(7): 1527-1537.
- Crome, S. Q., A. Y. Wang and M. K. Levings (2010). "Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease." Clin Exp Immunol **159**(2): 109-119.
- Crotty, S. (2011). "Follicular helper CD4 T cells (TFH)." Annu Rev Immunol **29**: 621-663.
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille (2009). "Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?" Immunity **30**(5): 626-635.
- Darrasse-Jeze, G., D. Klatzmann, F. Charlotte, B. L. Salomon and J. L. Cohen (2006). "CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice." Immunol Lett **102**(1): 106-109.
- Davids, M. S., H. T. Kim, P. Bachireddy, C. Costello, R. Liguori, A. Savell, A. P. Lukez, D. Avigan, Y. B. Chen, P. McSweeney, N. R. LeBoeuf, M. S. Rooney, M. Bowden, C. W. Zhou, S. R. Granter, J. L. Hornick, S. J. Rodig, M. Hirakawa, M. Severgnini, F. S. Hodi, C. J. Wu, V. T. Ho, C. Cutler, J. Koreth, E. P. Alyea, J. H. Antin, P. Armand, H. Streicher, E. D. Ball, J. Ritz, A. Bashey and R. J. Soiffer (2016). "Ipilimumab for Patients with Relapse after Allogeneic Transplantation." N Engl J Med **375**(2): 143-153.
- De Bandt, M., J. Sibilia, X. Le Loet, S. Prouzeau, B. Fautrel, C. Marcelli, E. Boucquillard, J. L. Siame, X. Mariette and I. Club Rhumatismes et (2005). "Systemic lupus erythematosus induced by anti-tumour necrosis factor alpha therapy: a French national survey." Arthritis Res Ther **7**(3): R545-551.
- De Rycke, L., D. Baeten, E. Kruithof, F. Van den Bosch, E. M. Veys and F. De Keyser (2005). "The effect of TNFalpha blockade on the antinuclear antibody profile in patients with chronic arthritis: biological and clinical implications." Lupus **14**(12): 931-937.
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enyoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom and S. C. Robson (2007).

"Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." J Exp Med **204**(6): 1257-1265.

Deeg, H. J. (2007). "How I treat refractory acute GVHD." Blood **109**(10): 4119-4126.

Deeg, H. J. and B. M. Sandmaier (2010). "Who is fit for allogeneic transplantation?" Blood **116**(23): 4762-4770.

Deeg, H. J., R. Storb, P. L. Weiden, T. Graham, K. Atkinson and E. D. Thomas (1981). "Cyclosporin-A: effect on marrow engraftment and graft-versus-host disease in dogs." Transplant Proc **13**(1 Pt 1): 402-404.

Deeg, H. J., R. Storb, P. L. Weiden, R. F. Raff, G. E. Sale, K. Atkinson, T. C. Graham and E. D. Thomas (1982). "Cyclosporin A and methotrexate in canine marrow transplantation: engraftment, graft-versus-host disease, and induction of intolerance." Transplantation **34**(1): 30-35.

Del Pozo-Balado Mdel, M., M. Leal, G. Mendez-Lagares and Y. M. Pacheco (2010). "CD4(+)CD25(+/hi)CD127(lo) phenotype does not accurately identify regulatory T cells in all populations of HIV-infected persons." J Infect Dis **201**(3): 331-335.

Devillier, R., S. Furst, R. Crocchiolo, J. El-Cheikh, L. Castagna, S. Harbi, A. Granata, E. D'Incan, D. Coso, C. Chabannon, C. Picard, A. Etienne, B. Calmels, J. M. Schiano, C. Lemarie, A. M. Stoppa, R. Bouabdallah, N. Vey and D. Blaise (2014). "A conditioning platform based on fludarabine, busulfan, and 2 days of rabbit antithymocyte globulin results in promising results in patients undergoing allogeneic transplantation from both matched and mismatched unrelated donor." Am J Hematol **89**(1): 83-87.

Di Ianni, M., F. Falzetti, A. Carotti, A. Terenzi, F. Castellino, E. Bonifacio, B. Del Papa, T. Zei, R. I. Ostini, D. Cecchini, T. Aloisi, K. Perruccio, L. Ruggeri, C. Balucani, A. Pierini, P. Sportoletti, C. Aristei, B. Falini, Y. Reisner, A. Velardi, F. Aversa and M. F. Martelli (2011). "Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation." Blood **117**(14): 3921-3928.

Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger and G. Schuler (2001). "Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood." J Exp Med **193**(11): 1303-1310.

Diez-Ruiz, A., G. P. Tilz, R. Zangerle, G. Baier-Bitterlich, H. Wachter and D. Fuchs (1995). "Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis." Eur J Haematol **54**(1): 1-8.

Doisne, J. M., C. M. Huber, K. Okkenhaug and F. Colucci (2015). "Immunomodulation of Selective Naive T Cell Functions by p110delta Inactivation Improves the Outcome of Mismatched Cell Transplantation." Cell Rep.

REFERENCES

- Dominguez-Villar, M., C. M. Baecher-Allan and D. A. Hafler (2011). "Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease." Nat Med **17**(6): 673-675.
- Du, J., C. Huang, B. Zhou and S. F. Ziegler (2008). "Isoform-specific inhibition of ROR alpha-mediated transcriptional activation by human FOXP3." J Immunol **180**(7): 4785-4792.
- Duhen, T., R. Duhen, A. Lanzavecchia, F. Sallusto and D. J. Campbell (2012). "Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells." Blood **119**(19): 4430-4440.
- Duthoit, C. T., D. J. Mekala, R. S. Alli and T. L. Geiger (2005). "Uncoupling of IL-2 signaling from cell cycle progression in naive CD4+ T cells by regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes." J Immunol **174**(1): 155-163.
- Edinger, M., P. Hoffmann, J. Ermann, K. Drago, C. G. Fathman, S. Strober and R. S. Negrin (2003). "CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation." Nat Med **9**(9): 1144-1150.
- Ehrenstein, M. R., J. G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D. A. Isenberg and C. Mauri (2004). "Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy." J Exp Med **200**(3): 277-285.
- Elpek, K. G., E. S. Yolcu, D. D. Franke, C. Lacelle, R. H. Schabowsky and H. Shirwan (2007). "Ex vivo expansion of CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling." J Immunol **179**(11): 7295-7304.
- Erhardt, A., M. Biburger, T. Papadopoulos and G. Tiegs (2007). "IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice." Hepatology **45**(2): 475-485.
- Ermann, J., P. Hoffmann, M. Edinger, S. Dutt, F. G. Blankenberg, J. P. Higgins, R. S. Negrin, C. G. Fathman and S. Strober (2005). "Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD." Blood **105**(5): 2220-2226.
- Eto, M., H. Mayumi, Y. Tomita, Y. Yoshikai, Y. Nishimura, T. Maeda, T. Ando and K. Nomoto (1991). "Specific destruction of host-reactive mature T cells of donor origin prevents graft-versus-host disease in cyclophosphamide-induced tolerant mice." J Immunol **146**(5): 1402-1409.
- Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre and P. Puccetti (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." Nat Immunol **4**(12): 1206-1212.

REFERENCES

- Faustman, D. and M. Davis (2010). "TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases." Nat Rev Drug Discov **9**(6): 482-493.
- Faustman, D. L. and M. Davis (2013). "TNF Receptor 2 and Disease: Autoimmunity and Regenerative Medicine." Front Immunol **4**: 478.
- Fazekas de St Groth, B. (2007). "Regulatory T-cell function: when suppressor cells can't suppress." Immunol Cell Biol **85**(3): 179-181.
- Feng, Y., A. Arvey, T. Chinen, J. van der Veeke, G. Gasteiger and A. Y. Rudensky (2014). "Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the Foxp3 locus." Cell **158**(4): 749-763.
- Ferrara, J., F. J. Guillen, B. Sleckman, S. J. Burakoff and G. F. Murphy (1986). "Cutaneous acute graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens in a murine model: histologic analysis and correlation to clinical disease." J Invest Dermatol **86**(4): 371-375.
- Ferrara, J. L. and H. J. Deeg (1991). "Graft-versus-host disease." N Engl J Med **324**(10): 667-674.
- Ferrara, J. L., J. E. Levine, P. Reddy and E. Holler (2009). "Graft-versus-host disease." Lancet **373**(9674): 1550-1561.
- Finke, J., W. A. Bethge, C. Schmoor, H. D. Ottinger, M. Stelljes, A. R. Zander, L. Volin, T. Ruutu, D. A. Heim, R. Schwerdtfeger, K. Kolbe, J. Mayer, J. A. Maertens, W. Linkesch, E. Holler, V. Koza, M. Bornhauser, H. Einsele, H. J. Kolb, H. Bertz, M. Egger, O. Grishina and G. Socie (2009). "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 **10**(9): 855-864.
- Flies, D. B., T. Higuchi and L. Chen (2015). "Mechanistic Assessment of PD-1H Coinhibitory Receptor-Induced T Cell Tolerance to Allogeneic Antigens." J Immunol **194**(11): 5294-5304.
- Floess, S., J. Freyer, C. Siewert, U. Baron, S. Olek, J. Polansky, K. Schlawe, H. D. Chang, T. Bopp, E. Schmitt, S. Klein-Hessling, E. Serfling, A. Hamann and J. Huehn (2007). "Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells." PLoS Biol **5**(2): e38.
- Fontaine, V., S. Mohand-Said, N. Hanoteau, C. Fuchs, K. Pfizenmaier and U. Eisel (2002). "Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2." J Neurosci **22**(7): RC216.

REFERENCES

- Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-336.
- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2005). "A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells." Nat Immunol **6**(11): 1142-1151.
- Fowell, D. and D. Mason (1993). "Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential." J Exp Med **177**(3): 627-636.
- Fritzsching, B., N. Oberle, N. Eberhardt, S. Quick, J. Haas, B. Wildemann, P. H. Krammer and E. Suri-Payer (2005). "In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death." J Immunol **175**(1): 32-36.
- Fu, J., D. Wang, Y. Yu, J. Heinrichs, Y. Wu, S. Schutt, K. Kaosaard, C. Liu, K. Haarberg, D. Bastian, D. G. McDonald, C. Anasetti and X. Z. Yu (2015). "T-bet is critical for the development of acute graft-versus-host disease through controlling T cell differentiation and function." J Immunol **194**(1): 388-397.
- Gaidot, A., D. A. Landau, G. H. Martin, O. Bonduelle, Y. Grinberg-Bleyer, D. Matheoud, S. Gregoire, C. Baillou, B. Combadiere, E. Piaggio and J. L. Cohen (2011). "Immune reconstitution is preserved in hematopoietic stem cell transplant co-administered with regulatory T cells for GVHD prevention." Blood **117** (10): 2975-2983.
- Gaidot, A., D. A. Landau, G. H. Martin, O. Bonduelle, Y. Grinberg-Bleyer, D. Matheoud, S. Gregoire, C. Baillou, B. Combadiere, E. Piaggio and J. L. Cohen (2011). "Immune reconstitution is preserved in hematopoietic stem cell transplantation coadministered with regulatory T cells for GVHD prevention." Blood **117**(10): 2975-2983.
- Garin, M. I., C. C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollon, R. Wait and R. I. Lechler (2007). "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells." Blood **109**(5): 2058-2065.
- Gavin, M. A., J. P. Rasmussen, J. D. Fontenot, V. Vasta, V. C. Manganiello, J. A. Beavo and A. Y. Rudensky (2007). "Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation." Nature **445**(7129): 771-775.
- Gavin, M. A., T. R. Torgerson, E. Houston, P. DeRoos, W. Y. Ho, A. Stray-Pedersen, E. L. Ocheltree, P. D. Greenberg, H. D. Ochs and A. Y. Rudensky (2006). "Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(17): 6659-6664.

REFERENCES

- Gershon, R. K. and K. Kondo (1970). "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." Immunology **18**(5): 723-737.
- Gettinger, S. N., L. Horn, L. Gandhi, D. R. Spigel, S. J. Antonia, N. A. Rizvi, J. D. Powderly, R. S. Heist, R. D. Carvajal, D. M. Jackman, L. V. Sequist, D. C. Smith, P. Leming, D. P. Carbone, M. C. Pinder-Schenck, S. L. Topalian, F. S. Hodi, J. A. Sosman, M. Sznol, D. F. McDermott, D. M. Pardoll, V. Sankar, C. M. Ahlers, M. Salvati, J. M. Wigginton, M. D. Hellmann, G. D. Kollika, A. K. Gupta and J. R. Brahmer (2015). "Overall Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1 Antibody, BMS-936558, ONO-4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer." J Clin Oncol **33**(18): 2004-2012.
- Glinka, Y. and G. J. Prud'homme (2008). "Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity." J Leukoc Biol **84**(1): 302-310.
- Glinka, Y., S. Stoilova, N. Mohammed and G. J. Prud'homme (2011). "Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta." Carcinogenesis **32**(4): 613-621.
- Glucksberg, H., R. Storb, A. Fefer, C. D. Buckner, P. E. Neiman, R. A. Cliff, K. G. Lerner and E. D. Thomas (1974). "Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors." Transplantation **18**(4): 295-304.
- Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi and R. J. Noelle (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." J Immunol **174**(4): 1783-1786.
- Gordon, C., G. E. Ranges, J. S. Greenspan and D. Wofsy (1989). "Chronic therapy with recombinant tumor necrosis factor-alpha in autoimmune NZB/NZW F1 mice." Clin Immunol Immunopathol **52**(3): 421-434.
- Gottschalk, R. A., E. Corse and J. P. Allison (2012). "Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells." J Immunol **188**(3): 976-980.
- Goulding, J., V. Tahiliani and S. Salek-Ardakani (2011). "OX40:OX40L axis: emerging targets for improving poxvirus-based CD8(+) T-cell vaccines against respiratory viruses." Immunol Rev **244**(1): 149-168.
- Graca, L., S. P. Cobbold and H. Waldmann (2002). "Identification of regulatory T cells in tolerated allografts." J Exp Med **195**(12): 1641-1646.
- Graca, L., S. Thompson, C. Y. Lin, E. Adams, S. P. Cobbold and H. Waldmann (2002). "Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance." J Immunol **168**(11): 5558-5565.

REFERENCES

- Gratwohl, A., R. Brand, F. Frassoni, V. Rocha, D. Niederwieser, P. Reusser, H. Einsele, C. Cordonnier, Acute, P. Chronic Leukemia Working, B. Infectious Diseases Working Party of the European Group for and T. Marrow (2005). "Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time." Bone Marrow Transplant **36**(9): 757-769.
- Green, D. R., P. M. Flood and R. K. Gershon (1983). "Immunoregulatory T-cell pathways." Annu Rev Immunol **1**: 439-463.
- Green, E. A., L. Gorelik, C. M. McGregor, E. H. Tran and R. A. Flavell (2003). "CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10878-10883.
- Gregori, S., M. Casorati, S. Amuchastegui, S. Smiroldo, A. M. Davalli and L. Adorini (2001). "Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance." J Immunol **167**(4): 1945-1953.
- Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Lohden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, K. Pfizenmaier and P. Scheurich (1995). "The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor." Cell **83**(5): 793-802.
- Grell, M., H. Wajant, G. Zimmermann and P. Scheurich (1998). "The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 570-575.
- Grinberg-Bleyer, Y., A. Baeyens, S. You, R. Elhage, G. Fourcade, S. Gregoire, N. Cagnard, W. Carpentier, Q. Tang, J. Bluestone, L. Chatenoud, D. Klatzmann, B. L. Salomon and E. Piaggio (2010). "IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells." J Exp Med **207**(9): 1871-1878.
- Grinberg-Bleyer, Y., D. Saadoun, A. Baeyens, F. Billiard, J. D. Goldstein, S. Gregoire, G. H. Martin, R. Elhage, N. Derian, W. Carpentier, G. Marodon, D. Klatzmann, E. Piaggio and B. L. Salomon (2010). "Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs." J Clin Invest **120**(12): 4558-4568.
- Griseri, T., M. Asquith, C. Thompson and F. Powrie (2010). "OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis." J Exp Med **207**(4): 699-709.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, B. L. Tollefsen, C. Kemper, J. P. Atkinson and T. J. Ley (2004). "Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells." Blood **104**(9): 2840-2848.

REFERENCES

- Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1997). "A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**(6652): 737-742.
- Hamadani, M., C. C. Hofmeister, B. Jansak, G. Phillips, P. Elder, W. Blum, S. Penza, T. S. Lin, R. Klisovic, G. Marcucci, S. S. Farag and S. M. Devine (2008). "Addition of infliximab to standard acute graft-versus-host disease prophylaxis following allogeneic peripheral blood cell transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **14**(7): 783-789.
- Hamano, R., J. Huang, T. Yoshimura, J. J. Oppenheim and X. Chen (2011). "TNF optimally activates regulatory T cells by inducing TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40." Eur J Immunol **41**(7): 2010-2020.
- Hamilton, K. E., J. G. Simmons, S. Ding, L. Van Landeghem and P. K. Lund (2011). "Cytokine induction of tumor necrosis factor receptor 2 is mediated by STAT3 in colon cancer cells." Mol Cancer Res **9**(12): 1718-1731.
- Hammond, W. A., M. Heckman, L. Finn, N. N. Diehl, A. Shreders, P. Flowers, V. Roy and J. Foran (2016). "No evidence of impact of maraviroc on outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplant with reduced intensity conditioning (RIC)." Biol Blood Marrow Transplant **22**: S396-S397.
- Han, J. M., S. J. Patterson and M. K. Levings (2012). "The Role of the PI3K Signaling Pathway in CD4(+) T Cell Differentiation and Function." Front Immunol **3**: 245.
- Hanash, A. M. and R. B. Levy (2005). "Donor CD4⁺CD25⁺ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation." Blood **105**(4): 1828-1836.
- Hansmann, L., C. Schmidl, J. Kett, L. Steger, R. Andreesen, P. Hoffmann, M. Rehli and M. Edinger (2012). "Dominant Th2 differentiation of human regulatory T cells upon loss of FOXP3 expression." J Immunol **188**(3): 1275-1282.
- Hara, M., C. I. Kingsley, M. Niimi, S. Read, S. E. Turvey, A. R. Bushell, P. J. Morris, F. Powrie and K. J. Wood (2001). "IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo." J Immunol **166**(6): 3789-3796.
- Harada, Y., C. Elly, G. Ying, J. H. Paik, R. A. DePinho and Y. C. Liu (2010). "Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells." J Exp Med **207**(7): 1381-1391.
- Hasko, G., D. G. Kuhel, J. F. Chen, M. A. Schwarzschild, E. A. Deitch, J. G. Mabley, A. Marton and C. Szabo (2000). "Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms." FASEB J **14**(13): 2065-2074.

REFERENCES

- Hasko, G., C. Szabo, Z. H. Nemeth, V. Kvetan, S. M. Pastores and E. S. Vizi (1996). "Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice." J Immunol **157**(10): 4634-4640.
- Hawrylowicz, C. M. and A. O'Garra (2005). "Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma." Nat Rev Immunol **5**(4): 271-283.
- He, X., S. Landman, S. C. Bauland, J. van den Dolder, H. J. Koenen and I. Joosten (2016). "A TNFR2-Agonist Facilitates High Purity Expansion of Human Low Purity Treg Cells." PLoS One **11**(5): e0156311.
- Hechinger, A. K., B. A. Smith, R. Flynn, K. Hanke, C. McDonald-Hyman, P. A. Taylor, D. Pfeifer, B. Hackanson, F. Leonhardt, G. Prinz, H. Dierbach, A. Schmitt-Graeff, J. Kovarik, B. R. Blazar and R. Zeiser (2015). "Therapeutic activity of multiple common gamma-chain cytokine inhibition in acute and chronic GVHD." Blood **125**(3): 570-580.
- Herman, A. E., G. J. Freeman, D. Mathis and C. Benoist (2004). "CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion." J Exp Med **199**(11): 1479-1489.
- Hicheri, Y., A. Bouchekioua, Y. Hamel, A. Henry, H. Rouard, C. Pautas, J. L. Beaumont, M. Kuentz, C. Cordonnier, J. L. Cohen and S. Maury (2008). "Donor regulatory T cells identified by FoxP3 expression but also by the membranous CD4+CD127low/neg phenotype influence graft-versus-tumor effect after donor lymphocyte infusion." J Immunother **31**(9): 806-811.
- Hilchey, S. P., A. De, L. M. Rimsza, R. B. Bankert and S. H. Bernstein (2007). "Follicular lymphoma intratumoral CD4+CD25+GITR+ regulatory T cells potently suppress CD3/CD28-costimulated autologous and allogeneic CD8+CD25- and CD4+CD25- T cells." J Immunol **178**(7): 4051-4061.
- Hill, G. R., J. M. Crawford, K. R. Cooke, Y. S. Brinson, L. Pan and J. L. Ferrara (1997). "Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines." Blood **90**(8): 3204-3213.
- Hill, G. R. and J. L. Ferrara (2000). "The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation." Blood **95**(9): 2754-2759.
- Hill, G. R., T. Teshima, V. I. Rebel, O. I. Krijanovski, K. R. Cooke, Y. S. Brinson and J. L. Ferrara (2000). "The p55 TNF-alpha receptor plays a critical role in T cell alloreactivity." J Immunol **164**(2): 656-663.
- Hippen, K. L., S. C. Merkel, D. K. Schirm, C. M. Sieben, D. Sumstad, D. M. Kadidlo, D. H. McKenna, J. S. Bromberg, B. L. Levine, J. L. Riley, C. H. June, P. Scheinberg, D. C. Douek, J. S. Miller, J. E. Wagner and B. R. Blazar (2011). "Massive ex vivo

expansion of human natural regulatory T cells (T(regs)) with minimal loss of in vivo functional activity." Sci Transl Med **3**(83): 83ra41.

Hockenbery, D. M., S. Cruickshank, T. C. Rodell, T. Gooley, F. Schuening, S. Rowley, D. David, M. Brunvand, B. Berryman, S. Abhyankar, M. Bouvier and G. B. McDonald (2007). "A randomized, placebo-controlled trial of oral beclomethasone dipropionate as a prednisone-sparing therapy for gastrointestinal graft-versus-host disease." Blood **109**(10): 4557-4563.

Hoffmann, P., J. Ermann, M. Edinger, C. G. Fathman and S. Strober (2002). "Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation." J Exp Med **196**(3): 389-399.

Hohmann, H. P., R. Remy, M. Brockhaus and A. P. van Loon (1989). "Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF alpha)." J Biol Chem **264**(25): 14927-14934.

Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061.

Horowitz, M. M., R. P. Gale, P. M. Sondel, J. M. Goldman, J. Kersey, H. J. Kolb, A. A. Rimm, O. Ringden, C. Rozman, B. Speck and et al. (1990). "Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation." Blood **75**(3): 555-562.

Horwitz, D. A., S. G. Zheng and J. D. Gray (2008). "Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other." Trends Immunol **29**(9): 429-435.

Housley, W. J., C. O. Adams, F. C. Nichols, L. Puddington, E. G. Lingenheld, L. Zhu, T. V. Rajan and R. B. Clark (2011). "Natural but not inducible regulatory T cells require TNF-alpha signaling for in vivo function." J Immunol **186**(12): 6779-6787.

Huang, C. T., C. J. Workman, D. Flies, X. Pan, A. L. Marson, G. Zhou, E. L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H. I. Levitsky, J. D. Powell, D. M. Pardoll, C. G. Drake and D. A. Vignali (2004). "Role of LAG-3 in regulatory T cells." Immunity **21**(4): 503-513.

Hubbard, V. M., J. M. Eng, T. Ramirez-Montagut, K. H. Tjoe, S. J. Muriglan, A. A. Kochman, T. H. Terwey, L. M. Willis, R. Schiro, G. Heller, G. F. Murphy, C. Liu, O. Alpdogan and M. R. van den Brink (2005). "Absence of inducible costimulator on alloreactive T cells reduces graft versus host disease and induces Th2 deviation." Blood **106**(9): 3285-3292.

Hui, D., N. Satkunam, M. Al Kaptan, T. Reiman and R. Lai (2006). "Pathway-specific apoptotic gene expression profiling in chronic lymphocytic leukemia and follicular lymphoma." Mod Pathol **19**(9): 1192-1202.

Isakov, N. and A. Altman (2012). "PKC-theta-mediated signal delivery from the TCR/CD28 surface receptors." Front Immunol **3**: 273.

REFERENCES

- Ito, T., S. Hanabuchi, Y. H. Wang, W. R. Park, K. Arima, L. Bover, F. X. Qin, M. Gilliet and Y. J. Liu (2008). "Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery." Immunity **28**(6): 870-880.
- Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka and S. Sakaguchi (1999). "Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance." J Immunol **162**(9): 5317-5326.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-995.
- Jacob, C. O., S. Aiso, S. A. Michie, H. O. McDevitt and H. Acha-Orbea (1990). "Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF-alpha and interleukin 1." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(3): 968-972.
- Jacob, C. O. and H. O. McDevitt (1988). "Tumour necrosis factor-alpha in murine autoimmune 'lupus' nephritis." Nature **331**(6154): 356-358.
- Jacobson, L. O., E. L. Simmons, E. K. Marks, M. J. Robson, W. F. Bethard and E. O. Gaston (1950). "The role of the spleen in radiation injury and recovery." J Lab Clin Med **35**(5): 746-770.
- Jagasia, M. H., H. T. Greinix, M. Arora, K. M. Williams, D. Wolff, E. W. Cowen, J. Palmer, D. Weisdorf, N. S. Treister, G. S. Cheng, H. Kerr, P. Stratton, R. F. Duarte, G. B. McDonald, Y. Inamoto, A. Vigorito, S. Arai, M. B. Datile, D. Jacobsohn, T. Heller, C. L. Kitko, S. A. Mitchell, P. J. Martin, H. Shulman, R. S. Wu, C. S. Cutler, G. B. Vogelsang, S. J. Lee, S. Z. Pavletic and M. E. Flowers (2015). "National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report." Biol Blood Marrow Transplant **21**(3): 389-401 e381.
- Jenq, R. R., C. Ubeda, Y. Taur, C. C. Menezes, R. Khanin, J. A. Dudakov, C. Liu, M. L. West, N. V. Singer, M. J. Equinda, A. Gobourne, L. Lipuma, L. F. Young, O. M. Smith, A. Ghosh, A. M. Hanash, J. D. Goldberg, K. Aoyama, B. R. Blazar, E. G. Pamer and M. R. van den Brink (2012). "Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation." J Exp Med **209**(5): 903-911.
- Joedicke, J. J., L. Myers, A. B. Carmody, R. J. Messer, H. Wajant, K. S. Lang, P. A. Lang, T. W. Mak, K. J. Hasenkrug and U. Dittmer (2014). "Activated CD8+ T cells induce expansion of Vbeta5+ regulatory T cells via TNFR2 signaling." J Immunol **193**(6): 2952-2960.
- Joetham, A., K. Takeda, C. Taube, N. Miyahara, S. Matsubara, T. Koya, Y. H. Rha, A. Dakhama and E. W. Gelfand (2007). "Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T

REFERENCES

cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta." J Immunol **178**(3): 1433-1442.

Joffre, O., N. Gorse, P. Romagnoli, D. Hudrisier and J. P. van Meerwijk (2004). "Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes." Blood **103**(11): 4216-4221.

Johnston, L., R. Armstrong, J. Baker, B. Sahaf, J. Otani, K. Tate, C. Tudisco, K. Sheehan, E. Meyer, D. Miklos and R. S. Negrin (2016). "A phase I study of donor regulatory T cells as treatment for steroid dependent/refractory chronic graft versus host disease." Blood **128**(22): 385.

Jones, S. C., G. F. Murphy and R. Korngold (2003). "Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD425 T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response." Biol Blood Marrow Transplant **9**(4): 243-256.

Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop and A. H. Enk (2001). "Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." J Exp Med **193**(11): 1285-1294.

Kanakry, C. G., H. L. Tsai, J. Bolanos-Meade, B. D. Smith, I. Gojo, J. A. Kanakry, Y. L. Kasamon, D. E. Gladstone, W. Matsui, I. Borrello, C. A. Huff, L. J. Swinnen, J. D. Powell, K. W. Pratz, A. E. DeZern, M. M. Showel, M. A. McDevitt, R. A. Brodsky, M. J. Levis, R. F. Ambinder, E. J. Fuchs, G. L. Rosner, R. J. Jones and L. Luznik (2014). "Single-agent GVHD prophylaxis with posttransplantation cyclophosphamide after myeloablative, HLA-matched BMT for AML, ALL, and MDS." Blood **124**(25): 3817-3827.

Kasamon, Y. L., L. Luznik, M. S. Leffell, J. Kowalski, H. L. Tsai, J. Bolanos-Meade, L. E. Morris, P. A. Crilley, P. V. O'Donnell, N. Rossiter, C. A. Huff, R. A. Brodsky, W. H. Matsui, L. J. Swinnen, I. Borrello, J. D. Powell, R. F. Ambinder, R. J. Jones and E. J. Fuchs (2010). "Nonmyeloablative HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high-dose posttransplantation cyclophosphamide: effect of HLA disparity on outcome." Biol Blood Marrow Transplant **16**(4): 482-489.

Kennedy, G. A., A. Varelias, S. Vuckovic, L. Le Texier, K. H. Gartlan, P. Zhang, G. Thomas, L. Anderson, G. Boyle, N. Cloonan, J. Leach, E. Sturgeon, J. Avery, S. D. Olver, M. Lor, A. K. Misra, C. Hutchins, A. J. Morton, S. T. Durrant, E. Subramoniapillai, J. P. Butler, C. I. Curley, K. P. MacDonald, S. K. Tey and G. R. Hill (2014). "Addition of interleukin-6 inhibition with tocilizumab to standard graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic stem-cell transplantation: a phase 1/2 trial." Lancet Oncol **15**(13): 1451-1459.

Khattari, R., T. Cox, S. A. Yasayko and F. Ramsdell (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." Nat Immunol **4**(4): 337-342.

REFERENCES

- Kim, B. S., I. K. Kim, Y. J. Park, Y. S. Kim, Y. J. Kim, W. S. Chang, Y. S. Lee, M. N. Kweon, Y. Chung and C. Y. Kang (2010). "Conversion of Th2 memory cells into Foxp3+ regulatory T cells suppressing Th2-mediated allergic asthma." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(19): 8742-8747.
- Kim, H. J., W. S. Min, B. S. Cho, K. S. Eom, Y. J. Kim, C. K. Min, S. Lee, S. G. Cho, J. Y. Jin, J. W. Lee and C. C. Kim (2009). "Successful prevention of acute graft-versus-host disease using low-dose antithymocyte globulin after mismatched, unrelated, hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia." Biol Blood Marrow Transplant **15**(6): 704-717.
- Kim, Y. C., R. Bhairavabhotla, J. Yoon, A. Golding, A. M. Thornton, D. Q. Tran and E. M. Shevach (2012). "Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3+ human T regulatory cells during in vitro expansion." Blood **119**(12): 2810-2818.
- Ko, J. M., A. B. Gottlieb and J. F. Kerbleski (2009). "Induction and exacerbation of psoriasis with TNF-blockade therapy: a review and analysis of 127 cases." J Dermatolog Treat **20**(2): 100-108.
- Kobbe, G., P. Schneider, U. Rohr, R. Fenk, F. Neumann, M. Aivado, L. Dietze, R. Kronenwett, A. Hunerliturkoglu and R. Haas (2001). "Treatment of severe steroid refractory acute graft-versus-host disease with infliximab, a chimeric human/mouse antiTNFalpha antibody." Bone Marrow Transplant **28**(1): 47-49.
- Kobie, J. J., P. R. Shah, L. Yang, J. A. Rebhahn, D. J. Fowell and T. R. Mosmann (2006). "T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine." J Immunol **177**(10): 6780-6786.
- Koch, M. A., K. R. Thomas, N. R. Perdue, K. S. Smigiel, S. Srivastava and D. J. Campbell (2012). "T-bet(+) Treg cells undergo abortive Th1 cell differentiation due to impaired expression of IL-12 receptor beta2." Immunity **37**(3): 501-510.
- Koch, M. A., G. Tucker-Heard, N. R. Perdue, J. R. Killebrew, K. B. Urdahl and D. J. Campbell (2009). "The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation." Nat Immunol **10**(6): 595-602.
- Koenecke, C., C. W. Lee, K. Thamm, L. Fohse, M. Schafferus, H. W. Mittrucker, S. Floess, J. Huehn, A. Ganser, R. Forster and I. Prinz (2012). "IFN-gamma production by allogeneic Foxp3+ regulatory T cells is essential for preventing experimental graft-versus-host disease." J Immunol **189**(6): 2890-2896.
- Koenen, H. J., R. L. Smeets, P. M. Vink, E. van Rijssen, A. M. Boots and I. Joosten (2008). "Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells." Blood **112**(6): 2340-2352.
- Kojima, A. and R. T. Prehn (1981). "Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune diseases in mice." Immunogenetics **14**(1-2): 15-27.

REFERENCES

- Kong, N., Q. Lan, M. Chen, J. Wang, W. Shi, D. A. Horwitz, V. Quesniaux, B. Ryffel, Z. Liu, D. Brand, H. Zou and S. G. Zheng (2012). "Antigen-specific transforming growth factor beta-induced Treg cells, but not natural Treg cells, ameliorate autoimmune arthritis in mice by shifting the Th17/Treg cell balance from Th17 predominance to Treg cell predominance." Arthritis Rheum **64**(8): 2548-2558.
- Kong, N., Q. Lan, M. Chen, T. Zheng, W. Su, J. Wang, Z. Yang, R. Park, G. Dagliyan, P. S. Conti, D. Brand, Z. Liu, H. Zou, W. Stohl and S. G. Zheng (2012). "Induced T regulatory cells suppress osteoclastogenesis and bone erosion in collagen-induced arthritis better than natural T regulatory cells." Ann Rheum Dis **71**(9): 1567-1572.
- Konig, S., M. Probst-Kepper, T. Reinl, A. Jeron, J. Huehn, B. Schraven and L. Jansch (2012). "First insight into the kinome of human regulatory T cells." PLoS One **7**(7): e40896.
- Koreth, J., H. T. Kim, K. T. Jones, P. B. Lange, C. G. Reynolds, M. J. Chammas, K. Dusenbury, J. Whangbo, S. Nikiforow, E. P. Alyea, 3rd, P. Armand, C. S. Cutler, V. T. Ho, Y. B. Chen, D. Avigan, B. R. Blazar, J. H. Antin, J. Ritz and R. J. Soiffer (2016). "Efficacy, durability, and response predictors of low-dose interleukin-2 therapy for chronic graft-versus-host disease." Blood **128**(1): 130-137.
- Koreth, J., K. Matsuoka, H. T. Kim, S. M. McDonough, B. Bindra, E. P. Alyea, 3rd, P. Armand, C. Cutler, V. T. Ho, N. S. Treister, D. C. Bienfang, S. Prasad, D. Tzachanis, R. M. Joyce, D. E. Avigan, J. H. Antin, J. Ritz and R. J. Soiffer (2011). "Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease." N Engl J Med **365**(22): 2055-2066.
- Kornete, M., E. Sgouroudis and C. A. Piccirillo (2012). "ICOS-dependent homeostasis and function of Foxp3+ regulatory T cells in islets of nonobese diabetic mice." J Immunol **188**(3): 1064-1074.
- Koulmanda, M., E. Budo, S. Bonner-Weir, A. Qipo, P. Putheti, N. Degauque, H. Shi, Z. Fan, J. S. Flier, H. Auchincloss, Jr., X. X. Zheng and T. B. Strom (2007). "Modification of adverse inflammation is required to cure new-onset type 1 diabetic hosts." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(32): 13074-13079.
- Koura, D. T., J. T. Horan, A. A. Langston, M. Qayed, A. Mehta, H. J. Khoury, R. D. Harvey, Y. Suessmuth, C. Couture, J. Carr, A. Grizzle, H. R. Johnson, J. A. Cheeseman, J. A. Conger, J. Robertson, L. Stempora, B. E. Johnson, A. Garrett, A. D. Kirk, C. P. Larsen, E. K. Waller and L. S. Kean (2013). "In vivo T cell costimulation blockade with abatacept for acute graft-versus-host disease prevention: a first-in-disease trial." Biol Blood Marrow Transplant **19**(11): 1638-1649.
- Koyama, M., M. Cheong, K. A. Markey, K. H. Gartlan, R. D. Kuns, K. R. Locke, K. E. Lineburg, B. E. Teal, L. Leveque-El Mouttie, M. D. Bunting, S. Vuckovic, P. Zhang, M. W. Teng, A. Varelias, S. K. Tey, L. F. Wockner, C. R. Engwerda, M. J. Smyth, G. T. Belz, S. R. McColl, K. P. MacDonald and G. R. Hill (2015). "Donor colonic CD103+

- dendritic cells determine the severity of acute graft-versus-host disease." J Exp Med **212**(8): 1303-1321.
- Koyama, M., R. D. Kuns, S. D. Olver, N. C. Raffelt, Y. A. Wilson, A. L. Don, K. E. Lineburg, M. Cheong, R. J. Robb, K. A. Markey, A. Varelias, B. Malissen, G. J. Hammerling, A. D. Clouston, C. R. Engwerda, P. Bhat, K. P. MacDonald and G. R. Hill (2011). "Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease." Nat Med **18**(1): 135-142.
- Krishnamoorthy, N., A. Khare, T. B. Oriss, M. Raundhal, C. Morse, M. Yarlagadda, S. E. Wenzel, M. L. Moore, R. S. Peebles, Jr., A. Ray and P. Ray (2012). "Early infection with respiratory syncytial virus impairs regulatory T cell function and increases susceptibility to allergic asthma." Nat Med **18**(10): 1525-1530.
- Kronenberg, M., M. Steinmetz, J. Kober, E. Kraig, J. A. Kapp, C. W. Pierce, C. M. Sorensen, G. Suzuki, T. Tada and L. Hood (1983). "RNA transcripts for I-J polypeptides are apparently not encoded between the I-A and I-E subregions of the murine major histocompatibility complex." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(18): 5704-5708.
- Kumar, A., A. R. Mhaskar, T. Reljic, R. S. Mhaskar, M. A. Kharfan-Dabaja, C. Anasetti, M. Mohty and B. Djulbegovic (2012). "Antithymocyte globulin for acute-graft-versus-host-disease prophylaxis in patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a systematic review." Leukemia **26**(4): 582-588.
- Kursar, M., M. Koch, H. W. Mittrucker, G. Nouailles, K. Bonhagen, T. Kamradt and S. H. Kaufmann (2007). "Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis." J Immunol **178**(5): 2661-2665.
- Lages, C. S., I. Suffia, P. A. Velilla, B. Huang, G. Warshaw, D. A. Hildeman, Y. Belkaid and C. Chougnet (2008). "Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation." J Immunol **181**(3): 1835-1848.
- Lai, H. Y., T. Y. Chou, C. H. Tzeng and O. K. Lee (2012). "Cytokine profiles in various graft-versus-host disease target organs following hematopoietic stem cell transplantation." Cell Transplant **21**(9): 2033-2045.
- Lal, G. and J. S. Bromberg (2009). "Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression." Blood **114**(18): 3727-3735.
- Lal, G., N. Zhang, W. van der Touw, Y. Ding, W. Ju, E. P. Bottinger, S. P. Reid, D. E. Levy and J. S. Bromberg (2009). "Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation." J Immunol **182**(1): 259-273.
- Lan, Q., H. Fan, V. Quesniaux, B. Ryffel, Z. Liu and S. G. Zheng (2012). "Induced Foxp3(+) regulatory T cells: a potential new weapon to treat autoimmune and inflammatory diseases?" J Mol Cell Biol **4**(1): 22-28.

REFERENCES

- Lantz, M., S. Malik, M. L. Slevin and I. Olsson (1990). "Infusion of tumor necrosis factor (TNF) causes an increase in circulating TNF-binding protein in humans." Cytokine **2**(6): 402-406.
- Laplante, M. and D. M. Sabatini (2009). "mTOR signaling at a glance." J Cell Sci **122**(Pt 20): 3589-3594.
- Larkin, J., V. Chiarion-Sileni, R. Gonzalez, J. J. Grob, C. L. Cowey, C. D. Lao, D. Schadendorf, R. Dummer, M. Smylie, P. Rutkowski, P. F. Ferrucci, A. Hill, J. Wagstaff, M. S. Carlino, J. B. Haanen, M. Maio, I. Marquez-Rodas, G. A. McArthur, P. A. Ascierto, G. V. Long, M. K. Callahan, M. A. Postow, K. Grossmann, M. Sznol, B. Dreno, L. Bastholt, A. Yang, L. M. Rollin, C. Horak, F. S. Hodi and J. D. Wolchok (2015). "Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma." N Engl J Med **373**(1): 23-34.
- Laurence, A., S. Amarnath, J. Mariotti, Y. C. Kim, J. Foley, M. Eckhaus, J. J. O'Shea and D. H. Fowler (2012). "STAT3 transcription factor promotes instability of nTreg cells and limits generation of iTreg cells during acute murine graft-versus-host disease." Immunity **37**(2): 209-222.
- Leclerc, M., S. Naserian, C. Pilon, A. Thiolat, G. H. Martin, C. Pouchy, C. Dominique, Y. Belkacemi, F. Charlotte, S. Maury, B. L. Salomon and J. L. Cohen (2016). "Control of GVHD by regulatory T cells depends on TNF produced by T cells and TNFR2 expressed by regulatory T cells." Blood **128**(12): 1651-1659.
- Lehmann, J., J. Huehn, M. de la Rosa, F. Maszyrna, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold and A. Hamann (2002). "Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13031-13036.
- Levine, J. E., S. Paczesny, S. Mineishi, T. Braun, S. W. Choi, R. J. Hutchinson, D. Jones, Y. Khaled, C. L. Kitko, D. Bickley, O. Krijanovski, P. Reddy, G. Yanik and J. L. Ferrara (2008). "Etanercept plus methylprednisolone as initial therapy for acute graft-versus-host disease." Blood **111**(4): 2470-2475.
- Levings, M. K., R. Sangregorio and M. G. Roncarolo (2001). "Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function." J Exp Med **193**(11): 1295-1302.
- Levy, Y., C. Durier, R. Krzysiek, C. Rabian, C. Capitant, A. S. Lascaux, C. Michon, E. Oksenhendler, L. Weiss, J. A. Gastaut, C. Goujard, C. Rouzioux, J. Maral, J. F. Delfraissy, D. Emilie, J. P. Aboulker and A. S. Group (2003). "Effects of interleukin-2 therapy combined with highly active antiretroviral therapy on immune restoration in HIV-1 infection: a randomized controlled trial." AIDS **17**(3): 343-351.
- Li, B. and M. I. Greene (2007). "FOXP3 actively represses transcription by recruiting the HAT/HDAC complex." Cell Cycle **6**(12): 1432-1436.

REFERENCES

- Li, B., A. Samanta, X. Song, K. Furuuchi, K. T. Iacono, S. Kennedy, M. Katsumata, S. J. Saouaf and M. I. Greene (2006). "FOXP3 ensembles in T-cell regulation." Immunol Rev **212**: 99-113.
- Li, B., A. Samanta, X. Song, K. T. Iacono, K. Bembas, R. Tao, S. Basu, J. L. Riley, W. W. Hancock, Y. Shen, S. J. Saouaf and M. I. Greene (2007). "FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(11): 4571-4576.
- Li, M. O., Y. Y. Wan and R. A. Flavell (2007). "T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation." Immunity **26**(5): 579-591.
- Li, Z., S. P. Mahesh, B. J. Kim, R. R. Buggage and R. B. Nussenblatt (2003). "Expression of glucocorticoid induced TNF receptor family related protein (GITR) on peripheral T cells from normal human donors and patients with non-infectious uveitis." J Autoimmun **21**(1): 83-92.
- Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali and R. Clynes (2008). "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." J Immunol **180**(9): 5916-5926.
- Liao, G., S. Nayak, J. R. Rigueiro, S. B. Berger, C. Detre, X. Romero, R. de Waal Malefyt, T. A. Chatila, R. W. Herzog and C. Terhorst (2010). "GITR engagement preferentially enhances proliferation of functionally competent CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells." Int Immunol **22**(4): 259-270.
- Lim, H. W., H. E. Broxmeyer and C. H. Kim (2006). "Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3+ regulatory T cells." J Immunol **177**(2): 840-851.
- Lin, W., D. Haribhai, L. M. Relland, N. Truong, M. R. Carlson, C. B. Williams and T. A. Chatila (2007). "Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3." Nat Immunol **8**(4): 359-368.
- Lin, X., M. Chen, Y. Liu, Z. Guo, X. He, D. Brand and S. G. Zheng (2013). "Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells." Int J Clin Exp Pathol **6**(2): 116-123.
- Linsley, P. S., W. Brady, M. Urnes, L. S. Grosmaire, N. K. Damle and J. A. Ledbetter (1991). "CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7." J Exp Med **174**(3): 561-569.
- Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler and J. A. Bluestone (2006). "CD127 expression inversely correlates with

REFERENCES

- FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." J Exp Med **203**(7): 1701-1711.
- Loizou, L., K. G. Andersen and A. G. Betz (2011). "Foxp3 interacts with c-Rel to mediate NF-kappaB repression." PLoS One **6**(4): e18670.
- Lopes, J. E., T. R. Torgerson, L. A. Schubert, S. D. Anover, E. L. Ocheltree, H. D. Ochs and S. F. Ziegler (2006). "Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor." J Immunol **177**(5): 3133-3142.
- Lorenz, E., C. Congdon and D. Uphoff (1952). "Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections." Radiology **58**(6): 863-877.
- Lorenz, E., D. Uphoff, T. R. Reid and E. Shelton (1951). "Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections." J Natl Cancer Inst **12**(1): 197-201.
- Loser, K., J. Apelt, M. Voskort, M. Mohaupt, S. Balkow, T. Schwarz, S. Grabbe and S. Beissert (2007). "IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice." J Immunol **179**(1): 365-371.
- Lourenco, E. V. and A. La Cava (2011). "Natural regulatory T cells in autoimmunity." Autoimmunity **44**(1): 33-42.
- Lu, L., X. F. Qian, J. H. Rao, X. H. Wang, S. G. Zheng and F. Zhang (2010). "Rapamycin promotes the expansion of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells after liver transplantation." Transplant Proc **42**(5): 1755-1757.
- Lu, L., J. Wang, F. Zhang, Y. Chai, D. Brand, X. Wang, D. A. Horwitz, W. Shi and S. G. Zheng (2010). "Role of SMAD and non-SMAD signals in the development of Th17 and regulatory T cells." J Immunol **184**(8): 4295-4306.
- Lu, S. X., O. Alpdogan, J. Lin, R. Balderas, R. Campos-Gonzalez, X. Wang, G. J. Gao, D. Suh, C. King, M. Chow, O. M. Smith, V. M. Hubbard, J. L. Bautista, J. Cabrera-Perez, J. L. Zakrzewski, A. A. Kochman, A. Chow, G. Altan-Bonnet and M. R. van den Brink (2008). "STAT-3 and ERK 1/2 phosphorylation are critical for T-cell alloactivation and graft-versus-host disease." Blood **112**(13): 5254-5258.
- Luznik, L., J. Bolanos-Meade, M. Zahurak, A. R. Chen, B. D. Smith, R. Brodsky, C. A. Huff, I. Borrello, W. Matsui, J. D. Powell, Y. Kasamon, S. N. Goodman, A. Hess, H. I. Levitsky, R. F. Ambinder, R. J. Jones and E. J. Fuchs (2010). "High-dose cyclophosphamide as single-agent, short-course prophylaxis of graft-versus-host disease." Blood **115**(16): 3224-3230.
- Luznik, L., P. V. O'Donnell and E. J. Fuchs (2012). "Post-transplantation cyclophosphamide for tolerance induction in HLA-haploidentical bone marrow transplantation." Semin Oncol **39**(6): 683-693.

REFERENCES

- Luznik, L., P. V. O'Donnell, H. J. Symons, A. R. Chen, M. S. Leffell, M. Zahurak, T. A. Gooley, S. Piantadosi, M. Kaup, R. F. Ambinder, C. A. Huff, W. Matsui, J. Bolanos-Meade, I. Borrello, J. D. Powell, E. Harrington, S. Warnock, M. Flowers, R. A. Brodsky, B. M. Sandmaier, R. F. Storb, R. J. Jones and E. J. Fuchs (2008). "HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide." Biol Blood Marrow Transplant **14**(6): 641-650.
- Mahmud, S. A., L. S. Manlove, H. M. Schmitz, Y. Xing, Y. Wang, D. L. Owen, J. M. Schenkel, J. S. Boomer, J. M. Green, H. Yagita, H. Chi, K. A. Hogquist and M. A. Farrar (2014). "Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells." Nat Immunol **15**(5): 473-481.
- Makita, S., T. Kanai, S. Oshima, K. Uraushihara, T. Totsuka, T. Sawada, T. Nakamura, K. Koganei, T. Fukushima and M. Watanabe (2004). "CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells." J Immunol **173**(5): 3119-3130.
- Malek, T. R. and A. L. Bayer (2004). "Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2." Nat Rev Immunol **4**(9): 665-674.
- Malek, T. R., A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli and L. Kong (2002). "CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2." Immunity **17**(2): 167-178.
- Mann, M. K., K. Maresz, L. P. Shriver, Y. Tan and B. N. Dittel (2007). "B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **178**(6): 3447-3456.
- Markey, K. A., K. P. MacDonald and G. R. Hill (2014). "The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice." Blood **124**(3): 354-362.
- Marson, A., K. Kretschmer, G. M. Frampton, E. S. Jacobsen, J. K. Polansky, K. D. MacIsaac, S. S. Levine, E. Fraenkel, H. von Boehmer and R. A. Young (2007). "Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation." Nature **445**(7130): 931-935.
- Martelli, M. F., M. Di Ianni, L. Ruggeri, F. Falzetti, A. Carotti, A. Terenzi, A. Pierini, M. S. Masetti, L. Amico, E. Urbani, B. Del Papa, T. Zei, R. Iacucci Ostini, D. Cecchini, R. Tognellini, Y. Reisner, F. Aversa, B. Falini and A. Velardi (2014). "HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse." Blood **124**(4): 638-644.
- Martin, G. H., S. Gregoire, D. A. Landau, C. Pilon, Y. Grinberg-Bleyer, F. Charlotte, J. P. Mege, L. Chatenoud, B. L. Salomon and J. L. Cohen (2013). "In vivo activation of

REFERENCES

- transferred regulatory T cells specific for third-party exogenous antigen controls GVH disease in mice." Eur J Immunol **43**(9): 2263-2272.
- Martin, P. J., J. D. Rizzo, J. R. Wingard, K. Ballen, P. T. Curtin, C. Cutler, M. R. Litzow, Y. Nieto, B. N. Savani, J. R. Schriber, P. J. Shaughnessy, D. A. Wall and P. A. Carpenter (2012). "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 **18**(8): 1150-1163.
- Marwaha, A. K., N. J. Leung, A. N. McMurchy and M. K. Levings (2012). "TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic?" Front Immunol **3**: 129.
- Matsunaga, T., S. Sakamaki, Y. Kohgo, S. Ohi, Y. Hirayama and Y. Niitsu (1993). "Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor can mobilize sufficient amounts of peripheral blood stem cells in healthy volunteers for allogeneic transplantation." Bone Marrow Transplant **11**(2): 103-108.
- Matsuoka, K., J. Koreth, H. T. Kim, G. Bascug, S. McDonough, Y. Kawano, K. Murase, C. Cutler, V. T. Ho, E. P. Alyea, P. Armand, B. R. Blazar, J. H. Antin, R. J. Soiffer and J. Ritz (2013). "Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease." Sci Transl Med **5**(179): 179ra143.
- Maury, S., F. M. Lemoine, Y. Hicheri, M. Rosenzweig, C. Badoual, M. Cherai, J. L. Beaumont, N. Azar, N. Dhedin, A. Sirvent, A. Buzyn, M. T. Rubio, S. Vigouroux, O. Montagne, D. Bories, F. Roudot-Thoraval, J. P. Vernant, C. Cordonnier, D. Klatzmann and J. L. Cohen (2010). "CD4+CD25+ regulatory T cell depletion improves the graft-versus-tumor effect of donor lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Sci Transl Med **2**(41): 41ra52.
- McClymont, S. A., A. L. Putnam, M. R. Lee, J. H. Esensten, W. Liu, M. A. Hulme, U. Hoffmuller, U. Baron, S. Olek, J. A. Bluestone and T. M. Brusko (2011). "Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes." J Immunol **186**(7): 3918-3926.
- McHugh, R. S., M. J. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. M. Shevach, M. Collins and M. C. Byrne (2002). "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor." Immunity **16**(2): 311-323.
- McKeever, U., J. P. Mordes, D. L. Greiner, M. C. Appel, J. Rozing, E. S. Handler and A. A. Rossini (1990). "Adoptive transfer of autoimmune diabetes and thyroiditis to athymic rats." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(19): 7618-7622.
- McMurchy, A. N., S. Di Nunzio, M. G. Roncarolo, R. Bacchetta and M. K. Levings (2009). "Molecular regulation of cellular immunity by FOXP3." Adv Exp Med Biol **665**: 30-46.

REFERENCES

- McMurphy, A. N., J. Gillies, M. C. Gizzi, M. Riba, J. M. Garcia-Manteiga, D. Cittaro, D. Lazarevic, S. Di Nunzio, I. S. Piras, A. Bulfone, M. G. Roncarolo, E. Stupka, R. Bacchetta and M. K. Levings (2013). "A novel function for FOXP3 in humans: intrinsic regulation of conventional T cells." Blood **121**(8): 1265-1275.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." Nat Rev Immunol **4**(10): 762-774.
- Michalek, R. D., V. A. Gerriets, S. R. Jacobs, A. N. Macintyre, N. J. MacIver, E. F. Mason, S. A. Sullivan, A. G. Nichols and J. C. Rathmell (2011). "Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets." J Immunol **186**(6): 3299-3303.
- Michonneau, D., P. Sagoo, B. Breart, Z. Garcia, S. Celli and P. Bousso (2016). "The PD-1 Axis Enforces an Anatomical Segregation of CTL Activity that Creates Tumor Niches after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation." Immunity **44**(1): 143-154.
- Mielcarek, M., T. Furlong, B. E. Storer, M. L. Green, G. B. McDonald, P. A. Carpenter, M. E. Flowers, R. Storb, M. Boeckh and P. J. Martin (2015). "Effectiveness and safety of lower dose prednisone for initial treatment of acute graft-versus-host disease: a randomized controlled trial." Haematologica **100**(6): 842-848.
- Mielcarek, M., B. E. Storer, M. E. Flowers, R. Storb, B. M. Sandmaier and P. J. Martin (2007). "Outcomes among patients with recurrent high-risk hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **13**(10): 1160-1168.
- Miyara, M., K. Wing and S. Sakaguchi (2009). "Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T-cell activation and expansion." J Allergy Clin Immunol **123**(4): 749-755; quiz 756-747.
- Miyara, M., Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochov and S. Sakaguchi (2009). "Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor." Immunity **30**(6): 899-911.
- Mohan, N., E. T. Edwards, T. R. Cupps, P. J. Oliverio, G. Sandberg, H. Crayton, J. R. Richert and J. N. Siegel (2001). "Demyelination occurring during anti-tumor necrosis factor alpha therapy for inflammatory arthritides." Arthritis Rheum **44**(12): 2862-2869.
- Monneret, G., A. L. Debard, F. Venet, J. Bohe, O. Hequet, J. Bienvenu and A. Lepape (2003). "Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis." Crit Care Med **31**(7): 2068-2071.
- Morgan, M. E., J. H. van Bilsen, A. M. Bakker, B. Heemskerk, M. W. Schilham, F. C. Hartgers, B. G. Elferink, L. van der Zanden, R. R. de Vries, T. W. Huizinga, T. H.

REFERENCES

- Ottenhoff and R. E. Toes (2005). "Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in humans." Hum Immunol **66**(1): 13-20.
- Morrissey, P. J., K. Charrier, S. Braddy, D. Liggitt and J. D. Watson (1993). "CD4⁺ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4⁺ T cells." J Exp Med **178**(1): 237-244.
- Motzer, R. J., B. Escudier, D. F. McDermott, S. George, H. J. Hammers, S. Srinivas, S. S. Tykodi, J. A. Sosman, G. Procopio, E. R. Plimack, D. Castellano, T. K. Choueiri, H. Gurney, F. Donskov, P. Bono, J. Wagstaff, T. C. Gauler, T. Ueda, Y. Tomita, F. A. Schutz, C. Kollmannsberger, J. Larkin, A. Ravaud, J. S. Simon, L. A. Xu, I. M. Waxman, P. Sharma and I. CheckMate (2015). "Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma." N Engl J Med **373**(19): 1803-1813.
- Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg and H. Cheroutre (2007). "Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid." Science **317**(5835): 256-260.
- Mukai, Y., T. Nakamura, M. Yoshikawa, Y. Yoshioka, S. Tsunoda, S. Nakagawa, Y. Yamagata and Y. Tsutsumi (2010). "Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex." Sci Signal **3**(148): ra83.
- Mukhopadhyay, A., J. Suttles, R. D. Stout and B. B. Aggarwal (2001). "Genetic deletion of the tumor necrosis factor receptor p60 or p80 abrogates ligand-mediated activation of nuclear factor-kappa B and of mitogen-activated protein kinases in macrophages." J Biol Chem **276**(34): 31906-31912.
- Munchel, A., C. Kesserwan, H. J. Symons, L. Luznik, Y. L. Kasamon, R. J. Jones and E. J. Fuchs (2011). "Nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high dose, post-transplantation cyclophosphamide." Pediatr Rep **3 Suppl 2**: e15.
- Murai, M., H. Yoneyama, T. Ezaki, M. Suematsu, Y. Terashima, A. Harada, H. Hamada, H. Asakura, H. Ishikawa and K. Matsushima (2003). "Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction." Nat Immunol **4**(2): 154-160.
- Murai, M., H. Yoneyama, A. Harada, Z. Yi, C. Vestergaard, B. Guo, K. Suzuki, H. Asakura and K. Matsushima (1999). "Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease." J Clin Invest **104**(1): 49-57.
- Mutis, T., R. S. van Rijn, E. R. Simonetti, T. Aarts-Riemens, M. E. Emmelot, L. van Bloois, A. Martens, L. F. Verdonck and S. B. Ebeling (2006). "Human regulatory T cells control xenogeneic graft-versus-host disease induced by autologous T cells in RAG2^{-/-}gammac^{-/-} immunodeficient mice." Clin Cancer Res **12**(18): 5520-5525.

REFERENCES

- Myers, L., J. J. Joedicke, A. B. Carmody, R. J. Messer, G. Kassiotis, J. P. Dudley, U. Dittmer and K. J. Hasenkrug (2013). "IL-2-independent and TNF-alpha-dependent expansion of Vbeta5+ natural regulatory T cells during retrovirus infection." J Immunol **190**(11): 5485-5495.
- Nadkarni, S., C. Mauri and M. R. Ehrenstein (2007). "Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta." J Exp Med **204**(1): 33-39.
- Nagar, M., J. Jacob-Hirsch, H. Vernitsky, Y. Berkun, S. Ben-Horin, N. Amariglio, I. Bank, Y. Kloog, G. Rechavi and I. Goldstein (2010). "TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA- regulatory T cells that modulates their suppressive function." J Immunol **184**(7): 3570-3581.
- Nakamura, K., A. Kitani and W. Strober (2001). "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta." J Exp Med **194**(5): 629-644.
- Nakayama, S., T. Yokote, M. Tsuji, T. Akioka, T. Miyoshi, Y. Hirata, N. Hiraoka, K. Iwaki, A. Takayama, U. Nishiwaki, Y. Masuda and T. Hanafusa (2014). "Expression of tumour necrosis factor-alpha and its receptors in Hodgkin lymphoma." Br J Haematol **167**(4): 574-577.
- Nakayama, S., T. Yokote, M. Tsuji, T. Akioka, T. Miyoshi, Y. Hirata, N. Hiraoka, K. Iwaki, A. Takayama, U. Nishiwaki, Y. Masuda, Y. Nishimura and T. Hanafusa (2014). "TNF-alpha receptor 1 expression predicts poor prognosis of diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified." Am J Surg Pathol **38**(8): 1138-1146.
- Nash, R. A., J. H. Antin, C. Karanes, J. W. Fay, B. R. Avalos, A. M. Yeager, D. Przepiorka, S. Davies, F. B. Petersen, P. Bartels, D. Buell, W. Fitzsimmons, C. Anasetti, R. Storb and V. Ratanatharathorn (2000). "Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors." Blood **96**(6): 2062-2068.
- Nash, R. A., L. Johnston, P. Parker, J. S. McCune, B. Storer, J. T. Slattery, T. Furlong, C. Anasetti, F. R. Appelbaum, M. E. Lloid, H. J. Deeg, H. P. Kiem, P. J. Martin, M. M. Schubert, R. P. Witherspoon, S. J. Forman, K. G. Blume and R. Storb (2005). "A phase I/II study of mycophenolate mofetil in combination with cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after myeloablative conditioning and allogeneic hematopoietic cell transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **11**(7): 495-505.
- Naymagon, L. and M. Abdul-Hay (2016). "Novel agents in the treatment of multiple myeloma: a review about the future." J Hematol Oncol **9**(1): 52.

REFERENCES

- Ng, W. F., P. J. Duggan, F. Ponchel, G. Matarese, G. Lombardi, A. D. Edwards, J. D. Isaacs and R. I. Lechler (2001). "Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells." Blood **98**(9): 2736-2744.
- Nguyen, D. X. and M. R. Ehrenstein (2016). "Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF-TNF-RII binding in rheumatoid arthritis." J Exp Med **213**(7): 1241-1253.
- Nie, H., Y. Zheng, R. Li, T. B. Guo, D. He, L. Fang, X. Liu, L. Xiao, X. Chen, B. Wan, Y. E. Chin and J. Z. Zhang (2013). "Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis." Nat Med **19**(3): 322-328.
- Nikiforow, S., H. T. Kim, H. Daley, C. Reynolds, K. T. Jones, P. Armand, V. T. Ho, E. P. Alyea, 3rd, C. S. Cutler, J. Ritz, J. H. Antin, R. J. Soiffer and J. Koreth (2016). "A phase I study of CD25/regulatory T-cell-depleted donor lymphocyte infusion for relapse after allogeneic stem cell transplantation." Haematologica **101**(10): 1251-1259.
- Nishikawa, H. and S. Sakaguchi (2010). "Regulatory T cells in tumor immunity." Int J Cancer **127**(4): 759-767.
- Nishizuka, Y. and T. Sakakura (1969). "Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice." Science **166**(3906): 753-755.
- O'Donnell, P. V., L. Luznik, R. J. Jones, G. B. Vogelsang, M. S. Leffell, M. Phelps, P. Rhubarb, K. Cowan, S. Piantados and E. J. Fuchs (2002). "Nonmyeloablative bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched related donors using posttransplantation cyclophosphamide." Biol Blood Marrow Transplant **8**(7): 377-386.
- O'Malley, W. E., B. Achinstein and M. J. Shear (1962). "Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of Sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance." J Natl Cancer Inst **29**(6): 1169-1175.
- Oberle, N., N. Eberhardt, C. S. Falk, P. H. Krammer and E. Suri-Payer (2007). "Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling." J Immunol **179**(6): 3578-3587.
- Oderup, C., L. Cederbom, A. Makowska, C. M. Cilio and F. Ivars (2006). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression." Immunology **118**(2): 240-249.

REFERENCES

- Oh-Hora, M., N. Komatsu, M. Pishyareh, S. Feske, S. Hori, M. Taniguchi, A. Rao and H. Takayanagi (2013). "Agonist-selected T cell development requires strong T cell receptor signaling and store-operated calcium entry." Immunity **38**(5): 881-895.
- Okamura, T., K. Fujio, S. Sumitomo and K. Yamamoto (2012). "Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells." Ann Rheum Dis **71 Suppl 2**: i96-100.
- Okubo, Y., T. Mera, L. Wang and D. L. Faustman (2013). "Homogeneous expansion of human T-regulatory cells via tumor necrosis factor receptor 2." Sci Rep **3**: 3153.
- Ono, M., H. Yaguchi, N. Ohkura, I. Kitabayashi, Y. Nagamura, T. Nomura, Y. Miyachi, T. Tsukada and S. Sakaguchi (2007). "Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1." Nature **446**(7136): 685-689.
- Ortega, G., R. J. Robb, E. M. Shevach and T. R. Malek (1984). "The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells." J Immunol **133**(4): 1970-1975.
- Ouyang, W., O. Beckett, Q. Ma, J. H. Paik, R. A. DePinho and M. O. Li (2010). "Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells." Nat Immunol **11**(7): 618-627.
- Pandiyani, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed and M. J. Lenardo (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." Nat Immunol **8**(12): 1353-1362.
- Park, H. J., J. S. Park, Y. H. Jeong, J. Son, Y. H. Ban, B. H. Lee, L. Chen, J. Chang, D. H. Chung, I. Choi and S. J. Ha (2015). "PD-1 upregulated on regulatory T cells during chronic virus infection enhances the suppression of CD8+ T cell immune response via the interaction with PD-L1 expressed on CD8+ T cells." J Immunol **194**(12): 5801-5811.
- Park, J. H., H. J. Lee, S. R. Kim, G. W. Song, S. K. Lee, S. Y. Park, K. C. Kim, S. H. Hwang and J. S. Park (2014). "Etanercept for steroid-refractory acute graft versus host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Korean J Intern Med **29**(5): 630-636.
- Penhale, W. J., A. Farmer, R. P. McKenna and W. J. Irvine (1973). "Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats." Clin Exp Immunol **15**(2): 225-236.
- Penhale, W. J., W. J. Irvine, J. R. Inglis and A. Farmer (1976). "Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells." Clin Exp Immunol **25**(1): 6-16.
- Penhale, W. J., P. A. Stumbles, C. R. Huxtable, R. J. Sutherland and D. W. Pethick (1990). "Induction of diabetes in PVG/c strain rats by manipulation of the immune system." Autoimmunity **7**(2-3): 169-179.

REFERENCES

- Perol, L., G. H. Martin, S. Maury, J. L. Cohen and E. Piaggio (2014). "Potential limitations of IL-2 administration for the treatment of experimental acute graft-versus-host disease." Immunol Lett **162**(2 Pt B): 173-184.
- Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, A. M. Thornton, R. S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara and E. M. Shevach (2002). "CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness." J Exp Med **196**(2): 237-246.
- Piccirillo, C. A. and E. M. Shevach (2001). "Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells." J Immunol **167**(3): 1137-1140.
- Pierini, A., W. Strober, C. Moffett, J. Baker, H. Nishikii, M. Alvarez, Y. Pan, D. Schneidawind, E. Meyer and R. S. Negrin (2016). "TNF-alpha priming enhances CD4+FoxP3+ regulatory T-cell suppressive function in murine GVHD prevention and treatment." Blood **128**(6): 866-871.
- Piguet, P. F., G. E. Grau, B. Allet and P. Vassalli (1987). "Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease." J Exp Med **166**(5): 1280-1289.
- Pillai, V., S. B. Ortega, C. K. Wang and N. J. Karandikar (2007). "Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells." Clin Immunol **123**(1): 18-29.
- Pilon, C. B., S. Petillon, S. Naserian, G. H. Martin, C. Badoual, P. Lang, D. Azoulay, E. Piaggio, P. Grimbert and J. L. Cohen (2014). "Administration of low doses of IL-2 combined to rapamycin promotes allogeneic skin graft survival in mice." Am J Transplant **14**(12): 2874-2882.
- Polansky, J. K., L. Schreiber, C. Thelemann, L. Ludwig, M. Kruger, R. Baumgrass, S. Cording, S. Floess, A. Hamann and J. Huehn (2010). "Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells." J Mol Med (Berl) **88**(10): 1029-1040.
- Postow, M. A., J. Chesney, A. C. Pavlick, C. Robert, K. Grossmann, D. McDermott, G. P. Linette, N. Meyer, J. K. Giguere, S. S. Agarwala, M. Shaheen, M. S. Ernstoff, D. Minor, A. K. Salama, M. Taylor, P. A. Ott, L. M. Rollin, C. Horak, P. Gagnier, J. D. Wolchok and F. S. Hodi (2015). "Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma." N Engl J Med **372**(21): 2006-2017.
- Powles, R., J. Mehta, S. Kulkarni, J. Treleaven, B. Millar, J. Marsden, V. Shepherd, A. Rowland, B. Sirohi, D. Tait, C. Horton, S. Long and S. Singhal (2000). "Allogeneic blood and bone-marrow stem-cell transplantation in haematological malignant diseases: a randomised trial." Lancet **355**(9211): 1231-1237.
- Powles, R. L., A. J. Barrett, H. Clink, H. E. Kay, J. Sloane and T. J. McElwain (1978). "Cyclosporin A for the treatment of graft-versus-host disease in man." Lancet **2**(8104-5): 1327-1331.

REFERENCES

- Powrie, F., M. W. Leach, S. Mauze, L. B. Caddle and R. L. Coffman (1993). "Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice." Int Immunol **5**(11): 1461-1471.
- Powrie, F. and D. Mason (1990). "OX-22high CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset." J Exp Med **172**(6): 1701-1708.
- Prevot, N., C. Briet, H. Lassmann, I. Tardivel, E. Roy, J. Morin, T. W. Mak, A. Tafuri and C. Boitard (2010). "Abrogation of ICOS/ICOS ligand costimulation in NOD mice results in autoimmune deviation toward the neuromuscular system." Eur J Immunol **40**(8): 2267-2276.
- Przepiorka, D., D. Weisdorf, P. Martin, H. G. Klingemann, P. Beatty, J. Hows and E. D. Thomas (1995). "1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading." Bone Marrow Transplant **15**(6): 825-828.
- Putnam, A. L., T. M. Brusko, M. R. Lee, W. Liu, G. L. Szot, T. Ghosh, M. A. Atkinson and J. A. Bluestone (2009). "Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes." Diabetes **58**(3): 652-662.
- Qureshi, O. S., Y. Zheng, K. Nakamura, K. Attridge, C. Manzotti, E. M. Schmidt, J. Baker, L. E. Jeffery, S. Kaur, Z. Briggs, T. Z. Hou, C. E. Futter, G. Anderson, L. S. Walker and D. M. Sansom (2011). "Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4." Science **332**(6029): 600-603.
- Raimondi, G., W. J. Shufesky, D. Tokita, A. E. Morelli and A. W. Thomson (2006). "Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4⁺CD25⁺ resting regulatory T cells from activated T cells." J Immunol **176**(5): 2808-2816.
- Ramos-Casals, M., P. Brito-Zeron, M. J. Cuadrado and M. A. Khamashta (2008). "Vasculitis induced by tumor necrosis factor-targeted therapies." Curr Rheumatol Rep **10**(6): 442-448.
- Ramos-Casals, M., P. Brito-Zeron, M. J. Soto, M. J. Cuadrado and M. A. Khamashta (2008). "Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies." Best Pract Res Clin Rheumatol **22**(5): 847-861.
- Ratanatharathorn, V., R. A. Nash, D. Przepiorka, S. M. Devine, J. L. Klein, D. Weisdorf, J. W. Fay, A. Nademanee, J. H. Antin, N. P. Christiansen, R. van der Jagt, R. H. Herzig, M. R. Litzow, S. N. Wolff, W. L. Longo, F. B. Petersen, C. Karanes, B. Avalos, R. Storb, D. N. Buell, R. M. Maher, W. E. Fitzsimmons and J. R. Wingard (1998). "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 **92**(7): 2303-2314.

REFERENCES

- Rauert, H., T. Stuhmer, R. Bargou, H. Wajant and D. Siegmund (2011). "TNFR1 and TNFR2 regulate the extrinsic apoptotic pathway in myeloma cells by multiple mechanisms." Cell Death Dis **2**: e194.
- Read, S., V. Malmstrom and F. Powrie (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." J Exp Med **192**(2): 295-302.
- Redpath, S. A., N. van der Werf, A. M. Cervera, A. S. MacDonald, D. Gray, R. M. Maizels and M. D. Taylor (2013). "ICOS controls Foxp3(+) regulatory T-cell expansion, maintenance and IL-10 production during helminth infection." Eur J Immunol **43**(3): 705-715.
- Ren, X., F. Ye, Z. Jiang, Y. Chu, S. Xiong and Y. Wang (2007). "Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." Cell Death Differ **14**(12): 2076-2084.
- Reshef, R., S. M. Luger, E. O. Hexner, A. W. Loren, N. V. Frey, S. D. Nasta, S. C. Goldstein, E. A. Stadtmauer, J. Smith, S. Bailey, R. Mick, D. F. Heitjan, S. G. Emerson, J. A. Hoxie, R. H. Vonderheide and D. L. Porter (2012). "Blockade of lymphocyte chemotaxis in visceral graft-versus-host disease." N Engl J Med **367**(2): 135-145.
- Robert, C., G. V. Long, B. Brady, C. Dutriaux, M. Maio, L. Mortier, J. C. Hassel, P. Rutkowski, C. McNeil, E. Kalinka-Warzocha, K. J. Savage, M. M. Hernberg, C. Lebbe, J. Charles, C. Mihalciou, V. Chiarion-Sileni, C. Mauch, F. Cognetti, A. Arance, H. Schmidt, D. Schadendorf, H. Gogas, L. Lundgren-Eriksson, C. Horak, B. Sharkey, I. M. Waxman, V. Atkinson and P. A. Ascierto (2015). "Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation." N Engl J Med **372**(4): 320-330.
- Rodriguez-Perea, A. L., E. D. Arcia, C. M. Rueda and P. A. Velilla (2016). "Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents." Clin Exp Immunol **185**(3): 281-291.
- Romio, M., B. Reinbeck, S. Bongardt, S. Huls, S. Burghoff and J. Schrader (2011). "Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells." Am J Physiol Cell Physiol **301**(2): C530-539.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, S. L. Topalian, D. J. Schwartzentruber, J. S. Weber, D. R. Parkinson, C. A. Seipp, J. H. Einhorn and D. E. White (1994). "Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2." JAMA **271**(12): 907-913.
- Rossignol, M., J. Pouyssegur and M. Klagsbrun (2003). "Characterization of the neuropilin-1 promoter; gene expression is mediated by the transcription factor Sp1." J Cell Biochem **88**(4): 744-757.

REFERENCES

- Rothe, M., V. Sarma, V. M. Dixit and D. V. Goeddel (1995). "TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40." Science **269**(5229): 1424-1427.
- Rothe, M., S. C. Wong, W. J. Henzel and D. V. Goeddel (1994). "A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor." Cell **78**(4): 681-692.
- Rowlings, P. A., D. Przepiorka, J. P. Klein, R. P. Gale, J. R. Passweg, P. J. Henslee-Downey, J. Y. Cahn, S. Calderwood, A. Gratwohl, G. Socie, M. M. Abecasis, K. A. Sobocinski, M. J. Zhang and M. M. Horowitz (1997). "IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade." Br J Haematol **97**(4): 855-864.
- Ruan, Q., V. Kameswaran, Y. Tone, L. Li, H. C. Liou, M. I. Greene, M. Tone and Y. H. Chen (2009). "Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome." Immunity **31**(6): 932-940.
- Rubtsov, Y. P., J. P. Rasmussen, E. Y. Chi, J. Fontenot, L. Castelli, X. Ye, P. Treuting, L. Siewe, A. Roers, W. R. Henderson, Jr., W. Muller and A. Y. Rudensky (2008). "Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces." Immunity **28**(4): 546-558.
- Rueda, C. M., C. B. Wells, T. Gisslen, A. H. Jobe, S. G. Kallapur and C. A. Chougnet (2015). "Effect of chorioamnionitis on regulatory T cells in moderate/late preterm neonates." Hum Immunol **76**(1): 65-73.
- Saadoun, D., M. Rosenzweig, F. Joly, A. Six, F. Carrat, V. Thibault, D. Sene, P. Cacoub and D. Klatzmann (2011). "Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis." N Engl J Med **365**(22): 2067-2077.
- Sackstein, R. (2006). "A revision of Billingham's tenets: the central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease." Biol Blood Marrow Transplant **12**(1 Suppl 1): 2-8.
- Sagoo, P., N. Ali, G. Garg, F. O. Nestle, R. I. Lechler and G. Lombardi (2011). "Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells." Sci Transl Med **3**(83): 83ra42.
- Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self." Nat Immunol **6**(4): 345-352.
- Sakaguchi, S., K. Fukuma, K. Kuribayashi and T. Masuda (1985). "Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease." J Exp Med **161**(1): 72-87.

REFERENCES

- Sakaguchi, S., M. Miyara, C. M. Costantino and D. A. Hafler (2010). "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system." Nat Rev Immunol **10**(7): 490-500.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-1164.
- Sakaguchi, S., T. Takahashi and Y. Nishizuka (1982). "Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis." J Exp Med **156**(6): 1577-1586.
- Sakaguchi, S., T. Takahashi and Y. Nishizuka (1982). "Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer." J Exp Med **156**(6): 1565-1576.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura and M. Ono (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." Cell **133**(5): 775-787.
- Sakoda, Y., J. J. Park, Y. Zhao, A. Kuramasu, D. Geng, Y. Liu, E. Davila and K. Tamada (2011). "Dichotomous regulation of GVHD through bidirectional functions of the BTLA-HVEM pathway." Blood **117**(8): 2506-2514.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe and J. A. Bluestone (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." Immunity **12**(4): 431-440.
- Santegoets, S. J., E. M. Dijkgraaf, A. Battaglia, P. Beckhove, C. M. Britten, A. Gallimore, A. Godkin, C. Gouttefangeas, T. D. de Gruijl, H. J. Koenen, A. Scheffold, E. M. Shevach, J. Staats, K. Tasken, T. L. Whiteside, J. R. Kroep, M. J. Welters and S. H. van der Burg (2015). "Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry." Cancer Immunol Immunother **64**(10): 1271-1286.
- Sarris, M., K. G. Andersen, F. Randow, L. Mayr and A. G. Betz (2008). "Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition." Immunity **28**(3): 402-413.
- Satake, A., A. M. Schmidt, S. Nomura and T. Kambayashi (2014). "Inhibition of calcineurin abrogates while inhibition of mTOR promotes regulatory T cell expansion and graft-versus-host disease protection by IL-2 in allogeneic bone marrow transplantation." PLoS One **9**(3): e92888.
- Sawitzki, B., C. I. Kingsley, V. Oliveira, M. Karim, M. Herber and K. J. Wood (2005). "IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo." J Exp Med **201**(12): 1925-1935.

REFERENCES

- Schmitz, N., M. Beksac, D. Hasenclever, A. Bacigalupo, T. Ruutu, A. Nagler, E. Gluckman, N. Russell, J. F. Apperley, N. C. Gorin, J. Szer, K. Bradstock, A. Buzyn, P. Clark, K. Borkett and A. Gratwohl (2002). "Transplantation of mobilized peripheral blood cells to HLA-identical siblings with standard-risk leukemia." Blood **100**(3): 761-767.
- Schonle, A., F. A. Hartl, J. Mentzel, T. Noltner, K. S. Rauch, A. Prestipino, S. A. Wohlfeil, P. Apostolova, A. K. Hechinger, W. Melchinger, K. Fehrenbach, M. C. Guadamillas, M. Follo, G. Prinz, A. K. Ruess, D. Pfeifer, M. A. del Pozo, A. Schmitt-Graeff, J. Duyster, K. I. Hippen, B. R. Blazar, K. Schachtrup, S. Minguet and R. Zeiser (2016). "Caveolin-1 regulates TCR signal strength and regulatory T-cell differentiation into alloreactive T cells." Blood **127**(15): 1930-1939.
- Schorle, H., T. Holtschke, T. Hunig, A. Schimpl and I. Horak (1991). "Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting." Nature **352**(6336): 621-624.
- Schubert, L. A., E. Jeffery, Y. Zhang, F. Ramsdell and S. F. Ziegler (2001). "Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation." J Biol Chem **276**(40): 37672-37679.
- Schumacher, A., P. O. Wafula, A. Z. Bertoja, A. Sollwedel, C. Thuere, I. Wollenberg, H. Yagita, H. D. Volk and A. C. Zenclussen (2007). "Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy." Obstet Gynecol **110**(5): 1137-1145.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher and B. Fazekas de St Groth (2006). "Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells." J Exp Med **203**(7): 1693-1700.
- Sega, E. I., D. B. Leveson-Gower, M. Florek, D. Schneidawind, R. H. Luong and R. S. Negrin (2014). "Role of lymphocyte activation gene-3 (Lag-3) in conventional and regulatory T cell function in allogeneic transplantation." PLoS One **9**(1): e86551.
- Serra, P., A. Amrani, J. Yamanouchi, B. Han, S. Thiessen, T. Utsugi, J. Verdaguer and P. Santamaria (2003). "CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells." Immunity **19**(6): 877-889.
- Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi and S. Sakaguchi (2005). "Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization." J Exp Med **201**(5): 723-735.
- Sfikakis, P. P. (2010). "The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions." Curr Dir Autoimmun **11**: 180-210.

REFERENCES

- Shevach, E. M., R. A. DiPaolo, J. Andersson, D. M. Zhao, G. L. Stephens and A. M. Thornton (2006). "The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells." Immunol Rev **212**: 60-73.
- Shevach, E. M., R. S. McHugh, C. A. Piccirillo and A. M. Thornton (2001). "Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells." Immunol Rev **182**: 58-67.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida and S. Sakaguchi (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." Nat Immunol **3**(2): 135-142.
- Shin, H. J., J. Baker, D. B. Leveson-Gower, A. T. Smith, E. I. Segal and R. S. Negrin (2011). "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 **118**(8): 2342-2350.
- Shlomchik, W. D. (2007). "Graft-versus-host disease." Nat Rev Immunol **7**(5): 340-352.
- Simpson, T. R., S. A. Quezada and J. P. Allison (2010). "Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS)." Curr Opin Immunol **22**(3): 326-332.
- Slavin, S., A. Nagler, E. Naparstek, Y. Kapelushnik, M. Aker, G. Cividalli, G. Varadi, M. Kirschbaum, A. Ackerstein, S. Samuel, A. Amar, C. Brautbar, O. Ben-Tal, A. Eldor and R. Or (1998). "Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases." Blood **91**(3): 756-763.
- Socie, G. and B. R. Blazar (2009). "Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside." Blood **114**(20): 4327-4336.
- Sorrer, M. L., W. Leisenring, H. J. Deeg, P. J. Martin and R. Storb (2005). "Re: Twenty-year follow-up in patients with aplastic anemia given marrow grafts from HLA-identical siblings and randomized to receive methotrexate/cyclosporine or methotrexate alone for prevention of graft-versus-host disease." Biol Blood Marrow Transplant **11**(7): 567-568.
- Sorrer, M. L., W. Leisenring, H. J. Deeg, P. J. Martin and R. Storb (2005). "Twenty-year follow-up of a controlled trial comparing a combination of methotrexate plus cyclosporine with cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients administered HLA-identical marrow grafts for leukemia." Biol Blood Marrow Transplant **11**(10): 814-815.
- Sorrer, M. L., B. R. Logan, X. Zhu, J. D. Rizzo, K. R. Cooke, P. L. McCarthy, V. T. Ho, M. M. Horowitz and M. C. Pasquini (2015). "Prospective Validation of the Predictive Power of the Hematopoietic Cell Transplantation Comorbidity Index: A

REFERENCES

- Center for International Blood and Marrow Transplant Research Study." Biol Blood Marrow Transplant **21**(8): 1479-1487.
- Spoerl, S., N. R. Mathew, M. Bscheider, A. Schmitt-Graeff, S. Chen, T. Mueller, M. Verbeek, J. Fischer, V. Otten, M. Schmickl, K. Maas-Bauer, J. Finke, C. Peschel, J. Duyster, H. Poeck, R. Zeiser and N. von Bubnoff (2014). "Activity of therapeutic JAK 1/2 blockade in graft-versus-host disease." Blood **123**(24): 3832-3842.
- Steiner, D., N. Brunicki, B. R. Blazar, E. Bachar-Lustig and Y. Reisner (2006). "Tolerance induction by third-party "off-the-shelf" CD4+CD25+ Treg cells." Exp Hematol **34**(1): 66-71.
- Storb, R., H. J. Deeg, V. Farewell, K. Doney, F. Appelbaum, P. Beatty, W. Bensinger, C. D. Buckner, R. Clift, J. Hansen and et al. (1986). "Marrow transplantation for severe aplastic anemia: methotrexate alone compared with a combination of methotrexate and cyclosporine for prevention of acute graft-versus-host disease." Blood **68**(1): 119-125.
- Storb, R., H. J. Deeg, L. Fisher, F. Appelbaum, C. D. Buckner, W. Bensinger, R. Clift, K. Doney, C. Irle, R. McGuffin and et al. (1988). "Cyclosporine v methotrexate for graft-v-host disease prevention in patients given marrow grafts for leukemia: long-term follow-up of three controlled trials." Blood **71**(2): 293-298.
- Storb, R., H. J. Deeg, J. Whitehead, F. Appelbaum, P. Beatty, W. Bensinger, C. D. Buckner, R. Clift, K. Doney, V. Farewell and et al. (1986). "Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia." N Engl J Med **314**(12): 729-735.
- Storb, R., R. B. Epstein, T. C. Graham and E. D. Thomas (1970). "Methotrexate regimens for control of graft-versus-host disease in dogs with allogeneic marrow grafts." Transplantation **9**(3): 240-246.
- Storb, R., R. F. Raff, F. R. Appelbaum, H. J. Deeg, W. Fitzsimmons, T. C. Graham, M. Pepe, M. Pettinger, G. Sale, R. van der Jagt and et al. (1993). "FK-506 and methotrexate prevent graft-versus-host disease in dogs given 9.2 Gy total body irradiation and marrow grafts from unrelated dog leukocyte antigen-nonidentical donors." Transplantation **56**(4): 800-807.
- Storb, R., C. Yu, J. L. Wagner, H. J. Deeg, R. A. Nash, H. P. Kiem, W. Leisenring and H. Shulman (1997). "Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation." Blood **89**(8): 3048-3054.
- Strauss, L., C. Bergmann, M. Szczepanski, W. Gooding, J. T. Johnson and T. L. Whiteside (2007). "A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment." Clin Cancer Res **13**(15 Pt 1): 4345-4354.

REFERENCES

- Strauss, L., C. Bergmann and T. L. Whiteside (2009). "Human circulating CD4+CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells kill autologous CD8⁺ but not CD4⁺ responder cells by Fas-mediated apoptosis." J Immunol **182**(3): 1469-1480.
- Strauss, L., M. Czystowska, M. Szajnik, M. Mandapathil and T. L. Whiteside (2009). "Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin." PLoS One **4**(6): e5994.
- Sugihara, S., Y. Izumi, T. Yoshioka, H. Yagi, T. Tsujimura, O. Tarutani, Y. Kohno, S. Murakami, T. Hamaoka and H. Fujiwara (1988). "Autoimmune thyroiditis induced in mice depleted of particular T cell subsets. I. Requirement of Lyt-1 dull L3T4 bright normal T cells for the induction of thyroiditis." J Immunol **141**(1): 105-113.
- Sugimoto, N., T. Oida, K. Hirota, K. Nakamura, T. Nomura, T. Uchiyama and S. Sakaguchi (2006). "Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis." Int Immunol **18**(8): 1197-1209.
- Sun, C. M., J. A. Hall, R. B. Blank, N. Bouladoux, M. Oukka, J. R. Mora and Y. Belkaid (2007). "Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid." J Exp Med **204**(8): 1775-1785.
- Suri-Payer, E., A. Z. Amar, A. M. Thornton and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells." J Immunol **160**(3): 1212-1218.
- Suzuki, H., Y. W. Zhou, M. Kato, T. W. Mak and I. Nakashima (1999). "Normal regulatory alpha/beta T cells effectively eliminate abnormally activated T cells lacking the interleukin 2 receptor beta in vivo." J Exp Med **190**(11): 1561-1572.
- Sykes, M., V. S. Abraham, M. W. Harty and D. A. Pearson (1993). "IL-2 reduces graft-versus-host disease and preserves a graft-versus-leukemia effect by selectively inhibiting CD4⁺ T cell activity." J Immunol **150**(1): 197-205.
- Sykes, M., M. L. Romick, K. A. Hoyles and D. H. Sachs (1990). "In vivo administration of interleukin 2 plus T cell-depleted syngeneic marrow prevents graft-versus-host disease mortality and permits alloengraftment." J Exp Med **171**(3): 645-658.
- Sykes, M., M. L. Romick and D. H. Sachs (1990). "Interleukin 2 prevents graft-versus-host disease while preserving the graft-versus-leukemia effect of allogeneic T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5633-5637.
- Taams, L. S., J. M. van Amelsfort, M. M. Tiemessen, K. M. Jacobs, E. C. de Jong, A. N. Akbar, J. W. Bijlsma and F. P. Lafeber (2005). "Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells." Hum Immunol **66**(3): 222-230.

REFERENCES

- Taams, L. S., M. Vukmanovic-Stejic, J. Smith, P. J. Dunne, J. M. Fletcher, F. J. Plunkett, S. B. Ebeling, G. Lombardi, M. H. Rustin, J. W. Bijlsma, F. P. Lafeber, M. Salmon and A. N. Akbar (2002). "Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells." Eur J Immunol **32**(6): 1621-1630.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu and S. Sakaguchi (1998). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state." Int Immunol **10**(12): 1969-1980.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak and S. Sakaguchi (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." J Exp Med **192**(2): 303-310.
- Takeda, I., S. Ine, N. Killeen, L. C. Ndhlovu, K. Murata, S. Satomi, K. Sugamura and N. Ishii (2004). "Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells." J Immunol **172**(6): 3580-3589.
- Tang, A. L., J. R. Teijaro, M. N. Njau, S. S. Chandran, A. Azimzadeh, S. G. Nadler, D. M. Rothstein and D. L. Farber (2008). "CTLA4 expression is an indicator and regulator of steady-state CD4+ FoxP3+ T cell homeostasis." J Immunol **181**(3): 1806-1813.
- Tang, Q., J. Y. Adams, C. Penaranda, K. Melli, E. Piaggio, E. Sgouroudis, C. A. Piccirillo, B. L. Salomon and J. A. Bluestone (2008). "Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction." Immunity **28**(5): 687-697.
- Tang, Q., K. J. Henriksen, M. Bi, E. B. Finger, G. Szot, J. Ye, E. L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi and J. A. Bluestone (2004). "In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes." J Exp Med **199**(11): 1455-1465.
- Tarbell, K. V., S. Yamazaki, K. Olson, P. Toy and R. M. Steinman (2004). "CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes." J Exp Med **199**(11): 1467-1477.
- Tawara, I., M. Koyama, C. Liu, T. Toubai, D. Thomas, R. Evers, P. Chockley, E. Nieves, Y. Sun, K. P. Lowler, C. Malter, N. Nishimoto, G. R. Hill and P. Reddy (2011). "Interleukin-6 modulates graft-versus-host responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation." Clin Cancer Res **17**(1): 77-88.
- Taylor, P. A., C. J. Lees and B. R. Blazar (2002). "The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality." Blood **99**(10): 3493-3499.

REFERENCES

- Taylor, P. A., A. Panoskaltsis-Mortari, G. J. Freeman, A. H. Sharpe, R. J. Noelle, A. Y. Rudensky, T. W. Mak, J. S. Serody and B. R. Blazar (2005). "Targeting of inducible costimulator (ICOS) expressed on alloreactive T cells down-regulates graft-versus-host disease (GVHD) and facilitates engraftment of allogeneic bone marrow (BM)." Blood **105**(8): 3372-3380.
- Taylor, P. A., A. Panoskaltsis-Mortari, J. M. Swedin, P. J. Lucas, R. E. Gress, B. L. Levine, C. H. June, J. S. Serody and B. R. Blazar (2004). "L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection." Blood **104**(12): 3804-3812.
- Thanarajasingam, G., H. T. Kim, C. Cutler, V. T. Ho, J. Koreth, E. P. Alyea, J. H. Antin, R. J. Soiffer and P. Armand (2013). "Outcome and prognostic factors for patients who relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **19**(12): 1713-1718.
- Thomas, E., R. Storb, R. A. Clift, A. Fefer, F. L. Johnson, P. E. Neiman, K. G. Lerner, H. Glucksberg and C. D. Buckner (1975). "Bone-marrow transplantation (first of two parts)." N Engl J Med **292**(16): 832-843.
- Thomas, E. D., H. L. Lochte, Jr., W. C. Lu and J. W. Ferrebee (1957). "Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy." N Engl J Med **257**(11): 491-496.
- Thornton, A. M., C. A. Piccirillo and E. M. Shevach (2004). "Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function." Eur J Immunol **34**(2): 366-376.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." J Exp Med **188**(2): 287-296.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (2000). "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific." J Immunol **164**(1): 183-190.
- Tichelli, A., A. Rovo, J. Passweg, C. P. Schwarze, M. T. Van Lint, M. Arat and G. Socie (2009). "Late complications after hematopoietic stem cell transplantation." Expert Rev Hematol **2**(5): 583-601.
- Tiemessen, M. M., A. L. Jagger, H. G. Evans, M. J. van Herwijnen, S. John and L. S. Taams (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19446-19451.
- Tomblyn, M., T. Chiller, H. Einsele, R. Gress, K. Sepkowitz, J. Storek, J. R. Wingard, J. A. Young, M. J. Boeckh, B. Center for International, R. Marrow, p. National Marrow Donor, B. European, G. MarrowTransplant, B. American Society of, T. Marrow, B.

REFERENCES

- Canadian, G. Marrow Transplant, A. Infectious Diseases Society of, A. Society for Healthcare Epidemiology of, M. Association of Medical, C. Infectious Disease, C. Centers for Disease and Prevention (2009). "Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective." Biol Blood Marrow Transplant **15**(10): 1143-1238.
- Torrey, H., J. Butterworth, T. Mera, Y. Okubo, L. Wang, D. Baum, A. Defusco, S. Plager, S. Warden, D. Huang, E. Vanamee, R. Foster and D. L. Faustman (2017). "Targeting TNFR2 with antagonistic antibodies inhibits proliferation of ovarian cancer cells and tumor-associated Tregs." Sci Signal **10**(462).
- Toubi, E., A. Kessel, Z. Mahmudov, K. Hallas, M. Rozenbaum and I. Rosner (2005). "Increased spontaneous apoptosis of CD4+CD25+ T cells in patients with active rheumatoid arthritis is reduced by infliximab." Ann N Y Acad Sci **1051**: 506-514.
- Tran, D. Q., H. Ramsey and E. M. Shevach (2007). "Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype." Blood **110**(8): 2983-2990.
- Trenado, A., F. Charlotte, S. Fisson, M. Yagello, D. Klatzmann, B. L. Salomon and J. L. Cohen (2003). "Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia." J Clin Invest **112**(11): 1688-1696.
- Trenado, A., M. Sudres, Q. Tang, S. Maury, F. Charlotte, S. Gregoire, M. Bonyhadi, D. Klatzmann, B. L. Salomon and J. L. Cohen (2006). "Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells." J Immunol **176**(2): 1266-1273.
- Trzonkowski, P., M. Bieniaszewska, J. Juscinska, A. Dobyszyk, A. Krzystyniak, N. Marek, J. Mysliwska and A. Hellmann (2009). "First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells." Clin Immunol **133**(1): 22-26.
- Uberti, J. P., L. Ayash, V. Ratanatharathorn, S. Silver, C. Reynolds, M. Becker, P. Reddy, K. R. Cooke, G. Yanik, J. Whitfield, D. Jones, R. Hutchinson, T. Braun, J. L. Ferrara and J. E. Levine (2005). "Pilot trial on the use of etanercept and methylprednisolone as primary treatment for acute graft-versus-host disease." Biol Blood Marrow Transplant **11**(9): 680-687.
- Uphoff, D. E. (1958). "Alteration of homograft reaction by A-methopterin in lethally irradiated mice treated with homologous marrow." Proc Soc Exp Biol Med **99**(3): 651-653.
- Vaeth, M., U. Schliesser, G. Muller, S. Reissig, K. Satoh, A. Tuettenberg, H. Jonuleit, A. Waisman, M. R. Muller, E. Serfling, B. S. Sawitzki and F. Berberich-Siebelt (2012).

REFERENCES

- "Dependence on nuclear factor of activated T-cells (NFAT) levels discriminates conventional T cells from Foxp3⁺ regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(40): 16258-16263.
- Valencia, X., G. Stephens, R. Goldbach-Mansky, M. Wilson, E. M. Shevach and P. E. Lipsky (2006). "TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells." Blood **108**(1): 253-261.
- Valzasina, B., C. Guiducci, H. Dislich, N. Killeen, A. D. Weinberg and M. P. Colombo (2005). "Triggering of OX40 (CD134) on CD4⁽⁺⁾CD25⁺ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR." Blood **105**(7): 2845-2851.
- van Bekkum, D. W., J. Roodenburg, P. J. Heidt and D. van der Waaij (1974). "Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora." J Natl Cancer Inst **52**(2): 401-404.
- van den Brink, M. R. and S. J. Burakoff (2002). "Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation." Nat Rev Immunol **2**(4): 273-281.
- Van Lint, M. T., C. Uderzo, A. Locasciulli, I. Majolino, R. Scime, F. Locatelli, G. Giorgiani, W. Arcese, A. P. Iori, M. Falda, A. Bosi, R. Miniero, P. Alessandrino, G. Dini, B. Rotoli and A. Bacigalupo (1998). "Early treatment of acute graft-versus-host disease with high- or low-dose 6-methylprednisolone: a multicenter randomized trial from the Italian Group for Bone Marrow Transplantation." Blood **92**(7): 2288-2293.
- van Mierlo, G. J., H. U. Scherer, M. Hameetman, M. E. Morgan, R. Flierman, T. W. Huizinga and R. E. Toes (2008). "Cutting edge: TNFR-shedding by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibits the induction of inflammatory mediators." J Immunol **180**(5): 2747-2751.
- van Oosten, B. W., F. Barkhof, L. Truyen, J. B. Boringa, F. W. Bertelsmann, B. M. von Blomberg, J. N. Woody, H. P. Hartung and C. H. Polman (1996). "Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2." Neurology **47**(6): 1531-1534.
- Vang, K. B., J. Yang, A. J. Pagan, L. X. Li, J. Wang, J. M. Green, A. A. Beg and M. A. Farrar (2010). "Cutting edge: CD28 and c-Rel-dependent pathways initiate regulatory T cell development." J Immunol **184**(8): 4074-4077.
- Vaughn, J. E., B. E. Storer, P. Armand, R. Raimondi, C. Gibson, A. Rambaldi, F. Ciceri, R. Oneto, B. Bruno, P. J. Martin, B. M. Sandmaier, R. Storb and M. L. Sorrow (2015). "Design and Validation of an Augmented Hematopoietic Cell Transplantation-Comorbidity Index Comprising Pretransplant Ferritin, Albumin, and Platelet Count for Prediction of Outcomes after Allogeneic Transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **21**(8): 1418-1424.

REFERENCES

- Veenstra, R. G., R. Flynn, K. Kreymborg, C. McDonald-Hyman, A. Saha, P. A. Taylor, M. J. Osborn, A. Panoskaltsis-Mortari, A. Schmitt-Graeff, E. Lieberknecht, W. J. Murphy, J. S. Serody, D. H. Munn, G. J. Freeman, J. P. Allison, T. W. Mak, M. van den Brink, R. Zeiser and B. R. Blazar (2015). "B7-H3 expression in donor T cells and host cells negatively regulates acute graft-versus-host disease lethality." Blood **125**(21): 3335-3346.
- Veenstra, R. G., P. A. Taylor, Q. Zhou, A. Panoskaltsis-Mortari, M. Hirashima, R. Flynn, D. Liu, A. C. Anderson, T. B. Strom, V. K. Kuchroo and B. R. Blazar (2012). "Contrasting acute graft-versus-host disease effects of Tim-3/galectin-9 pathway blockade dependent upon the presence of donor regulatory T cells." Blood **120**(3): 682-690.
- Venet, F., A. Pachot, A. L. Debard, J. Bohe, J. Bienvenu, A. Lepape and G. Monneret (2004). "Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes." Crit Care Med **32**(11): 2329-2331.
- Venken, K., N. Hellings, M. Thewissen, V. Somers, K. Hensen, J. L. Rummens, R. Medaer, R. Hupperts and P. Stinissen (2008). "Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level." Immunology **123**(1): 79-89.
- Vent-Schmidt, J., J. M. Han, K. G. MacDonald and M. K. Levings (2014). "The role of FOXP3 in regulating immune responses." Int Rev Immunol **33**(2): 110-128.
- Vignali, D. A., L. W. Collison and C. J. Workman (2008). "How regulatory T cells work." Nat Rev Immunol **8**(7): 523-532.
- Vu, M. D., X. Xiao, W. Gao, N. Degauque, M. Chen, A. Kroemer, N. Killeen, N. Ishii and X. C. Li (2007). "OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs." Blood **110**(7): 2501-2510.
- Vukmanovic-Stejcic, M., Y. Zhang, J. E. Cook, J. M. Fletcher, A. McQuaid, J. E. Masters, M. H. Rustin, L. S. Taams, P. C. Beverley, D. C. Macallan and A. N. Akbar (2006). "Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo." J Clin Invest **116**(9): 2423-2433.
- Wagner, J. E., J. S. Thompson, S. L. Carter and N. A. Kernan (2005). "Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial." Lancet **366**(9487): 733-741.
- Walunas, T. L., D. J. Lenschow, C. Y. Bakker, P. S. Linsley, G. J. Freeman, J. M. Green, C. B. Thompson and J. A. Bluestone (1994). "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation." Immunity **1**(5): 405-413.

REFERENCES

- Wan, Y. Y. and R. A. Flavell (2007). "Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression." Nature **445**(7129): 766-770.
- Wang, M., P. R. Crisostomo, T. A. Markel, Y. Wang and D. R. Meldrum (2008). "Mechanisms of sex differences in TNFR2-mediated cardioprotection." Circulation **118**(14 Suppl): S38-45.
- Wang, Y., A. Souabni, R. A. Flavell and Y. Y. Wan (2010). "An intrinsic mechanism predisposes Foxp3-expressing regulatory T cells to Th2 conversion in vivo." J Immunol **185**(10): 5983-5992.
- Wang, Y., M. A. Su and Y. Y. Wan (2011). "An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells." Immunity **35**(3): 337-348.
- Webster, K. E., S. Walters, R. E. Kohler, T. Mrkvan, O. Boyman, C. D. Surh, S. T. Grey and J. Sprent (2009). "In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression." J Exp Med **206**(4): 751-760.
- Wei, J., O. Duramad, O. A. Perng, S. L. Reiner, Y. J. Liu and F. X. Qin (2007). "Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3+ regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(46): 18169-18174.
- Weiss, J. M., A. M. Bilate, M. Gobert, Y. Ding, M. A. Curotto de Lafaille, C. N. Parkhurst, H. Xiong, J. Dolpady, A. B. Frey, M. G. Ruocco, Y. Yang, S. Floess, J. Huehn, S. Oh, M. O. Li, R. E. Niec, A. Y. Rudensky, M. L. Dustin, D. R. Littman and J. J. Lafaille (2012). "Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells." J Exp Med **209**(10): 1723-1742, S1721.
- Weiss, L., F. A. Letimier, M. Carriere, S. Maiella, V. Donkova-Petrini, B. Targat, A. Benecke, L. Rogge and Y. Levy (2010). "In vivo expansion of naive and activated CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cell populations in interleukin-2-treated HIV patients." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(23): 10632-10637.
- Weiss, T., M. Grell, K. Sieminski, F. Muhlenbeck, H. Durkop, K. Pfizenmaier, P. Scheurich and H. Wajant (1998). "TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60." J Immunol **161**(6): 3136-3142.
- Welniak, L. A., B. R. Blazar and W. J. Murphy (2007). "Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Annu Rev Immunol **25**: 139-170.
- Welniak, L. A., Z. Wang, K. Sun, W. Kuziel, M. R. Anver, B. R. Blazar and W. J. Murphy (2004). "An absence of CCR5 on donor cells results in acceleration of acute graft-vs-host disease." Exp Hematol **32**(3): 318-324.

REFERENCES

- Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby and M. E. Brunkow (2001). "X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy." Nat Genet **27**(1): 18-20.
- Willerford, D. M., J. Chen, J. A. Ferry, L. Davidson, A. Ma and F. W. Alt (1995). "Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment." Immunity **3**(4): 521-530.
- Williams, G. S., B. Mistry, S. Guillard, J. C. Ulrichsen, A. M. Sandercock, J. Wang, A. Gonzalez-Munoz, J. Parmentier, C. Black, J. Soden, J. Freeth, J. Jovanovic, R. Leyland, R. S. Al-Lamki, A. J. Leishman, S. J. Rust, R. Stewart, L. Jermutus, J. R. Bradley, V. Bedian, V. Valge-Archer, R. Minter and R. W. Wilkinson (2016). "Phenotypic screening reveals TNFR2 as a promising target for cancer immunotherapy." Oncotarget **7**(42): 68278-68291.
- Wilson, J., H. Cullup, R. Lourie, Y. Sheng, A. Palkova, K. J. Radford, A. M. Dickinson, A. M. Rice, D. N. Hart and D. J. Munster (2009). "Antibody to the dendritic cell surface activation antigen CD83 prevents acute graft-versus-host disease." J Exp Med **206**(2): 387-398.
- Wilson, J. M., W. G. Ross, O. N. Agbai, R. Frazier, R. A. Figler, J. Rieger, J. Linden and P. B. Ernst (2009). "The A2B adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells." J Immunol **182**(8): 4616-4623.
- Wilson, M. S., J. T. Pesce, T. R. Ramalingam, R. W. Thompson, A. Cheever and T. A. Wynn (2008). "Suppression of murine allergic airway disease by IL-2:anti-IL-2 monoclonal antibody-induced regulatory T cells." J Immunol **181**(10): 6942-6954.
- Wingard, J. R., N. S. Majhail, R. Brazauskas, Z. Wang, K. A. Sobocinski, D. Jacobsohn, M. L. Sorrow, M. M. Horowitz, B. Bolwell, J. D. Rizzo and G. Socie (2011). "Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation." J Clin Oncol **29**(16): 2230-2239.
- Wohlfert, E. and Y. Belkaid (2008). "Role of endogenous and induced regulatory T cells during infections." J Clin Immunol **28**(6): 707-715.
- Wohlfert, E. A., J. R. Grainger, N. Bouladoux, J. E. Konkel, G. Oldenhove, C. H. Ribeiro, J. A. Hall, R. Yagi, S. Naik, R. Bhairavabhotla, W. E. Paul, R. Bosselut, G. Wei, K. Zhao, M. Oukka, J. Zhu and Y. Belkaid (2011). "GATA3 controls Foxp3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice." J Clin Invest **121**(11): 4503-4515.
- Wolff, D., M. Schleuning, S. von Harsdorf, U. Bacher, A. Gerbitz, M. Stadler, F. Ayuk, A. Kiani, R. Schwerdtfeger, G. B. Vogelsang, G. Kobbe, M. Gramatzki, A. Lawitschka, M. Mohty, S. Z. Pavletic, H. Greinix and E. Holler (2011). "Consensus Conference on Clinical Practice in Chronic GVHD: Second-Line Treatment of Chronic Graft-versus-Host Disease." Biol Blood Marrow Transplant **17**(1): 1-17.

REFERENCES

- Wu, A. J., H. Hua, S. H. Munson and H. O. McDevitt (2002). "Tumor necrosis factor- α regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12287-12292.
- Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A. D. Lapan, J. C. Stroud, D. L. Bates, L. Guo, A. Han, S. F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen and A. Rao (2006). "FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT." Cell **126**(2): 375-387.
- Xhaard, A., V. Rocha, B. Bueno, R. P. de Latour, J. Lenglet, A. Petropoulou, P. Rodriguez-Otero, P. Ribaud, R. Porcher, G. Socie and M. Robin (2012). "Steroid-refractory acute GVHD: lack of long-term improved survival using new generation anticytokine treatment." Biol Blood Marrow Transplant **18**(3): 406-413.
- Xia, G., M. Kovochich, R. L. Truitt and B. D. Johnson (2004). "Tracking ex vivo-expanded CD4+CD25+ and CD8+CD25+ regulatory T cells after infusion to prevent donor lymphocyte infusion-induced lethal acute graft-versus-host disease." Biol Blood Marrow Transplant **10**(11): 748-760.
- Xiao, X., X. Shi, Y. Fan, X. Zhang, M. Wu, P. Lan, L. Minze, Y. X. Fu, R. M. Ghobrial, W. Liu and X. C. Li (2015). "GITR subverts Foxp3(+) Tregs to boost Th9 immunity through regulation of histone acetylation." Nat Commun **6**: 8266.
- Xu, J., A. K. Chakrabarti, J. L. Tan, L. Ge, A. Gambotto and N. L. Vujanovic (2007). "Essential role of the TNF-TNFR2 cognate interaction in mouse dendritic cell-natural killer cell crosstalk." Blood **109**(8): 3333-3341.
- Xu, Y., A. S. Flies, D. B. Flies, G. Zhu, S. Anand, S. J. Flies, H. Xu, R. A. Anders, W. W. Hancock, L. Chen and K. Tamada (2007). "Selective targeting of the LIGHT-HVEM costimulatory system for the treatment of graft-versus-host disease." Blood **109**(9): 4097-4104.
- Xun, C. Q., J. S. Thompson, C. D. Jennings, S. A. Brown and M. B. Widmer (1994). "Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice." Blood **83**(8): 2360-2367.
- Yadav, M., C. Louvet, D. Davini, J. M. Gardner, M. Martinez-Llordella, S. Bailey-Bucktrout, B. A. Anthony, F. M. Sverdrup, R. Head, D. J. Kuster, P. Ruminski, D. Weiss, D. Von Schack and J. A. Bluestone (2012). "Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo." J Exp Med **209**(10): 1713-1722, S1711-1719.
- Yang, X. D., R. Tisch, S. M. Singer, Z. A. Cao, R. S. Liblau, R. D. Schreiber and H. O. McDevitt (1994). "Effect of tumor necrosis factor α on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process." J Exp Med **180**(3): 995-1004.

REFERENCES

- Yao, Z., Y. Kanno, M. Kerenyi, G. Stephens, L. Durant, W. T. Watford, A. Laurence, G. W. Robinson, E. M. Shevach, R. Moriggl, L. Hennighausen, C. Wu and J. J. O'Shea (2007). "Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3." Blood **109**(10): 4368-4375.
- Yared, J. A., N. Hardy, Z. Singh, S. Hajj, A. Z. Badros, M. Kocoglu, S. Yanovich, E. A. Sausville, C. Ujjani, K. Ruehle, C. Goecke, M. Landau and A. P. Rapoport (2016). "Major clinical response to nivolumab in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma after allogeneic stem cell transplantation." Bone Marrow Transplant **51**(6): 850-852.
- Younes, A., A. Santoro, M. Shipp, P. L. Zinzani, J. M. Timmerman, S. Ansell, P. Armand, M. Fanale, V. Ratanatharathorn, J. Kuruvilla, J. B. Cohen, G. Collins, K. J. Savage, M. Trneny, K. Kato, B. Farsaci, S. M. Parker, S. Rodig, M. G. Roemer, A. H. Ligon and A. Engert (2016). "Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial." Lancet Oncol **17**(9): 1283-1294.
- Yu, C., K. Seidel, W. E. Fitzsimmons, G. Sale and R. Storb (1997). "Glucocorticoids fail to enhance the effect of FK506 and methotrexate in prevention of graft-versus-host disease after DLA-nonidentical, unrelated marrow transplantation." Bone Marrow Transplant **20**(2): 137-141.
- Yu, C., K. Seidel, R. A. Nash, H. J. Deeg, B. M. Sandmaier, A. Barsoukov, E. Santos and R. Storb (1998). "Synergism between mycophenolate mofetil and cyclosporine in preventing graft-versus-host disease among lethally irradiated dogs given DLA-nonidentical unrelated marrow grafts." Blood **91**(7): 2581-2587.
- Yu, N., X. Li, W. Song, D. Li, D. Yu, X. Zeng, M. Li, X. Leng and X. Li (2012). "CD4(+)CD25 (+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood." Inflammation **35**(6): 1773-1780.
- Yu, X., K. Harden, L. C. Gonzalez, M. Francesco, E. Chiang, B. Irving, I. Tom, S. Ivelja, C. J. Refino, H. Clark, D. Eaton and J. L. Grogan (2009). "The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells." Nat Immunol **10**(1): 48-57.
- Yuan, X., M. J. Dee, N. H. Altman and T. R. Malek (2015). "IL-2Rbeta-dependent signaling and CD103 functionally cooperate to maintain tolerance in the gut mucosa." J Immunol **194**(3): 1334-1346.
- Zabransky, D. J., C. J. Nirschl, N. M. Durham, B. V. Park, C. M. Ceccato, T. C. Bruno, A. J. Tam, D. Getnet and C. G. Drake (2012). "Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells." PLoS One **7**(3): e34547.
- Zakharova, M. and H. K. Ziegler (2005). "Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF-alpha: inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells." J Immunol **175**(8): 5024-5033.

REFERENCES

- Zanin-Zhorov, A., Y. Ding, S. Kumari, M. Attur, K. L. Hippen, M. Brown, B. R. Blazar, S. B. Abramson, J. J. Lafaille and M. L. Dustin (2010). "Protein kinase C- θ mediates negative feedback on regulatory T cell function." Science **328**(5976): 372-376.
- Zaragoza, B., X. Chen, J. J. Oppenheim, A. Baeyens, S. Gregoire, D. Chader, G. Gorochov, M. Miyara and B. L. Salomon (2016). "Suppressive activity of human regulatory T cells is maintained in the presence of TNF." Nat Med **22**(1): 16-17.
- Zarek, P. E., C. T. Huang, E. R. Lutz, J. Kowalski, M. R. Horton, J. Linden, C. G. Drake and J. D. Powell (2008). "A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells." Blood **111**(1): 251-259.
- Zeiser, R., A. Burchert, C. Lengerke, M. Verbeek, K. Maas-Bauer, S. K. Metzelder, S. Spoerl, M. Ditschkowski, M. Ecsedi, K. Sockel, F. Ayuk, S. Ajib, F. S. de Fontbrune, I. K. Na, L. Penter, U. Holtick, D. Wolf, E. Schuler, E. Meyer, P. Apostolova, H. Bertz, R. Marks, M. Lubbert, R. Wasch, C. Scheid, F. Stolzel, R. Ordemann, G. Bug, G. Kobbe, R. Negrin, M. Brune, A. Spyridonidis, A. Schmitt-Graff, W. van der Velden, G. Huls, S. Mielke, G. U. Grigoleit, J. Kuball, R. Flynn, G. Ihorst, J. Du, B. R. Blazar, R. Arnold, N. Kroger, J. Passweg, J. Halter, G. Socie, D. Beelen, C. Peschel, A. Neubauer, J. Finke, J. Duyster and N. von Bubnoff (2015). "Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multicenter survey." Leukemia **29**(10): 2062-2068.
- Zeiser, R. and R. S. Negrin (2008). "Interleukin-2 receptor downstream events in regulatory T cells: implications for the choice of immunosuppressive drug therapy." Cell Cycle **7**(4): 458-462.
- Zeiser, R., G. Socie and B. R. Blazar (2016). "Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: from intestinal microbiota alterations to donor T cell activation." Br J Haematol **175**(2): 191-207.
- Zganiacz, A., M. Santosuosso, J. Wang, T. Yang, L. Chen, M. Anzulovic, S. Alexander, B. Gicquel, Y. Wan, J. Bramson, M. Inman and Z. Xing (2004). "TNF- α is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection." J Clin Invest **113**(3): 401-413.
- Zhao, D. M., A. M. Thornton, R. J. DiPaolo and E. M. Shevach (2006). "Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes." Blood **107**(10): 3925-3932.
- Zheng, G., B. Wang and A. Chen (2004). "The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **173**(4): 2428-2434.
- Zheng, S. G. (2012). "Emerging topics and new perspectives on regulatory and effector T cells." J Mol Cell Biol **4**(1): 1-2.

REFERENCES

- Zheng, S. G., J. Wang and D. A. Horwitz (2008). "Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6." J Immunol **180**(11): 7112-7116.
- Zheng, Y., A. Chaudhry, A. Kas, P. deRoos, J. M. Kim, T. T. Chu, L. Corcoran, P. Treuting, U. Klein and A. Y. Rudensky (2009). "Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses." Nature **458**(7236): 351-356.
- Zheng, Y., S. Z. Josefowicz, A. Kas, T. T. Chu, M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2007). "Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells." Nature **445**(7130): 936-940.
- Zheng, Y., C. N. Manzotti, F. Burke, L. Dussably, O. Qureshi, L. S. Walker and D. M. Sansom (2008). "Acquisition of suppressive function by activated human CD4+ CD25- T cells is associated with the expression of CTLA-4 not FoxP3." J Immunol **181**(3): 1683-1691.
- Zhou, L., J. E. Lopes, M. M. Chong, Ivanov, II, R. Min, G. D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y. P. Rubtsov, A. Y. Rudensky, S. F. Ziegler and D. R. Littman (2008). "TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function." Nature **453**(7192): 236-240.
- Zhou, X., J. Wang, W. Shi, D. D. Brand, Z. Liu, H. Fan and S. G. Zheng (2010). "Isolation of purified and live Foxp3+ regulatory T cells using FACS sorting on scatter plot." J Mol Cell Biol **2**(3): 164-169.
- Ziegler, S. F. (2006). "FOXP3: of mice and men." Annu Rev Immunol **24**: 209-226.
- Ziegler, S. F. (2007). "FOXP3: not just for regulatory T cells anymore." Eur J Immunol **37**(1): 21-23.
- Zorn, E., E. A. Nelson, M. Mohseni, F. Porcheray, H. Kim, D. Litsa, R. Bellucci, E. Raderschall, C. Canning, R. J. Soiffer, D. A. Frank and J. Ritz (2006). "IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo." Blood **108**(5): 1571-1579.

Résumé en français

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) jouent un rôle majeur dans la modulation de l'alloréactivité après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques et permettent notamment de contrôler la réaction du greffon contre l'hôte (GVH) dans des modèles expérimentaux. Le potentiel thérapeutique des Treg est donc très important dans ce domaine, mais aussi dans l'auto-immunité ou en cancérologie. Cependant, de nombreuses barrières rendent difficile l'élaboration de stratégies thérapeutiques reposant sur le transfert adoptif de Treg chez l'homme et une meilleure compréhension des facteurs et mécanismes contrôlant la prolifération et les capacités suppressives de ces cellules permettrait de les cibler directement et si possible spécifiquement in vivo.

Dans ce travail, après avoir élaboré un nouveau système d'évaluation clinique de la GVH chez la souris et démontré sa simplicité, sa reproductibilité et sa performance, nous avons pu montrer que l'action suppressive des Treg dans la GVH dépendait de l'interaction entre le TNF α produit par les lymphocytes T conventionnels (Tconv) du donneur et le récepteur TNFR2 exprimé par les Treg. En effet, en bloquant cette interaction de 3 façons différentes, à savoir par un anticorps monoclonal bloquant anti-TNFR2, ou en utilisant soit des Treg n'exprimant pas TNFR2 soit des Tconv ne produisant pas de TNF α , nous avons à chaque fois montré que l'effet protecteur des Treg était aboli en l'absence du signal TNF. Le récepteur TNFR2 étant exprimé préférentiellement par les Treg par rapport aux Tconv, nos résultats ouvrent la voie au ciblage des Treg in vivo via TNFR2, soit pour activer ce récepteur par un agoniste et donc stimuler les Treg afin de contrôler la GVH, soit à l'inverse pour bloquer l'axe TNF α /TNFR2 par un antagoniste et ainsi inhiber les Treg, ce qui permettrait alors de lever un frein à l'alloréactivité dans les situations où l'on cherche à la stimuler pour renforcer l'effet anti-tumoral, comme par exemple dans le cas des rechutes post-allogreffe.

Abstract in English

Regulatory T cells (Tregs) are key players involved in the modulation of alloreactivity after hematopoietic stem cell transplantation. Indeed, Tregs can prevent graft-versus-host disease (GVHD) in experimental models. Therefore, the therapeutic potential of these cells in GVHD is substantial, as it is in other fields like auto-immunity or oncology. However, many obstacles still make the application of cellular therapy strategies based on the adoptive transfer of Tregs in humans quite complicated. A better understanding of factors and mechanisms that control the proliferation and suppressive capacities of Tregs could allow for a direct and specific targeting of these cells in vivo.

In this work, after designing a new clinical grading system for murine GVHD and demonstrating its ease of use, reproducibility and performance, we have shown that the suppressive action of Tregs in GVHD depends on the interaction between TNF α produced by donor conventional T cells (Tconvs) and TNFR2 expressed by Tregs. Using 3 different ways to block this interaction, i.e. with an anti-TNFR2 blocking monoclonal antibody, or Tregs that do not express TNFR2 or donor Tconvs that cannot produce TNF α , we were able to show in each situation that blocking TNF signaling resulted in a loss of protection by Tregs. TNFR2 being highly expressed by Tregs as compared with Tconvs, our results pave the way for in vivo targeting of Tregs through TNFR2, either to activate this receptor with an agonist and therefore stimulate Tregs to control GVHD, or to block the TNF α /TNFR2 axis with an antagonist and in this case inhibit Tregs, which could boost alloreactivity, as expected in some particular settings like post-transplant relapse.