



HAL
open science

Immunobiologie de la GVH chronique humain : dérégulation de la réaction du centre germinatif et implication de la réponse Th17

Edouard Forcade

► **To cite this version:**

Edouard Forcade. Immunobiologie de la GVH chronique humain : dérégulation de la réaction du centre germinatif et implication de la réponse Th17. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0439 . tel-02426943v1

HAL Id: tel-02426943

<https://theses.hal.science/tel-02426943v1>

Submitted on 3 Jan 2020 (v1), last revised 3 Jan 2020 (v2)

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE
SCIENCES de la VIE et de la SANTE

Par Edouard FORCADE

IMMUNOBIOLOGIE DE LA GVH CHRONIQUE HUMAINE :
Dérégulation de la réaction du centre germinatif et
Implication de la réponse Th17

Sous la direction du : Professeur Patrick BLANCO

Présentée et soutenue publiquement le 16 Décembre 2016

Membres du jury :

Monsieur le Professeur Noel MILPIED,
Monsieur le Professeur Gérard SOCIE,
Monsieur le Professeur Bernard BONNOTTE,
Monsieur le Professeur Antoine TOUBERT,
Monsieur le Professeur Jerome RITZ,
Monsieur le Professeur Patrick BLANCO

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur

Remerciements

A Marine,

Tu as rendu possible cette riche expérience partagée à deux,

Et bientôt à trois,

Merci pour ton soutien permanent et tes attentions constantes.

A mes parents,

A mes frère et sœur,

Merci pour votre soutien et votre présence.

Aux Membres du jury

Professeur Noël Milpied

Vous m'avez fait confiance dans ce long cursus et dans ce projet tout en instillant constamment de précieux conseils et en faisant preuve d'un soutien constant. Ce travail représente l'aboutissement d'une riche expérience que j'espère utiliser du lit du malade jusqu'à la paillasse.

Professeur Gérard Socié

Vous avez accepté de faire partie de ce jury et je vous en remercie. Vous m'accompagnez dans ce cursus de greffeur depuis 6 ans par vos enseignements cliniques et biologiques, et votre disponibilité. Cette aventure américaine est un peu la vôtre. Votre présence dans ce jury de thèse sur la biologie de la GVH chronique témoigne de ma reconnaissance et de mon admiration.

Professeur Bernard Bonnotte

Vous avez accepté de faire partie de ce jury et je vous en remercie. Sans le savoir, nos chemins se sont croisés dès le master 2 (Relation Hôte Greffon) permettant mon éveil scientifique. Votre présence dans ce jury permet ainsi de boucler la boucle. La présence de Nicolas dans notre unité présage de riches collaborations.

Professeur Antoine Toubert

Vous avez accepté de faire partie de ce jury et je vous en remercie. Vos enseignements et votre expertise m'auront accompagné au cours de mon master 2, et vous compter dans ce jury me paraissait indispensable pour apporter votre expertise de la biologie de l'allogreffe de CSH.

Professeur Jerome Ritz

I am thrilled and honored to have you for this PhD thesis defense. These two years in Boston were a great experience, professionally and personally. You trusted me and mentored me in a unique way to become an independent researcher and build my own project. This will definitely shape my way of approaching translational research, BMT and lab work. Thanks again for being here.

Professeur Patrick Blanco

Merci Patrick d'avoir accepté de diriger cette thèse en grande partie réalisée à distance. Tu as su maintenir le contact malgré la distance (merci Skype) pour vérifier que tout allait bien et organiser la suite ! Merci d'avoir accepté de m'intégrer dans ce groupe, où tu pousses au dynamisme permanent avec ce goût pour la transversalité. Même si j'ai produit plus de « results » aux US qu'en France, j'espère que tu sauras me faire confiance dans les projets à venir. Encore merci pour ton soutien !

Aux compagnons de route du l'UMR 5164

Du CIRID à ImmunoConcept, ce laboratoire m'a donné le goût pour la recherche, grâce aux conseils et soutien de toutes les personnes qui ont fait partie ou qui font toujours partie de l'unité. Je remercie Jean-Luc de m'avoir assisté dans mes premiers pas à la paillasse, sans oublier Sophie et Vincent (tu m'as montré une fois, et pas deux, mais c'est resté gravé ;)). Merci à Julie de m'avoir accueilli dans mon premier groupe et m'avoir appris cette rigueur scientifique.

Un grand merci à Patrick et son groupe de m'avoir accueilli dans leur équipe : merci à Cécile, Christophe, Esti, Pierre, Nathalie, et un merci tout particulier à MET pour son soutien à distance et ses conseils avisés. Un grand merci au pilier de cette équipe : Isa, merci pour tes conseils, ta patience, et ta gentillesse.

Je remercie bien évidemment le Professeur Jean-François Moreau pour ses conseils et ses discussions toujours riches.

Merci à tous les membres du labo dont Mimi, Maria, Nicolas, Dorothée, Valérie, Séverine, et Emeline, et à mes co-thésards et post-doc : Paoline, Angela, Delphine, Jonathan, Layal, Charlotte, Lynn et Valérie. Merci à cette super journée de M2 (Noémie, Pauline, Caroline et Laure) : super ambiance !

Aux collègues Boston,

Merci à mes collègues du Ritz's lab : Ana, Tiago, Masahiro, Kazayuki, Eduardo, Cathy, Roberto, Jennifer, Bryn, Kate, Suzanne, Carol, Marie, Ryley et Alex. A Suzanne, John, Steve et Kristen pour leurs conseils en cytométrie. A mes amis du département : Kyu, et aux Frenchies du Farber : Raphael, Romain, Cyrille. Aux amis de Boston : Héloïse et Mark, AnaLu, Bene, Francis, Mariaelena et Giuseppe.

A mes collègues de travail,

Merci à Reza et Stéphane de m'accueillir dans cette équipe de greffe, et pour leur transmission et bienveillance ; et à Laurence qui a rejoint l'équipe. A nos collègues « de la GVH chronique » : Marie Beylot-Barry, Jean-Christophe Fricain, Claire Dromer, Elodie Blanchard, et collègues anapath.

A Marie-Sarah, Thibaut, Arnaud, Krime, Gérald, Sophie, Axelle, Cyrille. Un grand merci à PYD pour ton soutien indéfectible !

A mes amis,

Merci à tous pour votre présence, vos appels Skype et vos visites : Nico, Marco, Clément, Elias, Kiko, Charles, Antoine, Simon, et tous les autres.

Titre : Immunobiologie de la GVH chronique humaine : Dérégulation de la réaction du centre germinatif et Implication de la réponse Th17

Résumé :

La GVH chronique (cGVHD) est une complication fréquente de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) dont la physiopathologie demeure partiellement comprise. Les données disponibles ont établi le rôle des lymphocytes T (LT) et B (LB) au cours de la cGVHD, mais la qualité de leur interaction et les sous-types de LT impliqués restent à définir. L'interaction entre les LT et les LB se fait au niveau du centre germinatif (CG) aboutissant à la production de LB mémoires et de cellules productrices d'anticorps de haute affinité grâce aux signaux d'aide reçus par les LT folliculaires helpers (TFH) finement contrôlés par une population régulatrice (TFR). La possibilité d'interroger les événements se déroulant au niveau du CG par l'analyse de leur contingent circulant (c) nous a permis de mieux comprendre la physiopathologie de la cGVHD. En effet, la signature phénotype des cTFH suggère un gain de fonction au cours de la cGVHD, confirmée par étude fonctionnelle, et corrélant avec le phénotype des LB observé. De plus, les mécanismes de régulation apparaissent défectueux au cours de la cGVHD, puisque les cTFR présentent un défaut numérique expliqué par un défaut de résistance à l'apoptose et de prolifération. D'autre part, nous avons analysé une population de LT CD4+CD146+CCR5+, leur conférant une capacité de migration au travers des structures endothéliales et vers les sites inflammatoires. Cette population est significativement augmentée au cours de la cGVHD, et les modèles murins de cGVHD recevant des splénocytes de souris CD146^{-/-} voient leur score clinique amélioré. L'expression de CD146 est associée à une polarisation Th17 justifiant un traitement par TMP778 (inhibiteur de ROR γ t) améliorant la cGVHD chez la souris. L'analyse de ces populations révèle des anomalies de la balance effecteur-régulateur et de potentielles cibles thérapeutiques à évaluer en clinique.

Mots clés : GVH chronique ; TFH ; TFR ; Th17.

Unités de recherche

ImmunoConcept – UMR CNRS 5164, Université de Bordeaux,

146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

Ritz's Laboratory, Division of Hematologic Malignancies, Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

Title: Immunobiology of human chronic GVHD: Germinal center reaction dysregulation and involvement of Th17 response

Abstract:

Chronic GVHD (cGVHD) remains a major complication of allogeneic stem cell transplantation and its pathogenesis poorly understood. Previous reports established the role of T cells and B cells during cGVHD, but the quality of their interaction and T cell subsets involved remain to be defined. T cell – B cell crosstalk occurs in the germinal center generating memory B cells and high affinity antibody secreting cells consecutively to signals provided by T follicular helper cells (TFH) which are tightly controlled by a regulatory subset (TFR). The opportunity to interrogate events occurring in the germinal center through the analysis of their circulating contingent (c), allowed us to better understand cGVHD pathogenesis. cTFH phenotypic signature suggest an enhanced function during cGVHD, confirmed in functional studies, and correlating with observed B cell phenotype. In addition, regulatory mechanisms appeared defective during cGVHD, as cTFR showed a numerical deficiency, explained by a defect in resistance to apoptosis and low proliferative capacity. We also studied a T cell subset expressing CD4+CD146+CCR5+, giving the capacity to migrate through endothelial structures and toward inflammatory sites. This population is significantly increased during cGVHD, and cGVHD murine models receiving splenocytes from CD146-/- mice showed improved clinical score. CD146 expression is associated with a Th17 polarization justifying a treatment by TMP778 (ROR γ t inhibitor) improving cGVHD in mice. The analysis of these different populations revealed an abnormal effector-regulator balance and potential therapeutic targets to evaluate in clinic.

Keywords: chronic GVHD; TFH; TFR; Th17

Research Unit

ImmunoConcept – UMR CNRS 5164, Université de Bordeaux,
146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

Ritz's Laboratory, Division of Hematologic Malignancies, Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

Liste des Publications réalisées au cours de la Thèse

Forcade E, Kim HT, Cutler C, Wang K, Alho AC, Nikiforow S, Ho VT, Koreth J, Armand P, Alyea EP, Blazar BR, Soiffer RJ, Antin JH and Ritz J. Circulating T Follicular Helper Cells with Increased Function during Chronic Graft-versus-Host-Disease. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2489-97.

Forcade E, Kamihara, Kim HT, Koreth J, Hirakawa M, Cutler CS, Nikiforow S, Ho VT, Armand P, Alyea EP, Blazar BR, Antin JH, Soiffer RJ and Ritz J. T Follicular Regulatory Cell Deficiency during Chronic Graft-versus-Host Disease is improved by Low-Dose IL-2 Therapy. *Manuscript in preparation*.

Forcade E,* Paz K,* Flynn R,* Li W, Jiang D, Chu HW, Yang J, Wilkes DS, Du J, Espada EL, Blanco P, Cutler CS, Antin JH, Soiffer RJ, Ritz J,[‡] Paczesny S,[‡] and Blazar BR[‡]. An Activated Th17-Prone T cell subset involved in Chronic Graft versus Host Disease Sensitive to Pharmacological Inhibition. *Submitted to Journal of Clinical Investigation*.

Alho AC, Kim HT, Chammas MJ, Reynolds CG, Matos TR, Forcade E, Whangbo J, Nikiforow S, Cutler CS, Koreth J, Ho VT, Armand P, Antin JH, Alyea EP, Lacerda JF, Soiffer RJ, Ritz J. Unbalanced recovery of regulatory and effector T cells after allogeneic stem cell transplantation contributes to chronic GVHD. *Blood*. 2016 Feb 4; 127(5) :646-57.

Poissonnier A, Sanséau D, Le Gallo M, Malleter M, Levoine N, Viel R, Morere L, Penna A, Blanco P, Dupuy A, Poizeau F, Fautrel A, Seneschal J, Jouan F, Ritz J, Forcade E, Rioux N, Contin-Bordes C, Ducret T, Vacher AM, Barrow PA, Flynn RJ, Vacher P, Legembre P. CD95-Mediated Calcium Signaling Promotes T Helper 17 Trafficking to Inflamed Organs in Lupus-Prone Mice. *Immunity*. 2016 Jul 19;45(1):209-23.

Liste des Illustrations

Figure 1 : Réaction du centre germinatif.

p.31

Figure 2 : Signaux d'activation du LT.

p.32

Figure 3 : Signalisation et régulation transcriptionnelle au cours de la polarisation Th17.

p.42

Figure 4 : Séquence de régulation transcriptionnelle au cours de la polarisation Th17.

p.43

Figure 5 : Plasticité des LT helpers médiés par les cytokines.

p.46

Figure 6 : Modèle cGVHD.

p.66

ABREVIATIONS

Ac : Anticorps	IDO : Indoleamine 2,3-dioxygenase
Ag : Antigène	Ig : Immunoglobuline
AID : Activation-Induced (Cytidine) Deaminase	IL : Interleukine
APC : Antigen Presenting Cell	ILC : Innate Lymphoid Cell
APRIL : A Proliferation-Inducing Ligand	ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
BAFF : B-cell Activating Factor	KO : Knock-Out
BCMA : B-cell Maturation Antigen	LAG-3 : Lymphocyte-activation gene 3
BCR : B-Cell Receptor	LB : Lymphocyte B
CD : Cluster of Differentiation	LPS : Lipopolysaccharide
CDR3 : Complementarity Determining Region	LT : Lymphocyte T
CG : Centre Germinatif	MALT : Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
rCG : réaction du Centre Germinatif	MLR : Mixed Lymphocyte Reaction
CIBMTR : Center for International Blood and Marrow Research	MZB : Marginal Zone B cell
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	NK : Natural Killer
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	PC : Plasma Cell
CR1/2 : Complement Receptor 1/2	PD1 : Programmed cell Death 1
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques	PRR : Pattern Recognition Receptor
CSP : Cellules Souches Périphériques	ROR : RAR-related orphan receptor
CSR : Class Switch Recombination	SAL : Serum anti-lymphocytaire
DC : Dendritic Cell	SAP : SLAM-associated protein
cDC : conventional Dendritic Cell	SDF-1 : Stromal cell-derived factor-1
DFS : Disease Free Survival	SHM : Somatic Hypermutation
FDC : Follicular Dendritic Cell	STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
FLT3-L : Fms-like tyrosine kinase 3	TACI : Transmembrane Activator and CAML Interactor
G-CSF : Granulocyte colony-stimulating factor	Tc : T cytotoxic cell
GCB : Germinal Center B cell	TCM : LT Central Memory
GM-CSF : Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor	TCR : T cell Receptor
GVL : Graft <i>versus</i> Leukemia	TEM : LT Effector Memory
GVH : Graft <i>versus</i> Host	TEMRA : LT Effector Memory RA+
aGVHD : GVH aiguë	TFH : T Follicular Helper
cGVHD : GVH chronique	TGF : Transforming Growth Factor
HLA : Human Leukocyte Antigen	Th : T helper
ICOS : Inducible T-cell COStimulator	TLR : Toll Like Receptor
	TN : LT Naïf
	TNF : Tumor Necrosis Factor
	TSLP : Thymic Stromal Lymphopoietin

Table des matières

INTRODUCTION	11
I. Partie 1 : La réaction chronique du Greffon contre l'Hôte : un modèle immunologique	12
A. Généralités sur l'Allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques	12
B. La GvH chronique	13
1. Présentation	13
2. Effet GVH/GVL	14
3. Prophylaxie et traitement de la cGVHD	15
II. Partie 2 : Immunobiologie de la cGVHD	16
A. Implication des Lymphocytes T au cours de la GVH chronique	17
1. Support de l'alloréactivité lymphocytaire T : le CMH et les Antigènes	17
2. Place de la T-déplétion dans la prévention de la cGVHD	17
3. Défaut des mécanismes de tolérance au cours de la cGVHD	18
a) Tolérance centrale	18
b) Tolérance périphérique	18
4. Caractérisation de la réponse lymphocytaire T au cours de la cGVHD	19
B. Implication des Lymphocytes B au cours de la GVH chronique	21
1. Perturbations homéostatiques post-greffe	21
2. Les LB, cellules productrices d'anticorps, au cours de la cGVHD	21
3. Activation et différenciation des LB au cours de la cGVHD	22
4. Défaut de tolérance	23
5. Implication des LB dans les modèles expérimentaux	23
6. Stratégies thérapeutiques ciblant les LB	24
III. Partie 3 : Activation Lymphocytaire B	25
A. Ontogénie des Lymphocytes B : génération du répertoire B	25
B. Activation des Lymphocytes B	26
1. Généralités	26

2. Activation thymo-indépendante.....	27
3. Voie thymo-dépendante : Réaction du centre germinatif (rCG).....	28
a) Acteurs	28
b) Organisation anatomique	29
c) La réaction du Centre Germinatif : un processus dynamique	29
IV. Partie 4 : Implication des Th17 et des TFH dans la réponse T effectrice	32
A. Polarisation du LT naïf.....	32
B. Les différents LT auxiliaires	33
C. Les Lymphocytes T Folliculaires Helper (TFH)	33
1. La différenciation des TFH :.....	34
2. Fonction des TFH :	36
3. Organisation anatomique	36
4. Régulation des TFH :	38
5. Applications cliniques.....	39
D. Les lymphocytes T helper 17 (ou Th17)	40
1. Différenciation et programme Th17	40
2. Fonction des Th17	43
3. Dualité et plasticité des Th17.....	44
4. Th17 dans la dysimmunité	47
a) Auto-immunité	47
b) Rôle des Th17 dans la GVH.....	47
RESULTATS	51
1. Papier 1	52
2. Papier 2	55
3. Papier 3	58
DISCUSSION et CONCLUSION	61
ANNEXES	67
BIBLIOGRAPHIE	71

INTRODUCTION

I. Partie 1 : La réaction chronique du Greffon contre l'Hôte : un modèle immunologique

A. Généralités sur l'Allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) consiste en une immunothérapie active utilisée dans le traitement des hémopathies bénignes ou malignes dans le but d'exercer un effet immunologique anti-tumoral et/ou de remplacer le tissu hématopoïétique ou immunologique défectueux (1). La première greffe de moelle pour une hémopathie maligne s'est faite à la fin de années 1950 par Thomas and coll. Bien que celle-ci n'ait pas permis une rémission prolongée, la procédure sera répétée et améliorée avec les progrès du typage HLA. A la fin des années 1960, la guérison de plusieurs patients atteints de leucémies avancées est décrite. L'effet greffon contre la maladie (*Graft versus Leukemia* ou GVL) est conceptualisé à la fin des années 1970 (2).

Au delà de cet effet GVL, l'allogreffe de CSH révèle son activité immunologique puissante par le développement d'un syndrome clinique parfois fatal chez le receveur. Il s'agit de la maladie du Greffon contre l'Hôte ou GVH (*Graft Versus Host*), décrite pour la première fois par Georges Mathé dans les années 1960 (3).

Deux formes cliniques différentes sont décrites (4) : une forme aiguë et une forme chronique, dont la présentation, le pronostic et le traitement diffèrent. Il sera ici question de la forme chronique.

B. La GHH chronique

1. Présentation

La GVH chronique ou cGVHD (pour chronic Graft *versus* Host Disease) est un syndrome clinique pléomorphe pouvant toucher tous les organes de la même façon que les maladies auto-immunes (5). Elle survient chez environ 50% des patients et se développe habituellement dans la première année post greffe. Jusqu'au début des années 2000, l'on distinguait les formes limitées et extensives en fonction des organes atteints selon les critères émis par le groupe de Seattle (5, 6). Le diagnostic était basé jusque là sur la survenue de manifestations clinico-biologiques au-delà des 100 jours (J100) post-greffe. Le National Institute of Health a émis un consensus en 2005 concernant le diagnostic de cGVHD (7). Depuis lors, l'on distingue la GVH aiguë de la GVH chronique selon un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et histologiques : la GVH aiguë pouvant survenir après J100 (GVH aiguë tardive ou « late acute »), une GVH chronique pouvant survenir avant J100, ou des signes de GVH aiguë et chronique pouvant s'entremêler au cours d'un syndrome dit « de chevauchement » (« overlap syndrome »). La cGVHD survient en médiane autour du 6^{ème} mois post allogreffe, mais peut survenir entre le 3^{ème} et le 24^{ème} mois (8).

Actuellement, le diagnostic de cGVHD est posé sur la base de signes dits « diagnostiques » comme : la sclérose cutanée, le lichen buccal, une fasciite, un syndrome de bronchiolite oblitérante, etc. Ces signes suffisent à poser le diagnostic de cGVHD au décours d'une allogreffe de CSH. D'autres signes sont dits « distinctifs » car ils sont évocateurs de cGVHD mais nécessite la réalisation d'une biopsie car non pathognomonique de cGVHD : vitiligo, alopecie, ulcérations buccales, syndrome sec oculaire, etc. Enfin d'autres signes sont communs à la GVH aiguë et chronique : érythème maculo-papuleux, érythème buccal, perturbations hépatiques (5, 7, 9).

Les facteurs de risque de cGVHD ont fait l'objet de plusieurs études et ont été confirmés avec le score NIH dans une grande cohorte par Flowers *et al* (8), retrouvant le rôle de : donneur non apparenté (compatible ou partiellement compatible), donneur féminin pour un receveur masculin, l'utilisation de cellules souches périphériques plutôt que de la moelle osseuse, et l'âge avancé du donneur et du receveur. L'absence d'utilisation de sérum anti-lymphocytaire est aussi associée à une augmentation du risque de cGVHD, et confirmée par d'autres études (10, 11).

Certains facteurs sont associés à un pronostic particulièrement péjoratif au développement de cGVHD. On décrivait classiquement une cGVHD dite progressive (i.e. dans le continuum d'une aGVHD), et l'existence d'une thrombopénie au diagnostic de cGVHD (12). Plus récemment, l'étude du CIBMTR (Center for International Blood and Marrow Transplant Research) sur plus de 5000 patients a rapporté le rôle des facteurs de risque suivants dans la mortalité liée à la cGVHD : l'âge du receveur > 60 ans, un antécédent de aGVHD, un délai entre la greffe et la cGVHD < 5 mois, un taux de bilirubine > 2 mg/dL au début de la cGVHD, un score de Karnofsky < 80%, un taux de plaquettes < 100 G/L, un donneur non apparenté avec incompatibilité HLA, une hémopathie avancée à la greffe, une incompatibilité sexuelle (de type donneur féminin – receveur masculin) (13).

La cGVHD est la principale cause de mortalité non liée à la rechute après allogreffe de CSH décrite selon le terme NRM (Non Relapse Mortality). Celle-ci est liée aux infections liées au déficit immunitaire induit par la GVH ou par les traitements, aux cancers secondaires, ou aux défaillances d'organes induites par la GVH.

Le diagnostic de cGVHD est rendu difficile du fait de la multitude des formes cliniques, de l'absence d'outil de standardisation et de la coexistence possible de manifestations de GVH aiguë rendant nécessaire la validation de nouveaux biomarqueurs.

2. Effet GVH/GVL

La survenue d'une GVHD est le témoin clinique d'une allo-réactivité dont le but ultime est l'effet anti-leucémique ou GVL (*Graft versus Leukemia*) visant à prévenir la récurrence de l'hémopathie maligne sous-jacente par l'éradication d'une maladie résiduelle, ou la diminution d'une masse tumorale résiduelle.

Cette association est suggérée par la réduction de l'incidence de rechute chez les patients développant une cGVHD à la fois dans les conditionnements myélo-ablatifs et dans les conditionnements atténués (14), confirmée en utilisant l'échelle du consensus NIH de 2005 (15).

3. Prophylaxie et traitement de la cGVHD

Plusieurs études ont rapporté le caractère bénéfique de la survenue d'une cGVHD en terme de survie sans rechute ou DFS (Disease-free Survival), mais celle-ci n'est pas toujours associée à un gain de survie globale du fait d'une mortalité imputable à la toxicité de la greffe liée à la survenue de la GVHD elle-même.

Plusieurs stratégies ont été évaluées pour réduire l'incidence de cGVHD post-greffe. Beaucoup d'entre elles se sont basées sur la déplétion des LT, population effectrice et responsable de l'allo-réactivité. Des études utilisant une T-déplétion par anticorps anti-CD6 ont échoué à réduire l'incidence de cGVHD (16). Cependant l'utilisation de sérum anti-lymphocytaire a montré une réduction de la cGVHD dans les conditionnements myélo-ablatifs (10, 11). Les greffes haplo-identiques, de plus en plus utilisées, utilisent actuellement une stratégie de lymphodéplétion post-greffe par Cyclophosphamide permettant une réduction significative de la cGVHD (17, 18).

Le traitement de la cGVHD repose sur des agents immunosuppresseurs dont les indications et modalités dépendent du stade, des organes atteints et de la sévérité de la cGVHD. Les corticoïdes en association avec la ciclosporine demeurent un traitement de référence avec les traitements topiques. Les alternatives thérapeutiques en 2^{ème} ligne sont multiples, profitant de l'amélioration des connaissances sur la biologie de la cGVHD (19, 20). On citera : la photochimiothérapie extra-corporelle, le rituximab, le mycophénolate mofetil, les inhibiteurs de mTOR, l'irradiation lymphoïde totale, l'imatinib, l'interleukine-2, les inhibiteurs de JAK2.

II. Partie 2 : Immunobiologie de la cGVHD

La cGVHD demeure une complication fréquente et représente la principale cause de morbidité et mortalité après allogreffe de CSH. Malgré les nombreuses études expérimentales et translationnelles réalisées (revues dans Cooke *et al* (21)), des travaux demeurent nécessaires pour mieux comprendre l'immunopathologie de la cGVHD indispensables au développement de prophylaxies ou de thérapeutiques efficaces.

Le système immunitaire est au cœur des complications post-allogreffe puisqu'il est l'acteur principal de la cGVHD, de l'effet GVL, et de la survenue d'infections lorsqu'il est défaillant. Cependant l'analyse du système immunitaire dans la physiopathologie de la cGVHD est rendue complexe par la multitude d'acteurs potentiellement incriminés. L'analyse des facteurs de risque de cGVHD suggère cependant l'implication de plusieurs composantes essentielles : le rôle du HLA et des mécanismes de reconnaissance directe et indirecte (donneurs non apparentés et incompatibilité HLA), le rôle des antigènes (Ag) mineurs du HLA comme le complexe antigénique H-Y (donneur féminin pour un receveur masculin), le rôle des lymphocytes T (utilisation de CSP *versus* moelle osseuse, et absence d'utilisation de SAL), et le rôle des mécanismes de tolérance et de senescence (âge avancé du donneur et du receveur).

Bien que les composantes de l'immunité innée soient aussi impliquées, nous nous en tiendrons à l'exposé des connaissances sur la composante adaptative du système immunitaire au cours de la physiopathologie de la cGVHD.

A. Implication des Lymphocytes T au cours de la GVH chronique

1. Support de l'alloréactivité lymphocytaire T : le CMH et les Antigènes

Les premières preuves de l'implication des LT au cours de la cGVHD remontent au début des années 1980 par le groupe de Thomas ED *and coll.* Des donneurs familiaux étaient choisis sur la base de la compatibilité HLA-A et -B et l'absence de réactivité de leurs lymphocytes au cours d'une réaction lymphocytaire mixte ou MLR. La réactivité des lymphocytes était ensuite réévaluée à distance de la greffe en présence de lymphocytes du receveur. Les patients ayant développé une cGVHD présentaient une réactivité augmentée comparativement au groupe de patients sans cGVHD (64% *versus* 8%)(22). Ainsi la cGVHD serait la conséquence d'une « intolérance immunitaire » avec la survie de clones alloréactifs spécifiques des Ag du receveur.

De plus, le développement de la cGVHD est associé chez la souris à l'expansion de clones CD4+T qui sont à la fois réactifs envers des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II exprimées par le donneur ou le receveur (reconnaissance allogénique directe ou indirecte) (23).

La survenue de cGVHD après allogreffe de CSH à partir de donneurs HLA compatibles apparentés ou non apparentés suggère l'implication d'Ag dits « mineurs » ou mHAs (minor Histocompatibility Antigens) mais immunogéniques, et génétiquement différents ou polymorphiques entre les couples donneur-receveur. Plus d'une vingtaine de mHAs ont été décrits et étudiés principalement dans le domaine de la GVH aiguë et de l'effet GVL (24). Cependant, dans le contexte d'allogreffe en situation d'incompatibilité sexuelle impliquant le mHA DBY, Zorn *et al* ont montré l'expansion de LT CD4+ réactifs envers DBY et capables de coordonner une réponse B (25).

2. Place de la T-déplétion dans la prévention de la cGVHD

La mise en évidence d'une réponse T allogénique responsable de la cGVHD à la fois chez l'homme et la souris, a conduit à des stratégies de T-déplétion dans le but de réduire l'incidence de cGVHD. Plusieurs stratégies ont été utilisées : des méthodes de T-déplétion *ex vivo* utilisant des Ac ciblant le CD2, CD5, CD7, CD4, CD8 (26), ciblant le CD6 (16), ciblant

le TCR $\alpha\beta$ ou utilisant l'élutriation (27, 28), et ciblant le CD52 ; d'autres méthodes reposent sur une T-déplétion *in vivo* en utilisant du sérum anti-lymphocytaire de lapin immunisés à partir de thymocytes humains (Thymoglobulines, Genzyme) (29, 30) ou immunisés à partir de lignées lymphoblastoïdes Jurkat (ATG Fresenius, Neovii)(10, 11, 31). Les méthodes de T-déplétion *in vivo* ont globalement donné de meilleurs résultats en terme de réduction d'incidence de cGVHD. L'administration post-greffe de Cyclophosphamide, mentionnée plus haut, représente une autre modalité efficace de T-déplétion *in vivo*.

3. Défaut des mécanismes de tolérance au cours de la cGVHD

a) Tolérance centrale

Le thymus est un organe clé de la lymphopoïèse T, puisque les LT y subissent les sélections positive et négative, permettant de limiter la circulation de clones T autoréactifs. Des études réalisées chez la souris ont montré une association entre la dysfonction thymique (conséquence du conditionnement ou de la GVH aiguë) et le défaut de délétion des clones autoréactifs conduisant au développement d'une cGVHD (32-34).

Bien qu'il ne soit pas possible d'évaluer le défaut de sélection négative *in vivo* chez l'homme, il est actuellement possible de mesurer la fonction thymique par l'analyse des LT naïfs qui viennent de sortir du thymus selon la méthode dite des TRECs (T-cell Receptor Excision Circle)(35). Plusieurs études ont montré une association entre la survenue d'une cGVHD et défaut de fonction thymique (36, 37). Les études longitudinales ont pu mettre en évidence l'impact de la GVH aiguë sur la fonction thymique (38). Ainsi, les lésions thymiques engendrées par la GVH aiguë rendrait compte du défaut de fonction thymique responsable de l'émergence de clones autoréactifs. Par ailleurs, les LT régulateurs naturels (nTreg) sont produits par le thymus, et leur défaut de production a un impact sur les mécanismes de tolérance périphérique.

b) Tolérance périphérique

Les LT CD4⁺ régulateurs (ou Treg) sont des acteurs clés de la tolérance périphérique. Ils inhibent le prolifération des LT effecteurs activés par des mécanismes contact-dépendant (CTLA-4, LAG-3, CD39) ou -indépendant (IL-10, TGF β , IL-35, granzymes, perforines,IDO)

(39). Le rôle des Treg dans le contrôle de l'alloréactivité a été étudié dans des modèles murins de cGVHD. Ceux-ci ont montré comment l'impact de la GVH aigüe sur les cellules présentatrices d'antigène pouvait induire un défaut d'homéostasie des Treg (40), un défaut de contrôle des réponses Th1 et Th17 au cours de la cGVHD (41), et l'amélioration de la cGVHD en cas d'administration de Treg activés fonctionnels (CD103+) (42).

L'analyse des Treg après allogreffe de CSH a rapporté des résultats variables quant à leur implication dans la cGVHD. En effet, certains groupes ont retrouvé une association entre cGVHD et des valeurs de Treg augmentées (43) et d'autres des valeurs de Treg diminuées (44-46). Cependant, les études longitudinales réalisées chez les patients retrouvent une association entre défaut de reconstitution des Treg et développement de cGVHD. Ce défaut numérique est la conséquence d'anomalies des voies de l'apoptose intrinsèque (BCL-2, Bim, BCL-XL) et extrinsèque (système Fas/Fas-L)(45, 47). Par ailleurs, l'analyse des Treg au niveau des tissus de patients avec une cGVHD révèle soit un défaut quantitatif (48, 49), soit une augmentation relative (*versus* effecteurs) comparativement aux tissus non lésionnels, associé à l'expression de CXCR3+ et T-bet (50).

Le déficit relatif en Treg a conduit à développer des stratégies facilitant l'expansion des Treg ou la déplétion relative des T effecteurs. En effet, une expansion de Treg a été observé chez des patients recevant une prophylaxie par sirolimus (51) ou vorinostat (Histone Désacetylase) (52). Le traitement curatif de la cGVHD par IL-2 (53, 54) ou l'administration de Treg purifiés (55) a fait aussi l'objet d'essais cliniques.

4. Caractérisation de la réponse lymphocytaire T au cours de la cGVHD

Nous avons vu précédemment le rôle des LT effecteurs et du défaut de tolérance au cours de la cGVHD. La caractérisation des acteurs lymphocytaires T au cours de la cGVHD est rendue difficile par leur diversité et le matériel biologique utilisé : sang *versus* tissu. Pendant de nombreuses années, un dogme prédominait : « implication des Th1 dans la GVH aigüe, des Th2 dans la GVH chronique ». Ceci a été débattu au grès des modèles murins, de la découverte de nouveaux effecteurs, et de l'amélioration des connaissances en immunologie rendant ces conclusions « simplistes » moins fréquentes.

La caractérisation des acteurs peut être réalisée selon plusieurs approches :

- Caractérisation exhaustive et systématique de tous les profils lymphocytaires T existants (Th1, Th2, Th17, Th9, Th22...Tc1, Tc2...);
- Approche protéomique visant à caractériser des médiateurs (chimiokines, cytokines, facteurs de croissance ...) impliqués dans diverses voies physiopathologiques ;
- Approche « lésionnelle » consistant à caractériser le type de liaison pathologique observée au cours d'un processus immunologique et interroger les réseaux d'acteurs qui y sont impliqués : inflammation et inflammasome, fibrose, réparation, ...

L'analyse détaillée des LT dans le sang des patients après allogreffe de CSH permet d'individualiser plusieurs compartiments selon l'expression de CD45RA et CCR7 (ou CD62L) : T naïfs (TN : CD45RA+CCR7+), centraux mémoires (CM : CD45RA-CCR7+), effecteurs mémoires (EM : CD45RA-CCR7-) et effecteurs RA+ ou tardifs (TEMRA : CD45RA+CCR7-). Les patients développant une cGVHD présentent une augmentation relative des CD4+ EM dès 3 mois post allogreffe (44, 56), ayant une capacité supérieure à produire des cytokines. Concernant les LT CD8+, les données peuvent varier selon la méthodologie. D'Asaro *et al* ont observé une augmentation des CD8+ TEMRA chez les patients présentant une cGVHD (57), alors que Alho *et al* ont observé chez les patients développant une cGVHD une augmentation des CD8+ TN et TCM (44).

Concernant la polarisation de la réponse effectrice au cours de la cGVHD, plusieurs études s'accordent sur la conjonction d'une réponse mixte Th1 – Th17. L'analyse de l'infiltrat cellulaire au niveau des lésions orales de cGVHD a révélé la présence de CD8+ et CD4+ exprimant T-bet, facteur de transcription impliqué dans la réponse Th1/Tc1 (58). La présence d'un tel infiltrat est en rapport avec l'expression de CXCR3 (58), récepteur permettant la migration vers les zones inflammatoires, en réponse à la chimiokine CXCL9 retrouvée augmentée dans le plasma des patients ayant une cGVHD (59).

Dander *et al* ont observé une augmentation des Th17 dans le sang des patients ayant une cGVHD, dont certains co-expriment l'IFN- γ (60). Ces patients présentent un infiltrat cellulaire Th17 au niveau des zones lésionnelles, inversement proportionnel à la présence de Treg (49).

Plus récemment, la confrontation des infiltrats cellulaires observés au sein des biopsies cutanées de GVH aiguë, cGVHD lichénoïde ou sclérodermiforme a révélé la présence d'un infiltrat avec une polarisation mixte Th1-Th17 au cours de la cGVHD lichénoïde (expression d' IFN- γ , d'IL-17, IL-12/IL-23, CXCL9, CXCL10, IL23) (61).

B. Implication des Lymphocytes B au cours de la GVH chronique

1. Perturbations homéostatiques post-greffe

La reconstitution des LB après allogreffe de CSH est un processus dynamique et régulé qui repose sur la délétion de clones B auto-réactifs et la génération de LB matures capables de reconnaître un large répertoire antigénique conférant ainsi une protection contre les agents pathogènes infectieux (62). Ce processus repose sur deux éléments clés : le taux de BAFF (B cell activating factor) et le récepteur des LB ou BCR (B cell receptor).

Dans les suites d'une allogreffe de CSH, le taux de BAFF est augmenté de façon contemporaine à la lymphopénie B observée, et diminue à la faveur de la récupération lymphocytaire B (63). BAFF est un facteur de croissance pour les LB qui régule l'homéostasie des LB à la fois chez l'homme et la souris (64, 65) et dont le taux est retrouvé augmenté dans de nombreuses maladies auto-immunes (66, 67). Ainsi, le contexte post-allogreffe de récupération lymphocytaire B favorise la survie de clones B activés, auto- ou allo-réactifs qui auraient subi une sélection négative par délétion en l'absence d'activation du BCR et de l'engagement de BAFF-R de façon concomitante (68, 69). Sarantopoulos *et al* ont observé chez les patients développant une cGVHD des niveaux importants de BAFF associés à une lymphopénie B, corrélant avec l'activité de la maladie (70, 71). De façon parallèle, la survenue d'une cGVHD a un impact sur la lymphopoïèse B (mesurée au travers des KRECs) participant probablement à la restriction du répertoire B (72). De plus, BAFF protège les LB de l'apoptose et intervient dans la différenciation des LB mémoires en cellules sécrétant des anticorps (73). Allen *et al* ont montré que les LB naïfs de patients avec une cGVHD présentaient une résistance à l'apoptose en présence de BAFF comparativement à ceux provenant de patients sans cGVHD (74). Enfin, les LB de patients cGVHD présentent une capacité de production d'IgG augmentée en présence de BAFF (70).

2. Les LB, cellules productrices d'anticorps, au cours de la cGVHD

Les patients développant une cGVHD présentent fréquemment des anticorps (Ac) dirigés contre des allo-Ag ou contre des Ag non-polymorphiques (auto-Ag). De façon variable, ont été décrits : des Ac anti-noyaux, anti-muscle lisse, anti-mitochondries, anti-ADN, anti-Sm, ANCA (75, 76), ainsi que des Ac anti-PDGFR activateurs (77).

De façon intéressante, la découverte d'allo-anticorps chez des patients développant une cGVHD reflète le processus d'alloréactivité témoin de la reconnaissance par les LB du

donneur d'antigènes inconnus mais présent chez le receveur. C'est le cas de la greffe en situation d'incompatibilité sexuelle (ou sex-mismatch) où un receveur de sexe masculin reçoit un greffon de donneur féminin. En effet, les patients greffés dans ce contexte développent fréquemment des Ac dirigés contre le complexe H-Y (complexe antigénique mineur sexuel masculin) (78), et leur détection dès 3 mois post-greffe prédit la survenue d'une cGVHD (79).

3. Activation et différenciation des LB au cours de la cGVHD

L'analyse phénotypique des LB permet d'évaluer leur profil d'activation et leur capacité à se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps. Différents panels ont été utilisés pour décrire les sous-populations lymphocytaires B : IgD, IgM, CD27, CD38, CD24, CD21. De façon similaire aux maladies auto-immunes (80, 81), plusieurs rapports s'entendent sur l'association entre le développement d'une cGVHD et l'augmentation du pool de LB ayant rencontré l'Ag et donc exprimant le CD27+, au profit de 2 sous-populations : les « pre-GC » (IgD+CD38^{hi}CD27+) et les plasmablastes (IgD-CD38^{hi}CD27+)(70). Les observations concernant les LB de type « transitionnel » varient : augmenté en cas de cGVHD pour Sarantopoulos *et al* (70), et diminué pour Kuzmina *et al* (82). Ces différences témoignent probablement de définitions de LB transitionnels différentes (IgD+CD38^{hi}CD27- et IgD+CD21^{low}CD38^{hi}, respectivement) et intéressant majoritairement des patients ayant développé un syndrome de bronchiolite oblitérante pour la deuxième équipe.

Ces observations témoignent d'un profil activé des LB au cours de la cGVHD. C'est pourquoi Allen *et al* ont tenté de caractériser l'activation LB chez les patients après allogreffe de CSH. Ainsi, ils ont observé une augmentation de la taille et du contenu cellulaire protéique en réponse à l'excès de BAFF, et une augmentation de la phosphorylation de ERK et AKT dans les LB de patients avec une cGVHD (74). De plus, ce profil activé est souligné par la capacité augmentée des LB de cGVHD à répondre à une activation BCR (par anti-IgM), se traduisant par un excès de phosphorylation de Syk et de BLNK (B cell linker protein)(83). La contribution du signal au travers du BCR est aussi suggéré par l'augmentation de la phosphorylation de la Bruton tyrosine kinase (Btk) dans les LB de patients avec cGVHD (84).

Enfin, ces perturbations homéostatiques lymphocytaires B suggèrent une capacité augmentée à sécréter des IgG au cours de la cGVHD. En effet, les LB mémoires de patients avec cGVHD active secrètent spontanément des IgG contrairement aux patients sans maladie active (70). Cette fonction sécrétrice d'anticorps est en grande partie assurée par les plasmablastes et plasmocytes. La survie de ces cellules dépend notamment de facteurs tels

BAFF ou APRIL (A Proliferation Inducing Ligand) appartenant à la superfamille des ligands du TNF et partageant avec BAFF deux récepteurs (BCMA et TACI). APRIL joue un rôle important dans la différenciation terminale des LB, dans le switch de classe et dans la survie des plasmocytes (85). Une étude récente a rapporté une augmentation significative d'APRIL au cours de la cGVHD active (*versus* absence de cGVHD), corrélant positivement avec la fréquence de plasmablastes circulants. Le taux d'APRIL était par ailleurs associé au taux d'Ac anti-noyaux, et à un score NIH sévère (86).

4. Défaut de tolérance

Enfin, l'implication des LB au cours de la cGVHD ne se limite pas à leur rôle « effecteur » dans la physiopathologie. En effet, une population de LB dits « régulateurs » (Breg) est décrite et joue un rôle de suppression sur les lymphocytes T effecteurs via la sécrétion d'IL-10 (87). Par analogie avec les maladies auto-immunes, cette population a fait l'objet d'études dans le contexte de cGVHD, retrouvant un déficit de Breg associé avec l'activité et la sévérité de la cGVHD (88, 89) traduisant ainsi un défaut de tolérance périphérique. De plus, leur enrichissement dans les greffons de sang placentaire expliquerait la moindre incidence de cGVHD dans ce type de greffe (90).

5. Implication des LB dans les modèles expérimentaux

En parallèle, les données expérimentales provenant des modèles murins ont permis de montrer le rôle des LB dans l'induction d'un phénotype de cGVHD avec manifestations auto-immunes (DBA/2 -> BALB/c) (91), par leur rôle de cellules présentatrices d'Ag favorisant l'expansion clonale des LT CD4+ (92). De façon complémentaire, l'équipe de Blazar and coll. a montré dans un autre modèle (C57Bl/6 -> B10.BR) que les LB infiltraient les organes cibles et que le dépôt des Ac produits par les LB du donneur étaient nécessaires au développement de la cGVHD (93). Dans un modèle de type parent (DBA/2) dans F1 (DBA/2 x C57Bl/6), il semblerait que le répertoire auto-réactif des LB ne soit pas différent de souris normales, mais les clones B auto-réactifs activés au cours de la cGVHD auraient subi une commutation isotypique (production d'IgG) (94).

6. Stratégies thérapeutiques ciblant les LB

Ces données d'immunopathologie sur le rôle des LB dans la cGVHD ont conduit au développement de plusieurs thérapeutiques visant à dépléter une population, à entraver son activation ou bloquer des mécanismes de signalisation ou d'expansion.

Plusieurs études ont évalué l'efficacité d'une déplétion des LB par un anticorps monoclonal, le rituximab, ciblant le CD20, marqueur des LB matures. L'utilisation du rituximab, pour le traitement des cGVHD réfractaires aux corticoïdes, a permis d'obtenir un taux de réponse globale d'environ 60-70%, permettant dans de nombreux cas de réduire des corticoïdes (95, 96). Plus récemment, l'utilisation du rituximab en prophylaxie a montré une réduction de l'incidence de cGVHD dans un essai de phase 2 (97).

D'autres thérapeutiques permettent de cibler certains sous-types de LB comme les plasmocytes, sécrétant des Ac. Le bortezomib est un inhibiteur du protéasome utilisé dans le myélome, ciblant ainsi les plasmocytes tumoraux avec de bons résultats. Les études du bortezomib en prévention (98-100) ou en traitement (101) de la cGVHD ont aussi apporté des résultats intéressants, à évaluer ultérieurement dans des essais de phase 3.

Des traitements plus récents ciblant la signalisation en aval du BCR via l'inhibition de Btk (84) ou l'inhibition de Syk (102) ont donné de bons résultats dans les modèles murins, et sont actuellement en cours d'évaluation clinique.

III. Partie 3 : Activation Lymphocytaire B

Dans la deuxième partie, nous avons exposé le rôle des LB au cours de la cGVHD. Les données expérimentales et les données cliniques humaines suggèrent l'activation pathologique de clones auto- ou allo-réactifs dans le développement de la cGVHD. Après un rappel d'ontogénie des LB, nous exposerons les voies d'activation du LB.

A. Ontogénie des Lymphocytes B : génération du répertoire B

L'ontogénie des LB débute au niveau de la moelle osseuse, chez l'homme, où les progéniteurs lymphoïdes communs vont connaître une succession d'étapes de différenciation (pré-pro-B, pro-B, pré-B, LB) sous l'influence de divers facteurs solubles (IL-7, Stem Cell Factor, SDF-1, TSLP, FLT3-L) et de facteurs de transcription (E2A, EBF et Pax5) (103). Au cours de ces étapes, vont avoir lieu les recombinaisons des gènes des immunoglobulines (VDJ pour IgH, puis VJ pour Ig κ et Ig λ) sous l'influence des enzymes RAG1/2 aboutissant à l'expression clonale d'une immunoglobuline de surface (slg) conférant une spécificité de reconnaissance de l'antigène. Cette slg est associée aux molécules Ig α (CD79a) et Ig β (CD79b) constituant le complexe du récepteur des cellules B ou BCR (B cell receptor) assurant la reconnaissance de l'antigène et la transduction du signal. Ces étapes donnent naissance à des LB immatures qui passent dans la circulation sanguine avant de coloniser les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate, MALT – Mucosa-Associated Lymphoid Tissue...) où les LB subissent une maturation fonctionnelle et l'on distingue 3 entités principales : les LB folliculaires, les LB de la zone marginale et les LB de type B1 localisés dans les séreuses.

B. Activation des Lymphocytes B

1. Généralités

Le processus d'activation du LB repose sur une première étape de reconnaissance de l'Ag par le BCR. Ce dernier est capable de reconnaître des antigènes de différentes natures : protéiques, lipidique, saccharidiques. Ces Ag peuvent être reconnus sous une forme soluble, ou accrochés à une cellule présentatrice d'Ag (DC, FDC).

L'activation complète du LB est facilitée par le pontage de plusieurs complexes BCR avec l'antigène aboutissant à l'activation des molécules CD79a et CD79b par la phosphorylation de leur portion intra-cytoplasmique sur des résidus ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) par des kinases de la famille Src (Lyn). Ceci induit le recrutement et l'assemblage de molécules de signalisation intracellulaire : Syk, Phospholipase-C γ 2 (PLC γ 2), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), tyrosine kinase Bruton (Btk), Vav, avec des molécules adaptatrices comme Blnk (B cell linker). Cette étape d'activation aboutit à l'expression de gènes de maturation fonctionnelle, et l'internalisation de l'Ag, son processing pour aboutir à la présentation *via* le CMH autorisant les LB à recevoir l'aide des LT CD4+ pour faciliter leur activation complète (104).

D'autres signaux membranaires en rapport avec l'environnement cellulaire du LB (cytokines, complément, molécules d'adhérence) permettent de contrôler la signalisation du BCR vers la survie, l'apoptose ou la différenciation. En effet, l'opsonisation du pathogène par des fragments du complément (C3d) peut être reconnue par un récepteur à la surface des LB (CD21 ou Complement Receptor 2) entraînant l'activation *via* le CD19 en même temps que la reconnaissance par le BCR potentialisant ainsi le signal. D'autres molécules peuvent induire un rétrocontrôle négatif sur l'activation du LB, c'est le cas du récepteur au fragment Fc des immunoglobulines Fc γ RIIB (CD32B).

Les LB sont essentiellement folliculaires (80%), le reste se répartissant entre la zone marginale, les séreuses, la moelle osseuse et le sang. Selon leur localisation, les LB activés peuvent soit produire rapidement des Ac de faible affinité, ou **activation thymo-indépendante**, soit ils peuvent entrer dans le centre germinatif pour subir l'hypermutation somatique (SHM) aboutissant à la production d'Ac de haute affinité. Cette dernière est appelée **activation thymo-dépendante**.

2. Activation thymo-indépendante

L'activation thymo-indépendante concerne principalement deux sous-populations de LB appelés LB type B1 et LB de la zone marginale (MZB). Les B1 et MZB peuvent être considérés comme des « innate-like » lymphocytes permettant d'assurer une réponse humorale rapide de faible affinité le temps de la mise en place de la réponse adaptative (105). Ils sont caractérisés par leur densité importante en Toll like receptors (TLRs) et l'expression de BCR polyréactifs. Ils sont activés par les **antigènes thymo-indépendants (TI)** qui sont classés en deux types : les TI-1 (LPS) stimulant les LB spécifiques d'un Ag ou non spécifiques de l'Ag en cas de haute concentration par fixation au BCR et TLRs ; les TI-2 sont des polysaccharides multivalents ou autres structures avec une répétition de motifs induisant une réponse spécifique en crosslinkant plusieurs molécules de BCR (106).

Les B1 sont localisés dans la cavité péritonéale et dans une moindre mesure dans la rate. On distingue les B1a (CD5+) et les B1b (CD5-). Ils reconnaissent des Ag glycolipidiques induisant une réponse mémoire IgM+ persistant dans la cavité péritonéale. En cas de re-challenge, un signal TLR complémentaire sera nécessaire pour une différenciation en plasmocyte, le LB mémoire IgM+ migre alors dans la rate (107). Ces B1 ont aussi été décrits chez l'homme, caractérisés par le phénotype CD20+CD27+CD43+CD70-, chez qui ils peuvent stimuler les LT et jouerait un rôle dans la physiopathologie du lupus (108).

Chez l'homme, la zone marginale splénique se situe entre la pulpe blanche et la circulation, et contient les MZB, des macrophages et des polynucléaires neutrophiles. Cette localisation stratégique permet de surveiller les Ag circulants. Les MZB peuvent aussi être détectés au niveau des ganglions (paroi interne du sinus sous-capsulaire), de l'épithélium des amygdales, des MALT et du sang. Les macrophages et polynucléaires peuvent capter les Ag par leur PRR (Pattern Recognition Receptor) pour les présenter aux LB et les activer. L'activation des LB induit leur différenciation en plasmablastes et la sécrétion d'Ac de façon T-dépendante ou T-indépendante. Au delà de la production d'IgM, les MZB peuvent produire des IgG et IgA après commutation isotypique, et peuvent aussi subir l'hypermutation somatique (105).

3. Voie thymo-dépendante : Réaction du centre germinatif (rCG)

Les LB proliférant après activation par l'Ag vont suivre l'un des 3 destins suivants (107):

- Différenciation en plasmocytes extra-folliculaire à courte durée de vie
- Différenciation en LB mémoire CG-indépendante
- Différenciation en LB mémoire CG-dépendante

Le choix entre ces destins dépend de : la localisation du LB et des signaux de migration reçus, de l'affinité du BCR pour l'Ag, de la quantité de BCR engagée et de la quantité de signaux de co-stimulation reçue de la part des LT (109).

Le CG est associé à la réponse humorale T-dépendante. Il représente la zone principale où sont produits les plasmocytes produisant des Ac de haute affinité et les cellules B mémoires. Il est constitué de 3 acteurs cellulaires principaux : les LB du centre germinatif (ou GCB), les lymphocytes T folliculaires helper (ou TFH) et les cellules dendritiques folliculaires (ou FDC).

a) Acteurs

Les cellules dendritiques folliculaires (FDCs)

Population cellulaire essentielle à la formation d'un centre germinatif, les FDC se situent dans la zone folliculaire B des organes lymphoïdes secondaires. Grâce à leur structure réticulaire, l'expression de récepteurs du complément (CR1 ou CR2), de TLRs et de récepteurs au fragment Fc, les FDC peuvent retenir les Ag. Elles supportent la réaction du centre germinatif (rCG) à travers différentes fonctions (110) : maintien de l'organisation folliculaire et recrutement des acteurs de rCG par la production de CXCL13, l'expression de molécules d'adhésion (CR1, CR2, ICAM1, VCAM1), de molécules de survie (IL-6 et BAFF) et suppression de cellules apoptotiques (*via* Mfge8).

Les lymphocytes T folliculaires helper (TFH)

Ils représentent une population de LT CD4+ auxiliaires spécialisés dans l'aide des LB en leur apportant les signaux nécessaires à leur prolifération et leur différenciation en cellules sécrétant des Ac de haute affinité. Un chapitre exposant leur phénotype, fonction et programme moléculaire leur est attribué ci-dessous.

b) Organisation anatomique

Quelques jours après le début de la réponse immune, les LB activés vont s'implanter au niveau des follicules B où ils prolifèrent au sein de FDCs qui représentent un réseau de cellules stromales avec de grandes capacités de capture antigénique (109, 111).

Alors que le CG mature, deux zones se forment : la zone claire et la zone sombre. Quel que soit l'organe lymphoïde, la zone claire est orientée vers la zone de contact antigénique (muqueuse intestinale, sinus marginal, ...). La zone claire est occupée par les extensions des FDCs et par les GCB appelés centrocytes. Au niveau de la zone sombre, les FDCs sont plus rares, et les GCB, denses, sont appelés centroblastes. Les LT constituent 5-20% du CG et se concentrent au niveau de la zone claire.

c) La réaction du Centre Germinatif : un processus dynamique

Les données dynamiques de rCG proviennent essentiellement des modèles murins expérimentaux de vaccination permettant de suivre les conséquences de l'immunisation au niveau des organes lymphoïdes.

A l'état basal, en dehors de toute infection, les organes lymphoïdes secondaires, tels la rate et les ganglions, contiennent des follicules principalement constitués de LB naïfs. Environ une semaine après l'exposition à l'antigène, les CG se développent au milieu de ces zones folliculaires B, repoussant à la périphérie des B naïfs constituant la zone dite du manteau.

Suite à une vaccination, il a été montré que l'affinité moyenne des Ac pour l'Ag étranger augmentait au cours du temps. Ce processus, nommé maturation d'affinité, est due aux mutations survenant dans la région variable des gènes des Ig. Les plasmocytes (PC) de courte durée de vie comportent peu de mutations, comparativement aux PC de longue durée de vie suggérant des mécanismes d'hypermutation dans les LB du CG, transmis de façon clonale. Ce processus de maturation d'affinité survient dans le CG, au cours des processus de prolifération clonale, SHM et de sélection.

Au cours de la progression de la réponse immune, les centres extra-folliculaires de PC diminuent, alors que les PC à longue durée de vie et les B mémoires apparaissent.

La chronologie des évènements survenant au cours de la rCG a été modélisée de la façon suivante (112):

- **Rencontre antigénique** (Jour(J) 0 – J1 après immunisation) : l'Ag arrive au niveau des organes lymphoïdes secondaires, par le sang ou les vaisseaux lymphatiques ou par des cellules dendritiques conventionnelles (cDC). Les LB dont le BCR se lie à l'Ag, up-régulent CCR7 et migrent vers la zone T en réponse à un gradient CCL-19, CCL-21. Les LT CD4+ qui reconnaissent l'Ag présenté par les cDC *via* le CMH de classe II, et certains exprimant CXCR5 migrent vers la bordure T-B.
- **Phase de la bordure T-B** (J2 – J4) : Les TFH et LB activés par l'Ag se rencontrent à la bordure T-B. Les LB activés ont internalisés l'Ag et l'ont apprêté au niveau de molécules de CMH II qu'ils expriment à leur surface. Les interactions entre le TFH et le LB spécifiques de l'Ag favorisent la prolifération et la différenciation du LB. A ce stade, les interactions sont compétitives du fait du surnombre de GCB *versus* TFH privilégiant les GCB interagissant avec la plus grande affinité. La protéine SAP (signalling lymphocyte activation molecule associated-protein) joue à ce niveau un rôle majeur. Trois voies sont alors possibles : (1) les GCB migrent vers le centre du follicule pour initier un CG ; (2) des plasmablastes / plasmocytes migrent en dehors du follicule et débute une production précoce d'Ac ; (3) des LB mémoires sont générés suite à une interaction avec les TFH de courte durée. Les interactions avec les LB permettent l'établissement du programme complet de TFH (CXCR5^{hi}PD1^{hi} BCL-6+) et ceux-ci migrent vers le follicule B. Les LB débutent la commutation isotypique.
- **Centre germinatif précoce** (J5 – J7) : les GCB migrent au centre du follicule où elles prolifèrent intensément et débutent l'hypermutation somatique (SHM) sous la dépendance d'AID (Activation Induced Deaminase). Ceci se fait au sein d'un réseau de FDCs qui retiennent des complexes immuns contenant l'Ag immunisant.
- **Centre germinatif mature** (J8 – J21) : le CG se divise en zone claire et zone sombre, et contient des TFH en plus grand nombre ainsi que des « Tingible body Macrophages (TBM) qui englobent les GCB mourantes. Débute alors une migration cyclique des GCB entre la zone claire et la zone sombre.
- **Dissolution du CG** (à partir de J21) : les CG se désolidarisent, les LB sont moins nombreux, à l'inverse des TBM.

La dynamique de migration des GCB au sein du centre germinatif est hautement régulé par des couples chimiokines – récepteurs (109). Les centrocytes expriment fortement CXCR4 leur permettant de migrer vers la zone sombre en réponse à SDF-1 (CCL-21) produit par les

cellules stromales de la zone sombre. Inversement, CXCL13 est plus abondant au niveau de la zone claire, où il s'accumule au niveau des expansions des FDCs, permettant l'accumulation des GCB au niveau de la zone claire par leur expression de CXCR5.

Ainsi, des centrocytes peuvent retourner dans la zone sombre pour compléter un autre tour de mutation et de sélection.

Le processus de sélection se fait principalement dans la zone claire où se situe un intense réseau de FDCs et de TFH. Les FDCs captant des Ag et complexes immuns peuvent tester l'affinité des clones B ayant subi la maturation d'affinité (SHM et CSR). D'autres part les clones B présentant les interactions avec les TFH de plus haute affinité recevront des signaux de survie. Tous les autres clones B débuteront un processus d'apoptose et seront nettoyés par les TBM (109, 111).

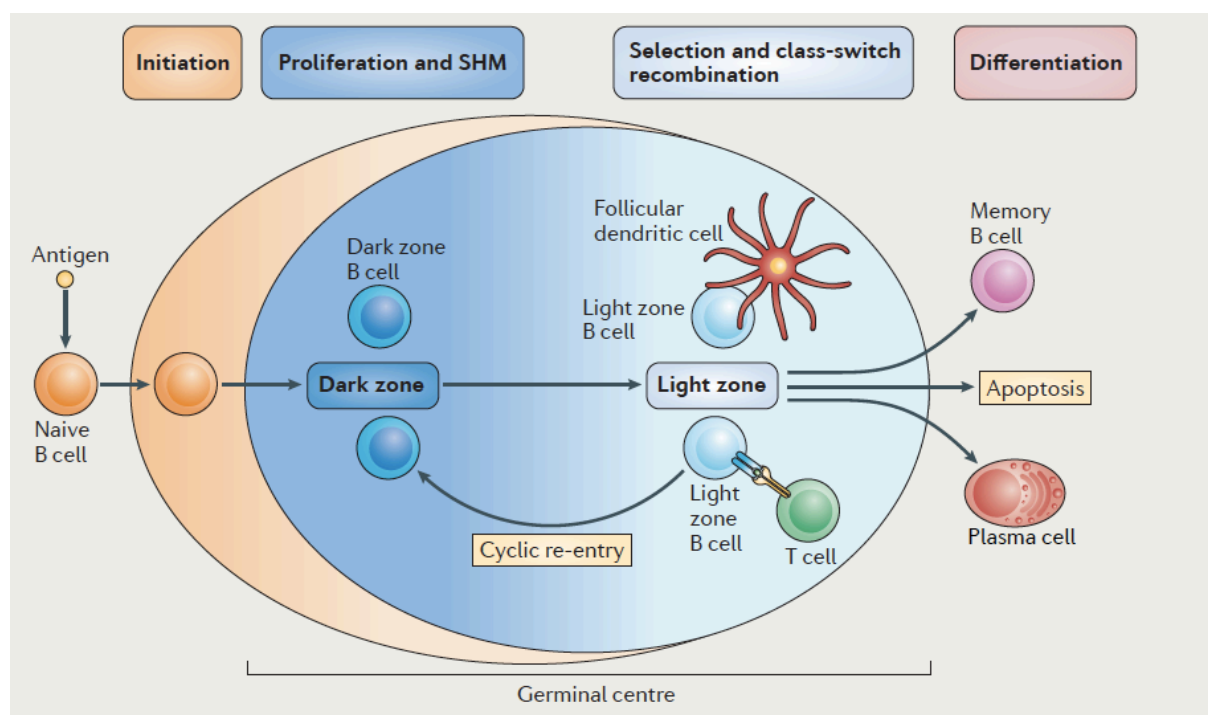


Figure 1 : Réaction du centre germinatif (*in* Basso K and Dalla-Favera R, Nat Rev Immunol 2015)

IV. Partie 4 : Implication des Th17 et des TFH dans la réponse T effectrice

A. Polarisation du LT naïf

Pendant de nombreuses années, le paradigme de la réponse Th1/Th2 prévalait (113), jusqu'à la découverte d'autres populations de LT CD4+ auxiliaires, parmi lesquelles l'on décrit : les Th17, Th22, Th9, Tfh et les Treg (114, 115).

Les LT CD4+ naïfs émergent du thymus après avoir subi la sélection positive (vérification de la reconnaissance du CMH de classe II avec une faible affinité) puis la sélection négative (vérification de l'absence de forte affinité pour les peptides du soi = élimination de clones auto-réactifs), et circulent dans le sang périphérique. Leur destin est soumis à l'éventuelle reconnaissance d'un antigène peptidique « dangereux » (selon la théorie du danger de Polly Matzinger (116)) présenté par une cellule dendritique (DC, pour Dendritic Cell). L'activation et la différenciation du LT naïf (ou Th0) dépendent de 3 signaux (**Figure 2**) :

- **Signal 1** : Trans-activation LT:DC selon la complémentarité TCR(CDR3) : CMH-II + peptide ;
- **Signal 2** : Engagement de molécules de co-stimulation ;
- **Signal 3** : Environnement cytokinique.

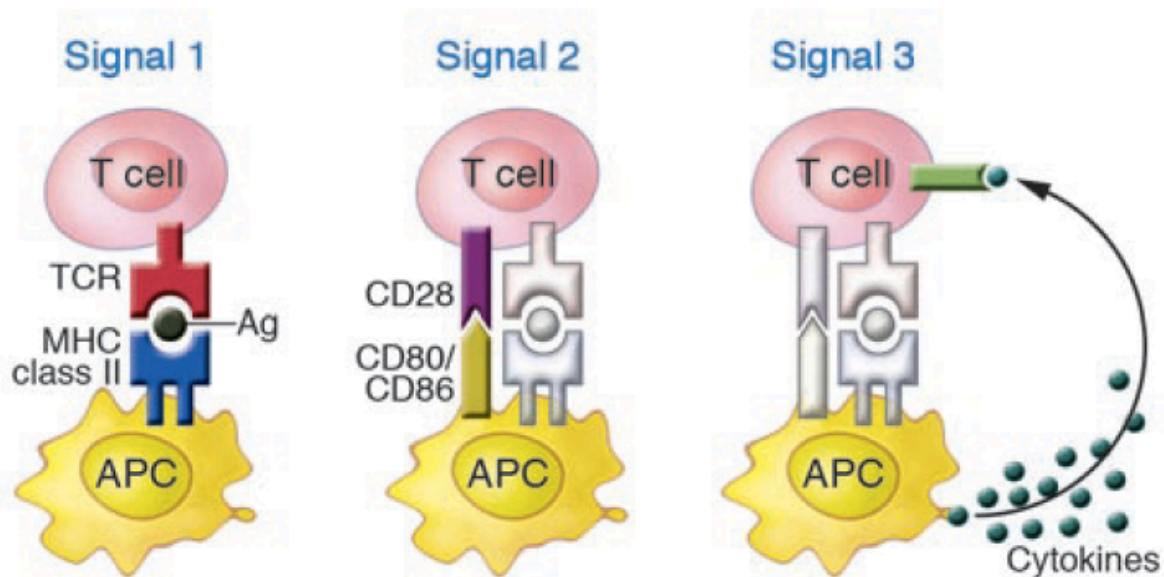


Figure 2 : Signaux d'activation du LT (*In* Gutcher I and Becher B, J Clin Invest 2007)

Ces étapes jouent un rôle majeur dans la différenciation et la polarisation de la réponse T auxiliaires puisque l'intensité du signal TCR, les molécules de co-stimulation mises en jeu, la prédominance d'une cytokine ou d'une combinaison de cytokines auront un impact direct sur le type de LT auxiliaire engendré.

B. Les différents LT auxiliaires

Chaque type de LT auxiliaire (ou helper) peut-être défini par l'environnement cytokinique favorable à sa différenciation, le(s) facteur(s) de transcription clé(s) mis en jeu, les cytokines produites, et les molécules exprimées.

Ainsi, plusieurs types de LT helpers peuvent être définis :

- **Th1** : Ils sont induits par l'IL-12, expriment T-bet (gène *Tbx21*), produisent de l'IFN- γ , et contrôlent les pathogènes intracellulaires ;
- **Th2** : Ils sont induits par l'IL-4, expriment GATA3 (gène *Gata3*), produisent de l'IL-4, IL-5 et IL-13, et participent à l'éradication des parasites extracellulaires (helminthes) ;
- **Th17** : Ils sont induits par l'IL-23, l'IL-6 et le TGF- β , expriment ROR γ t et STAT3 (gènes *Rorc* et *Stat3*), produisent l'IL-17, l'IL-22 et l'IL-21, et protègent les muqueuses des infections bactériennes et fongiques ;
- **Th9** : Ils sont induits par l'IL-4 et le TGF- β , expriment PU.1, produisent l'IL-9, et protègent contre les parasites extracellulaires, et jouent un rôle dans la régulation du cancer ;
- **TFH** : Ils sont induits par le TGF- β , l'IL-12 et l'IL-23, expriment BCL-6, et produisent l'IL-21. Ils apportent l'aide aux LB et améliore l'affinité des Ac.

C. Les Lymphocytes T Folliculaires Helper (TFH)

La première description des TFH remonte au début des années 2000, où plusieurs groupes ont ainsi décrit la présence de LT CD4+ exprimant le marqueur CXCR5 au sein d'organes lymphoïdes secondaires comme les amygdales (117-119). CXCR5 est le récepteur de la chimiokine CXCL13 et est exprimé par les LB leur permettant de migrer pour former les follicules. Ainsi les LT CD4+ exprimant CXCR5 peuvent migrer vers les follicules en réponse

à CXCL13 (120). L'axe CXCR5-CXCL13 est donc capital dans la co-localisation des TFH et LB favorisant l'engagement du TCR avec les CMH classe II pour restreindre l'aide apportée aux LB spécifiques de l'antigène, au cours de laquelle plusieurs molécules de co-stimulation sont engagées. De plus, le taux plasmatique de CXCL13 est corrélé à l'activité des centres germinatifs après immunisation de souris (121).

Les TFH peuvent ainsi être caractérisés dans les organes lymphoïdes secondaires comme des LT CD4⁺ exprimant CXCR5, ICOS, PD1, CD40L, le facteur de transcription BCL-6, et pouvant produire de l'IL-21 et du CXCL13 en cas de stimulation.

1. La différenciation des TFH :

Le profil TFH des CD4⁺T en tant que programme de différenciation à part entière, a été permis par :

- l'identification de BCL-6 en tant que promoteur régulant l'expression du programme TFH (122-124) ;
- la démonstration *in vivo* de leur fonction d'aide pour les LB (122, 124, 125);
- l'identification de l'importance de l'interleukine-21 (IL-21) pour la fonction des TFH (125-127).

A ce jour, le processus de différenciation multi-étapes des TFH peut être décrit de la façon suivante (128, 129):

- **Phase de Priming** : les LT CD4⁺ naïfs sont primés par les DC (130, 131). A ce stade, le type de DC, la force du signal TCR, l'environnement cytokinique et les molécules de co-stimulation joueraient un rôle. En effet, à la fois ICOS (125, 132) et l'axe OX40/OX40L (133) ont été décrits comme déterminants. L'environnement cytokinique est fondamental mais des différences inter-espèces sont observées. En effet, chez la souris, le rôle de l'IL-6 est prépondérant puisqu'il induit BCL-6 (123), et BCL-6 et CXCR5 sont associés dans plusieurs modèles (132, 134, 135). Chez l'homme, le rôle de l'IL-12 (131), puis de son association avec TGF- β et l'IL-23 dans l'induction de CXCR5, IL-21 et BCL-6 ont été démontrés (136). Enfin, l'IL-2 joue un rôle négatif sur la différenciation des TFH (137, 138).
- **Phase d'interaction avec les LB** : suite à la phase de priming, les TFH up-régulent CXCR5 et down-régulent CCR7 et PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand 1), leur

permettant de co-localiser avec les LB au niveau de la bordure T-B, de fournir des signaux essentiels aux LB, mais aussi de recevoir des signaux des LB. En effet, les LB sont nécessaires à la différenciation des TFH de part leur rôle d'APC et par l'expression d'ICOS-L (139).

- **Phase du Centre Germinatif** : A ce stade, la majorité des TFH présentent les marqueurs canoniques du programme, puisqu'ils sont CXCR5^{hi}PD1^{hi}BCL-6^{hi}Maf^{hi}SAP^{hi}PSGL1^{lo}CCR7^{lo}. Ils sont capables de sécréter les molécules clés : CXCL13, IL-21, IL-4 (139). D'autres molécules que nous ne détaillerons jouent un rôle important dans la différenciation des TFH, c'est le cas de EBI2, S1P et SAP (Revue dans (128)).

Une fois que les TFH ont terminé leur différenciation au niveau du centre germinatif (GC TFH) et qu'ils ont apporté l'aide nécessaire aux LB, 3 destins sont possibles :

- Transit vers un centre germinatif de proximité ;
- Résider dans le follicule adjacent pour rentrer dans le même CG secondairement ;
- Quitter le CG, après avoir down-régulé BCL-6, et devenir un TFH mémoire.

BCL-6 est un gène clé de régulation du programme des TFH. En effet, les modèles de knock-out *in vivo* ont démontré l'absence de génération de TFH (122-124), alors que la différenciation des autres CD4⁺ T helper n'était pas influencée. De plus, le niveau d'expression de BCL-6 est corrélé au niveau d'expression d'ICOS et PD1, deux molécules caractéristiques des TFH. Les TFH pleinement différenciés expriment un haut niveau de BCL-6 contrairement aux Th1, Th2, Th17 qui expriment un haut niveau de Blimp-1 (122, 140, 141). Blimp-1 est un antagoniste de BCL-6 et inversement. Les CD4⁺ T exprimant Blimp-1 de façon constitutive ne peuvent pas se différencier en TFH, mais peuvent se différencier en cellules effectrices non-TFH (i.e. Th1, Th2, Th17).

Plus récemment, l'antagonisme et l'exclusivité de BCL-6 et Blimp-1 ont été revues puisque des GC TFH co-exprimant BCL-6 et T-bet ou BCL-6 et ROR γ t, chez la souris comme chez l'homme, ont été décrits. Cependant, leurs différences fonctionnelles ne sont pas encore connues (129).

Malgré le rôle essentiel de BCL-6 dans le programme de différenciation des TFH, ce programme, de façon similaire aux Th1, Th2, Th17 et Treg, ne peut pas se résumer à un

mais plusieurs facteurs de transcription témoignant de la complexité de ces processus mais aussi de la possibilité de plasticité (128). Ainsi, ce réseau de facteurs de transcription inclut : la famille des STATs (STAT3 et STAT4), C-Maf, Interferon Regulatory Factor (IRF) 4, Batf (BAsic leucine zipper transcription factor) et Ascl2.

2. Fonction des TFH :

La principale fonction des TFH est d'apporter des signaux d'aide pour les LB, induisant leur différenciation et le processus de maturation d'affinité permettant la production d'Ac de haute affinité. Cette aide pour les LB passe par des signaux de survie (CD40L, IL-4, IL-21, BAFF) et des signaux de prolifération (CD40L, IL-21) participant ainsi à la maintenance du CG (139). Ces signaux induisent par ailleurs l'induction d'AID nécessaire au processus d'hypermutation somatique. Les TFH contrôlent la taille du CG et restreignent l'accès au CG pour les LB de haute affinité pour l'Ag. De plus, les TFH s'aident eux-mêmes *via* la sécrétion autocrine de cytokine (IL-21), et apportent des signaux aux FDC (139).

3. Organisation anatomique

Les TFH exprimant des niveaux faibles de CXCR5 et ICOS (CXCR5^{lo}ICOS^{lo}) sont localisés en dehors des CGs et représentent une population de précurseurs de TFH (ou pré-TFH) puisqu'ils expriment des molécules de TFH comme CD40L, IL-21 et CXCL13 mais n'expriment pas BCL-6 (142). Ces pré-TFH ont montré une fonction supérieure *in vitro* en terme d'aide pour les LB naïfs.

Les GC TFH sont localisés au sein du CG dont le rôle a été détaillé précédemment. Leur phénotype diffère puisqu'ils sont CXCR5^{hi}ICOS^{hi}BCL-6^{hi}.

La localisation au sein des organes lymphoïdes rendant l'étude des TFH difficile chez l'homme, leur recherche dans le sang a été réalisée dans divers contextes, normaux ou pathologiques afin de mieux comprendre certaines maladies.

Dès 2000, des LT CD4+ circulants exprimant le marqueur CXCR5 ont été rapportés à la fois chez l'homme et la souris. Ces TFH dits « circulants » ou « mémoires » ont été décrits par

plusieurs groupes. Ils diffèrent des GC TFH puisqu'ils n'expriment PD1 et ICOS qu'à un faible niveau et n'expriment pas BCL-6 (143-147). Cependant, leur étude *in vitro* a révélé un profil fonctionnel très proche de leur apparentés au niveau du centre germinatif. En effet, ils expriment l'IL-21 et sont capables d'up-réguler CD40L, deux molécules essentielles à l'aide des LB. Ces TFH mémoires ont un phénotype « central mémoire » (CD45RA-CCR7+) et résident majoritairement dans la rate, les ganglions, la moelle osseuse et ont la capacité de re-circuler dans le sang (144). En cas de réactivation, ils peuvent redevenir des TFH ou des GC TFH.

Chez l'homme, les TFH mémoires (ou circulants, cTFH) ont un phénotype hétérogène variant selon l'expression CCR7, CXCR3, CCR6, PD1 et ICOS, qui permettent de distinguer plusieurs profils fonctionnels (148).

Les cTFH contiennent une fraction de cellules quiescentes exprimant faiblement PD1 (PD1^{lo}). Celles-ci sont polarisées et fonctionnelles, comme en attestent leur profil d'expression génique et leur capacité d'aide pour les B (146).

L'utilisation de CXCR3 et CCR6 permet de définir 3 sous-populations parmi les TFH : cellules CXCR3+CCR6- partageant des propriétés de Th1 (exprimant l'IFN- γ) appelées TFH1 ; cellules CXCR3-CCR6- partageant des propriétés de Th2 (exprimant l'IL-4, IL-5 et IL-13) appelées TFH2 ; et des cellules CXCR3-CCR6+ partageant des propriétés de Th17 (exprimant l'IL-17 et IL-23). Les expériences *in vitro* ont montré que les TFH2 et TFH17 étaient capables d'induire la différenciation des LB naïfs en plasmablastes, de produire des Ig et d'effectuer une commutation isotypique grâce à la sécrétion d'IL-21. Par contre, les TFH1 manquent de capacité d'aide pour les LB naïfs (146, 147, 149). Ces différentes sous-populations se distinguent aussi par leur impact sur la commutation isotypique, puisque les TFH2 induiraient plutôt des IgG et IgE, alors que les TFH17 plutôt des IgG et IgA.

L'utilisation de CCR7, ICOS et PD1 permet de définir 3 autres sous-populations : une population activée (CCR7^{lo}ICOS⁺PD1^{hi}) et deux populations quiescentes (CCR7^{hi}ICOS⁻PD1⁺ et CCR7^{hi}ICOS⁻PD1⁻). Chez le sujet sain, les TFH exprimant ICOS sont rares mais augmentent dans certains contextes comme la vaccination, et seraient des TFH activés mémoires, générés chez la souris avant le stade de GC TFH (145).

Des avancées plus récentes ont permis de mieux définir l'origine et la fonction des TFH1. En effet, la différenciation des CD4+ naïfs en Th1 versus TFH1 est sous l'influence de l'IL-12 induisant une up-régulation de T-bet et de CXCR5. La divergence entre un phénotype Th1 et TFH1 serait sous le contrôle de IRF4 et Eomesodermin (150). D'autre part, les TFH1 activés (CXCR3+ICOS+) sont capables d'aider les B mémoires (143) et contribuent à la génération d'anticorps de haute affinité (151).

4. Régulation des TFH :

Du fait de l'activité intense du CG, de la quantité d'antigènes présents et de signaux de survie concentrés dans une même zone, des mécanismes de régulation du CG sont nécessaires. Ces mécanismes de régulation s'opèrent au niveau de chaque acteur de l'interaction. Ainsi, les TFH peuvent contrôler le nombre de GCB selon un mécanisme Fas-FasL, et les GCB, exprimant PD-L1, peuvent réguler négativement l'activité des TFH, exprimant fortement PD1, comme exposé par Cubas *et al* dans le contexte du VIH (152). La régulation CG par les Treg provenait initialement d'observations chez la souris et l'homme. Les souris déficientes pour FoxP3 présentent ainsi une réponse humorale augmentée (153), tout comme les patients présentant un syndrome IPEX développant des auto-Ac (154). Par la suite, l'identification de Treg exprimant CXCR5 et se localisant à la bordure T-B et dans le CG (155) permettra de définir une sous-population spécialisée appelée « T Follicular Regulatory cells » (TFR). Ces TFR co-expriment BCL-6 et FoxP3, et présentent une expression diminuée d'IL-21, CD40L et d'IL-4 (156-158). Par ailleurs, ils expriment des molécules caractéristiques des Treg comme CTLA-4, GITR et Granzymes. Les TFR se différencient à partir de Treg, sous le contrôle de plusieurs voies de co-stimulation : ICOS est nécessaire à la différenciation en TFR (159), alors que PD1 et CTLA-4 l'inhibent (159-161). Les expériences *in vivo* chez la souris ont permis de montrer la capacité des TFR à inhiber puissamment et spécifiquement la réponse B selon plusieurs mécanismes précisés secondairement *in vitro*. Les TFR diminuent la production d'IgG par les LB en bloquant les capacités d'aide des TFH (diminution d'IL-4, d'IL-21) et leur capacité proliférative. Ils exercent leur fonction par le biais de molécules de co-stimulation négative (CTLA-4), de production de cytokines inhibitrices (TGF- β , IL-10) ou de molécules cytotoxiques (Granzymes). Plus récemment, l'étude de modèle murin de cGVHD a révélé une diminution des TFR au niveau des organes lymphoïdes secondaires (162).

De façon similaire aux TFH, un contingent circulant de TFR (cTFR) a été détecté chez l'homme et la souris, démontrant une capacité suppressive puissante, Ag-spécifique, et représentant un pool de TFR mémoires (159, 163, 164).

5. Applications cliniques

La compréhension des mécanismes de différenciation et de fonction des TFH a permis d'améliorer les connaissances en pathologie avec de nombreuses applications cliniques.

La détection d'auto-anticorps (auto-Ac) est un élément majeur des maladies auto-immunes. Ces auto-Ac sont dirigés contre des Ag du soi, incluant des composants nucléaires (anti-ADN), des Ag spécifiques de tissus ou de facteurs solubles, et peuvent induire des dysfonctions d'organes. Ils résultent d'une rupture des mécanismes de tolérance au cours du développement des LB, dont le sort peut être « rachaté » au cours de la réaction du centre germinatif. Plusieurs études soutiennent le rôle des TFH dans les maladies auto-immunes.

L'implication de la réaction du CG au cours du Lupus Erythemateux Systémique (LES) a été suggéré par des études retrouvant une augmentation des plasmablastes (CD27+CD38^{hi}) produisant des Ac présentant des mutations somatiques (80, 165). Plusieurs études ont retrouvé une activation des TFH (ICOS+ ou PD1+) dans le contexte du LES (166, 167), dans la polyarthrite rhumatoïde (168, 169) et le diabète de type 1 (170). Un déséquilibre de la balance entre cTFH helper (TFH2 et TFH17) *versus* non helper (TFH1) a été retrouvé dans le LES et la dermatomyosite (147, 166) corrélant avec l'activité de la maladie, le titre d'auto-Ac et le nombre de plasmablastes circulants.

Dans le domaine de la cGVHD, le rôle du CG et des Ac provenant du donneur avait été montré comme nécessaire au développement de la maladie chez la souris (93). Secondairement, l'utilisation de ce modèle de Bronchiolite Oblitérante a permis de montrer une augmentation des TFH au sein des organes lymphoïdes secondaires suggérant leur rôle dans la physiopathologie de la cGVHD (162, 171).

Enfin, le champ d'application des TFH s'est étendu aux domaines de la vaccination, des déficits immunitaires et de la réponse humorale contre le VIH et le cancer qui ont fait l'objet de revues (128, 129, 139).

D. Les lymphocytes T helper 17 (ou Th17)

Chez l'homme et la souris, les LT Th17 sont définis par leur capacité à sécréter de l'IL-17 en réponse à la stimulation et par leur expression de ROR γ t. Par ailleurs, ils sécrètent d'autres cytokines comme l'IL-23 et l'IL-21, et expriment des molécules de surface pouvant jouer un rôle dans leur migration (CCR6 et CCR4) (172).

1. Différenciation et programme Th17

Les études initiales suggéraient le rôle de l'IL-23 dans la différenciation des LT en Th17, mais ceci n'a pu être confirmé puisque les LT naïfs n'expriment pas le récepteur à l'IL-23. Néanmoins, plusieurs études ont montré que les LT naïfs activés en présence de TGF- β et d'IL-6 se différencient en Th17 et expriment ROR γ t (173, 174). De plus, l'IL-21 produit par les Th17 participerait à leur amplification de façon autocrine ; et l'IL-23 permettrait la stabilisation et l'expansion de Th17 déjà différencié. Ghoreschi *et al* ont défini d'autres modalités de différenciation de LT naïfs en Th17, à la fois chez l'homme et la souris, en utilisant l'association d'IL-1, d'IL-6 et d'IL-23, et en excluant le TGF- β (175). Ces derniers présentent un profil fonctionnel et transcriptionnel distinct puisqu'ils co-expriment l'IFN- γ et présentent un rôle pathogénique dans certaines maladies auto-immunes (176).

ROR γ t a été identifié comme le régulateur principal de la différenciation des Th17 par Ivanov *et al* (177). ROR γ , codé par le gène *Rorc*, ROR α et ROR β sont tous des membres de la famille des ROR (*retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear hormone receptor family*). L'expression de *Rorc* conduit à la production de deux isoformes ROR γ et ROR γ t, cette dernière étant exclusivement exprimée dans les cellules du système immunitaire (178). La culture de LT naïfs de souris ROR γ ^{-/-} en condition inductrice de Th17 (IL-6 + TGF- β) conduit à une diminution drastique du nombre de cellules sécrétant de l'IL-17 (177).

L'expression du programme Th17 ne se limite cependant pas au facteur de transcription ROR γ t, mais fait appel à de nombreux autres partenaires (**Figure 3**). En effet, il interagit avec : STAT3, IRF4, BATF (Basic-leucine-zipper transcription factor ATF-like) pour initier le programme complet de différenciation (179) (**Figure 4**).

La première étape repose sur l'activation de STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) en aval de la signalisation via les récepteurs à IL-6 et IL-23. STAT3 régule directement les cytokines de type Th17, les gènes des récepteurs aux cytokines telles IL-17,

IL-17F, IL-23R, et contrôle l'expression de facteurs de transcription spécifiques comme *Rorc*, *Batf* et *Irf4* (180). De plus, STAT3 se lie aux promoteurs des gènes de l'IL-17A et IL-17F. Ainsi, la délétion de STAT3 dans les LT murins empêche la différenciation Th17 (172). De même, les patients présentant une mutation autosomique dominante de STAT3 dans le cadre de l'AD-HIES (Autosomal Dominant – Hyper-IgE Syndrome or Job's syndrome) développent une candidose chronique cutanéomuqueuse, des infections à *Staphylococcus aureus* et pulmonaires par déficit de Th17 et défaut de signalisation de l'IL-6, IL-23 et IL-22 (179).

BATF est un élément essentiel dans le maintien de l'expression de ROR γ t. Il est up-régulé suite à l'activation du TCR (181). BATF se dimérise avec JUNB pour se lier aux promoteurs des gènes *IL-17*, *IL-21* et *IL-22* dans les Th17. IRF4 est impliqué à la fois dans la différenciation des Th2 et des Th17. Les souris IRF4^{-/-} sont protégées contre l'EAE (Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale) et contiennent moins de Th17, conséquence du défaut d'expression de ROR γ t (182).

Ainsi, IRF4 et BATF sont tous les deux essentiels à la différenciation Th17, et leur rôle passe par le contrôle de l'accessibilité de la chromatine permettant à ROR γ t d'accéder aux gènes cibles (183). Par ailleurs, d'autres éléments entrent en jeu dans le programme Th17 comme HIF α , formant un complexe avec ROR γ t induisant l'expression d'IL-17, et pouvant aussi se lier avec FoxP3 conduisant à sa dégradation, stabilisant ainsi la polarisation Th17 en condition d'hypoxie (184).

B lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp-1) joue un rôle important dans le phénotype Th17 pathologique. Il est induit par l'IL-23 et agit de façon coordonnée à ROR γ t à la fois comme un activateur de gènes (*Il23r* et *Csf1*) et un répresseur d'autres gènes (*Bcl2*, *FoxP3*, *GATA3*).

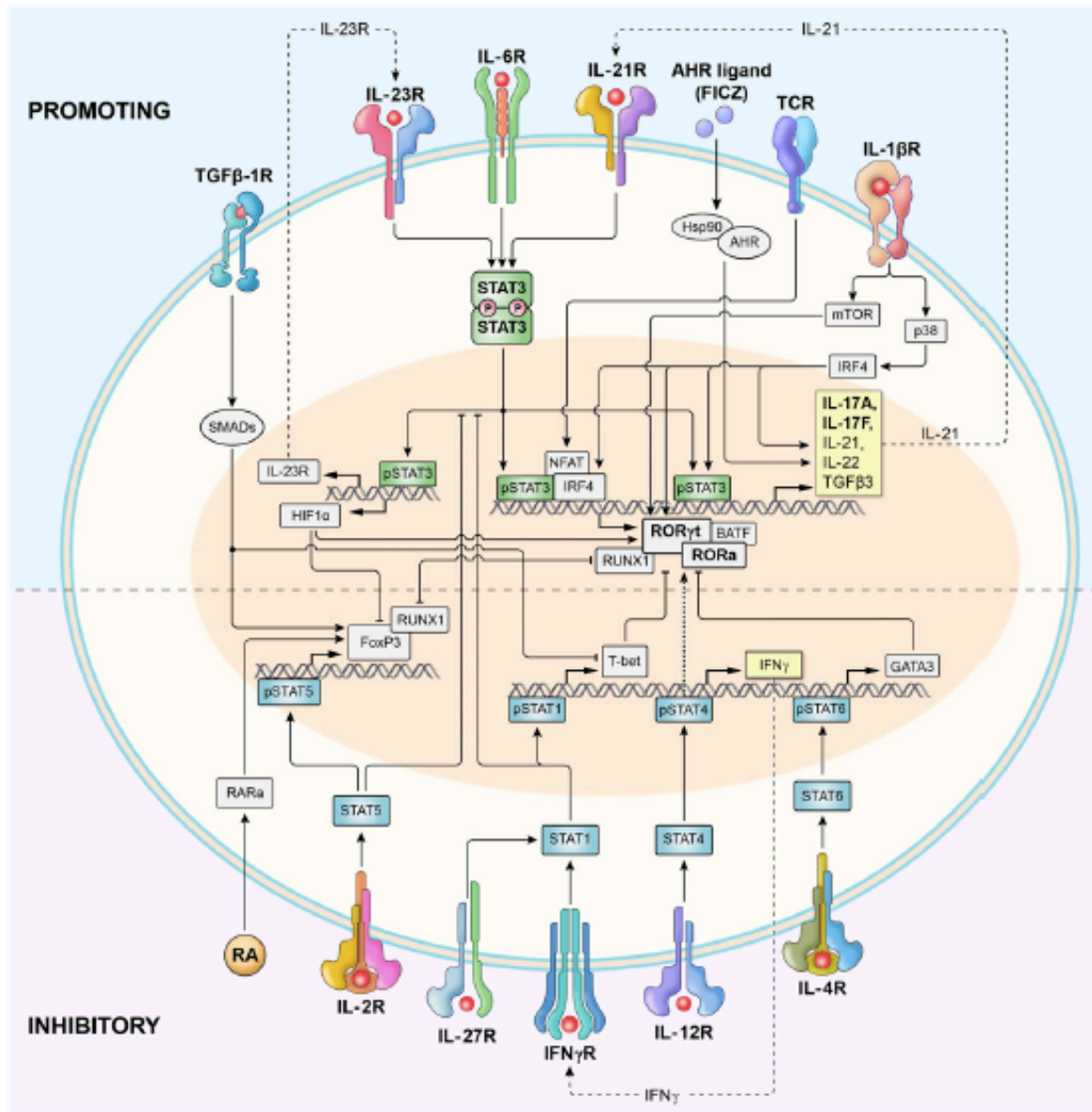


Figure 3 : Représentation de la signalisation et de la régulation transcriptionnelle au cours de la polarisation Th17 (*in* Muranski P and Restifo NP (185))

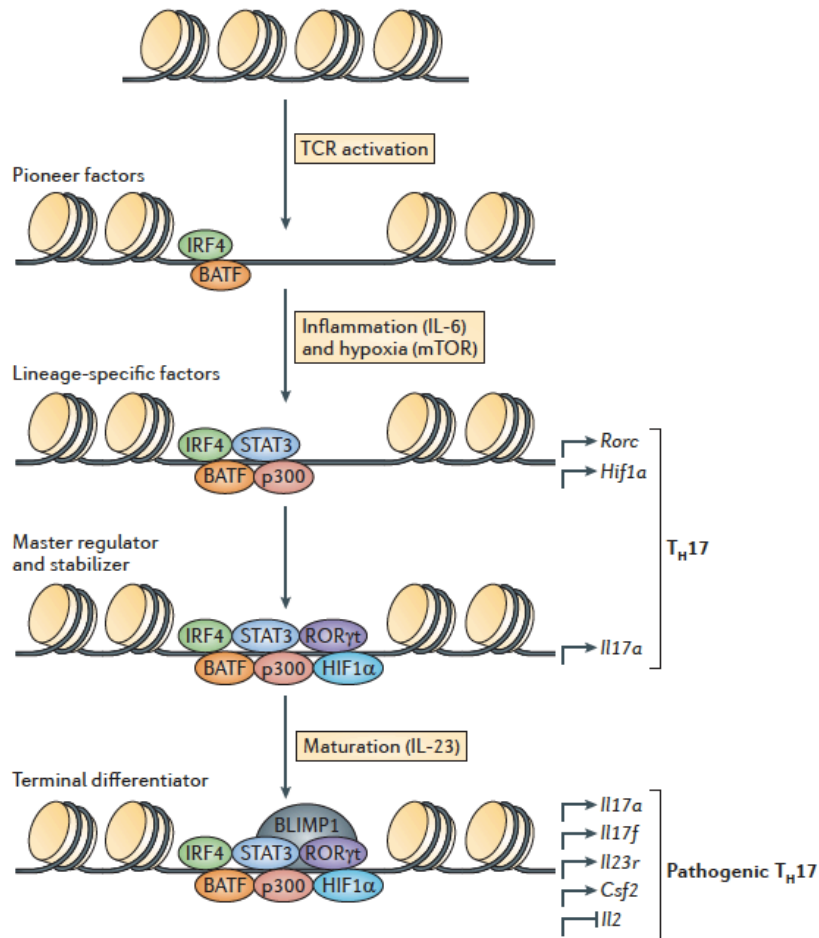


Figure 4 : Représentation de la séquence de régulation transcriptionnelle au cours de la polarisation Th17 (*in Gaffen SL et al (179)*)

2. Fonction des Th17

L'IL-17 est une cytokine clé du programme Th17 et a été découverte en 1993. On dénombre 6 membres : IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (ou IL-25) et IL-17F. L'IL-17A et l'IL-17F présentent de nombreuses homologies de séquence et sont produites par le même type cellulaire. D'autres types cellulaire peuvent cependant produire de l'IL-17 comme les LT γ δ , les ILCs (Innate Lymphoid Cells) et les NK.

L'IL17A et l'IL-17F forment des complexes homodimériques ou hétérodimériques et se lient au récepteur de l'IL-17 (IL-17R). Ce dernier est composé de 5 membres (A->E), et l'IL-17A/F se lient à l'hétérodimère IL-17RA-C avec des affinités différentes. La liaison de l'IL-17 à son récepteur induit des effets biologiques différents en fonction des couples cytokine – hétérodimère récepteur. La liaison de l'IL-17A/F à son récepteur induit des cytokines pro-inflammatoires et/ou une inflammation tissulaire de type auto-immune (176).

L'IL-17RA est exprimé à la fois par des cellules immunitaires et non immunitaires (cellules épithéliales, cellules endothéliales, fibroblastes). La signalisation via l'IL-17R induit la production de médiateurs de l'inflammation participant au recrutement de types cellulaires induisant une inflammation tissulaire. Parmi ces médiateurs, sont décrits : IL-1, IL-6, IL-8, TNF et MMP (176).

L'IL-17 induit la production de CXCL8 par les cellules endothéliales et épithéliales favorisant le recrutement des neutrophiles. Dans des situations d'inflammation chronique Th17-médiée, les types cellulaires produisent du CCL20 favorisant le recrutement des Th17 (exprimant CCR6) et amplifiant la réaction. Par ailleurs, les Th17 peuvent aussi produire l'IL-22, l'IL-21, l'IL-26, le Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF) et du Tumor Necrosis Factor (TNF)- α . Toutes ces cytokines, chimiokines et facteurs de croissance concourent au recrutement des acteurs de l'inflammation conduisant à une infiltration tissulaire par amplification, parfois pathologique (172, 176). Ces effets biologiques attribuent ainsi deux conséquences principales à l'action des Th17 (185):

- La protection contre les pathogènes extra-cellulaires (bactéries, levures) au niveau du tube digestif, des voies aériennes et de la peau *via* des cytokines au pouvoir chémo-attractant (IL-17, TNF- α , IL-1 β et GM-CSF), par la production indirecte de protéines antimicrobiennes (défensines) et l'aide à la réponse humorale ;
- Les dommages tissulaires induits par la réponse inflammatoire *via* CCL20, IL-1, IL-6, ...

Cette dualité rend compte de la difficulté de l'analyse des contextes pathologiques et de leur traitement.

3. Dualité et plasticité des Th17

La possibilité de modifications des fonctions effectrices, ou plasticité, entre les différents sous-populations de LT helpers est le témoin de l'importance de l'environnement cytokinique et de la redondance de certaines cytokines dans les programmes de différenciation.

En effet, le TGF- β est reconnu pour participer à la différenciation des Th17 et des Treg (173, 186). Les souris n'ayant pas de TGF- β ne produisent pas de Treg ni de Th17. L'activation de LT naïfs en présence de TGF- β induit l'up-régulation de ROR γ t et de FoxP3. Ces cellules ne peuvent sécréter de l'IL-17, mais peuvent se différencier en Treg ou Th17 en fonction de l'environnement cytokinique (187). Des cellules co-exprimant ROR γ t et FoxP3 ont été

trouvées chez la souris et produisent moins d'IL-17 témoignant de l'interaction réciproque entre ces deux facteurs (115).

Le programme de différenciation Th17 ne correspond pas à un état de transformation terminale. En effet, des Th17 générés *in vivo* vont perdre leur phénotype en l'absence d'exposition permanente à l'IL-6 et au TGF- β et peuvent se convertir en Th1 ou Th2 en cas d'exposition à l'IL-12 ou l'IL-4 respectivement (188). Que ce soit en condition physiologique ou pathologique, il est possible de détecter des cellules double-positives IL-17+IFN- γ + suggérant un chevauchement des programmes de différenciation. Ces cellules Th1/Th17 détectées en condition pathologique (maladie de Crohn) co-expriment T-bet et ROR γ t (189). Ceci est probablement expliqué par le statut de méthylation (permissif ou non) du promoteur de *Tbx21* (codant pour T-bet) régulant la capacité des Th17 à co-exprimer des caractéristiques de Th1 (IFN- γ) ou à devenir des Th1, selon l'environnement en IL-12 (190).

De la même manière, Schmitt *et al* ont montré que le TGF- β associé à l'IL-12 ou l'IL-23 induisait l'expression de molécules clés des TFH (CXCR5, ICOS, IL-21) par des LT naïfs et présentait des capacités d'aide des LB (136). Cette nouvelle observation du rôle centrale du TGF- β partagé par les Th17, TFH et Treg rend compte d'une plasticité potentielle en fonction de l'environnement cytokinique. De façon intéressante, Hirota *et al* ont décrit la plasticité des Th17 vers un phénotype TFH induisant une réponse IgA au niveau des plaques de Peyer (191).

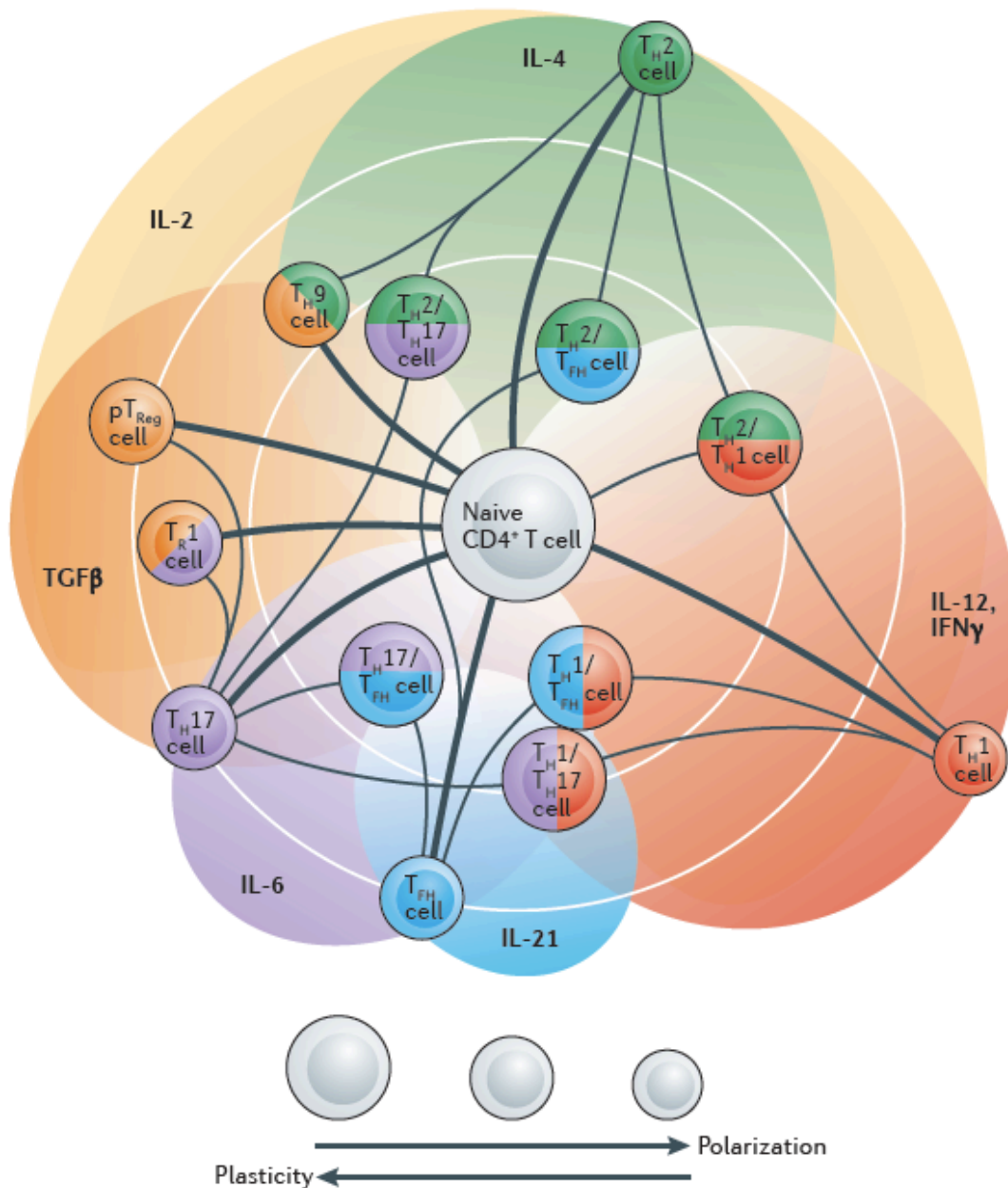


Figure 5 : Plasticité des LT helper médiée par les cytokines (*In* DuPage M and Bluestone JA (114))

4. Th17 dans la dysimmunité

a) *Auto-immunité*

Les premiers modèles murins suggéraient que les LT Th1, spécifiques d'auto-Ag, étaient nécessaires pour l'induction d'auto-immunité. Cependant, l'utilisation de souris déficientes pour le gène de l'IL-12 (IL-12p35), l'IFN- γ ou le récepteur favorisant la différenciation Th1 (IL-12R β 2) étaient plus susceptibles envers les maladies auto-immunes. A l'opposé, les souris déficientes pour l'IL-12p40 étaient résistantes aux maladies auto-immunes. Ceci a révélé que la chaîne p40 pouvait se lier à la chaîne p19 pour former un nouvel hétérodimère d'IL-23, et la déficience pour ces deux chaînes rendait les souris résistantes à l'EAE, arthrite induite par le collagène, les modèles de maladie inflammatoire digestive.... De la même façon, la déficience pour l'IL-17A ou F, ou leur récepteur protège les souris des maladies auto-immunes.

Plusieurs études ont rapporté des infiltrats IL-17+ au niveau des tissus siège de dysimmunité (176). C'est le cas dans la polyarthrite rhumatoïde (Miossec 2009), dans la sclérose en plaques, le syndrome de Gougerot-Sjögren, et dans les maladies inflammatoires comme le Crohn, pour lequel une population Th1/Th17 a aussi été décrite (189). Le polymorphisme du gène *IL23R* (R381Q) peut être associé à une protection ou à une susceptibilité pour certaines maladies auto-immunes (192).

La meilleure compréhension des mécanismes générant la réponse Th17 ou des conséquences de la réponse Th17 a conduit au développement de thérapeutiques ciblant l'IL-17A/F, l'IL-23p19/p40, l'IL-22, le TNF- α , ou RORC par des anticorps monoclonaux ou des composés chimiques (176).

b) *Rôle des Th17 dans la GVH*

L'implication des Th17 dans la GVH a été suggéré dès la fin des années 1990, en commençant par des modèles de GVH aiguë (193). En 1998, Murphy *et al* observaient que les souris déficientes pour l'IFN- γ présentaient une sévérité accrue de GVHD aiguë, alors que les souris déficientes pour l'IL-4 semblaient être protégées de l'aGVHD (194). Plusieurs

éléments concourent à l'implication des Th17 dans l'aGVHD. En effet, l'administration de Th17 différenciés *in vitro* augmente la sévérité de l'aGVHD (195). Les souris développant une aGVHD présente une infiltration des organes lymphoïdes par des Th17, et l'administration de splénocytes provenant de donneurs déficients pour l'IL-17 (IL-17^{-/-}) retarde significativement le développement de l'aGVHD (196). Dans ce même modèle d'incompatibilité du CMH (B57/Bl6 -> BALB/c), Yi *et al* ont retrouvé des résultats différents, et observent l'inter-dépendance des polarisations Th1, Th2 et Th17 et la ségrégation anatomique de leur effet. En effet, l'administration de splénocytes IFN- γ ^{-/-} induit une augmentation de la différenciation vers un profil Th2, Th17, et augmente les dommages tissulaires au niveau de la peau et du poumon. L'administration de CD4⁺ IFN- γ ^{-/-} et IL-4^{-/-} induit une augmentation des Th17 et des dommages préférentiels au niveau de la peau. Alors que les CD4⁺ déficients en Th1 et Th17 induisent une pneumopathie idiopathique (197) non observée en cas de double délétion de ROR γ t et T-bet (198). Par ailleurs, le rôle des Th17 est suggéré indirectement par des modèles de KO pour l'IL-6 favorisant la reconstitution des Treg (199) ou en bloquant l'IL-23 (200) ou l'IL-21 (201).

Chez l'homme l'étude de l'infiltrat tissulaire en Th17, au cours de la GVH aiguë, a été réalisée au niveau hépatique, retrouvant un rapport Th17/Treg diminué dans le contexte de GVH aiguë et corrélée à sa sévérité. Dans le même sens, l'étude de biopsies cutanées de patients développant une aGVHD retrouvait un infiltrat IFN- γ ⁺, mais pas d'infiltrat IL-17⁺ (202). Par ailleurs, l'analyse des Th17 dans le sang au cours de la GVH aiguë retrouve une augmentation de leur nombre, associée à une diminution des Treg, corrélées à la sévérité. Les cytokines associées aux Th17 (TGF- β , IL-6, IL-1 β , IL-17, IL-21, IL-23) étaient augmentées alors que l'IL-22 était diminuée (203). Au cours de la GVH aiguë humaine, l'augmentation des Th17 dans le sang pourrait expliquer leur diminution dans les organes cibles. Ces perturbations dans la compartimentalisation anatomique n'excluent cependant pas un infiltrat Th17 au niveau des organes lymphoïdes.

Dans les modèles expérimentaux de cGVHD, au-delà du mauvais contrôle des Th1 et Th17 par les Treg (Chen, 2007, Th17), les travaux successifs ont mis en évidence le rôle de STAT3 (204) et des molécules sécrétées dans la réponse Th17 agissant sur l'infiltrat cellulaire en acteurs de l'immunité innée (G-CSF, CSF1) (205, 206).

PROBLEMES et QUESTIONS POSEES

La GVH chronique est une complication fréquente et grave de l'allogreffe de CSH. Sa compréhension incomplète limite le développement de nouvelles thérapeutiques. La recherche translationnelle sur la GVH chronique chez l'homme représente donc un espoir pour déchiffrer les mécanismes physiopathologiques sous-jacents.

Au cours de ma thèse doctorale, j'ai eu la chance de passer 2 ans au sein du laboratoire du Prof. Jerome Ritz au Dana-Farber Cancer Institute. Son équipe a largement contribué aux progrès dans les connaissances sur l'immunologie de l'allogreffe de CSH en abordant : la reconstitution immunitaire post-greffe, le rôle de l'immunité humorale dans la GVH chronique, et les LT effecteurs et régulateurs dans la GVH chronique permettant de développer de nouvelles thérapeutiques. Son équipe a démontré la présence de perturbations homéostatiques des lymphocytes B dans le contexte d'une augmentation de BAFF favorisant la survie de clones B autoréactifs par rupture des mécanismes de tolérance au cours de la GVH chronique. De plus, la détection d'auto- et d'allo-anticorps, l'augmentation des LB mémoires (de type post-GC et plasmablastes) et le profil activé des LB suggèrent l'implication du centre germinatif. La possibilité de détecter des TFH circulants (cTFH) nous a donné l'opportunité d'interroger les événements survenant au niveau des organes lymphoïdes secondaires difficiles d'accès.

Ainsi, nos objectifs étaient les suivants :

- Caractériser la reconstitution des cTFH après allogreffe de CSH ;
- Comparer le profil d'activation et de polarisation (TFH1, 2, 17) des cTFH parmi des patients développant ou non une GVH chronique ;
- Comparer la fonction des cTFH entre les deux groupes de patients ;
- Décrire les capacités de survie et d'apoptose des cTFH au cours de la cGVHD ;
- Décrire les mécanismes de régulation du centre germinatif (Treg et TFR) ;

Malgré la mise en évidence de longue date de l'implication des lymphocytes T (LT) dans la physiopathologie de la GVH chronique, des efforts sont nécessaires pour caractériser les sous-populations fonctionnellement importantes, permettant d'envisager des thérapeutiques ciblées et d'en évaluer l'efficacité. L'identification récente d'une population présentant un

profil Th17 et capable d'interagir avec l'endothélium pour accéder aux sites de l'inflammation, nous ont conduit à :

- Décrire cette population de LT CD4+ CD146+ au cours de la GVH chronique ;
- Décrire son profil de polarisation (Th1, Th2, Th17) ;
- Evaluer son rôle dans des modèles murins de GVH chronique ;
- Evaluer l'impact d'inhibiteurs spécifiques du profil Th17 sur cette population *in vitro* et *in vivo* chez la souris.

RESULTATS

Article 1

Circulating T Follicular Helper Cells with Increased Function during Chronic Graft-*versus*-Host-Disease

Edouard Forcade, Haesook T. Kim, Corey Cutler, Kathy Wang, Ana C. Alho, Sarah Nikiforow, Vincent T. Ho, John Koreth, Philippe Armand, Edwin P. Alyea, Bruce R. Blazar, Robert J. Soiffer, Joseph H. Antin and Jerome Ritz

Blood 2016; **127**(20):2489-2497

Contexte et Synthèse de l'article

Comme nous l'avons vu en introduction, le rôle des Lymphocytes B (LB) dans la GVH chronique (cGVHD) a été caractérisée principalement au cours des dix dernières années (76, 207, 208). En effet, plusieurs éléments pouvaient suggérer leur rôle : la fréquente détection d'auto- et d'allo-anticorps dans le plasma des patients ayant développé une cGVHD ; l'augmentation du facteur de survie (BAFF) des LB favorisant l'émergence de clones autoréactifs ; le phénotype des LB chez les patients avec cGVHD caractérisé par un profil d'activation et mémoire (post-Centre germinatif) ; la détection d'anticorps anti-HY (de type IgG de haute affinité) dans le contexte de greffe à partir d'un donneur féminin pour un receveur masculin ; et le bénéfice clinique observé après traitement par anticorps monoclonal déplétant les LB (le rituximab). Tous ces éléments suggèrent le passage des LB par le centre germinatif permettant leur différenciation en LB mémoires et cellules productrices d'anticorps ayant subi la maturation d'affinité. Les LB reçoivent au niveau du centre germinatif des signaux indispensables à leur survie et leur différenciation par une sous-populations de LT CD4⁺ spécialisés, appelés LT folliculaires helper (TFH). Ces TFH ont été montrés augmentés au sein des organes lymphoïdes secondaires des souris ayant développé une cGVHD (171), suggérant leur étude dans la physiopathologie humaine. Cette étude a été largement facilitée par la possibilité d'étudier les TFH circulants (cTFH) dans le sang correspondant au pool de TFH mémoires apparentés aux TFH du centre germinatif (GC TFH)(147).

L'étude de populations immunitaires après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est soumise à la cinétique de reconstitution de ces populations au cours du temps, pouvant avoir un impact sur les résultats des analyses biologiques. Nous avons donc entrepris au préalable une étude des cTFH à différents points post-greffe chez différents patients. Cette étude (**Annexe 2**), non longitudinale et non retenue lors de la publication de ce papier, a montré la reconstitution progressive des cTFH au cours du temps, soumise à la lymphopénie CD4⁺, mais atteignant des valeurs normales dès 9 mois post-greffe en terme de pourcentage permettant de retenir ce délai pour une étude des cTFH au cours de la cGVHD.

Nous avons donc étudié les cTFH chez les 66 patients ayant reçu une allogreffe de CSH, parmi lesquels 38 présentaient une cGVHD active, 12 un antécédent de cGVHD mais non active au moment du prélèvement, et 16 patients n'ayant jamais présenté de cGVHD. Cette étude a montré la diminution des cTFH en pourcentage et valeur absolue au cours de la cGVHD, suggérant un homing et/ou une rétention des TFH dans les organes lymphoïdes secondaires, en lien avec l'augmentation de CXCL13, chimiokine attirant les TFH au niveau des centres germinatifs. De plus, les cTFH étaient retrouvés activés (ICOS^{hi}PD1^{hi}) et

proliférant (Ki67). L'étude des sous-populations de cTFH sur la base de CXCR3 et CCR6 permet de définir 3 principaux sous-types : TFH Th1 (CXCR3+CCR6-), Th2 (CXCR3-CCR6-) et Th17 (CXCR3-CCR6+), les deux derniers présentant les meilleures capacités d'aide pour les LB. Chez les patients présentant une cGVHD, le pourcentage de TFH Th17 était corrélé à la sévérité de la cGVHD (score NIH), et l'inverse était observé pour les TFH Th1. Cette signature phénotypique suggérant un gain de fonction de ces TFH au cours de la cGVHD, nous avons entrepris une évaluation directe fonctionnelle des cTFH après allogreffe de CSH. La co-culture de cTFH de patients transplantés a montré une capacité d'aide augmentée pour les cTFH de patients présentant une cGVHD active comparativement à ceux qui n'en présentaient pas. Enfin, ce gain de fonction était corroboré *in vivo* par une forte corrélation entre l'activation et la prolifération des cTFH de patients et la génération de LB mémoires et de plasmablastes.

Ces éléments sont en faveur de l'implication des TFH dans la cGVHD humaine, représentant un élément clé coordonnant la réponse B allo-réactive.

TRANSPLANTATION

Circulating T follicular helper cells with increased function during chronic graft-versus-host disease

Edouard Forcade,¹⁻³ Haesook T. Kim,^{4,5} Corey Cutler,^{1,2} Kathy Wang,^{1,2} Ana C. Alho,^{1,2} Sarah Nikiforow,^{1,2} Vincent T. Ho,^{1,2} John Koreth,^{1,2} Philippe Armand,^{1,2} Edwin P. Alyea,^{1,2} Bruce R. Blazar,⁶ Robert J. Soiffer,^{1,2} Joseph H. Antin,^{1,2} and Jerome Ritz^{1,2,7}

¹Division of Hematologic Malignancies and Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA; ²Harvard Medical School, Boston, MA; ³UMR CNRS 5164, Bordeaux University, Bordeaux, France; ⁴Department of Biostatistics and Computational Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA; ⁵Harvard School of Public Health, Boston, MA; ⁶Division of Blood and Marrow Transplantation, University of Minnesota, Minneapolis, MN; and ⁷Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA

Key Points

- cTFH are activated and skewed toward a Th2/Th17 phenotype promoting their B-cell help function during cGVHD.
- cTFH activation signature correlates with memory B-cell and plasmablast phenotype in cGVHD patients.

Chronic graft-versus-host disease (cGVHD) remains a major late complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Previous studies have established that both donor B and T cells contribute to immune pathology in cGVHD but the mechanisms responsible for coordinated B- and T-cell responses directed against recipient antigens have not been understood. T follicular helper cells (TFH) play an important role in the regulation of B-cell immunity. We performed extensive phenotypic and functional analysis of circulating TFH (cTFH) and B cells in 66 patients after HSCT. Patients with active cGVHD had a significantly lower frequency of cTFH compared with patients without cGVHD. This was associated with higher CXCL13 plasma levels suggesting increased homing of TFH to secondary lymphoid organs. In patients with active cGVHD, cTFH phenotype was skewed toward a highly activated profile with predominance of T helper 2 (Th2)/Th17 subsets. Activated cTFH in patients with cGVHD demonstrated increased functional ability to promote B-cell immunoglobulin secretion and maturation.

Moreover, the activation signature of cTFH was highly correlated with increased B-cell activation and plasmablast maturation in patients after transplant. These studies provide new insights into the immune pathogenesis of human cGVHD and identify TFH as a key coordinating element supporting B-cell involvement in this disease. (*Blood*. 2016;127(20):2489-2497)

Introduction

Chronic graft-versus-host disease (cGVHD) remains a major long-term complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), occurring in ~50% of patients.¹ Donor T cells targeting alloantigens in the recipient play a critical role in the initiation of tissue injury, and depletion of mature T cells from the stem cell graft markedly reduces the subsequent incidence of cGVHD.^{2,3} However, B cells also play a key role in the immune pathology of cGVHD.⁴⁻⁶ Both murine models and clinical studies have shown that cGVHD is associated with multiple abnormalities of B-cell reconstitution including decreased numbers of B-cell progenitors, increased representation of memory B cells, and decreased frequency of regulatory B cells.^{4,7-11} cGVHD is also associated with high levels of B-cell activating factor (BAFF), high BAFF-to-B-cell ratios and aberrant B-cell activation.^{4,6,10,12,13} The frequent detection of auto- and alloantibodies after HSCT and the clinical benefit of B-cell-targeted therapy also emphasize the important role of B cells in the development of cGVHD.¹⁴⁻¹⁸

T and B cells represent 2 distinct arms of the adaptive immune system and both arms interact at many levels to coordinate effective and specific immune responses. For example, T-cell-mediated activation of

B cells in the germinal center (GC) reaction promotes differentiation of naive B cells into memory B cells and class switching of immunoglobulin genes. These specific helper functions are mediated by a distinct CD4 T-cell subset in the GC, termed the T follicular helper cells (TFH). TFH characteristically expresses the BCL-6 transcription factor in association with surface expression of CXCR5 and programmed cell death protein 1 (PD-1). TFH interactions with B cells are mediated through surface molecules such as inducible T-cell costimulator (ICOS) and CD40L and secretion of interleukin-21 (IL-21). Through these mechanisms, TFH promotes immunoglobulin class-switch and somatic hypermutation leading to production of high-affinity antibodies as well as differentiation into long-lived plasma cells.¹⁹

Although TFH function primarily in secondary lymphoid structures, recent studies have identified a TFH subset that normally circulates in the peripheral blood (circulating TFH [cTFH]).^{20,21} cTFH can be identified within the CD4⁺CD45RA⁻ memory T-cell compartment by expression of CXCR5 but unlike GC TFH, cTFH do not express BCL-6. Nevertheless, resident GC TFH and cTFH share functional capacities for providing B-cell help and the identification of cTFH in peripheral blood has provided investigators

Submitted December 21, 2015; accepted February 24, 2016. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, March 4, 2016; DOI 10.1182/blood-2015-12-688895.

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

Table 1. Clinical characteristics of HSCT patients

	HSCT patients, N = 66			P No vs Active
	No cGVHD, n = 16	Active cGVHD, n = 38	Resolved cGVHD, n = 12	
Age, y				
Median	56.6	61.7	63.1	ns
Range	25-74.9	25.9-75.6	32.6-69.5	
Sex (%)				
M	9 (56)	23 (60)	7 (58)	ns
F	7 (44)	15 (40)	5 (42)	
Disease (%)				
Acute leukemia	6 (38)	15 (40)	3 (25)	
HD, NHL, CLL, MM	8 (50)	15 (40)	6 (50)	
MDS, MPN	1 (6)	7 (18)	2 (17)	
Nonmalignant	1 (6)	1 (2)	1 (8)	
Conditioning regimen (%)				
MAC	4 (25)	8 (21)	6 (50)	ns
RIC	12 (75)	30 (79)	6 (50)	
Donor type (%)				
MRD	9 (56)	10 (27)	4 (33)	
MUD	5 (31)	24 (63)	7 (58)	
mmUD	2 (13)	4 (10)	1 (9)	
Graft source (%)				
PBSC	13 (81)	37 (97)	9 (75)	
BM	3 (19)	1 (3)	3 (25)	
GVHD prophylaxis (%)				
Tac-MTX	6 (37)	15 (40)	6 (50)	
Tac-Sir	3 (19)	5 (13)	1 (8)	
Tac-Sir-MTX	7 (44)	18 (47)	5 (42)	
Months from HSCT to sample collection				
Median	35.8	28.9	52.8	.09
Range	12-87.9	9.6-123.8	11.7-140.9	
Grade II-IV aGVHD (%)				
Yes	0	17 (45)	3 (25)	

aGVHD, acute GVHD; BM, bone marrow; CLL, chronic lymphocytic leukemia; F, female; HD, Hodgkin disease; M, male; MAC, myeloablative conditioning; MDS, myelodysplastic syndrome; MM, multiple myeloma; mmUD, mismatched unrelated donor; MPN, myeloproliferative neoplasm; MRD, matched related donor; MUD, matched unrelated donor; NHL, non-Hodgkin lymphoma; ns, not significant; PBSC, peripheral blood stem cell; RIC, reduced-intensity conditioning; Tac-MTX, tacrolimus-methotrexate; Tac-Sir, tacrolimus-sirolimus; Tac-Sir-MTX, tacrolimus-sirolimus-methotrexate.

with the opportunity to better understand interactions between T cells and B cells that occur in the GC during autoimmune diseases,^{22,23} infections,^{24,25} and vaccine responses.^{26,27}

The present studies were undertaken to examine the phenotype and function of cTFH in patients with cGVHD. Although cTFH are reduced in cGVHD, cTFH express high levels of activation markers and exhibit high levels of functional helper activity for both autologous B cells and allogeneic B cells from healthy donors. In patient samples, phenotypic measures of cTFH activation were significantly correlated with markers of B-cell activation in vivo. These findings suggest that cTFH contribute to sustained activation of B cells and therefore play an important role coordinating T- and B-cell responses in patients with cGVHD.

Material and methods

Patient characteristics

Laboratory studies were performed on fresh samples from 66 patients who underwent allogeneic HSCT at the Dana-Farber Cancer Institute and Brigham and Women's Hospital (Boston, MA). Clinical characteristics of these patients are summarized in Table 1. cGVHD grade was established at the time of sample collection using National Institutes of Health guidelines.²⁸ Clinical manifestations of cGVHD are summarized in Table 2. Resolved cGVHD was defined as the absence of any clinically active disease without steroid therapy at the time of sample collection. Among 12 patients with resolved cGVHD, 2 patients were

receiving immunosuppressive treatment (1 tacrolimus [Tac], 1 sirolimus [Sir]). Peripheral blood samples were also obtained from 22 healthy stem cell transplant donors. All patients and healthy donors were enrolled in clinical research protocols approved by the Human Subjects Protection Committee of the Dana-Farber/Harvard Cancer Center. Written informed consent was obtained prior to sample collection, in accordance with the Declaration of Helsinki. Boston Children's Hospital Institutional Review Board approval was obtained to receive discarded fresh tonsil tissue after elective tonsillectomy.

Sample processing

Blood samples anticoagulated with EDTA were processed within 6 hours of collection. Samples were centrifuged for 15 minutes at 2000 rpm to collect plasma which was stored at -80°C . Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using density gradient centrifugation (Ficoll-Hypaque; GE Healthcare). Fresh tonsils were cut into 5-mm tissue blocks and mechanically disrupted through a 70- μm cell strainer. Tonsil mononuclear cells were separated by density gradient centrifugation and washed twice before being cryopreserved.

Flow cytometry

PBMCs were stained at 4°C for 20 minutes with fluorochrome-conjugated antibodies to characterize cTFH and B cells. The following reagents were used: CD3 (clone UCHT1), CD4 (SK3), CXCR5 (RF8B2), CXCR3 (1C6/CXCR3), CCR6 (11A9), CD38 (HIT2) from BD Biosciences; CD45RA (IMU2711) from Beckman; ICOS (C398.4A), PD-1 (EH12.2H7), CD19 (HIB19), immunoglobulin D (IgD; IA6-2) from BioLegend; and CD27 (O323) from

Table 2. Clinical characteristics of cGVHD in the study population

	Mild N = 15	Moderate N = 14	Severe N = 9	Resolved N = 12
Mucosal, oral and/or genital (%)	8 (53)	11 (78)	7 (77)	
Scleroderma (%)	0	3 (21)	3 (33)	
Lung (%)	0	0	5 (55)	
Immunosuppressive therapy at sample collection (%)	7 (47)	10 (71)	7 (77)	1 (8)
Steroid treatment (%)	5 (33)	5 (35)	6 (66)	0
Mean steroid dose, mg/kg/d	0.108	0.142	0.276	0
Mean time between resolution and sample collection, mo	—	—	—	28.9

eBioscience. To measure proliferation, PBMCs were stained with antibodies directed against intracellular antigen Ki67 (B56; BD) using the FoxP3 kit (eBioscience). Susceptibility to apoptosis was evaluated by staining for BCL-2 (BCL-2/100; BD) and CD95/Fas (DX2; BioLegend). For cytokine flow cytometry, sorted subsets were stimulated with phorbol myristate acetate (50 ng/mL), ionomycin (1 μ M; from Sigma-Aldrich) in the presence of Brefeldin A (BD) for 4 hours. Cells were then fixed and permeabilized with the BD Cytofix/Cytoperm kit and stained with cytokine-specific antibodies: interferon- γ (IFN- γ ; clone B27), and IL-17 (clone N49-653) from BD and IL-4 (clone MP4-25D2) from BioLegend. Flow cytometry standards and quality controls were run regularly to ensure stability of the analytical instruments. A minimum of 200 000 events were recorded in the lymphocyte gate. Cells were analyzed using LSR Fortessa (BD Bioscience) and FlowJo v.10 software (Treestar).

T-cell-B-cell coculture

PBMCs were enriched for either memory CD4⁺ T cells or B cells using the MACS kit (Miltenyi Biotec) and subsequently stained for flow sorting using the FACSaria (BD Biosciences). Cells were purified based on the following markers: cTFH (CD19⁻CXCR5⁺CD4⁺CD45RA⁻ T cells), non-TFH (CD19⁺CXCR5⁻CD4⁺CD45RA⁻ T cells), naive B cells (CD3⁻IgD⁺CD27⁻CD19⁺), and memory B cells (CD3⁻CD27⁺CD19⁺). Sorted populations were confirmed to be >95% pure. Subsets were plated at 20 000 cells per well, at a 1:1 ratio, in RPMI 1640 medium containing L-glutamine, penicillin, streptomycin, 10% fetal bovine serum, and 1 μ g/mL staphylococcal enterotoxin reduced (SEB; Toxin Technology) for up to 12 days. Plasmablast differentiation (CD27^{hi}CD38^{hi} B cells) was assessed at day 6. IgG and IgM were measured at day 10.²²

ELISA

CXCL13 was measured in plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's protocols (R&D Systems). IgG and IgM were measured in culture supernatant using ELISA kits (Bethyl Laboratories). Samples were tested in duplicate along with standards and calibrator controls provided by the manufacturer.

Statistical analysis

Baseline clinical characteristics were compared between groups using either the Fisher exact test or the χ^2 test for categorical variables or the Wilcoxon rank-sum test for continuous variables. Phenotypic and functional data were compared using the (exact) Wilcoxon rank-sum test for unpaired group comparison and the Wilcoxon signed-rank test for paired comparison. Univariable linear regression analysis was performed for factors listed in Tables 1-2 to identify those that were associated with the frequency of cTFH. Factors that were significant at the 0.1 level from the univariable analysis were included in the multivariable analysis. Prior to analysis, the normality assumption was examined and absolute cTFH values were natural log-transformed to meet the normality assumption. Due to the colinearity between epithelial cGVHD and cGVHD status at sample collection, these variables were included separately in 2 multivariable models. Correlation studies were performed using the nonparametric Spearman-rank test and various smoothing techniques were used in graphical presentation of correlation.²⁹ All tests were 2-sided at the significance level of 0.05 and multiple comparisons were not considered. All statistical analyses were performed using SAS version 9.2 (SAS Institute) and R version 3.1.3 (the Comprehensive R Archive Network [CRAN] Project). All graphs were made using either R or Prism software (GraphPad).

Results

Altered cTFH frequency and numbers during cGVHD

To characterize cTFH in cGVHD, we examined fresh blood samples from 22 healthy donors and a cohort of 66 patients at least 9 months after HSCT (Tables 1-2). Within the patient cohort, 16 had no cGVHD, 12 had resolved cGVHD, and 38 had active cGVHD at the time of testing. Overall, the frequency of cTFH was significantly decreased after HSCT compared with healthy donors (median, 9.87% vs 13.65% of CD4 T cells; $P = .001$). The frequency of cTFH was decreased in

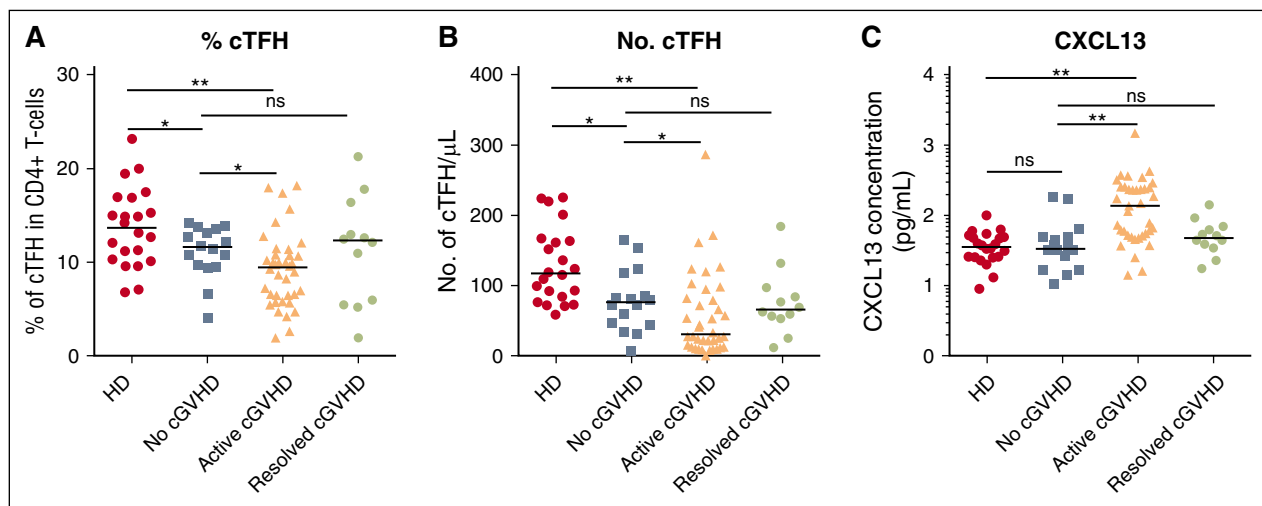


Figure 1. Abnormal cTFH values and CXCL13 levels in patients with active cGVHD. (A) Frequency of cTFH (CXCR5⁺CD45RA⁻ within CD4⁺ T cells) in healthy donors (HD), patients with no cGVHD, active cGVHD, and resolved cGVHD. (B) Absolute number of cTFH (CXCR5⁺CD45RA⁻CD4⁺ T cells) in the different clinical groups. (C) CXCL13 plasma concentration (pg/mL) was measured by ELISA and plotted for each patient group. Data were log₁₀ transformed. Black bar represents median value for each group. The Wilcoxon rank-sum test was used. * $P < .05$; ** $P < 10^{-4}$. ns, not significant.

Table 3. LS linear regression analysis for factors associated with percentage of cTFH in all HSCT patients

Clinical factors	Contrast	Univariable			Multivariable		
		LS mean difference	STDERR	P	LS mean difference	STDERR	P
Age	≥50 vs <50 y old	-1.85	1.09	.09	-1.33	1.08	.22
Conditioning intensity	RIC vs MAC	-2.54	1.12	.026	-1.61	1.27	.21
GVHD prophylaxis	(Tac/Sir or Tac/Sir/MTX) vs Tac/MTX	-2.52	1.00	.015	-2.14	0.97	.03
cGVHD status at sample collection	Active vs (none or resolved)	-1.98	1.02	.055	-1.99	0.98	.046
"Epithelial" cGVHD	Gut/scleroderma/skin vs others	-3.35	0.97	.001	-3.19	0.94	.001

Other variables that were examined in univariable regression analysis were patient sex, donor type, graft source, and aGVHD grade II-IV. *P* values for these variables were >.1. In multivariable analysis, variables with *P* < .1 from the univariable analysis were included to avoid overfitting the model. *P* values shown in bold represent significant values.

LS, least squares; LS mean difference, least squares (marginal) mean difference between 2 groups; STDERR, standard error of the LS mean difference.

patients with active cGVHD compared with patients without cGVHD (median, 9.44% vs 11.65% of CD4 T cells; *P* = .03) (Figure 1A). Comparisons based on absolute numbers of cTFH showed a median twofold difference (30.65 vs 76.45 cTFH per μ L, respectively) that was also significant (*P* = .038) (Figure 1B). In contrast, cTFH in patients with resolved cGVHD was similar to patients without cGVHD. Further multivariable linear regression analysis confirmed that active cGVHD was a significant factor for low percentage of cTFH after adjusting for other transplant characteristics (*P* = .046) (Table 3). When cGVHD site was examined, cGVHD involving the gastrointestinal track, skin, and sclerodermatous cGVHD were each significantly associated with lower percentage of cTFH. Combining these 3 sites as "epithelial cGVHD" was the strongest predictor of low percentage of cTFH in univariable and multivariable analysis (*P* = .001). The other factor that affected percentage of cTFH in multivariable analysis was acute GVHD prophylaxis (*P* = .03). Patients who received Tac/Sir \pm methotrexate (MTX) had a significantly lower percentage of cTFH (9% vs 11.52%, *P* = .015 from univariable analysis) and absolute numbers of cTFH (32.4 vs 82.1, *P* = .0003) compared with those who received Tac/MTX.

cTFH are characterized by expression of CXCR5, a receptor for CXCL13 chemokine. CXCL13-CXCR5 interaction promotes homing of TFH to lymphoid follicles, facilitating contact between TFH and B cells. CXCL13 levels in our cohort were significantly increased in patients with active cGVHD compared with patients with no cGVHD

(137.7 pg/mL vs 33.74 pg/mL, *P* < 10^{-4}) (Figure 1C). CXCL13 levels in patients with resolved cGVHD were similar to levels in patients without cGVHD and healthy donors.

cTFH are activated during cGVHD

Functionally active TFH in lymphoid tissues express high levels of ICOS and PD-1 (supplemental Figure 1A, available on the *Blood* Web site). However, few activated cTFH are present in peripheral blood in healthy donors (supplemental Figure 1C).^{24,25} In contrast, ICOS^{hi}PD-1^{hi} cTFH are increased in patients with active cGVHD compared with healthy donors (2.035% vs 0.59% for HD, *P* < 10^{-4}) (Figure 2A). The frequency of ICOS^{hi}PD-1^{hi} cTFH in patients with active cGVHD was also increased compared with patients with no cGVHD (2.035% vs 1.065%, respectively, *P* = .028) but was similar in patients with resolved cGVHD and no cGVHD. The frequency of ICOS^{hi}PD-1^{hi} cTFH did not correlate with the clinical grade of cGVHD. This may reflect the impact of steroid use, which was more frequent in patients with severe cGVHD (Table 2).³⁰ As shown in Figure 2B, the activation profile of cTFH in patients with active cGVHD is associated with higher proliferative activity measured by Ki67 (3.83% active cGVHD vs 2.31% no cGVHD, *P* = .01). Proliferation of cTFH in patients with no cGVHD was increased compared with healthy donors (*P* = .033), but cTFH proliferation in resolved cGVHD was not significantly increased

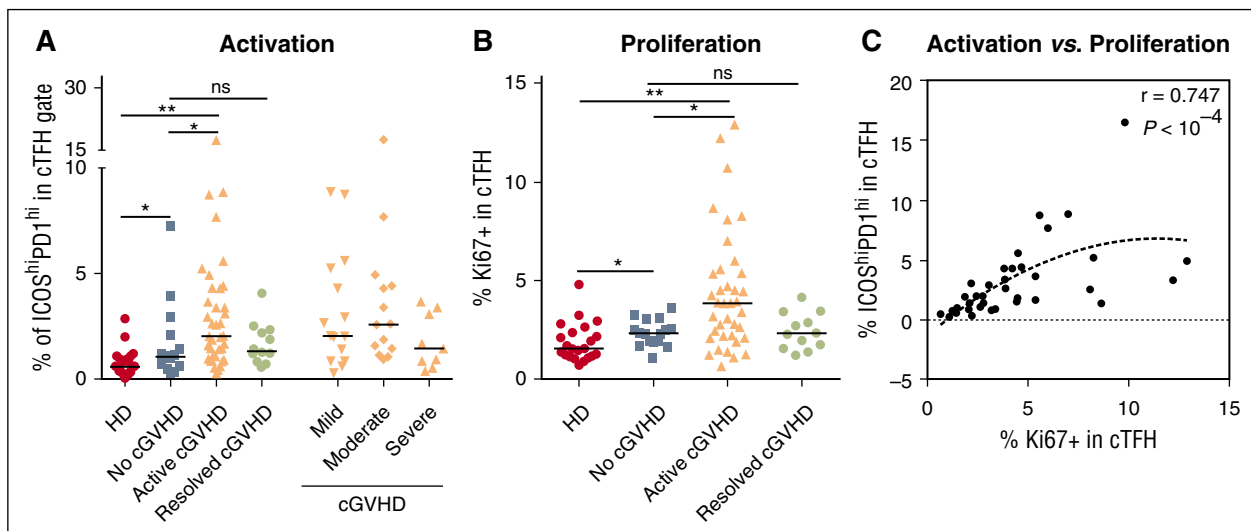


Figure 2. cTFH are activated and proliferate in patients with active cGVHD. (A) Frequency of ICOS^{hi}PD-1^{hi} in cTFH (CXCR5⁺CD45RA⁻CD4⁺ T cells) was determined in different patient groups. (B) Ki67 expression within cTFH (CXCR5⁺CD45RA⁻CD4⁺ T cells) was determined in different patient groups. (C) Positive correlation between proliferation and frequency of highly activated ICOS^{hi}PD-1^{hi} cTFH in the active cGVHD group. Black bar represents median value for each group. The Wilcoxon rank-sum test was used in panels A and B. The Spearman test was used in panel C. **P* < .05; ***P* < 10^{-4} . The gating strategy for identifying ICOS^{hi}PD-1^{hi} in cTFH is shown in supplemental Figure 1.

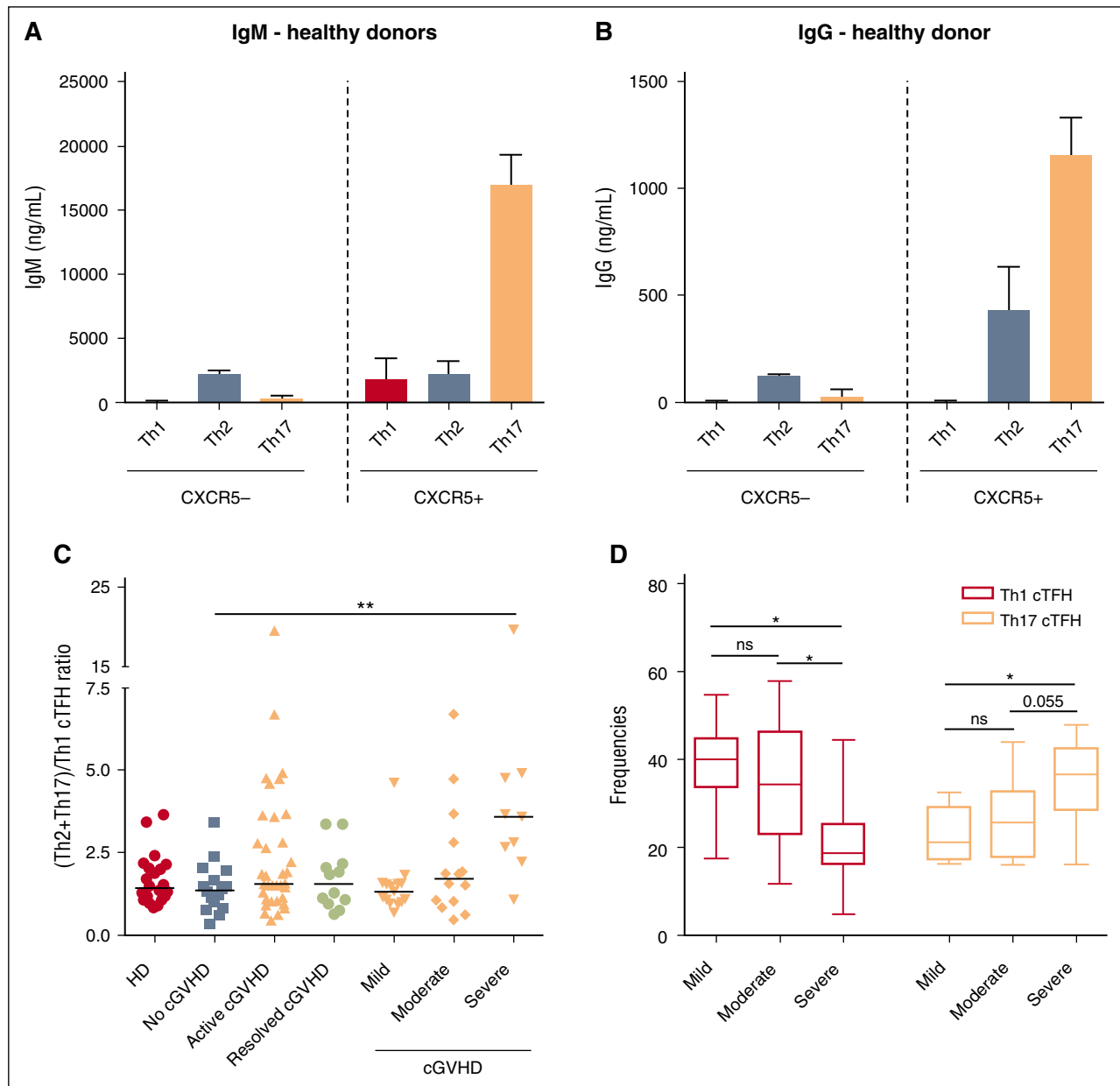


Figure 3. Function of cTFH subsets and relative distribution after HSCT. (A) IgM production by naive B cells (IgD^+CD27^-) after in vitro coculture with different subsets of cTFH ($CXCR5^+$) and non-TFH ($CXCR5^-$) cells. (B) IgG production by naive B cells (IgD^+CD27^-) after in vitro coculture with different subsets of cTFH ($CXCR5^+$) and non-TFH ($CXCR5^-$) cells. $N = 3$. Graphs represent mean and standard deviation (SD). (C) Ratio of (Th2+Th17)/Th1 cTFH subsets in different patient groups. Black bars represent median values for each group. (D) Whisker plots represent frequency of Th1 (blue) and Th17 (red) cTFH subsets in patients with different severity of cGVHD. Exact Wilcoxon rank-sum test was used. ns, not significant; * $P < .05$; ** $P < 10^{-4}$.

($P = .057$). Notably, proliferative activity is highly correlated with the frequency of $ICOS^{hi}PD-1^{hi}$ cTFH (Spearman, $r = 0.747$; $P < 10^{-4}$) in the active cGVHD cohort (Figure 2C).

cTFH T helper subset homeostasis is altered in cGVHD

Previous studies have defined distinct CD4 T-cell subsets based on expression of CXCR3 and CCR6 as follows: T helper 1 (Th1) ($CXCR3^+CCR6^-$), Th2 ($CXCR3^-CCR6^-$), Th17 ($CXCR3^-CCR6^+$), and Th⁺⁺ ($CXCR3^+CCR6^+$).²² Our studies confirmed that Th1, Th2, and Th17 subsets within cTFH are each characterized by a distinct cytokine expression profile. Th1 cTFH express high levels of IFN- γ ; Th2 cTFH express IL-4; and Th17 cTFH express IL-17 (supplemental

Figure 2). The functional capacity of cTFH and non-cTFH subsets was examined by evaluating the ability of each subset to induce secretion of IgM and support class-switch secretion of IgG by naive B cells. As expected, non-cTFH ($CXCR5^-$) provided little or no B-cell help (Figure 3A-B). The Th17 cTFH subset was the primary subset capable of inducing IgM secretion, immunoglobulin heavy chain class switching, and IgG secretion by naive B cells. The Th2 cTFH subset also demonstrated functional capacity for induction of IgG secretion (Figure 3B) but the Th1 cTFH subset provided no support for either IgM or IgG secretion.

After transplant, the relative distribution of functional cTFH subsets was altered in patients with cGVHD. Within cTFH, we used the ratio (Th2+Th17) to Th1 to evaluate the capacity for B-cell help in each

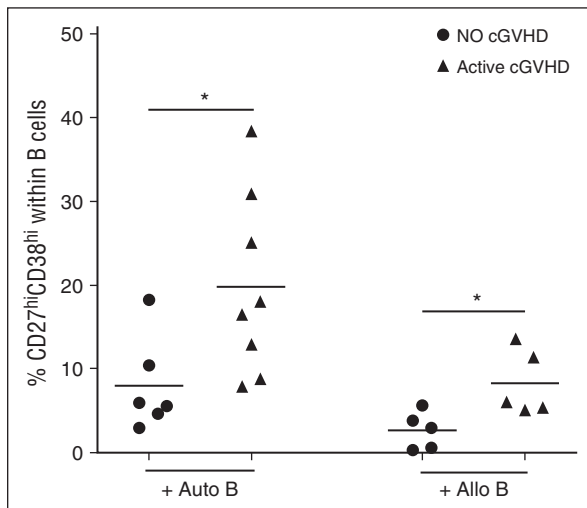


Figure 4. Increased cTFH function in patients with active cGVHD. Frequency of plasmablasts (CD27^{hi}CD38^{hi} B cells) was measured after naive B cells were cultured with cTFH in the presence of SEB for 6 days. Circulating TFH were purified by cell sorting (purity >95%) from fresh patient samples and cultured with autologous naive (IgD⁺CD27⁻) B cells (Auto B) or naive B cells from an allogeneic healthy donor (Allo B). Results are compared for cTFH obtained from patients with no cGVHD (n = 6, for the autologous condition; n = 5 for the allogeneic condition) or active cGVHD (n = 8 for the autologous condition; n = 5 for the allogeneic condition). Black bars represent median values for each group. Exact Wilcoxon rank-sum test was used. *P < .05.

patient sample. This ratio was not significantly different among active, none, and resolved cGVHD groups and was similar to healthy donors (Figure 3C). However, when frequencies of Th1 and Th17 cTFH were examined among cGVHD patients, there was an inverse linear relationship between Th1 cTFH ($P = .0011$) and clinical grade of cGVHD and a positive linear relationship between Th17 cTFH and clinical grade ($P = .0013$) (Figure 3D). Furthermore, the (Th2+Th17)-to-Th1 ratio was significantly higher in severe cGVHD compared with no cGVHD (3.59 vs 1.365, $P = .0006$) (Figure 3C). We also found that highly activated ICOS^{hi}PD-1^{hi} cTFH were significantly increased within the CXCR3⁻ fraction (Th2+Th17) in patients with active cGVHD compared with the no cGVHD group (1.47% vs 0.83%; $P = .01$) (data not shown). Taken together, these results show that cTFH homeostasis is skewed toward predominance of activated Th2 and Th17 subsets in patients with active severe cGVHD.

Enhanced function of cTFH in patients with cGVHD

To examine the functional capacity of cTFH after transplant, we established a functional assay to measure the ability of cTFH to induce naive B-cell differentiation to mature plasmablasts. In this assay, cTFH are purified by cell sorting and incubated with naive B cells purified from the same sample. As shown in Figure 4, cTFH from patients with active cGVHD induced significantly greater plasmablast differentiation than cTFH from patients without cGVHD when cultured with autologous naive B cells ($P = .029$). Because previous studies demonstrated that B cells are constitutively activated in cGVHD, this finding may simply reflect increased sensitivity of B cells to external stimulation in these patients.¹² We therefore also examined the functional capacity of patient cTFH to induce plasmablast differentiation of naive B cells from healthy donors. In these experiments, cTFH from patients with active cGVHD also induced greater plasmablast differentiation from normal naive B cells ($P = .032$). Clinical characteristics of patients used for functional experiments are summarized in supplemental Table 1. Taken together,

these data indicate that cTFH in patients with cGVHD exhibit increased functional activity for B-cell help.

Altered phenotype of cTFH correlates with B-cell phenotype during cGVHD

Previous studies have demonstrated that active cGVHD is associated with higher levels of CD27⁺ B cells including both IgD⁺CD38^{hi} and IgD⁻CD38^{hi} subsets.⁴ TFH support differentiation of B cells into plasmablasts, and we therefore examined whether the altered cTFH signature we identified in active cGVHD was correlated with B-cell phenotype in these patients. In this analysis, the total number of CD27⁺ B cells was strongly correlated with the number of highly activated ICOS^{hi}PD-1^{hi} cTFH ($r = 0.68$, $P < 10^{-4}$) (Figure 5A). Within cTFH, the Th1 subset is CXCR3⁺ whereas the Th2 and Th17 subsets are CXCR3⁻. Thus, cTFH subsets with increased B-cell help capacity can be phenotypically defined as CXCR3⁻. As shown in Figure 5B-C, the proliferative activity (Ki67) of cTFH and CXCR3⁻ cTFH correlated with the generation of CD27^{hi}CD38^{hi} B cells ($r = 0.48$, $P = .0029$ and $r = 0.57$, $P = .0002$, respectively). Similarly, the number of highly activated ICOS^{hi}PD-1^{hi} cTFH was strongly correlated with the generation of CD27^{hi}CD38^{hi} B cells ($r = 0.70$, $P < 10^{-4}$) (Figure 5D) and the frequency of CXCR3⁻ICOS^{hi}PD-1^{hi} cTFH with high B-cell help capacity correlated well with blood plasmablast count ($r = 0.48$, $P = .0024$) (Figure 5E).

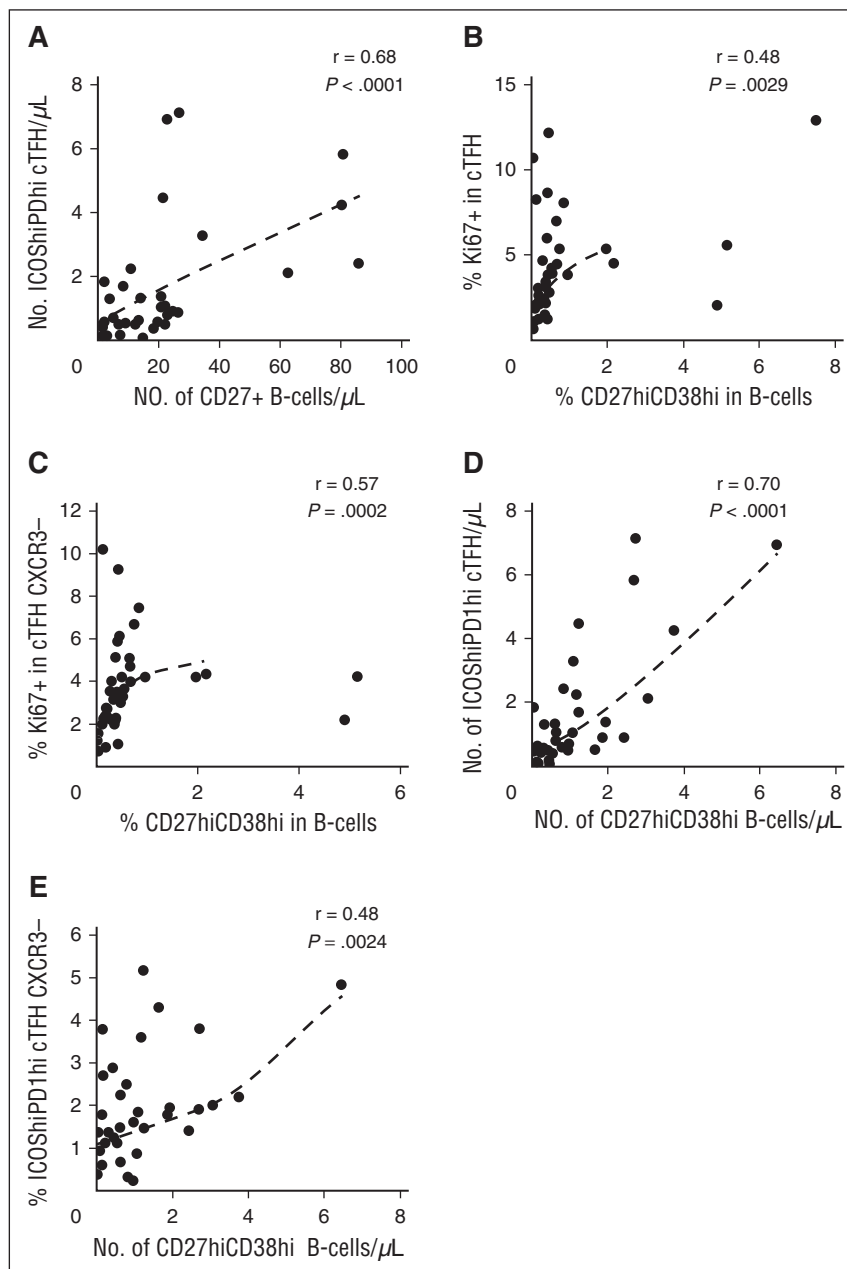
Discussion

Patients with cGVHD frequently develop IgG antibodies directed at minor histocompatibility antigens in the recipient.^{14,15,31} In individual patients, these specific B-cell responses have been associated with clonal T-cell responses directed against different peptide epitopes contained within the same antigen.^{32,33} These observations suggest that cGVHD is associated with coordinated T- and B-cell responses directed against allogeneic target antigens. Coordinated T- and B-cell responses have also been observed in murine models, where TFH cells are required for the development of immune pathology characteristic of cGVHD.⁸ Lymphoid TFH play a key role in promoting B-cell maturation leading to the generation of long-lived plasma cells that produce high-affinity IgG antibodies. Because cTFH exhibit many phenotypic and functional characteristics of resident TFH it was possible to examine the potential role of these cells in promoting B-cell immunity in cGVHD.

After HSCT, the percentage of cTFH was significantly lower in patients with active cGVHD compared with patients without cGVHD. Abnormal homing and trafficking of cTFH in patients with cGVHD could explain this decrease and led us to measure levels of CXCL13 in the same patients. In previous studies, increased levels of CXCL13 were found in patients with autoimmune diseases and high levels correlated with disease activity.^{34,35} After HSCT, increased plasma levels of CXCL13 were only present in patients with active cGVHD. CXCL13 levels in patients without cGVHD or resolved cGVHD were similar to levels in healthy donors. These results suggest that the lower frequency of cTFH in active cGVHD could reflect increased trafficking and retention of cTFH in lymphoid organs induced by CXCL13.

Activated TFH in secondary lymphoid organs express high levels of ICOS (CD278) and PD-1 (CD279). These immune-regulatory molecules are also expressed on cTFH, and their level of expression reflects the activation status of cTFH.^{36,37} ICOS, a CD28-superfamily costimulatory molecule, has been shown to play a key role in TFH

Figure 5. cTFH signature correlates with plasmablast generation in patients with cGVHD (N = 38). (A) Correlation between number of activated cTFH (ICOS^{hi}PD-1^{hi} CXCR5⁺CD45RA⁻CD4⁺ T cells) and number of circulating CD27⁺ B cells in patient samples. (B) Correlation between cTFH proliferation (%Ki67) and percentage of plasmablasts (CD27^{hi}CD38^{hi}) in patient samples. (C) Correlation between proliferation (%Ki67) of CXCR3⁻ cTFH and percentage of plasmablasts (CD27^{hi}CD38^{hi}) in patient samples. (D) Correlation between number of activated cTFH (ICOS^{hi}PD-1^{hi}) and number of plasmablasts (CD27^{hi}CD38^{hi}) in patient samples. (E) Correlation between percentage of activated CXCR3⁻ cTFH (ICOS^{hi}PD-1^{hi}) and number of plasmablasts (CD27^{hi}CD38^{hi}) in patient samples. The Spearman test was used.



commitment.³⁸ PD-1 is a negative regulator of TFH activity.³⁹ However, PD-1^{hi} cTFH displays high levels of “helper” function.³⁷ In our analysis, some cTFH exhibited a highly activated ICOS^{hi}PD-1^{hi} phenotype that was similar to activated TFH in GC. This ICOS^{hi}PD-1^{hi} subset within cTFH was 2 times more prevalent in patients with active cGVHD compared with patients without cGVHD. These cTFH were also highly proliferative and the level of activation correlated with their level of proliferation.

In healthy donors, cTFH are composed of Th1, Th2, and Th17 subsets, each with distinct functional capacity. In our study, both Th2 and Th17 cTFH subsets were able to promote class switching and induce IgG secretion from naive B cells. Th2 and Th17 subsets are therefore the primary cTFH subsets that provide B-cell “help”. In patients with active cGVHD, the ratio of (Th2+Th17)-to-Th1 cTFH was increased in severe cGVHD and the proportional

increase in Th17 cTFH was positively correlated with clinical disease activity. In contrast, Th1 cTFH are proportionally increased in patients with active cGVHD. Th1 cTFH secrete IFN- γ but do not secrete IL-4 or IL-17, the primary cytokines that support B-cell function and immunoglobulin class switching.^{22,25,26,40} This finding explains why Th1 cTFH provide little B-cell help. However, Th1 cTFH may also negatively regulate B-cell function. Notably, IFN- γ rapidly induces expression of PD-L1 on antigen-presenting cells, thus providing a negative costimulatory signal for TFH that expresses high levels of PD-1.^{39,41} Thus, Th1 cTFH may represent an important regulatory subset, and increased levels of this subset after HSCT may prevent B-cell activation by other cTFH subsets and suppress cGVHD.

When coculturing cTFH with autologous naive B cells, we found greater levels of plasmablast generation in patients with

active cGVHD compared with patients without cGVHD. Because B cells are aberrantly activated in cGVHD,^{10,12,13} this observation could reflect *in vivo* priming and increased sensitivity of patient B cells to cTFH. To exclude the effect of *in vivo* B-cell priming, we carried out cocultures with patient cTFH and naive B cells from a healthy donor. Moreover, the same B cells were used in assays with different patient cTFH to normalize the evaluation of cTFH activity. Although the magnitude of B-cell maturation was less, cTFH from patients with active cGVHD also induced greater plasmablast differentiation from normal B cells.

The maintenance of T-cell alloreactivity is a dynamic process, which is influenced by the ability of activated cells to resist apoptosis. Cell death mechanisms through either extrinsic (CD95/Fas) or intrinsic (BCL-2) apoptosis pathways have thus been shown to play a role in the differential regulation of different T-cell subsets.^{42,43} BCL-2 is a critical antiapoptotic molecule that protects mitochondrial integrity during activation of the intrinsic apoptosis pathway. In murine models, BCL-2 helps to protect activated TFH from negative regulation.⁴⁴ In healthy donors, we observed that Th2 and Th17 cTFH subsets express higher levels of BCL-2 than Th1 cTFH. Although differences were relatively small, the expression of BCL-2 in Th2 and Th17 cTFH was significantly increased in patients with active cGVHD compared with patients without cGVHD (data not shown). Consistent with results in murine models, these observations suggest that BCL-2 preferentially promotes the survival of cTFH subsets that provide increased levels of B-cell help.⁴⁴ In contrast to BCL-2, CD95/Fas initiates death receptor-induced apoptosis through the extrinsic pathway. In healthy donors, CD95 is highly expressed on memory T cells, and these subsets are more susceptible to extrinsic pathway apoptosis. Similar to other memory T cells, cTFH express relatively high levels of CD95. CD95 expression is increased with cTFH activation and Th17 cTFH express higher levels of CD95 than other cTFH subsets. Nevertheless, CD95 expression in cTFH was similar in patients with and without cGVHD (data not shown). Although high level expression of CD95 likely serves to limit the survival of activated cTFH, expression of CD95 is not altered in cGVHD.

The altered cTFH signature we observed in patients with active cGVHD reflects significantly increased levels of cTFH activation, survival, and functional capacity for B-cell help. To examine whether these phenotypic measures of cTFH activity were translated into an actual effect on B cells *in vivo*, we examined our data for correlations between measures of cTFH activity and B-cell phenotypes. This analysis confirmed that several measures of cTFH activity were significantly correlated with either the number or proportion of memory B cells in patient samples. In particular, the proportion of ICOS^{hi}PD-1^{hi}cTFH and CXCR3⁻ICOS^{hi}PD-1^{hi} cTFH subsets was highly correlated with the percentage and absolute numbers of peripheral plasmablasts, respectively. These correlations provide further evidence that increased levels of cTFH activation and functional activity result in altered B-cell homeostasis and promote increased B-cell maturation in patients with cGVHD. Interestingly, patients with cGVHD often present with hypogammaglobulinemia. However, B cells from patients with cGVHD patients produce greater amounts of IgG when stimulated *ex vivo* when compared with B cells from patients without cGVHD.⁴ In murine models IgG antibodies are deposited in tissues associated with cGVHD and this may explain the lower levels of immunoglobulin in plasma in patients with active disease.⁷ Taken together, these data

suggest that increased cTFH activity promotes B-cell help leading to antibody production and deposition in damaged tissues. Alternatively, hypogammaglobulinemia may be due to chronic immune-suppressive therapy in these patients.

In summary, our studies provide new evidence that TFH play an important role in the coordination of T- and B-cell immunity in cGVHD. Although previous studies established that both donor T cells and B cells contribute to immune pathology associated with cGVHD, it was not known how these 2 arms of the adaptive immune system coordinated their attack on recipient cells. The identification of TFH as a key component of this coordinated response also suggests that known mediators of TFH functions play important roles in the regulation of these TFH–B-cell interactions. More specifically, TFH functions rely heavily on molecules that mediate homing to lymphoid organs (CXCL13/CXCR5) and specific signaling pathways and cytokines (ICOS, PD-1, CD40L, IL-21) that mediate T–B-cell collaborations. Specific targeting of these molecules may offer new therapeutic opportunities that may improve upon current strategies that rely primarily on pan-B-cell depletion. Although pan-B-cell depletion offers some benefit for patients with cGVHD, clinical improvement is often limited to only a fraction of patients.^{16,18} Targeting TFH–B-cell interactions is being developed as a therapy for autoimmune diseases and this may also be an effective strategy in patients with cGVHD.^{44–47}

Acknowledgments

The authors thank Kristen Cowens, Steven Paula, Suzan Lazo-Kallanian, and John Daley for excellent assistance with flow cytometry studies and cell sorting, Lauren Gaffny and Doreen Hearsey for their support in obtaining human samples, and M. Fleming and H. Kozakewich for providing human tonsil specimens.

This work was supported by National Institutes of Health, National Cancer Institute grants P01CA142106, CA183559, CA183560, Leukemia and Lymphoma Translational Research Grant 6462-15, and the MD-PhD Program (Bordeaux Teaching Hospital, France).

Authorship

Contribution: E.F. performed experiments; E.F. and J.R. designed the study, analyzed data, and wrote the manuscript; H.T.K. performed statistical analysis; K.W., A.C.A., and B.R.B. analyzed and interpreted data; C.C., S.N., J.K., V.T.H., P.A., E.P.A., R.J.S., and J.H.A. provided samples; and all authors contributed to editing and reviewed the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: J.K. received research funding from Prometheus Labs, Otsuka Pharmaceuticals, Millennium Pharmaceuticals; served on advisory boards for Kadmon Corp, Takeda Pharmaceuticals; and received honoraria from Miltenyi Biotec GmbH. The remaining authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Jerome Ritz, Dana-Farber Cancer Institute, 450 Brookline Ave, Boston, MA 02215; e-mail: jerome_ritz@dfci.harvard.edu.

References

- Socié G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2014;124(3):374-384.
- Devine SM, Carter S, Soiffer RJ, et al. Low risk of chronic graft-versus-host disease and relapse associated with T cell-depleted peripheral blood stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia in first remission: results of the blood and marrow transplant clinical trials network protocol 0303. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(9):1343-1351.
- Soiffer RJ, Lerademacher J, Ho V, et al. Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Blood*. 2011;117(25):6963-6970.
- Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, et al. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;113(16):3865-3874.
- Kuzmina Z, Krenn K, Petkov V, et al. CD19(+) CD21(low) B cells and patients at risk for NIH-defined chronic graft-versus-host disease with bronchiolitis obliterans syndrome. *Blood*. 2013;121(10):1886-1895.
- Sarantopoulos S, Blazar BR, Cutler C, Ritz J. B cells in chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(1):16-23.
- Srinivasan M, Flynn R, Price A, et al. Donor B-cell alloantibody deposition and germinal center formation are required for the development of murine chronic GVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood*. 2012;119(6):1570-1580.
- Flynn R, Du J, Veenstra RG, et al. Increased T follicular helper cells and germinal center B cells are required for cGVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood*. 2014;123(25):3988-3998.
- Jacobson CA, Sun L, Kim HT, et al. Post-transplantation B cell activating factor and B cell recovery before onset of chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(5):668-675.
- Sarantopoulos S, Ritz J. Aberrant B-cell homeostasis in chronic GVHD. *Blood*. 2015;125(11):1703-1707.
- de Masson A, Bouaziz JD, Le Buanec H, et al. CD24(hi)CD27+ and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2015;125(11):1830-1839.
- Allen JL, Fore MS, Wooten J, et al. B cells from patients with chronic GVHD are activated and primed for survival via BAFF-mediated pathways. *Blood*. 2012;120(12):2529-2536.
- Allen JL, Tata PV, Fore MS, et al. Increased BCR responsiveness in B cells from patients with chronic GVHD. *Blood*. 2014;123(13):2108-2115.
- Miklos DB, Kim HT, Zorn E, et al. Antibody response to DBY minor histocompatibility antigen is induced after allogeneic stem cell transplantation and in healthy female donors. *Blood*. 2004;103(1):353-359.
- Miklos DB, Kim HT, Miller KH, et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood*. 2005;105(7):2973-2978.
- Cutler C, Miklos D, Kim HT, et al. Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2006;108(2):756-762.
- Kapur R, Ebeling S, Hagenbeek A. B-cell involvement in chronic graft-versus-host disease. *Haematologica*. 2008;93(11):1702-1711.
- Cutler C, Kim HT, Bindra B, et al. Rituximab prophylaxis prevents corticosteroid-requiring chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: results of a phase 2 trial. *Blood*. 2013;122(8):1510-1517.
- Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 2014;41(4):529-542.
- Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med*. 2000;192(11):1545-1552.
- Schaerli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med*. 2000;192(11):1553-1562.
- Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. 2011;34(1):108-121.
- Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2010;62(1):234-244.
- Boswell KL, Paris R, Boritz E, et al. Loss of circulating CD4 T cells with B cell helper function during chronic HIV infection. *PLoS Pathog*. 2014;10(1):e1003853.
- Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, et al; International AIDS Vaccine Initiative Protocol C Principal Investigators. Human circulating PD-1+ CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*. 2013;39(4):758-769.
- Bentebibel SE, Lopez S, Obermoser G, et al. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci Transl Med*. 2013;5(176):176ra32.
- Herati RS, Reuter MA, Dolfi DV, et al. Circulating CXCR5+PD-1+ response predicts influenza vaccine antibody responses in young adults but not elderly adults. *J Immunol*. 2014;193(7):3528-3537.
- Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(12):945-956.
- Venables WN, Ripley BD. *Modern Applied Statistics with S-Plus*. 2nd ed. New York, NY: Springer; 1998.
- Feng X, Wang D, Chen J, et al. Inhibition of aberrant circulating Tfh cell proportions by corticosteroids in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2012;7(12):e51982.
- Nakasone H, Tian L, Sahaf B, et al. Allogeneic HY antibodies detected 3 months after female-to-male HCT predict chronic GVHD and nonrelapse mortality in humans. *Blood*. 2015;125(20):3193-3201.
- Zorn E, Miklos DB, Floyd BH, et al. Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation. *J Exp Med*. 2004;199(8):1133-1142.
- Porcheray F, Miklos DB, Floyd BH, et al. Combined CD4 T-cell and antibody response to human minor histocompatibility antigen DBY after allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation*. 2011;92(3):359-365.
- Festa ED, Hankiewicz K, Kim S, et al. Serum levels of CXCL13 are elevated in active multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2009;15(11):1271-1279.
- Schiffer L, Kämpers P, Davalos-Misslitz AM, et al. B-cell-attracting chemokine CXCL13 as a marker of disease activity and renal involvement in systemic lupus erythematosus (SLE). *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(12):3708-3712.
- Schmitt N, Ueno H. Blood Tfh cells come with colors. *Immunity*. 2013;39(4):629-630.
- He J, Tsai LM, Leong YA, et al. Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5+ CD4+ T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity*. 2013;39(4):770-781.
- Choi YS, Kageyama R, Eto D, et al. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity*. 2011;34(6):932-946.
- Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med*. 2013;19(4):494-499.
- Chevalier N, Jarrossay D, Ho E, et al. CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *J Immunol*. 2011;186(10):5556-5568.
- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26(1):677-704.
- Matsuoka K, Kim HT, McDonough S, et al. Altered regulatory T cell homeostasis in patients with CD4+ lymphopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest*. 2010;120(5):1479-1493.
- Murase K, Kim HT, Bascug OR, et al. Increased mitochondrial apoptotic priming of human regulatory T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2014;99(9):1499-1508.
- McCarron MJ, Marie JC. TGF- β prevents T follicular helper cell accumulation and B cell autoreactivity. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4375-4386.
- Klimatcheva E, Pandina T, Reilly C, et al. CXCL13 antibody for the treatment of autoimmune disorders. *BMC Immunol*. 2015;16(1):6.
- Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 2011;365(22):2055-2066.
- Matsuoka K, Koreth J, Kim HT, et al. Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. 2013;5(179):179ra43.



blood[®]

2016 127: 2489-2497

doi:10.1182/blood-2015-12-688895 originally published
online March 4, 2016

Circulating T follicular helper cells with increased function during chronic graft-versus-host disease

Edouard Forcade, Haesook T. Kim, Corey Cutler, Kathy Wang, Ana C. Alho, Sarah Nikiforow, Vincent T. Ho, John Koreth, Philippe Armand, Edwin P. Alyea, Bruce R. Blazar, Robert J. Soiffer, Joseph H. Antin and Jerome Ritz

Updated information and services can be found at:

<http://www.bloodjournal.org/content/127/20/2489.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Transplantation](#) (2139 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

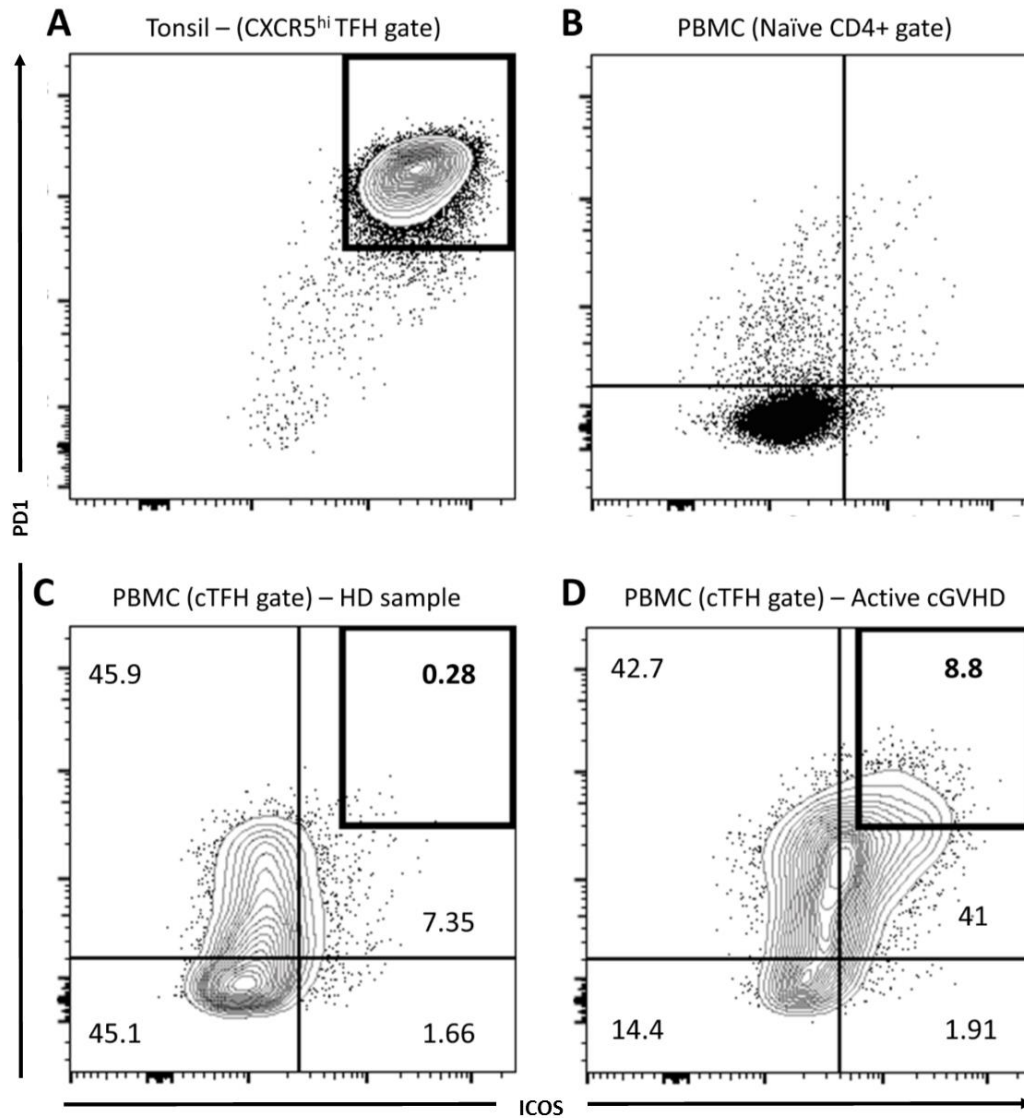
<http://www.bloodjournal.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Supplemental Data

Circulating T Follicular Helper Cells with Increased Function during Chronic Graft- *versus-Host-Disease*

Edouard Forcade^{1,2,3}, Haesook T. Kim^{4,5}, Corey Cutler^{1,2}, Kathy Wang^{1,2}, Ana C. Alho^{1,2}, Sarah Nikiforow^{1,2}, Vincent T. Ho^{1,2}, John Koreth^{1,2}, Philippe Armand^{1,2}, Edwin P. Alyea^{1,2}, Bruce R. Blazar⁷, Robert J. Soiffer^{1,2}, Joseph H. Antin^{1,2} and Jerome Ritz^{1,2,8}

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1: Gating strategy for identification of ICOS^{hi} and PD-1^{hi} cTFH.

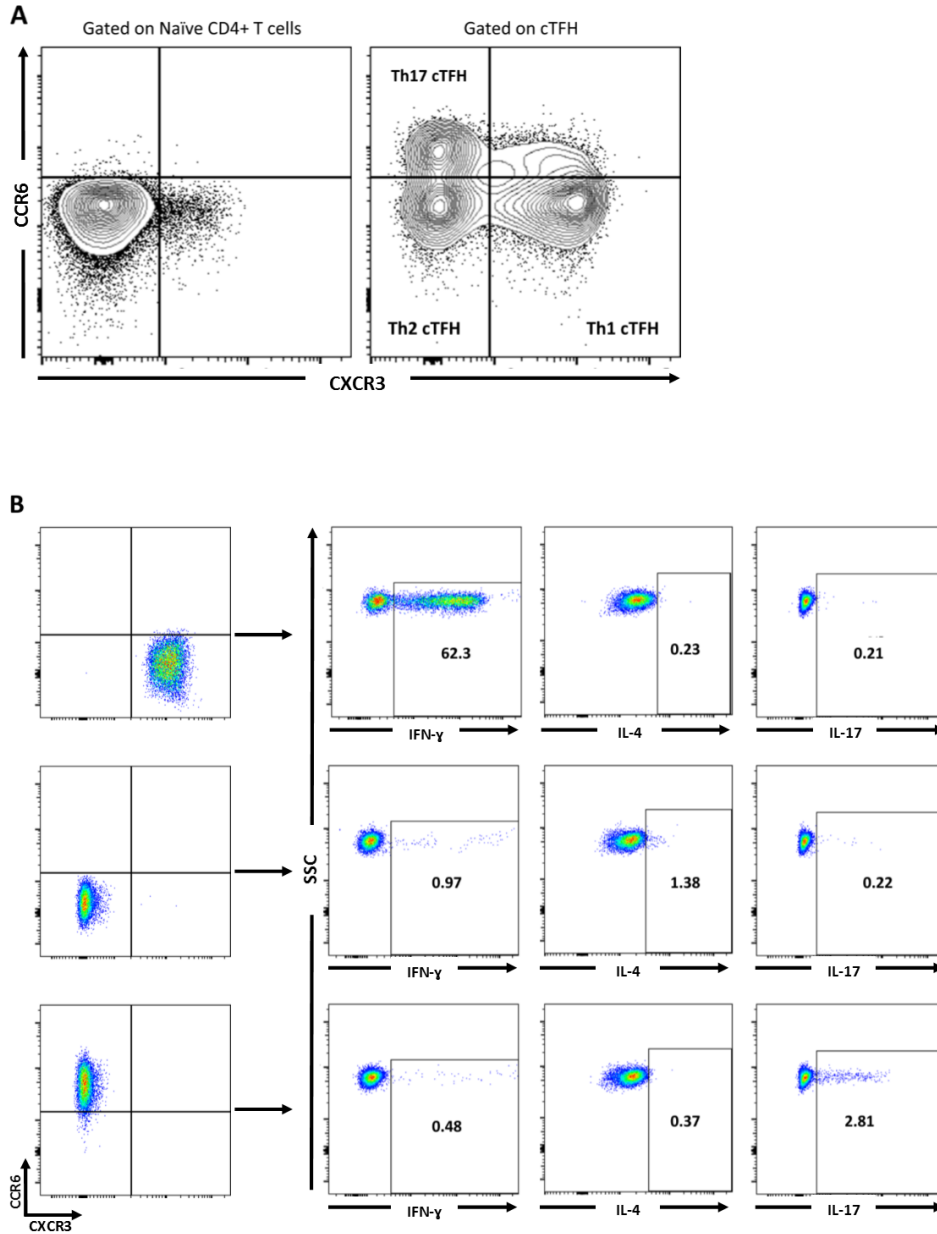
A) Example of a tonsil specimen stained for ICOS and PD-1, gated on CXCR5^{hi}CD45RA⁻CD4⁺ T cells.

B) ICOS/PD-1 gating strategy in PBMC based on naive CD4⁺ T-cells (CD45RA⁺);

C) Example of ICOS/PD-1 staining of PBMC to identify ICOS^{hi}PD-1^{hi} cTFH in a representative healthy donor sample;

D) Example of ICOS/PD-1 staining of PBMC to identify ICOS^{hi}PD-1^{hi} cTFH in a representative chronic GVHD patient sample;

Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 2: Characterization of cTFH Th subsets.

A) Strategy for gating Th subsets within cTFH based on expression of CXCR3 and CCR6. Gates are based on CD45RA⁺CD4⁺ T cells as an internal control.

B) Th1, Th2 and Th17 subsets were sorted and stimulated for 4 hours with PMA-ionomycin, in presence of Brefeldin A, for cytokine profiling. Each cTFH subset secretes different quantities of interferon- γ , IL-4 and IL-17 after in vitro stimulation.

Supplemental Table 1: Clinical characteristics of patients used for assays of cTFH function.

Patient ID	Disease	Conditioning Regimen	Time post SCT (months)	Donor Type	cGVHD	cGVHD grade	Active cGVHD	Organs involved at sample date	Immuno-suppressive treatment
#1	ALL	MAC	24	MRD	YES	Mild	Active	Raynaud syndrome, serositis, ANA titer +	Pred 5mg
#2	MDS	MAC	140	MRD	YES	Moderate	Active	Oral, ocular, esophagus strictures	Tac + Sir
#3	B NHL	RIC	168	URD	YES	Mild	Active	Skin, ocular	Tac + Pred 5mg
#4	B NHL	RIC	38	URD	YES	Mild	Active	Skin, oral	Sir
#5	AML	MAC	38	URD	YES	Mild	Active	Oral, ocular	No
#6	B NHL	RIC	36	URD	NO	N/A	N/A	N/A	N/A
#7	B NHL	RIC	37	MRD	NO	N/A	N/A	N/A	N/A
#8	B NHL	RIC	34	URD	YES	Severe	Active	Genital	No
#9	B NHL	RIC	24	mmURD	NO	N/A	N/A	N/A	N/A
#10	B NHL	RIC	43	URD	NO	N/A	N/A	N/A	N/A
#11	B NHL	RIC	121	MRD	YES	Mild	Resolved	None	No
#12	PMF	MAC	51	URD	YES	Mild	Resolved	None	Sir
#13	AML	RIC	23.5	URD	YES	Moderate	Active	Oral, ocular, tenosynovitis, arthritis, ANA titer +	Tac
#14	AML	MAC	36	URD	YES	Moderate	Active	Oral, fasciitis, eosinophilia	MMF

ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia; MDS: Myelodysplastic Syndrome; B NHL: B type Non Hodgkin Lymphoma; AML: Acute Myeloid Leukemia; PMF: Primary Myelofibrosis; MAC: Myeloablative Conditioning; RIC: Reduced Intensity Conditioning; MRD: Matched Related Donor; URD: Unrelated Donor; mmURD: mismatched Unrelated Donor; ANA titer +: Anti-nuclear Antibody titer positive; Pred: Prednisone; Tac: Tacrolimus; Sir: Sirolimus; MMF: Mycophenolate Mofetil; N/A: Not Applicable.

Article 2

T Follicular Regulatory Cell Deficiency during Chronic Graft-versus-Host Disease is improved by Low-Dose IL-2 Therapy

Edouard Forcade, * Yusuke Kamihara, * Haesook T. Kim, John Koreth, Corey Cutler, Masahiro Hirakawa, Kathy Wang, Ana C. Alho, Sarah Nikiforow, Vincent T. Ho, Philippe Armand, Edwin P. Alyea, Bruce R. Blazar, Robert J. Soiffer, Joseph H. Antin and Jerome Ritz

*EF and YK contributed equally to this work

Manuscrit en cours de préparation

Contexte et Synthèse de l'article

Dans l'article précédent, nous avons apporté des éléments suggérant la participation des TFH dans la physiopathologie de la cGVHD. Cependant, les populations dites effectrices, auxquelles appartiennent les TFH, sont habituellement associées à des mécanismes régulateurs permettant de contrôler la réponse effectrice et de l'arrêter si nécessaire pour éviter un déséquilibre pouvant conduire au développement de pathologies. Cette balance effecteur – régulateur a été l'objet de travaux par notre laboratoire (Prof. Ritz's laboratory) dans le contexte de la cGVHD. En effet, nous avons montré au préalable que les LT CD4+ régulateurs (ou Treg) étaient diminués au cours de la cGVHD, conséquence d'un défaut de survie impliquant les voies de l'apoptose et des télomères (45, 47, 209). Ce déséquilibre homéostatique vis-à-vis des T effecteurs apparaît dès 3 mois post-greffe favorisant le développement d'une cGVHD (44). Cette observation a permis de mettre en place des stratégies visant à corriger ce défaut soit par administration d'interleukine-2 (IL-2), soit par administration de Treg purifiés aux patients (53, 55, 210).

De la même manière, ont été définis en 2011, des LT folliculaires régulateurs dont le but est de contrôler la réaction du CG, permettant d'empêcher l'émergence de clones B auto-réactifs, et d'arrêter la réaction du CG au décours d'une infection (156-158). Ces TFR font défaut dans des modèles murins de maladies auto-immunes, et dans des modèles murins de cGVHD (162). De la même manière que pour les cTFH, des cTFR peuvent être détectés dans le sang de souris ou de patients permettant d'évaluer leur rôle, leur phénotype et leur fonction dans divers processus pathologiques (163, 164).

Nous avons donc entrepris l'étude et la comparaison de TFR au niveau du sang et d'amygdales permettant de caractériser les cTFR comme une population apparentée des TFR, quiescente, et présentant une fonction suppressive de la réaction du CG. Ces cTFR ont été étudiés chez des patients en post-greffe, retrouvant des valeurs diminuées par rapport aux témoins sains, de façon plus marquée chez les patients avec une cGVHD active. Ce défaut quantitatif apparaît secondaire à un défaut de maintenance (augmentation de la susceptibilité à l'apoptose et défaut de prolifération) et un probable défaut de différenciation. Leur faible nombre dans le sang ne permettant pas leur étude fonctionnelle directe chez les patients, nous avons analysé leur fréquence en relation avec celle des LB de types plasmablastes, retrouvant une forte corrélation inverse chez les patients avec une cGVHD active, suggérant leur déficit fonctionnel *in vivo*.

Notre groupe a préalablement montré le bénéfice de faibles doses d'IL-2 pour expandre les Treg et améliorer le score clinique de cGVHD. Nous avons donc entrepris l'étude de l'IL-2 sur la réaction du centre germinatif. L'IL-2 apparaît bloquer cette réaction de façon dose

dépendante, dès les faibles doses, et de façon indépendante des Treg/TFR, suggérant un mécanisme direct sur les TFH.

Cette étude, bien qu'exposée dans un format d'article, doit être complétée. En effet, nous avons prévu de compléter l'analyse d'amygdales supplémentaires, de répéter les expériences de suppression avec les cTFR, et de terminer l'étude de ces différentes populations chez les patients recevant de l'IL-2 (étude en cours à Boston, utilisant le CyTOF).

T Follicular Regulatory Cell Deficiency during Chronic Graft-versus-Host Disease is improved by Low-Dose IL-2 Therapy

Edouard Forcade,^{1,2,3,4*} Yusuke Kamihara,^{1,2*} Haesook T. Kim,^{5,6} John Koreth,^{1,2} Masahiro Hirakawa,^{1,2} Corey Cutler,^{1,2} Sarah Nikiforow,^{1,2} Vincent T. Ho,^{1,2} John Koreth,^{1,2} Philippe Armand,^{1,2} Edwin P. Alyea,^{1,2} Bruce R. Blazar,⁷ Joseph H. Antin^{1,2} Robert J. Soiffer^{1,2} and Jerome Ritz^{1,2,8}

Affiliation:

¹Division of Hematologic Malignancies and Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA;

²Harvard Medical School, Boston, MA, USA;

³UMR CNRS 5164, Bordeaux University, Bordeaux, France;

⁴Department of Hematology and Cell Therapy, University Hospital, Bordeaux, France;

⁵Department of Biostatistics and Computational Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA;

⁶Harvard School of Public Health, Boston, MA;

⁷Division of Blood and Marrow Transplantation, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA;

⁸Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA.

*: These authors contributed equally as first authors.

Corresponding Authors:

Jerome Ritz, Dana-Farber Cancer Institute, 450 Brookline Avenue, Boston, MA 02215; email: jerome_ritz@dfci.harvard.edu.

Disclosure / Conflict of interest:

Category: T follicular regulatory cells; chronic GVHD; IL-2

Key-words:

Word count:

Introduction

Chronic Graft *versus* Host Disease (cGvHD) remains a significant cause of morbidity and mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) requiring the development of new therapies (1). Despite recent advances in the disease characterization, cGvHD immune biology remains poorly understood (2). An impairment of the balance between effector and regulator subsets appear of first importance as a breakdown of central and peripheral tolerance has been shown. Several reports in murine models and human studies showed a defect of thymic function (3-6), regulatory T cells (7-9) and more recently regulatory B cells (10, 11). The role of Treg has been supported by several studies showing their deficiency during cGVHD, consecutive to an abnormal reconstitution kinetic and deregulated cell death mechanisms (7, 8, 12). This led to different strategies to improve T cell peripheral tolerance using low-dose (LD) Interleukin-2 (IL-2) (13, 14) or Treg infusion (15). *In vivo* LD IL-2 improved cGvHD score, inducing Treg proliferation, increasing thymic export and enhancing resistance to apoptosis through the improvement of STAT5 phosphorylation of Treg over Tcon (14, 16).

cGvHD discriminate from acute GvHD with the involvement of activated B cells in the context of a high BAFF/B cell ratio promoting the survival of autoreactive B cell clones (17-21). These B cells displayed features consistent with antigen encountering and follicular maturation through the germinal center reaction (19). Consistently, data from murine models showed an increased GC activity and the requirement of this structure for the development of cGvHD and Bronchiolitis Obliterans (BO) (22, 23). We recently provided evidence for abnormal GC-dependent B cell activation and differentiation into high affinity antibody producing cells through

the help from T follicular helper cells (TFH) showing increased activation and function (24). TFH represent a key player of GC reaction through the expression of CD40L, interleukin-21 (IL-21) and IL-4 providing help to high affinity GC B cell clones (25). Regulatory mechanisms are necessary to control GC reaction and avoid uncontrolled B cell clone expansion. Immune checkpoints, such as PD-L1/PD1 axis, have been shown to play a role in GC control providing a negative feedback to TFH (26). Similarly, cellular regulatory mechanisms have also been shown to control the GC reaction (27). Previous studies reported an increased antibody production in mice and humans displaying FoxP3 deficiency (lacking regulatory T cells – Treg) secondary to genetic abrogation or mutation (28, 29). Subsequently, FoxP3-expressing CD4⁺ T cells were observed within follicles at the T-B border and inside the GC (30-32). Because of a distinct transcriptomic signature, these cells were named T follicular regulatory cells (TFR). Described in human and mice, they express both TFH (CXCR5, PD1, BCL-6) and Treg (CD25, FoxP3) markers (30-32). TFR differentiate in the periphery from natural Treg, and their deficiency enhances GC reaction consistent with their suppressive activity (30-32). TFR differ from TFH by their incapacity to produce IL-21, IL-4 and to up-regulate CD40L, and resemble to some extents to Treg as they produce Granzyme A, IL-10 and TGF- β and express high levels of CTLA4 and GITR (31). TFR are capable of suppressing antigen-specific antibody production by B cell *in vivo*. In parallel, *in vitro* experiments have helped describing TFR mechanism of action (27). They suppress TFH and/or B cells through cellular interaction or production of soluble factors (TGF- β , IL-10 and granzymes). More recently, TFR have been identified in the blood of mice and humans allowing their study in pathological contexts (33, 34).

Herein, we characterized circulating TFR (cTFR) phenotype in comparison to tonsil TFR and studied them in 64 HSCT patients. We observed a marked defect of this subset regulating GC, correlating with *in vivo* increase of plasmablasts capable of producing high affinity antibody involved during cGvHD pathogeny. Utilizing LD IL-2 in steroid refractory cGvHD patients, we could improve TFH/TFR ratio thus improving their clinical score and providing new mechanism of action of LD IL-2.

Results

T Follicular Regulatory cells circulate in the blood in a quiescent state

T follicular regulatory cells (TFR) were described as a suppressive subset within B cell follicles which aim to control the Germinal Center (GC) reaction (30-32). They express both regulatory CD4⁺ T cells (Treg CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3⁺) and TFH (CD45RA-CXCR5+BCL-6⁺) features.

In human tonsils, TFR (CD45RA-CXCR5+CD25^{hi}FoxP3+CD4⁺T cells, **Figure 1A**) represent a small subset (median %: 1.71% of CD4⁺T cells), while Treg (CD25^{hi}FoxP3⁺) represent a median of 3.12% of CD4⁺T. Thus, TFR is the most represented suppressive subset in tonsils (mean % of CXCR5⁺ cells = 64.1% of Treg). Treg suppressive function was shown to correlate with FoxP3 expression and to act through CTLA-4 and GITR molecules. We, thus, characterized these molecules using multi-parametric flow cytometry, and observed a similar expression of FoxP3 between CXCR5⁻ Treg (CD45RA-CXCR5-CD25^{hi}FoxP3+CD4⁺T cells) and TFR, that was markedly augmented compared to Naïve Treg (CD45RA+CD25^{hi}FoxP3+CD4⁺T cells) (**Figure 1B**). BCL-6, the master regulator of TFH program, showed reduced expression in TFR compared to TFH (**Figure 1C**). CTLA4 expression was increased in TFR compared to CXCR5⁻ Treg (CTLA4 MFI: 3489 *versus* 2317 for TFR and CXCR5⁻ Treg respectively) (**Figure 1D**), while GITR expression did not differ between the two subsets (**Sup Figure 1A**). ICOS and PD1 were shown to characterize TFH activation status and to correlate with their function. We compared ICOS between the different subsets and observed a greater expression of ICOS among CD4⁺ T cell subsets expressing CXCR5 compared to CXCR5⁻ subsets, with TFR presenting the greatest expression (**Sup Figure 1A**).

Conversely, TFH FoxP3⁻ showed increased PD1 expression compared to CXCR5⁻Treg and TFR (**Sup Figure 1A**).

As previously described in murine or human studies (33, 34), TFR can be found in the peripheral blood (also called circulating TFR – cTFR). In a group of 18 healthy donors, cTFR represent 4.25% of cTFH (range = 0.97 – 11.3%), similar to values observed in tonsils, but only represent 0.34% of CD4⁺T (0.09 – 1.24%) (**Figure 1E**). Therefore, cTFR represent a minor population within regulatory subsets of peripheral blood (median 8.8% of total Treg). Interestingly, cTFR phenotype differ from GC TFR and blood CXCR5⁻ Treg. Indeed, they present decreased expression of FoxP3, CTLA4, GITR, ICOS, Ki67 (**Sup Figure 1B**).

Collectively, these results suggest that TFR can be found in the peripheral blood but represent a much smaller compared to its GC relative. cTFR may represent a quiescent state of GC TFR, similarly to blood memory TFH.

TFR are deficient during cGvHD

The establishment of tolerance represent a major goal in order to obtain a successful HSCT outcome and avoid GVHD-related toxicity. Previous reports described the breakdown of tolerance occurring during cGVHD related to the defect of regulatory immune subsets such as Treg or Breg (7-11). In addition, we and others provided data supporting the role of TFH during cGVHD related to their activity and increased function in both human and murine studies (22, 24). As TFR regulate GC reaction, we intended to characterize cTFR subset in a cohort of HSCT patients and evaluate their impact on cGVHD occurrence.

We first compared cTFR values between a group of 18 healthy donors (HD) and 64 HSCT patients. cTFR % within cTFH was decreased in HSCT compared to HD (1.44 vs 4.35, $p=0.0002$ for HSCT and HD groups respectively) (**Figure 2A**). This was also true when considering cTFR % within CD4⁺ T cells (0.08 vs 0.34, $p<10^{-4}$, respectively)(*data not shown*) and cTFR absolute numbers (0.37 vs 2.76/ μ L, $p<10^{-4}$, respectively) (**Figure 2A**). As previous reports characterized cTFR with the co-expression of CXCR5 and ICOS within CD4⁺FoxP3⁺ or CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}, we also considered this cTFR ICOS⁺ subset (CD45RA-CD25^{hi} FoxP3⁺CXCR5⁺ICOS⁺) within CD4⁺ and observed similar findings (0.04 vs 0.13, $p=0.0004$, respectively) (**Sup Figure 2A**).

Our cohort of HSCT patients comprised 15 patients who never developed cGvHD, 37 patients with active cGvHD and 12 patients with resolved cGvHD. Their detailed characteristics are shown in **Table 1**. cTFR are significantly decreased in patients with active cGvHD compared to No cGvHD (median cTFR % within CD4⁺: 0.034 vs 0.18, $p=0.0012$) and patients with resolved cGvHD (median cTFR % within CD4⁺: 0.034 vs 0.14, $p=0.02$), while cTFR values did not differ between No cGvHD and resolved cGvHD groups (**Figure 2B**). Interestingly, cTFR values tended to be negatively associated with NIH grade (median cTFR %: 0.11 vs 0.029, $p=0.004$ for mild vs moderate; 0.11 vs 0.012, $p=0.005$ for mild vs severe; 0.029 vs 0.012, $p=0.2$ for moderate vs severe) (**Figure 2B**). We previously showed that cTFH were reduced during active cGvHD (24). However, cTFR reduction was more pronounced and resulted in a significantly increased in cTFH/cTFR ratio in active cGvHD patients compared to No cGvHD patients (median cTFH/cTFR ratio: 0.85 vs 0.44, $p=0.029$ for active vs No cGvHD, respectively) (**Figure 2C**).

Taken together, these results suggest that cTFR are deficient during cGvHD and inversely correlate with the disease severity, thus enhancing cTFH effector over cTFR.

cTFR altered numbers are associated with reduced survival

TFR have been shown to exert their suppressive capacity within GC area. Thus, decreased cTFR values observed in the context of cGvHD could be consecutive to either increased homing to lymphoid structures, either decreased survival. To allow a comprehensive analysis of TFR survival, we first analyzed markers of apoptosis (BCL-2) and cell-mediated death (CD95/Fas) expressed by GC TFR.

In human tonsils, BCL-2 expression is increased in TFR compared to CXCR5-Treg (mean BCL-2 MFI: 1378 vs 1213, respectively) and TFH FoxP3- (mean BCL-2 MFI: 1378 vs 910.7, respectively) (**Sup Figure 3A**). Conversely, CD95/Fas showed the highest expression in TFR compared to all other subsets, highly correlating with CTLA4 expression (**Sup Figure 3A**). In HD, blood TFR showed increased BCL-2 expression compared to CXCR5-Treg (mean BCL-2 MFI: 1848 vs 1178, $p=0.002$, for TFR and CXCR5-Treg respectively), but reduced expression compared to TFH FoxP3- (mean BCL-2 MFI: 1848 vs 2115, $p=0.002$, for TFR and TFH FoxP3- respectively). CD95 expression did not differ between blood TFR and TFH FoxP3- (mean CD95 MFI: 1985 vs 2065, *not significant*, for TFR and TFH FoxP3- respectively), while CXCR5-Treg showed the highest expression (**Sup Figure 3A**). Collectively, these data suggest that TFR survival vary between blood and tonsil with an advantage of survival of TFR over TFH in the GC.

We, thus, evaluated BCL-2 and CD95 cTFR expression in the different clinical groups and merged the No cGvHD and Resolved cGvHD groups (called “Without cGvHD” as they did not differ in terms of cTFR values, phenotype and BCL-2/CD95 expression (data not shown). BCL-2 expression by cTFR was significantly decreased in cGvHD patients compared to Without cGvHD group (median BCL-2 ratio: 1831 vs 1939, $p=0.037$ respectively). Similarly, we compared CD95 expression by cTFR and observed a trend for increased expression in active cGvHD patients that was not significant (**Figure 3A**).

The role of a regulatory subset is evaluated through its capacity to exert its suppressive function but also to survive comparatively to effectors. We, thus, evaluated cTFH (CD45RA-CXCR5⁺CD25^{lo}FoxP3⁻ CD4⁺ T cells) survival over cTFR survival using a BCL-2 ratio. This ratio was significantly increased in active cGvHD patients compared to the group Without cGvHD (BCL-2 ratio: 1.26 vs 1.14, $p=0.0013$ for active cGvHD and Without cGvHD groups respectively) (**Figure 3B**).

Collectively, these results indicate that cTFR decreased values may be related to decreased survival, while cTFH increased survival enhance alloreactivity.

TFR function is altered during cGvHD

In mice, TFR were shown to localize in B cell follicles to control GC reaction by their suppressive function. We sought to evaluate cTFR suppressive function using the *in vitro* model of GC reaction after separating the different subsets using cell sorting, as previously described (24, 33, 35). The addition of cTFR at a 1:1 ratio (cTFR:cTFH) together with cTFH co-cultured with memory B cells did not show reduction in terms of plasmablast frequency. However, cTFR adjunction led to a decrease in IgG

production. This suggests that cTFR may inhibit signals from cTFH participating in class switching. Increasing CXCR5-Treg:cTFH ratio in favor of CXCR5-Treg, induced a reduction in plasmablast differentiation and IgG production (**Figure 4A**).

TFR suppress B cell differentiation into plasmablast and maturation affinity of GC B cell, thus inhibiting high affinity antibody production. We sought to evaluate cTFR suppressive function *in vivo* in the post-transplant setting. As cTFR represent a small subset within CD4⁺ T cells, we could not directly assess cTFR function. Thus, we evaluated the relationship between cTFR and plasmablast frequencies. The analysis of active cGvHD patients revealed a strong inverse correlation between cTFR and plasmablasts (Spearman test: $r = -0.49$, $p=0.003$) (**Figure 4B**). Taken together, these results suggest that cTFR function is altered during cGvHD.

Low-Dose IL2 inhibits in vitro GC reaction

We previously showed that LD IL-2 enhances Treg expansion due to its high affinity receptor (13, 16). LD IL-2 induces the increased phosphorylation of STAT5 and promotes the regulatory balance through Treg activation and expansion (16). In addition, the administration of LD IL-2 was shown to increase Treg/Tcon ratio in patients with active cGvHD, thus improving their clinical score (13, 14, 16). The role of IL-2 on TFH has been mainly studied in murine models showing a negative influence on TFH differentiation through its action on STAT3/STAT5 balance (36, 37). Nonetheless, little is known about IL-2 role on already differentiated TFH and GC reaction. More recently, He *et al* showed a reduction of TFH and Th17 under IL-2 therapy (38).

Using our GC reaction model, we evaluated the impact of LD IL-2, and observed a dose-dependent decrease of plasmablast differentiation and IgG production, starting at very low dose of IL-2, suggesting its activity on high affinity receptor expressing cells (**Figure 5A**). To evaluate whether IL-2 was acting through regulatory subsets (cTFR) contained within sorted T cells, we compared the effect of IL-2 using cTFH and memory B cell co-culture, depleting or not regulatory subsets (see Supplemental Methods). We observed a dose-dependent decrease of plasmablast differentiation and IgG production in both conditions (with or without TFR depletion), without observing any difference after depleting TFR (**Figure 5B**).

Collectively, these results suggest that LD IL-2 inhibit *in vitro* GC reaction, without acting through cTFR suppressive activity, suggesting additional mechanism of action.

LD IL-2 restores TFR values and activity

We previously showed that LD IL-2 restored Treg:Tcon ratio thus improving cGvHD clinical score (13, 14, 16). Recently, LD IL-2 was shown to decrease TFH and Th17 values during therapy in patients with Systemic Lupus Erythematosus (38).

As cTFR values reflect the suppressive capacity toward the germinal center activity (33, 34), we sought to evaluate cTFR:cTFH ratio using mass cytometry (CyTOF) in a cohort of patients receiving LD IL-2 and previously described (39).

Using viSNE map of cTFR and cTFH, we observed an improvement of cTFR:cTFH ratio over the course of IL-2 therapy, with a maximum ratio observed at 2 weeks, and subsequently decreasing to reach baseline values at 12 weeks (**Figure 6**). This suggests that LD IL-2 can improve the cTFR:cTFH ratio and may improve GC regulation through a numerical advantage toward regulatory subsets over effector subsets.

Discussion

We and others previously provided data supporting the incapacity to establish immune tolerance leading to the development of chronic GvHD (3, 7, 8, 10, 11). This has been shown for both central and peripheral tolerance with a quantitative Treg defect involved in cGvHD pathogenesis. More recently, the impact of acute GvHD on Treg reconstitution and its association with cGvHD has been shown (40). Therefore, Effector – Regulator balance appear of first importance (2).

The role of T effector cells in cGvHD development has been shown across many reports, but in the last two decades, the role of B cells has emerged as another major factor. During cGvHD, B cells expands in the context of lymphopenia and high BAFF level promoting the survival of auto-reactive clones (18-20, 41). Their activation status and differentiation phenotype has been shown to be associated with increased GC activity in both human and murine models (19, 22, 23). Accordingly, we have shown that TFH, playing a central role during GC reaction, were highly activated and presented increased function. GC reaction produce high affinity GC B cell clones capable to secrete immunoglobulins that have undergone class switching and somatic hypermutation (24). This central reaction requires the co-localization of TFH and B cells. In 2005, regulatory T cells have been observed within GC area (42), and were called TFR in 2011, after the demonstration of their functional capacity (30-32). TFR co-express FoxP3 and BCL-6, two master regulators of Treg and TFH function, respectively (**Fig. 1B-C**). TFR express FoxP3 at similar level compared to CXCR5-Treg, but showed decreased BCL-6 expression compared to TFH. This difference is consecutive to upregulation of Blimp-1 in TFR as opposed to TFH as previously shown (31). Hence, the reciprocal inhibition between BCL-6 and Blimp-1 observed in TFH (43), may not happen in TFR allowing for FoxP3 expression.

TFR also differ from TFH on other phenotypic aspects. They show increased expression of CTLA4, GITR, ICOS, and decreased expression of PD1 (**Fig. 1D and Supp Fig. 1A**). This phenotypic pattern reflects underlying functions, as CTLA4 has been shown to mediate Treg suppressive function (44) and its deletion is associated with increased antibody production suggesting that CTLA4 control B cell response (45). In addition, CTLA4 was, more recently, shown to regulate humoral response through the modulation of TFH, TFR and Treg (46, 47). Although the role of Glucocorticoid-induced TNFR family related gene (GITR) in tolerance has been debated (48), blocking GITR in Treg abrogated their suppressive capacity (49). GITR expression was described as a marker used to sort Treg and TFR in mice (50), but its upregulation on other activated T cells limits GITR reliability to solely define TFR (50). So far, the role of GITR in TFR remains to be defined. ICOS also appears as a key molecule in both TFH and Treg differentiation (51) and may explain its greater expression to allow for increased co-stimulation. Finally, PD1/PD-L1 axis has been shown to play a major role in TFH inhibition, especially, through PD-L1 expressing B cells during HIV infection (26). PD1 deficient mice study revealed the role of PD1 in TFR differentiation from Treg and showed increased TFR numbers with enhanced suppressive activity (52).

The analysis of regulatory subsets showed a different distribution between tonsil and blood. TFR represent the majority of FoxP3 expressing CD4⁺ T cells within tonsil, as opposed to blood, where CXCR5⁻ Treg are predominant (**Fig. 1E**). Blood TFR also present a different phenotype as they show reduced expression of FoxP3, CTLA4, GITR, ICOS, PD1 and proliferate less (Ki67) compared to GC TFR (**Supp. Fig. 1B**). Collectively, these data suggest that cTFR represent a quiescent state of GC TFR and may constitute a memory pool of TFR as shown in murine studies while

displaying antigen specificity (34). The inter-relationship between the GC and circulating pool of TFR was also attested in IPEX-syndrome in which a contraction of blood TFR was observed (53).

The analysis of cTFR as a surrogate for TFR function within GC allowed us to interrogate their role after HSCT and during cGvHD pathogenesis. We analyzed blood TFR after HSCT and in a group of HD, and observed a marked reduction of cTFR after HSCT (**Fig. 2A**). This reduction was more pronounced in active cGvHD patients and was associated with their NIH clinical grade (**Fig. 2B**) resulting in an increased cTFH/cTFR ratio in active cGvHD patients (**Fig. 2C**). In the same line, murine models developing auto-immune like syndrome or cGvHD showed reduced TFR frequency (54, 55). Dhaeze *et al* recently showed a reduction of cTFR during multiple sclerosis (33). In addition, we observed a reduced frequency of proliferating cTFR (**Supp. Fig. 2**) suggesting their incapacity to overcome the altered TFH/TFR ratio. Collectively, these data underline the importance of the TFH/TFR balance to avoid uncontrolled humoral response such as the one observed in auto-/allo-reactivity (50). Previous reports showed that both TFR and cTFR originate from Treg (30-32, 34). In our cohort, Treg frequency did not significantly differ between active and No cGvHD groups (*data not shown*) suggesting that an altered differentiation process together with an altered maintenance process may explain cTFR reduced values.

In addition, TFR maintenance not only depends on its capacity to proliferate, but also on its capacity to survive. We, thus, analyzed the expression of BCL-2 and CD95/Fas, two proteins reflecting internal and external apoptosis pathways, as previously shown (12). BCL-2 analysis showed a reduced expression in cTFR as

opposed to their target (cTFH) (**Fig. 3A-B**), while CD95 expression did not differ between clinical groups and subsets. This altered survival of cTFR may explain their quantitative defect thus impacting the pool of suppressing cells. In addition, it also underlines the relative advantage of cTFH survival which present enhanced function in the context of cGvHD (24). Similarly, resistance to apoptosis has been shown as a mechanism for TFH to escape regulation and to participate to autoreactivity in murine models (56).

The primary function of TFR is to suppress GC reaction in order to control GC B cell proliferation and to control GC maintenance. Similarly, cTFR have been shown in mice to exhibit potent suppressive activity (34, 52). In order to evaluate cTFR function, we undertook a suppressive assay evaluating the suppression of plasmablast generation and IgG production using a GC-like reaction *in vitro* as previously described (24, 35). The addition of cTFR or CXCR5- impacted GC reaction (**Fig. 4A**). Recently, Dhaeze *et al* implemented cTFR function understanding using another readout in which cTFR were able to suppress effector T cells proliferation (CFSE assay). Interestingly, they did not find significant difference between tonsil and blood TFR suppressive capacity (33). As small cTFR numbers did not allow for direct functional assessment, we analyzed *in vivo* the impact of cTFR on plasmablast generation. We observed a strong inverse correlation between cTFR % within CD4+ T cells and plasmablast % in the blood of patient with active cGvHD patients (**Fig. 4B**). These data suggest that TFR impairment may allow for an increased GC activity in an auto-/allo-reactive context, participating in cGvHD pathogenesis.

The differentiation, maintenance, expansion and function of Treg has been shown to depend on IL-2 which is signaling through STAT5 pathway. Similarly, TFR express CD25, the IL-2 receptor α -chain, conferring sensitivity to low-dose IL-2 (LD IL-2). Conversely, TFH program is associated with STAT3-STAT4 signaling (57), and *in vivo* STAT3 pharmacological inhibition induced TFH reduction and TFR increase in cGvHD murine model (55). STAT5 signaling is inhibiting TFH program through BCL-6 inhibition (37). Thus, the STAT3/STAT5 balance is regulating the fate of GC activity. We sought to evaluate the impact of IL-2 on GC-like *in vitro* reaction. LD IL-2, as low as 10 IU/mL, inhibited plasmablast differentiation and IgG production in a dose dependent manner (**Fig. 5A**). As IL-10 was previously shown to induce CD25 upregulation on B cells enhancing their proliferation and differentiation through IL-2 (58), IL-2 mediated inhibition of GC like reaction may not act through B cells. To evaluate, the potential role of TFR contained within TFH, we undertook a similar experiment after depleting Treg (containing TFR), and observed similar results (**Fig. 5B**). Collectively, these results suggest that IL-2 may impede GC reaction through direct activity on TFH cells. In murine models, IL-2 was shown to suppress the GC response to influenza, through a Treg independent mechanism but directly acting on TFH cells by preventing their differentiation (36). Consistently, patients receiving LD IL-2 for SLE showed a reduction of TFH values throughout the time of therapy. Therefore, we evaluated the impact of LD IL-2 on cTFR and cTFH values in patients. Longitudinal analysis of samples from patients receiving IL-2 revealed a significant improvement of cTFR:cTFH ratio suggesting an improvement of regulatory capacity towards GC (**Figure 6**).

Herein, we provided data supporting the role of TFR deficiency during cGvHD pathogenesis through an impairment of cTFR survival and maintenance. Patients with active cGvHD showed a strong inverse correlation between cTFR % and plasmablasts % suggesting an impairment of GC suppression mechanisms with the disease severity. Utilizing LD IL-2 in patients with enhanced GC activity showed a numerical improvement of cTFR values, and may also present a direct activity on TFH cells as suggested by *in vitro* assays.

Material and Methods

Patient Characteristics

Laboratory studies were performed on samples from 64 patients who underwent allogeneic HSCT at the Dana-Farber Cancer Institute and Brigham and Women's Hospital (Boston, MA). Clinical characteristics of these patients are summarized in Table 1A. Chronic GVHD grade was established at the time of sample collection using NIH guidelines (59). Resolved chronic GVHD was defined as the absence of any clinically active disease without steroid therapy at the time of sample collection. Among 12 patients with resolved chronic GVHD, one patient was receiving immunosuppressive treatment (one tacrolimus). Peripheral blood samples were also obtained from 18 healthy stem cell transplant donors. All patients and healthy donors were enrolled in clinical research protocols approved by the Human Subjects Protection Committee of the Dana-Farber/Harvard Cancer Center. Written informed consent was obtained prior to sample collection, in accordance with the Declaration of Helsinki. Boston Children's Hospital Institutional Review Board approval was obtained to receive discarded fresh tonsil tissue after elective tonsillectomy.

Sample processing

Blood samples anti-coagulated with EDTA were processed within 6 hours of collection. Samples were centrifuged for 15 minutes at 2000 rpm to collect plasma which was stored at -80°C. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using density gradient centrifugation (Ficoll-Hypaque, GE Healthcare). Fresh tonsils were cut into 5 mm tissue blocks and mechanically disrupted through a 70µm cell strainer. Tonsil mononuclear cells were separated by density gradient centrifugation and washed twice before being cryopreserved.

Flow Cytometry

PBMC were stained at 4°C for 20 minutes with fluorochrome-conjugated antibodies (see Supplemental Table X) to characterize cTFH, cTFR and B cells. Intracellular staining was performed using the FoxP3 kit (eBioscience). BCL-2 expression was normalized using an isotype control for each sample. Flow cytometry standards and quality controls were run regularly to ensure stability of the analytical instruments. A minimum of 200,000 events were recorded in the lymphocyte gate. Cells were analyzed using LSR Fortessa (BD Bioscience) and FlowJo v.10 software (Treestar).

T cell - B cell co-culture

cTFH (CD19-CD14-CD4+CD45RA-CXCR5+) and memory B cells (CD3-CD14-CD19+CD27+) were cultured as previously described, with or without the addition of CXCR5- Treg (CD19-CD14-CD4+CD45RA-CXCR5-CD25^{hi}CD127^{lo}) or cTFR (CD19-CD14-CD4+CD45RA-CXCR5+CD25^{hi}CD127^{lo}) at different ratios. Sorted populations were confirmed to be >95% pure. cTFH and memory B cells were co-cultured in the presence of 1 µg/mL *Staphylococcal enterotoxin reduced* (SEB, Toxin Technology, Sarasota, FL) for up to 7 days. Plasmablast differentiation (CD27^{hi}CD38^{hi} B cells) and IgG production in the supernatant were assessed at Day 7 by FACS and ELISA (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) respectively.

Antibody staining for mass cytometry

PBMCs were washed with MaxPar Cell Staining Buffer (Fluidigm) and blocked with Human FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec) for 10 minutes at room temperature. Cells were then incubated with all antibodies targeting cell surface markers for 30

minutes at room temperature and then washed twice with Cell Staining Buffer. After washing, cells were fixed with Cytofix Fixation Buffer (BD Biosciences) and permeabilized with Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences) following the manufacturer's instructions. Fixed/permeabilized cells were washed twice with Cell Staining Buffer and incubated with all antibodies targeting intracellular antigens for 30 minutes at room temperature. After staining with intracellular antibodies, cells were washed twice with Cell Staining Buffer and incubated with 191/193I_r DNA intercalator (Fluidigm) following the manufacturer's instructions. Prior to mass cytometry analysis, cells were washed twice with Cell Staining Buffer and twice with MaxPar Water (Fluidigm). In experiments where PBMCs from healthy donors were stimulated in vitro, fresh samples were processed and stained simultaneously. Patient samples were obtained at different time points after starting IL-2 therapy: baseline pretreatment; 1, 2, 4, 8, and 12 weeks during treatment; 4 weeks after discontinuation of IL-2 (16 weeks); and at 48 weeks in patients receiving extended IL-2 therapy. All samples from an individual patient were thawed and stained simultaneously. Therefore, all samples from a single in vitro stimulation experiment and all samples from an individual patient were processed identically to facilitate comparison across multiple samples. Cells were analyzed on a CyTOF 2 mass cytometer (Fluidigm) at an event rate of approximately 500 cells/second. To normalize CyTOF data over different days, EQ Four Element Calibration Beads (Fluidigm) were added in all samples. Resulting data were analyzed with software available through Cytobank (www.cytobank.org). To remove debris and doublets, single cells were gated based on cell length and DNA content as previously described. To interpret high dimensional single-cell data that were produced by mass cytometry, we used a visualization tool based on the viSNE algorithm, which allows

visualization of high-dimensional cytometry data on a 2-dimensional map at single-cell resolution and preserve the nonlinearity.

Statistical analysis

Baseline clinical characteristics were compared between groups using either Fisher's exact test or Chi-square test for categorical variables or Wilcoxon-rank-sum test for continuous variables. Phenotypic and functional data were compared using (exact) Wilcoxon-rank-sum test for unpaired group comparison and Wilcoxon-signed-rank test for paired comparison. Correlation studies were performed using the non-parametric Spearman-rank test. All tests were two-sided at the significance level of 0.05 and multiple comparisons were not considered. All statistical analyses were performed using Prism software (GraphPad, San Diego, CA).

References

1. Socie G, and Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2014;124(3):374-84.
2. Cooke KR, *et al*. The Biology of Chronic Graft-Versus-Host Disease: a Task Force Report From the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016.
3. Clave E, *et al*. Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009;113(25):6477-84.
4. Toubert A, Glauzy S, Douay C, and Clave E. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. *Tissue Antigens*. 2012;79(2):83-9.
5. Wu T, *et al*. Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*. 2013;191(1):488-99.
6. Zhang Y, Hexner E, Frank D, and Emerson SG. CD4+ T cells generated de novo from donor hemopoietic stem cells mediate the evolution from acute to chronic graft-versus-host disease. *J Immunol*. 2007;179(5):3305-14.
7. Alho AC, *et al*. Unbalanced recovery of regulatory and effector T cells after allogeneic stem cell transplantation contributes to chronic GVHD. *Blood*. 2016;127(5):646-57.
8. Matsuoka K, *et al*. Altered regulatory T cell homeostasis in patients with CD4+ lymphopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest*. 2010;120(5):1479-93.
9. Zorn E, *et al*. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2005;106(8):2903-11.
10. de Masson A, *et al*. CD24(hi)CD27(+) and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2015;125(11):1830-9.
11. Khoder A, *et al*. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. *Blood*. 2014;124(13):2034-45.
12. Murase K, *et al*. Increased mitochondrial apoptotic priming of human regulatory T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2014;99(9):1499-508.
13. Koreth J, *et al*. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 2011;365(22):2055-66.
14. Koreth J, *et al*. Efficacy, durability, and response predictors of low-dose interleukin-2 therapy for chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2016;128(1):130-7.
15. Nikiforow S, *et al*. A phase I study of CD25/regulatory T cell-depleted donor lymphocyte infusion for relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2016.
16. Matsuoka K, *et al*. Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. 2013;5(179):179ra43.
17. Sarantopoulos S, Blazar BR, Cutler C, and Ritz J. B cells in chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(1):16-23.

18. Sarantopoulos S, *et al.* High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2007;13(20):6107-14.
19. Sarantopoulos S, *et al.* Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2009;113(16):3865-74.
20. Allen JL, *et al.* B cells from patients with chronic GVHD are activated and primed for survival via BAFF-mediated pathways. *Blood.* 2012;120(12):2529-36.
21. Allen JL, *et al.* Increased BCR responsiveness in B cells from patients with chronic GVHD. *Blood.* 2014;123(13):2108-15.
22. Flynn R, *et al.* Increased T follicular helper cells and germinal center B cells are required for cGVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood.* 2014;123(25):3988-98.
23. Srinivasan M, *et al.* Donor B-cell alloantibody deposition and germinal center formation are required for the development of murine chronic GVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood.* 2012;119(6):1570-80.
24. Forcade E, *et al.* Circulating T follicular helper cells with increased function during chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2016;127(20):2489-97.
25. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity.* 2014;41(4):529-42.
26. Cubas RA, *et al.* Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med.* 2013;19(4):494-9.
27. Sage PT, and Sharpe AH. T follicular regulatory cells. *Immunol Rev.* 2016;271(1):246-59.
28. Lin W, *et al.* Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116(5):1106-15.
29. Tsuda M, *et al.* The spectrum of autoantibodies in IPEX syndrome is broad and includes anti-mitochondrial autoantibodies. *J Autoimmun.* 2010;35(3):265-8.
30. Chung Y, *et al.* Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med.* 2011;17(8):983-8.
31. Linterman MA, *et al.* Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med.* 2011;17(8):975-82.
32. Wollenberg I, *et al.* Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. *J Immunol.* 2011;187(9):4553-60.
33. Dhaeze T, *et al.* Circulating Follicular Regulatory T Cells Are Defective in Multiple Sclerosis. *J Immunol.* 2015;195(3):832-40.
34. Sage PT, Alvarez D, Godec J, von Andrian UH, and Sharpe AH. Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. *J Clin Invest.* 2014;124(12):5191-204.
35. Morita R, *et al.* Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity.* 2011;34(1):108-21.
36. Ballesteros-Tato A, *et al.* Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity.* 2012;36(5):847-56.
37. Johnston RJ, Choi YS, Diamond JA, Yang JA, and Crotty S. STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *J Exp Med.* 2012;209(2):243-50.
38. He J, *et al.* Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4(+) T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Nat Med.* 2016;22(9):991-3.
39. Hirakawa M, *et al.* Low-dose IL-2 selectively activates subsets of CD4+ Tregs and NK cells. *JCI Insight.* 2016;1(18):e89278.

40. Leveque-EI Mouttie L, *et al.* Corruption of dendritic cell antigen presentation during acute GVHD leads to regulatory T-cell failure and chronic GVHD. *Blood*. 2016;128(6):794-804.
41. Brink R. Regulation of B cell self-tolerance by BAFF. *Seminars in immunology*. 2006;18(5):276-83.
42. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, and Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol*. 2005;175(7):4180-3.
43. Johnston RJ, *et al.* Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*. 2009;325(5943):1006-10.
44. Walker LS. Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun*. 2013;45(49-57).
45. Wing K, *et al.* CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science*. 2008;322(5899):271-5.
46. Sage PT, Paterson AM, Lovitch SB, and Sharpe AH. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity*. 2014;41(6):1026-39.
47. Wing JB, Ise W, Kurosaki T, and Sakaguchi S. Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4. *Immunity*. 2014;41(6):1013-25.
48. Shevach EM, and Stephens GL. The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat Rev Immunol*. 2006;6(8):613-8.
49. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, and Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 2002;3(2):135-42.
50. Sage PT, and Sharpe AH. T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends Immunol*. 2015;36(7):410-8.
51. Choi YS, *et al.* ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity*. 2011;34(6):932-46.
52. Sage PT, Francisco LM, Carman CV, and Sharpe AH. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat Immunol*. 2013;14(2):152-61.
53. Charbonnier LM, *et al.* Regulatory T-cell deficiency and immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like disorder caused by loss-of-function mutations in LRBA. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(1):217-27.
54. Vaeth M, *et al.* Follicular regulatory T cells control humoral autoimmunity via NFAT2-regulated CXCR5 expression. *J Exp Med*. 2014;211(3):545-61.
55. Flynn R, *et al.* Targeted Rho-associated kinase 2 inhibition suppresses murine and human chronic GVHD through a Stat3-dependent mechanism. *Blood*. 2016;127(17):2144-54.
56. McCarron MJ, and Marie JC. TGF-beta prevents T follicular helper cell accumulation and B cell autoreactivity. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4375-86.
57. Schmitt N, *et al.* The cytokine TGF-beta co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol*. 2014;15(9):856-65.
58. Fluckiger AC, Garrone P, Durand I, Galizzi JP, and Banchereau J. Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *J Exp Med*. 1993;178(5):1473-81.

59. Jagasia MH, *et al.* 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.* 2015;21(3):389-401 e1.

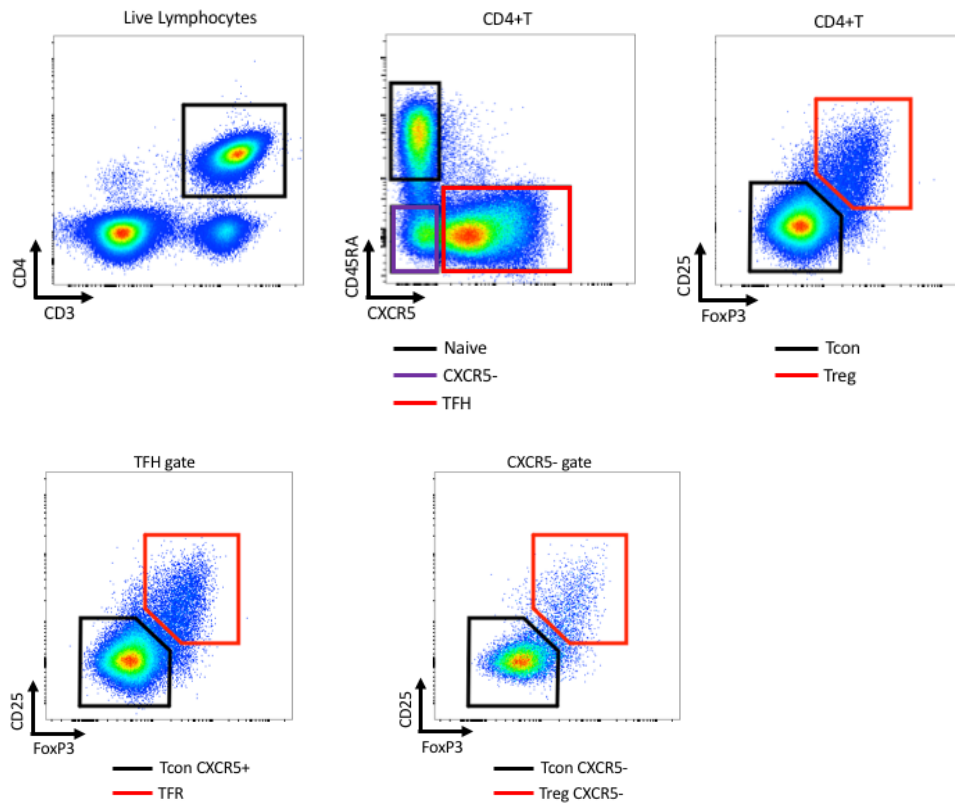
**T Follicular Regulatory cell Deficiency during Chronic Graft-versus-Host
Disease is improved by Low-Dose IL2 Therapy**

Edouard Forcade,^{1,2,3,4*} Yusuke Kamihara,^{1,2*} Haesook T. Kim,^{5,6} John Koreth,^{1,2}
Masahiro Hirakawa,^{1,2} Corey Cutler,^{1,2} Sarah Nikiforow,^{1,2} Vincent T. Ho,^{1,2} John
Koreth,^{1,2} Philippe Armand,^{1,2} Edwin P. Alyea,^{1,2} Bruce R. Blazar,⁷ Joseph H. Antin^{1,2}
Robert J. Soiffer^{1,2} and Jerome Ritz^{1,2,8}

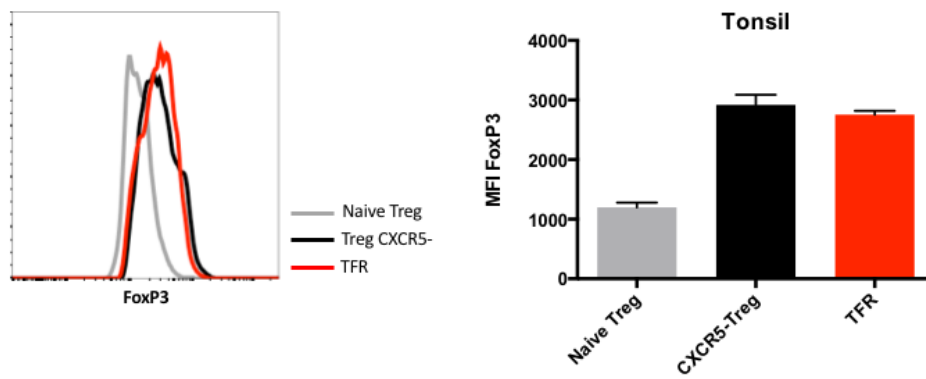
Figures, table and supplemental information

Figure 1

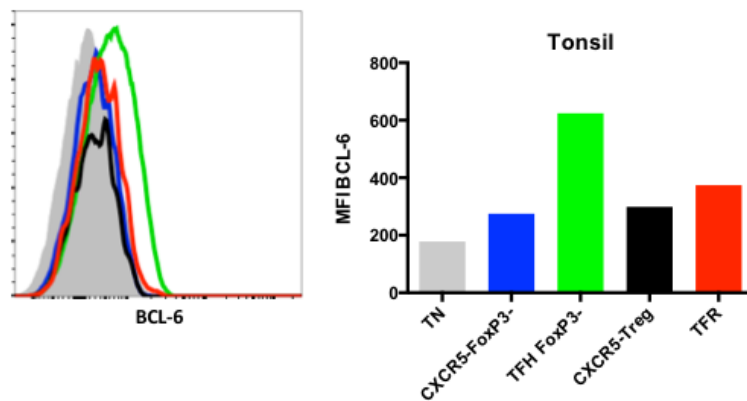
A.



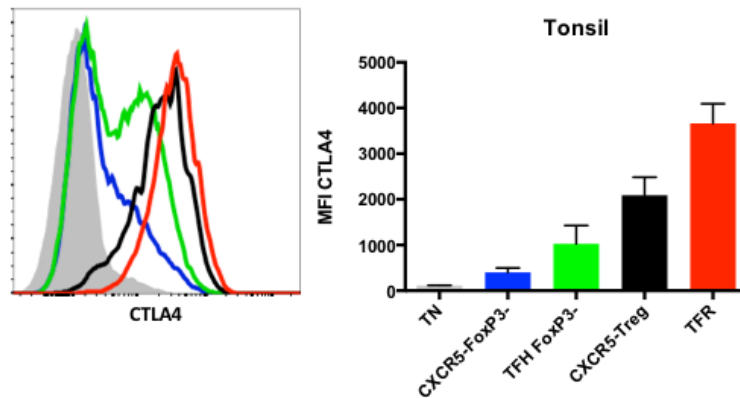
B.



C.



D.



E.

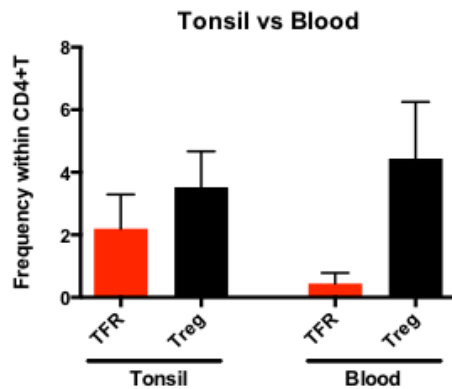
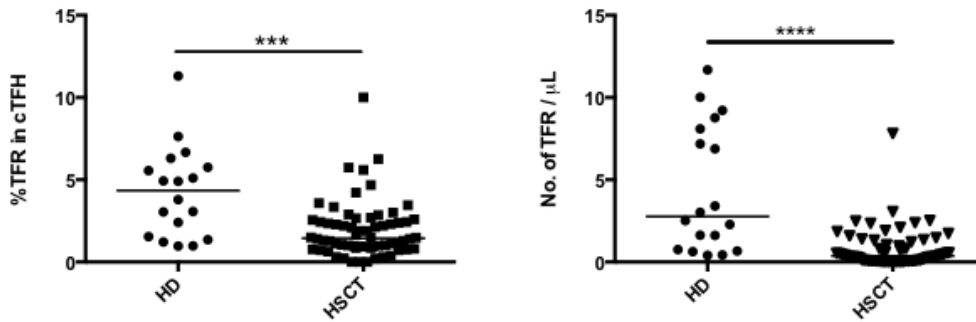


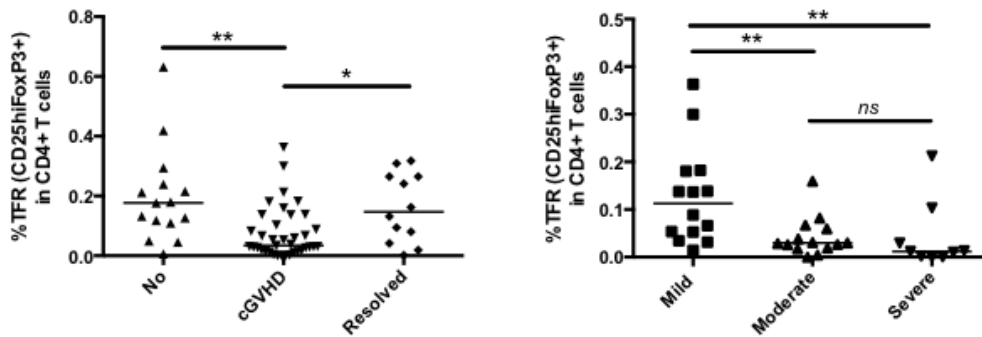
Figure 1: Circulating TFR represent a small subset in a quiescent state compared to tonsil TFR. **A.** Gating strategy to delineate TFR and cTFR starting from live CD4+ T cells in PBMC. One representative example is shown. **B.** Overlay and bar graph (mean \pm SD) representing FoxP3 expression in Naïve Treg, CXCR5- Treg and TFR from tonsil specimen (n=3). **C.** Overlay and bar graph (mean \pm SD) representing BCL-6 expression in Naïve, CXCR5-FoxP3-, TFH FoxP3-, CXCR5- Treg and TFR from tonsil specimen (n=3). **D.** Overlay and bar graph (mean \pm SD) representing intracellular CTLA4 expression in Naïve, CXCR5-FoxP3-, TFH FoxP3-, CXCR5- Treg and TFR from tonsil specimen (n=3). **E.** Comparison of TFR and CXCR5- Treg distribution (mean \pm SD) within tonsil (n=3) and blood (n=18).

Figure 2

A.



B.



C.

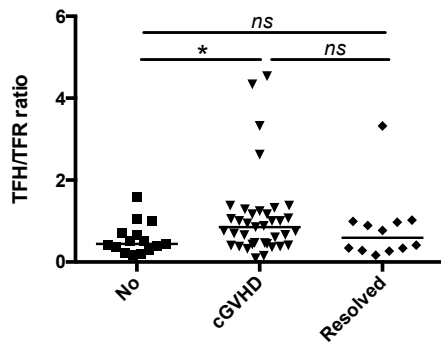
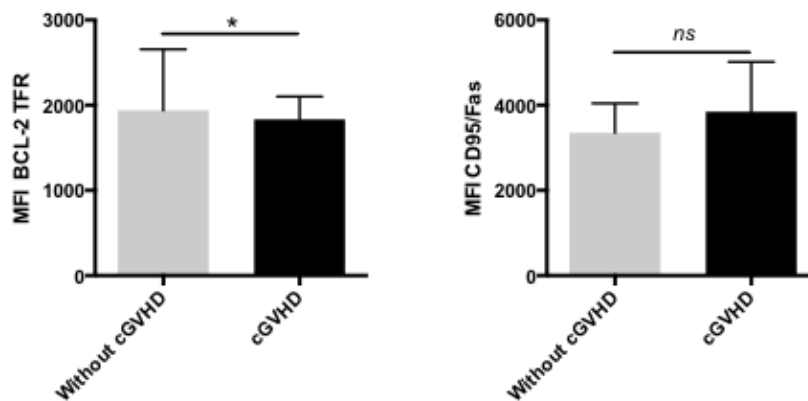


Figure 2: Altered cTFR values in HSCT patients with cGvHD. **A.** cTFR (CD25^{hi}FoxP3⁺) in cTFH (CD45RA-CXCR5⁺ CD4⁺ T cells) % and absolute number are shown in 18 HD and 64 HSCT patients. **B.** Frequency of cTFR (CD25^{hi}FoxP3⁺+CD45RA-CXCR5⁺) in CD4⁺ T cells in No cGvHD (n=15), Active cGvHD (n=37) and Resolved cGvHD (n=12) (*left graph*) and in mild (n=15), moderate (n=13) and severe (n=9) active cGvHD patients. **C.** cTFH (CD25^{lo}FoxP3-CD45RA-CXCR5⁺ % in CD4⁺T) over cTFR (CD25^{hi}FoxP3⁺+CD45RA-CXCR5⁺ % in CD4⁺T) ratio in different clinical groups. Black bar represents median value for each group. Wilcoxon-rank-sum test was used. ns = not significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 10^{-4}$.

Figure 3

A.



B.

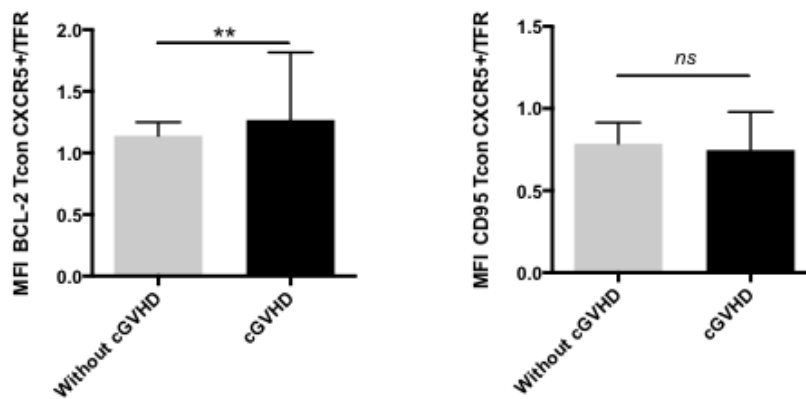
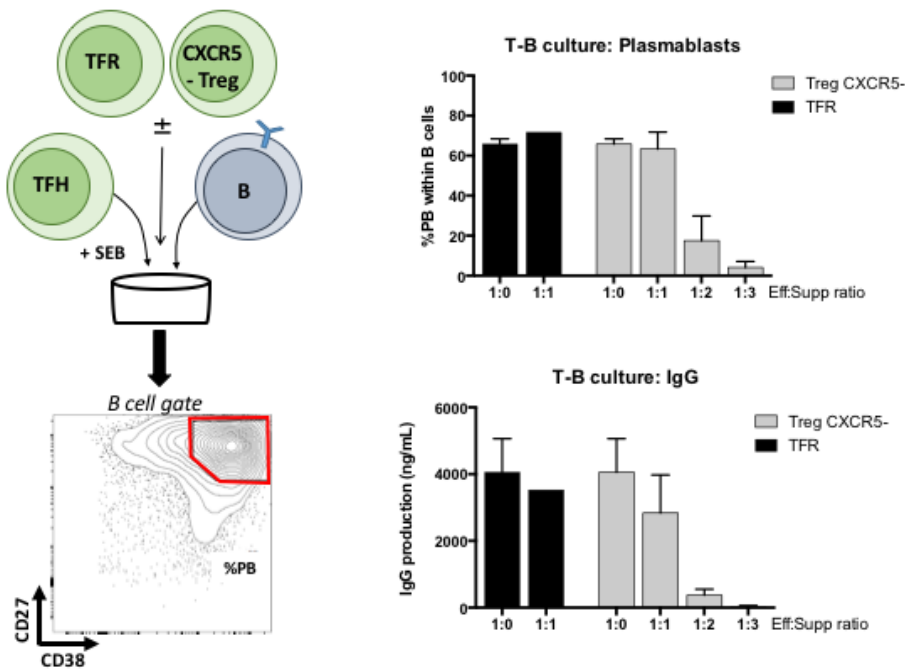


Figure 3: cTFR survival is altered in patients with cGvHD. **A.** BCL-2 (*left*) and CD95/Fas (*right*) MFI (Median Fluorescence Intensity) of cTFR are shown in active cGvHD patients (n=37) and patients without cGvHD (n=27). **B.** BCL-2 (*left*) and CD95/Fas (*right*) ratio are shown in active and Without cGvHD groups to compare the survival of effector (cTFH = Tcon CXCR5+: CD25^{lo}FoxP3-CD45RA-CXCR5+CD4+T) over regulator (cTFR = cTFR). Bar graphs representing mean and interquartile range. Wilcoxon-rank-sum test was used. ns = not significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

Figure 4

A.



B.

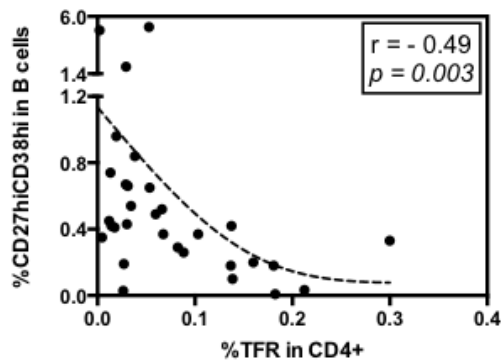
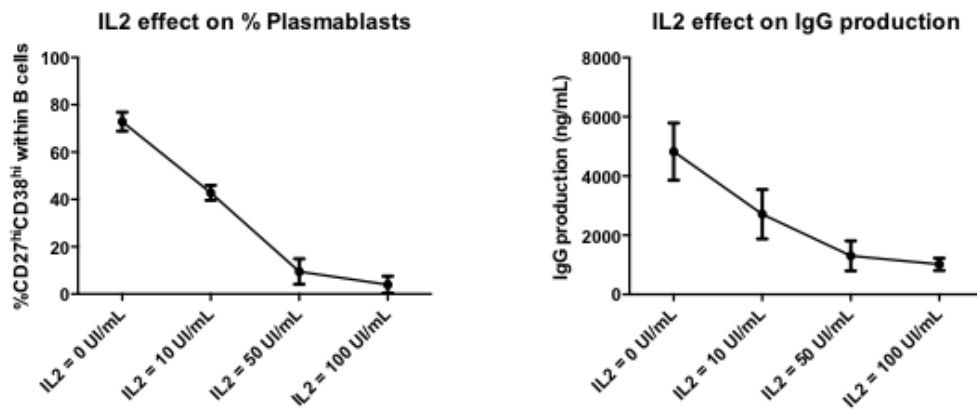


Figure 4: cTFR suppressive function on GC is altered in active cGvHD patients. **A.** T-B co-culture experiment evaluating suppression capacity of cTFR (CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3+CD45RA-CXCR5+CD4+T) or CXCR5-Treg (CD25^{hi}CD127^{lo}CD45RA-CXCR5-CD4+T) added to cTFH (CD25^{lo}CD127+CD45RA-CXCR5+CD4+T) and memory B cells (CD3-CD19+CD27+) in presence of SEB. Plasmablast (CD27^{hi}CD38^{hi} within CD19+CD4-) generation was evaluated by flow cytometry and IgG measured in the supernatant by ELISA. Bar graphs represent mean and SEM for cTFR (n=1) and CXCR5-Treg (n=3) conditions. **B.** Correlation between % of cTFR in CD4+T cells and plasmablasts within B cells. Spearman test.

Figure 5

A.



B.

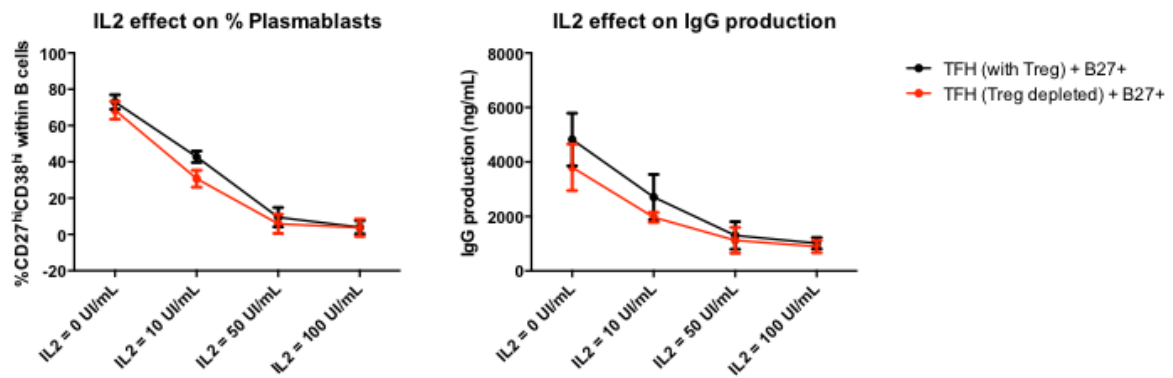


Figure 5: IL-2 impedes GC-like reaction in a cTFR-independent mechanism. **A.** IL-2 effect on a T-B co-culture experiment was evaluated through plasmablast generation and IgG production. **B.** Comparison of IL-2 effect with (red) or without (black) depletion of Treg/cTFR. Graphs depict mean and SD values.

Figure 6

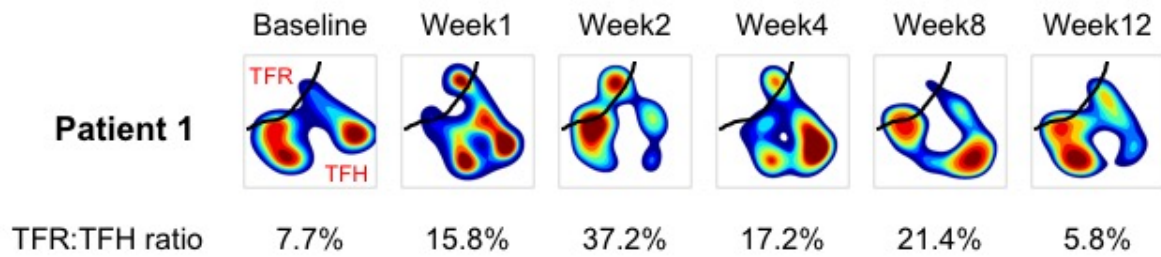


Figure 6: Contour viSNE plots of cTFR:cTFH ratio in a representative patient with chronic graft-versus-host disease (GVHD) receiving low-dose IL-2 therapy. The contour maps represent cell density in each region of the map at the indicated time point (in weeks [W]) during IL-2 therapy.

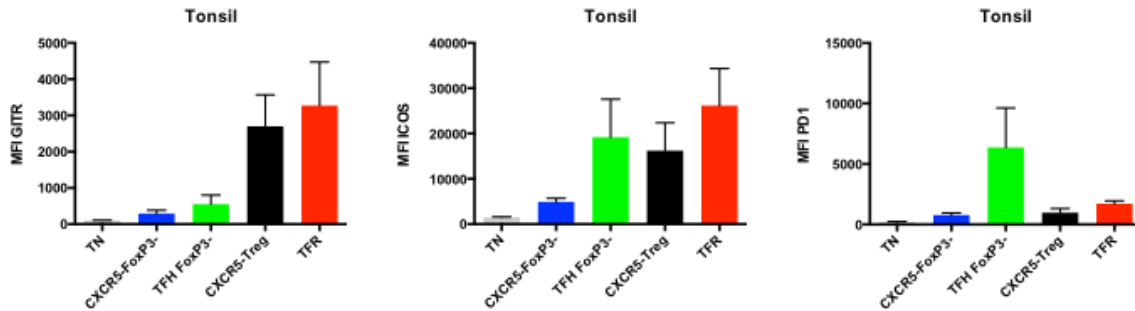
Table 1: Clinical characteristics of HSCT patients

		HSCT Patients (N=64)		
		No cGVHD	Active cGVHD	Resolved cGVHD
		N=15	N=37	N=12
Age (years)	<i>Median</i>	55.4	63.1	63.3
	<i>Range</i>	25 – 74.9	25.9 – 75.6	34 – 71.7
Sex	<i>M (%)</i>	8 (53)	23 (62)	6 (50)
	<i>F (%)</i>	7 (47)	14 (38)	6 (50)
Disease	<i>Acute Leukemia (%)</i>	5 (33)	14 (38)	3 (25)
	<i>HD, NHL, CLL, MM (%)</i>	7 (47)	15 (40)	6 (50)
	<i>MDS, MPN (%)</i>	1 (7)	7 (19)	2 (16)
	<i>Non Malignant (%)</i>	2 (13)	1 (3)	1 (9)
Conditioning regimen	<i>MAC (%)</i>	4 (27)	8 (22)	5 (42)
	<i>RIC (%)</i>	11 (73)	29 (78)	7 (58)
Donor Type	<i>MRD (%)</i>	8 (53)	10 (27)	4 (33)
	<i>MUD (%)</i>	6 (40)	24 (63)	8 (67)
	<i>mmUD (%)</i>	1 (7)	3 (8)	0 (0)
Graft Source	<i>PBSC</i>	12 (80)	36 (97)	10 (83)
	<i>BM</i>	3 (20)	1 (3)	2 (17)
GVHD Prophylaxis	<i>Tac-MTX (%)</i>	6 (40)	14 (38)	5 (42)
	<i>Tac-Sir (%)</i>	4 (27)	6 (16)	1 (8)
	<i>Tac-Sir-MTX (%)</i>	5 (33)	17 (46)	6 (50)
Months from HSCT to sample collection	<i>Median</i>	35.8	31.3	52.8
	<i>Range</i>	12 – 87.9	9.6 – 123.8	11.7 – 140.9
Grade II-IV aGVHD	<i>YES (%)</i>	1 (6.6)	17 (46)	3 (25)
cGVHD	<i>Mild (%)</i>	NA	15 (40)	NA
	<i>Moderate (%)</i>	NA	13 (35)	NA
	<i>Severe (%)</i>	NA	9 (25)	NA
Immunosuppressive treatment	<i>Corticosteroid (%)</i>	NA	13 (35)	0
	<i>Other (%)</i>	NA	25 (67)	1 (8.3)

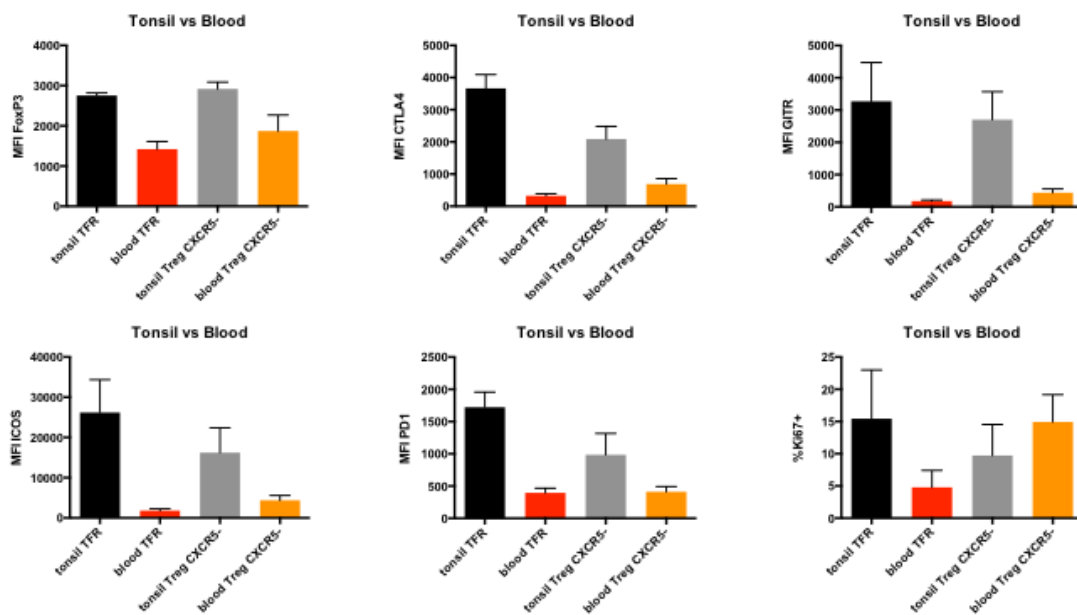
M = Male; F = Female; HD = Hodgkin Disease; NHL = Non-Hodgkin Lymphoma; CLL = Chronic Lymphocytic Leukemia; MM = Multiple Myeloma; MDS = Myelodysplastic Syndrome; MPN = Myeloproliferative Neoplasm; MAC = Myeloablative Conditioning; RIC = Reduced Intensity Conditioning; MRD = Matched Related Donor; MUD = Matched Unrelated Donor; mmUD = Mismatched Unrelated Donor; PBSC = Peripheral Blood Stem Cell; BM = Bone Marrow; Tac-MTX = Tacrolimus-Methotrexate; Tac-Sir = Tacrolimus-Sirolimus; Tac-Sir-MTX = Tacrolimus-Sirolimus-Methotrexate; aGVHD = acute GVHD. cGVHD = chronic GVHD; ns = not significant. NA: Not Applicable.

Supplemental Figure 1

A.



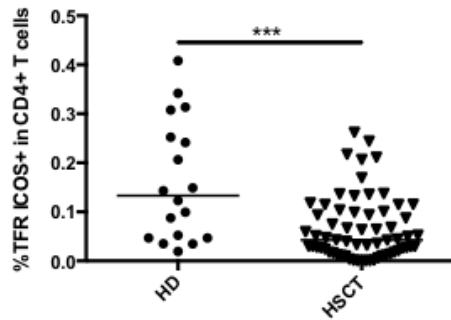
B.



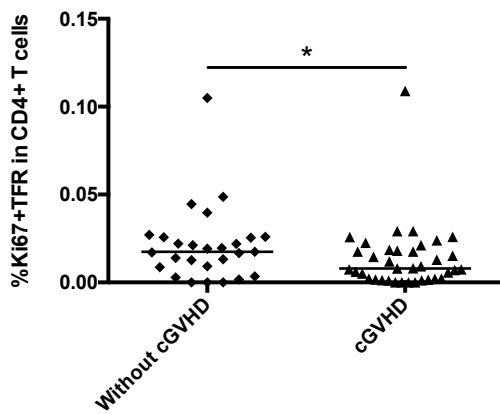
Supplemental Figure 1: A. Bar graph (mean \pm SD) representing GITR, ICOS and PD1 expression in Naïve, CXCR5-FoxP3-, TFH FoxP3-, CXCR5-Treg and TFR from tonsil specimen (n=3). **B.** Comparison of FoxP3, CTLA4, GITR, ICOS, PD1, Ki67 expression between tonsil (n=3) and blood (n=10) specimens in regulatory subsets: TFR and CXCR5-Treg. Bar graph (mean \pm SD).

Supplemental Figure 2

A.



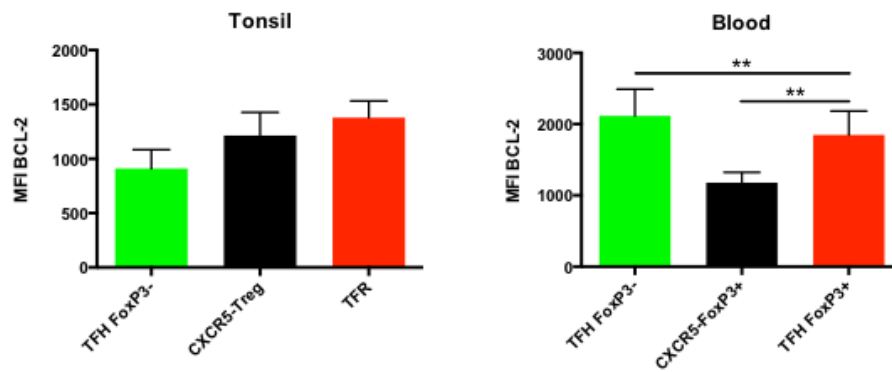
B.



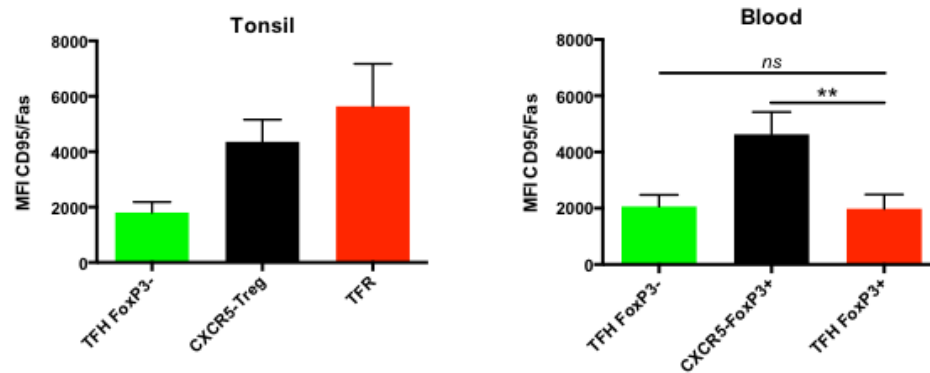
Supplemental Figure 2: A. cTFR ICOS+ (CD25^{hi}FoxP3+ICOS+CD45RA-CXCR5+ in CD4+ T cells) frequency in HD (n=18) and HSCT patients (n=64). **B.** Frequency of Ki67+cTFR (Ki67+CD25^{hi}FoxP3+CD45RA-CXCR5+) in CD4+ T cells in Without (n=27) and Active cGvHD (n=37) groups. Black bar represents median value for each group. Wilcoxon-rank-sum test was used. ns = not significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 10^{-4}$.

Supplemental Figure 3

A.



B.



Supplemental Figure 3: A. Comparison of BCL-2 expression (MFI: Median Fluorescence Intensity) in different subsets within tonsil (*left*) and blood (*right*) specimen (n=3 and 10 respectively). **B.** Comparison of CD95/Fas expression (MFI: Median Fluorescence Intensity) in different subsets within tonsil (*left*) and blood (*right*) specimen (n=3 and 10 respectively). Bar graphs represent mean and SD. Wilcoxon signed-rank test was used. ns = not significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

Supplemental Methods

Reagents used for flow cytometry staining and sorting

Antibody	Clone	Company
CD3	UCHT1	BD Bioscience
CD4	SK3	BD Bioscience
CD45RA	IMU2711	Beckman Coulter
CXCR5	RF8B2	BD Bioscience
ICOS	C398.4A	BioLegend
PD1	EH12.2H7	BioLegend
CD25	M-A251	BD Bioscience
CD127	eBioRDR5	eBioscience
FoxP3*	PCH101	eBioscience
BCL-2*	BCL-2/100	BD Bioscience
CD95	DX2	BioLegend
Ki67*	B56	BD Bioscience
CTLA4*	BNI3	BD Bioscience
GITR	DT5D3	Miltenyi
BCL-6*	K112-91	BD Bioscience
CD19	HIB19	BioLegend
IgD	IA6-2	BioLegend
CD27	O323	eBioscience
CD38	HIT2	BD Bioscience
Fixable Viability Dye	N/A	eBioscience

*: intracellular staining

Article 3

An Activated Th17-Prone T cell subset involved in Chronic Graft *versus* Host Disease Sensitive to Pharmacological Inhibition

Edouard Forcade,* Katelyn Paz,* Ryan Flynn,* Wei Li, Liangyi Liu, Di Jiang, Hong Wei Chu, Jiangfei Yang, David S. Wilkes, Jing Du, Eduardo L. Espada, Patrick Blanco, Corey S. Cutler, Joseph H. Antin, Robert J. Soiffer, Jerome Ritz,[‡] Sophie Paczesny,[‡] and Bruce R. Blazar[‡]

*: These authors contributed equally as first authors.

[‡]: These authors contributed equally as last authors

Submitted to The Journal of Clinical Investigation

Contexte et Synthèse de l'article

Le rôle des LT dans la cGVHD est démontré depuis de nombreuses années. Cependant, la caractérisation grandissante de différentes sous-populations T effectrices ou régulatrices permet d'améliorer nos connaissances et d'envisager de nouveaux traitements ciblant de façon plus spécifique les populations effectrices pathologiques impliquées dans la cGVHD.

Le paradigme des réponses Th1/Th2 ayant été dépassé par la découverte de nouvelles populations (Th9, Th17, Th22, TFH), les études réalisées chez la souris ont apporté de nouvelles données proposant la participation conjointe des Th1 et Th17 dans le développement de la cGVHD. Chez l'homme, peu de données sont disponibles concernant l'étude des Th17 au cours de la cGVHD. L'on notera cependant l'étude de Dander *et al* ayant analysé les Th17 circulants retrouvant une augmentation de ceux-ci en cas de cGVHD active ; et l'étude de Brüggem observant dans les tissus siège de lésions lichénoïdes de cGVHD un infiltrat mixte Th1/Th17.

Plus récemment, nous avons caractérisé une nouvelle population de LT CD4⁺ co-exprimant les molécules CD146 et CCR5 leur conférant un avantage de migration trans-endothéliale en direction de tissus inflammatoires (211, 212). Cette population proposée comme pathogène dans la GVH aiguë, est apparue candidate dans la cGVHD par les études de protéomique (213). En effet, l'étude par spectrométrie de masse a permis de définir plusieurs biomarqueurs de la cGVHD parmi lesquels le CD146 apparaissait.

Nous avons donc entrepris d'étudier cette population de LT CD4⁺ exprimant le CD146 dans des modèles murins et humains de cGVHD. L'augmentation tardive de cette population, dans un modèle murin de GVH aiguë, suggérait son implication dans la cGVHD. En effet, l'étude de patients ayant développé une cGVHD active a montré une augmentation de LT CD4⁺CD146⁺, à la fois parmi les effecteurs et les régulateurs. Cette population activée est polarisée vers un profil Th17 comme en témoigne l'augmentation de ROR γ t et la sécrétion d'IL-17. De plus, elle inclut une sous-population mixte dite Th1/Th17, présentant une augmentation de ROR γ t et de T-bet, proposée dans d'autres modèles de dysimmunité comme pathologique. Les Treg exprimant CD146 présentent par ailleurs une fonction suppressive diminuée, entravant les mécanismes de tolérance périphérique.

L'utilisation de modèle murin de cGVHD a permis d'attester le rôle des LT CD4⁺CD146⁺, puisque l'injection de splénocytes de souris déficiente pour CD146 retrouvait une diminution du score de cGVHD. Le profil Th17 de cette population nous a conduit à évaluer l'efficacité de molécules inhibitrices de ROR γ t (TMP778) dans le but de bloquer cette réponse alloréactive impliquée dans la cGVHD. L'administration de TMP778 a permis de diminuer le score de cGVHD chez la souris de la même manière que les anticorps bloquant l'IL-17, ou

l'administration d'inhibiteur de STAT3 (Cucurbitacine I). Enfin, nous avons montré *in vitro* que la différenciation de Th17 et de cette population mixte Th1/Th17 était bloquée en présence de TMP778.

Ces données sont en faveur de l'implication des Th17 dans la cGVHD et permettent de définir une population candidate impliquée dans l'alloréactivité. Les données humaines et murines suggèrent l'utilisation de cet inhibiteur de ROR γ t dans le cadre d'essai clinique chez des patients avec une cGVHD cortico-résistante.

An Activated Th17-Prone T cell subset involved in Chronic Graft-versus-Host Disease Sensitive to Pharmacological Inhibition

Edouard Forcade,^{1,2,3,4*} Ryan Flynn,^{5*} Katelyn Paz,^{5*} Wei Li,^{7,8,9,10} Di Jiang,¹¹ Hong Wei Chu,¹¹ Jiangfei Yang,¹² David S. Wilkes,¹³ Jing Du,⁵ Eduardo L. Espada,^{1,2} Patrick Blanco,³ Corey S. Cutler,^{1,2} Joseph H. Antin,^{1,2} Robert J. Soiffer,^{1,2} Jerome Ritz,^{1,2,6‡} Sophie Paczesny,^{7,8,9,10‡} and Bruce R. Blazar.^{5‡}

Affiliation:

¹Division of Hematologic Malignancies and Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA;

²Harvard Medical School, Boston, MA, USA;

³UMR CNRS 5164, Bordeaux University, Bordeaux, France;

⁴Department of Hematology and Cell Therapy, University Hospital, Bordeaux, France;

⁵Division of Blood and Marrow Transplantation, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA;

⁶Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA.

⁷Department of Pediatrics, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA;

⁸Herman B. Wells Center for Pediatric Research, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA;

⁹Department of Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA;

¹⁰Melvin and Bren Simon Cancer Center, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA;

¹¹National Jewish Health, Denver, Colorado, USA.

¹²Tempero Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA, USA.

¹³Dean, University of Virginia, School of Medicine, Charlottesville, VA, USA.

*: These authors contributed equally as first authors.

‡: These authors contributed equally as last authors

Corresponding Authors:

Bruce R. Blazar, Department of Pediatrics, Masonic Cancer Center, University of Minnesota, 420 Delaware St SE, MMC 109, Minneapolis, MN 55455, USA. Email: blaza001@umn.edu

Sophie Paczesny, Indiana University School of Medicine, 1044 W. Walnut Street, Room R4-425, Indianapolis, Indiana, 46202, USA. Email: sophpacz@iu.edu

Disclosure / Conflict of interest:

Category: Research article

Key-words: CD146, RORgt, chronic GVHD

Word count:

- Abstract: 228
- Manuscript: 7778
- Figures: 6
- Table(s): 1

Abstract (max 250 words)

Chronic Graft-versus-Host Disease (cGvHD) remains a major complication of allogeneic stem cell transplantation requiring the development of novel therapies specifically targeting alloreactive effector T cells. CD146 and CCR5 represent 2 molecules expressed by activated T cells and associated with increased migration capacity. We observed in a murine model of acute GvHD a delayed but significant increase of CD146+CD4+ T cells suggesting their possible involvement during cGvHD. Consistently, we observed an increased frequency of CD146+CD4+ T cells in patients with active cGvHD with enhanced ROR γ t expression. This Th17-prone subset was enriched for cells co-expressing CD146 and CCR5 that harbor mixed Th1/Th17 features and were more frequent in cGvHD patients. Utilizing a murine model of Bronchiolitis Obliterans (BO) cGvHD, we investigated the role of CD146-expressing T cells in the pathogenesis of cGvHD. The allograft of T cells from CD146 deficient mice significantly reduced pulmonary cGvHD compared to Wild Type without affecting T cell – B cell cooperation. We, thus, evaluated the effect of TMP778, a small molecule interfering with ROR γ t activity. TMP778 significantly reduced in vitro differentiation of the Th1/Th17 pathogenic subset, and markedly alleviated cGvHD in murine models similarly to agents targeting Th17 pathway such as STAT3 inhibitor or interleukin-17 (IL-17) blocking antibody. Our data suggest CD146 expressing T cells as a cGvHD biomarker and that targeting Th17 pathway may represent a promising therapy for cGvHD to evaluate in clinic.

228 words.

Introduction

Over the decades, improvements have been made in acute graft-versus-host Disease (aGvHD) prevention. In contrast, chronic graft-versus-host disease (cGvHD), that is often preceded by aGvHD, continues to be a significant cause of morbidity and mortality, affecting an estimated 50% of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) patients (1, 2). Efforts have been made to characterize proteomic and cellular biomarkers to better define disease severity, predict therapeutic responses and improve our understanding of cGvHD pathogenesis (3-7).

Donor T effector cells (Teffs) have been shown to mediate alloreactivity toward recipient tissue in both human and mice (2, 8, 9) and are required elements of aGvHD and cGvHD generation. Both in vitro or in vivo T cell depletion have reduced but not eliminated cGvHD incidence and both can be associated with increased infections and malignancy recurrence as complications. Offsetting GvHD-causing Teffs are regulatory mechanisms that serve to dampen the immune destructive responses that can harm the organism. These include cell surface molecules such as co-inhibitory receptors, metabolic control switches such as the indoleamine 2,3-dioxygenase tryptophan catabolic pathway, and cellular mechanisms such as regulatory T cells (Tregs). Relevant to cGvHD in patients, we previously showed that patients developing cGvHD presented altered Treg homeostasis with quantitative deficiency (5). Strategies to expand Tregs in vivo were efficient at reducing but not uniformly eliminating disease severity (10). Similarly, we observed abnormal homeostasis and chronically activated B cells (6, 11), offering the possibility to deplete or target them (12-14). Thus, approaches to be used in combination with Treg augmentation would be desirable. Identifying a new Teff cell involved in the pathogenesis of the disease would be a key

step forward in order to develop prophylactic, therapeutic and prognostic means of reducing the significant consequences of cGvHD in patients.

GvHD causing Tregs can be contained within T-helper (Th) cell subsets that have been progressively defined according to the expression of surface markers, activation molecules, chemokine receptors and their capacity to secrete cytokines. Nomenclature defining Th polarization (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, etc.) is expanding with the further complexity that Th cells can have a degree of plasticity, converting from one subset to another (15). The Th17 subset is defined according to the expression of RAR-orphan receptor gamma transcription factor (ROR γ t) (16) and the capacity of cells to secrete interleukin-17 (IL-17) upon stimulation. In addition, different surface markers have been described such as chemokine receptor (CCR)6, CD161, CCR4, IL23R and CD5L to characterize the Th17 subset (17, 18). Several studies have attempted to decipher the role of Th17 in acute GvHD (aGvHD) (19, 20). However, murine models presented conflicting results, as IL-17 knockout (KO) donor T cells either reduced (21) or exacerbated aGvHD (22). Similarly, human aGvHD studies reported discordant results. Indeed, blood/tissue Th17 cells were found to be either increased (23) or decreased (24, 25). Interestingly, some studies provided data suggesting Th17 involvement in the transition from aGvHD to cGvHD. Indeed, Chen *et al* reported the expansion of Th17 in the early phase of aGvHD playing a role in the development of later auto-immune-like disease (26) and, in parallel, Carlson *et al* described the role of Th17 in severe skin and lung injuries that may resemble to cGvHD (27).

With respect to the pathogenesis of cGvHD, the role of Th17 cells is less controversial. Studies that demonstrated Th17 role in murine model with auto-immunity features (26), scleroderma (28) and multi-organ system disease with bronchiolitis obliterans (BO) in a CSF-1/CSF-1R (29) and signal transducer and activation of

transcription (STAT)3-dependent manner (30, 31). In humans, there is a paucity of data. Dander *et al* showed an increase of Th17 cells in the blood of patient with active cGvHD (23), and a mixed Th1/Th17 signature was observed in the skin of patients with active disease (32). More recently, we reported candidate biomarkers (CCL14 and CD146) in the plasma of patients developing gastrointestinal (GI) GvHD that revealed an activated Th17-prone T cell population (CD4+CD146+CCR5+ T cells) participating in the pathogenesis of aGvHD (33). Interestingly, CD146 appeared associated with cGvHD in our recent large proteomic study (7). Altogether, these data suggest studying the role of Th17 and ROR γ t pathway during cGvHD pathogenesis, and targeting this subset may provide clinical benefit.

Strategies specifically targeting Th17 subset have included antibody-mediated neutralization of IL-17 or IL-23, and were predominantly evaluated in the field of autoimmune diseases (34-36). The Th17 program is dependent on the master regulator ROR γ t, and STAT3 signaling. Dual ROR γ t or STAT3 pathways inhibitors have been developed such as the small GTPase, Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2 (Rock2) inhibitor, KD025. We recently showed that KD025 was efficient in suppressing murine and human cGvHD through inhibition of ROR γ t and STAT3, leading to reduced IL-17 and IL-21 cytokine production and T follicular helper (TFH) cells that can support pathogenic antibody production during cGvHD (31, 37). Via its effects on STAT5, Treg production also is facilitated (31, 38). Other inhibitors can provide a more specific approach by targeting the Th17 program (e.g. ROR γ t) only without affecting all downstream STAT3 signaling (e.g. TFH and Th17) in order to preserve other immune functions such as humoral immunity (STAT3/4-dependent) (39, 40). One such small-molecule ROR γ t inhibitor is TMP778 which acts through several modalities: interruption of ROR γ t binding its target genes, disrupting

ROR γ t interaction with other transcription factors or coactivators and promotion of Gata3 transactivation (39). Previous reports demonstrated the role of TMP778 interfering with Th17 cell differentiation and its activity during autoimmune diseases (39, 41). Molecular studies showing a STAT3-dependent mechanism of action suggest TMP778 use as a candidate treatment of cGvHD.

Herein, we showed that CD146-expressing cells are increased in the context of cGvHD in both human and mice, and harbor a Th17 polarization with an upregulation of ROR γ t and an increased capacity to secrete IL-17. This population was required for cGvHD pathogenesis, as both CD146 knockout and ROR γ t specific inhibition (TMP778) alleviated disease severity. Altogether, our data support the use of TMP778 as a new therapeutic option for cGvHD.

Results

CD146 expression is induced on CD4 T cells in murine aGVHD and increase over time

CD146 expression is barely detectable on CD4 T cells in naïve mice (42). However, in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice, CD146 expression is induced on CD4 T cells from both spleen/lymph nodes as well as the central nervous system and depletion of CD146⁺ CD4 T cells decreases EAE severity (43, 44). We have previously showed that transfer of CD146 KO T cells in allogeneic murine aGVHD models does not impact GVHD severity in comparison to wildtype (WT) T cells (33). To investigate whether CD146 could play a functional role in cGVHD, we first assessed the kinetics of CD146 expression on CD4 T cells in a minor histocompatibility antigen (miHA)-mismatched murine model of aGVHD (C57BL/6→C3H.SW) (**Figure 1**). At day (d)14 post transplantation, only low level CD146 expression was detected on CD4 T cells isolated from spleen, mesenteric lymph nodes (MLNs), liver, and GI tract. CD146 was significantly upregulated on MLN and gut CD4 T cells at d21 ($p=0.003$ for MLN and $p=0.005$ for gut, unpaired t test) and d35 ($p<0.0001$ for MLN and $p=0.0007$ for gut) as compared to d14, whereas CD146 expression on splenic and liver CD4 T cells was significantly higher at day 35 than day 14 ($p<0.0001$ for liver and $p=0.02$ for spleen). Moreover, CD146 expression was higher on CD4 T cells from MLNs and GI than spleen and liver. In contrast, CD4 T cells from the syngeneic control animals did not upregulate CD146. Therefore, in response to inflammation caused by alloreactivity CD4 T cells upregulated CD146 relatively late during murine GVHD suggesting that CD146 T cells may also be involved in cGVHD pathogenesis.

Increased frequencies of CD146+ and CD146+CCR5+ CD4 T cell subsets during cGvHD

CD146 and CCR5 represent two molecules facilitating migration of T cells through the endothelium in response to homing signals released from inflamed tissues (45, 46). We previously demonstrated that patients with GI GvHD presented an increased frequency of CD146+CCR5+ T cells compared to patients without GvHD, non-enteritis GvHD, or with isolated skin GvHD (33). Our data above suggest a role for the involvement of this population in late aGvHD manifestations. To evaluate the role of CD146 and CCR5 expressing cells in the pathogenesis of human cGvHD, we performed multi-parameter flow cytometry on human samples from HSCT patients presenting or not an active cGvHD at the time of sample collection. Patients' clinical characteristics are listed in **Table 1**.

First, we analyzed the expression of CD146 within conventional CD4 T cells (Tcon), defined as non-Treg cells i.e. excluding CD25^{hi}CD127^{low} cells. CD146 was significantly upregulated in CD4 Tcon during cGvHD compared to patients without cGvHD (median %: 6.76 vs. 3.28 respectively, $p < 10^{-4}$) (**Figure 2A**). Interestingly, CD146+ Tcon cells appeared to be positively associated with cGvHD disease severity according to NIH criteria (**Figure 2A**). We also analyzed the subset co-expressing CD146 and CCR5 (CD146+CCR5+). Although representing a smaller fraction within CD4+ T cells, CD146+CCR5+ within the Tcon subset was significantly increased during active cGvHD (median %: 0.62 vs. 0.27 respectively, $p = 0.015$) (**Figure 2B**), similar to the CD146+ fraction. We also examined CD4+ Treg (defined as CD25^{hi}FoxP3⁺), and found, similarly to aGvHD (33), a significant up-regulation of CD146 (median %: 21.65 vs. 13.2 respectively, $p=10^{-4}$) (**Figure 2C**), and an increased

frequency of the double positive subset (CD146+CCR5+) within the Treg subset (median %: 3.4 vs. 2.1 respectively, $p = 0.007$) (**Figure 2D**), during cGvHD.

Taken together these data indicate that both CD146+ and CD146+CCR5+ T cell subsets with increased migration capacity are increased during cGvHD.

CD146 expressing CD4+ T cells are skewed towards a Th17 profile during cGvHD

We next evaluated whether these increased Tcon subsets seen during cGvHD in patients were prone to generate a specific polarization profile. Previous reports suggested that CD146+ subsets tended to be polarized towards a Th17 phenotype and function (47). As ROR γ t is a major transcription factor contributing to the Th17 polarization of T cell subset, we assessed its expression in the previous subsets using flow cytometry among HSCT patients. In our cohort, ROR γ t expression was increased in active cGvHD patients compared to No cGvHD when examining effector CD4 T cells (CD4+ Tcon, median ROR γ t median fluorescence intensity (MFI): 244 vs. 197 respectively, $p=0.0045$) (**Figure 3A**) as well as in both the CD146+CD4+ Tcon (median MFI: 291.5 vs. 244.5 respectively, $p=0.029$) (**Figure 3B**) and CD146+CCR5+CD4+ Tcon (median MFI: 356 vs. 269.5 respectively, $p=0.042$) subsets (**Figure 3C**). The same trends were observed for the CD4+ Treg (median ROR γ t MFI: 192 vs. 156.5 for active cGvHD and No cGvHD respectively, $p=0.0066$) (**Figure 3D**), as well as in CD146+CD4+ Treg (median MFI: 200 vs. 160.5 respectively, $p=0.0056$) (**Figure 3E**), and CD146+CCR5+CD4+ Treg (median MFI: 210.5 vs. 162 respectively, $p=0.0007$) (**Figure 3F**) subsets. Since ROR γ t upregulation in Tregs may have affected Treg function, we assessed suppressor function according to CD146 expression levels in an in vitro suppression assay with Tcon. We observed a significant decreased suppressive capacity of CD146+ Treg compared to CD146- Treg (**Figure 3G**). Taken

together, these data suggest that CD146 and CD146/CCR5 expressing cells, in both Tcon and Treg, are polarized towards a Th17 phenotype, which is augmented during cGvHD and may contribute to its pathogenesis.

CD146+CCR5+ CD4+ T cell subsets harbor a mixed polarization

CCR5 is a chemokine receptor associated with Th1 polarization (48). Thereby, we decided to evaluate T-bet expression, a canonical transcription factor of Th1 subset, within our population of interest. In Healthy Donors (HD), CCR5 expression within Tcon had a greater impact on T-bet upregulation compared to CD146 (T-bet mean MFI: 661.5 in CD146-CCR5+ vs. 446.3 in CD146-CCR5-, $p=0.0078$; 661.5 in CD146-CCR5+ vs. 520.9 in CD146+CCR5-, $p=0.07$) (Sup Fig 1D-F). We then evaluated IFN- γ production as a key Th1 signature cytokine. Consistent with T-bet upregulation data, the CD146-CCR5+ expressing subset produced a greater amount of IFN- γ compared to the reciprocal CD146+CCR5- subset (mean IFN- γ production: 66.15 vs. 23.69 respectively, $p=0.002$) (Sup Fig 2A-C). Together, our data showed in HD that CD146+CCR5+ expressing CD4+ T cells present both features of Th1 (T-bet/IFN γ) and Th17 (ROR γ t/IL-17) with CD146 driving most of the Th17 phenotype. As CD146+ and CD146+CCR5+CD4 T cells are highly correlated (Spearman's: $r=0.81$, $p=0.016$, in HD), we evaluated whether CD146+ expressing CD4+ T cells were enriched for a Th1/Th17 subset previously described as pathogenic. When we analyzed CD146+CD4+ T cells, we observed a significant enrichment of a population secreting both cytokines IFN γ +IL-17+ (mean %: 2.36% for CD146+ subset vs. 0.179% for CD146-, $p=0.002$; and 4.579% for CD146+CCR5+ vs 0.236% for CD4+ excluding CD146+CCR5+, $p=0.002$) (Sup Fig 2G and 2I). Interestingly, in our cohort, the Th1/Th17 (IFN γ +IL-17+) subset within CD146+CD4+ T cells appeared to be

associated with active cGvHD disease severity (**Sup Fig 3**) (median % of IFN γ +IL-17+CD146+ in CD4+ T cells: 0.0152% for mild vs. 0.0438% for moderate, $p=0.064$; 0.0438% for moderate vs. 0.075% for severe, $p=0.367$; $p=0.048$ between mild and severe).

CD146 deficiency of donor T cells alleviates mouse cGvHD

Herein, our data from human samples suggest a role for CD146+ subset in the pathogenesis of cGvHD. Thus, we hypothesized that HSCT with CD146 KO donor T cells would preclude cGvHD generation using a well-established multi-organ system cGvHD mouse model system that has BO as a prominent clinicopathological manifestation. We previously showed that B10.BR recipients receiving bone marrow (BM) and splenocytes from C57BL/6 (B6) donors developed a systemic multi-organ system cGvHD with BO mimicking human cGvHD, representing a powerful tool to evaluate therapeutic interventions to better understand cGvHD pathogenesis and assess pharmacological interventions (14, 31, 49, 50). In this model, donor T cells differentiate into TFH cells that collaborate with BM-derived B cells to mediate cGvHD via a ROR γ t, STAT3, and IL-17/IL-21 dependent mechanism (28, 44, 45). The production and release of pathogenic antibody associated with a germinal center reaction results in pulmonary fibrosis that is dependent upon donor macrophages (26). When using splenocytes from CD146 KO vs WT donors, pulmonary function tests (resistance; compliance; elastance) performed 2 months post-transplant, were each significantly improved and comparable to BM only mice that do not develop cGvHD (**Figure 4A**). Organ fibrosis assessed by trichrome staining of lung (**Figure 4B**) and liver (not shown) cryosections demonstrated significantly decreased collagen deposition with CD146 KO donors compared to WT, quantitatively confirmed using a

hydroxyproline assay to measure collagen burden (**Figure 4C**). Flow cytometry of single-cell suspensions was performed to quantify the frequency of pathogenic T cell subsets with Th17-related features within the lung. Mice developing cGVHD had a significant increase in the IFN γ +IL-17+ subset within both CD146+ and CD146+CCR5+ fractions, which was abrogated when using splenocytes from CD146 KO donors (**Sup Fig 4A**). We previously showed that development of BO during murine cGvHD was associated with an increased infiltrate of TFH cells along with germinal center B cells (GC B cells) within the spleen (50). Splenic flow cytometry indicated no difference in TFH or GC B cells between the mice receiving CD146 KO vs WT (**Sup Fig 4B**). Taken together, our data indicate that CD146 expression is necessary for cGvHD development in this model at the level of a lung and liver pathogenic IFN γ +IL-17+ subset rather than via direct effects on TFH/GC B cell interactions.

TMP778 targeting of ROR γ t suppresses the development of pathogenic Th1/Th17 and CD146+CCR5+ CD4 T cells in vitro

We have previously shown that CD146+CCR5+CD4 T cells are Th17 committed, express higher levels of Th17 markers and exhibit a pathogenic Th1/Th17 phenotype (co-expressing IL-17 and IFN- γ) (15). Therefore, we examined whether TMP778, an inhibitor of the Th17 master transcription factor RORC, could block the development of Th1/Th17-polarized CD146+CCR5+CD4 T cells. Total CD4 T cells from HD were cultured under Th17 polarizing condition in the presence of increasing doses of TMP778 or vehicle control DMSO. TMP778 significantly reduced the frequency of IL-17+IFN- γ + T cells in a dose-dependent manner (**Fig. 5A**). In addition, the frequency of CD146+CCR5+ T cells was also inhibited in a dose-dependent manner (**Fig. 5B**).

Similarly, TMP778 at a concentration of 0.1 μ M and 1 μ M significantly inhibited the generation of Th1/Th17 and CD146+CCR5+CD4 T cells in allogeneic mixed lymphocyte reaction (MLR) cultures (**Sup Fig. 5**). Together, our results indicate that TMP778 can suppress not only the differentiation of Th17 but also the development of Th1/Th17 and CD146+CCR5+ CD4 T cells in vitro.

Pharmacological and neutralizing antibody inhibition of ROR γ t, STAT3 or IL-17 alleviates mouse cGvHD

Our previous results suggested a relationship between CD146 and Th17 polarity. Thus, we evaluated the in vivo cGvHD effect of pharmacological inhibition of ROR γ t with a novel small molecule inhibitor that showed strong efficiency in other Th17 driven disease (39) and under the in vitro Th17 polarizing conditions from HD described immediately above. TMP778 interacts with ROR γ t to hamper its transcription factor activity and, consequently, IL-17 secretion (39, 41). Recipients receiving TMP778 showed a significant improvement of pulmonary function tests at d60, reaching the level of recipients receiving CD146 KO splenocytes or BM only (**Figure 6**). Similarly, administration of an anti-IL-17 blocking antibody significantly improved each of the pulmonary function test parameters, alleviating BO-related cGvHD (**Figure 6**).

STAT3 is a critical regulator of Th17 pathway modulating the expression of several Th17-related genes (ROR γ t, ROR α , RUNX1, BATF, IRF-4, c-Maf) (51). Cucurbitacin I is a STAT3-specific blocking molecule that prevents STAT3 phosphorylation and downstream effects (52). When we administered Cucurbitacin I to recipients receiving WT T cells, we observed a significant improvement of pulmonary function test parameters and the alleviation of BO (**Figure 6**). Taken together, our

results show that ROR γ t and STAT3 pharmacological inhibitors and neutralizing anti-IL17 mAb alleviates cGvHD features.

Discussion

In the present study, we sought to identify and characterize a new T cell subset involved in human and murine cGvHD. Defining cellular biomarkers of cGvHD, such as T cell subsets, remains a major goal in order to improve our understanding and to develop targeted therapies. Herein, we defined a pathogenic CD4 T cell population based on the expression of CD146 and CCR5 reflecting its capacity to migrate to inflamed tissue and to interact with barriers such as endothelium in the context of alloreactivity.

CD146 (also called MCAM: Melanoma Cell Adhesion Molecule) is a cell adhesion glycoprotein expressed on lymphoid cells, endothelial cells, smooth muscle and tumor cells, and displays homophilic or heterophilic interaction (53). It has been shown to play a major role in T cell migration through interaction with endothelial cells (33, 46). Hence, CD146 expression on T cells has been shown as a surrogate of subsets with trans-endothelial migration capacity (33) during the course of inflammation. We used a miHA mismatched murine aGvHD model, when followed for longer time, enabled insights in the transition between aGvHD to cGvHD. Kinetic analysis through d35 revealed an expansion of CD146+CD4 T cells in the GI tract and the MLNs, providing supportive evidence for the potential role of CD146 expressing cells during the late alloreactivity such as that as a predecessor to cGvHD. In further support of this contention, patients with active cGvHD had significantly higher CD146 expression in CD4 T cells, Tcon and Treg subsets.

CD146 can be up-regulated on T cells upon TCR or mitogen stimulation, reflecting T cell activation. When binding CD146 through homophilic interaction, downstream transducing signals induce phosphorylation of cellular proteins such as Pyk2, focal adhesion kinase and paxillin thus promoting trans-endothelial migration (46). Similarly, we also evaluated another subset of CD146 expressing cells, the CD146/CCR5 double

positive CD4 T cells which appeared to be increased in patients with cGvHD. This CD146 expressing CD4 T cells (including CD146+CCR5+) exhibited Th17 features. Specifically, CD146+CD4 T cells express significantly higher concentration of ROR γ t and IL-17 intracellular expression upon stimulation. Previous reports showed that CD146 expressing T cells up-regulated IL-17, IL-22 and CCR6 mRNA (47). Here, we observed in patients with active cGvHD an increased expression of ROR γ t within CD146+ or CD146+CCR5+ T cells (Tcon and Treg) suggesting a strong Th17 signature during cGvHD. Interestingly, CD146-expressing Treg showed a decreased suppressive capacity. This underlines the altered homeostasis between Treg and Tcon previously described (5), and the potential impact of a defective function within regulatory subsets during cGvHD.

CCR5 is a chemokine receptor for CCL14 and CCL5, secreted at inflammatory sites, shown to promote the homing of inflammatory Teff subset, such as Th1 (48). We showed that CCR5 expressing CD4 T cells expressed greater level of T-bet and IFN- γ . CCR5 expressing CD4 T cells have been evaluated in the context of aGvHD, but no reports investigated its implication on circulating T cells during cGvHD. Morita *et al* reported the expression of CCR5 by a lymphoid infiltrate within the skin of patients with cGvHD suggesting its role in the migration of T cells towards inflammatory sites (54). Interestingly, CD146/CCR5 double positive CD4 T cells appeared to be enriched for a subset with a mixed polarization Th1/Th17, as attested by the co-expression of ROR γ t/T-bet and IFN- γ /IL-17. This subset has been shown to harbor a pathogenic role in several autoimmune diseases (55, 56). Indeed, Annunziato *et al* previously showed that Th1/Th17 subset showed increased cytotoxic capacity and lower susceptibility to the Treg suppressive activity (55). Comparably, Bruggen *et al* observed a mixed Th1/Th17 signature in the skin of patients with lichenoid cGvHD (32).

In order to understand the role of CD146 expressing T cells in the pathogenesis of cGvHD, we utilized donor CD146 KO splenocytes in our multi-organ model of cGvHD with BO manifestations (49). We observed a significant alleviation of BO-cGvHD. Furthermore, we observed an increase in the pathogenic IFN γ +IL-17+ subset within both CD146+ and CD146+CCR5+ fractions in the lung of animals developing cGVHD that was alleviated when using CD146 KO splenocytes. We previously showed, in this model, the requirement of allo-antibody production from donor B cells differentiated during GC reaction where TFH cells play a central role (49, 50). However, we didn't observe any impact on TFH and GC B cell frequencies between CD146 KO and WT splenocyte conditions. This suggests that CD146 KO does not impair T-B cross talk and B cell differentiation into GC B cells and plasmablasts. Instead, CD146 KO appears to hamper Th17 cells that harbor pro-fibrotic functions toward lung tissue, as we and other have previously shown (57, 58); thus explaining the improvement of pulmonary function parameters.

Because CD146 expressing subset is Th17-polarized and appear as a key player of cGvHD, we tested a small molecule inhibitor of the ROR γ t pathway to specifically target the Th17 derived subset. TMP778 is a pharmacological inhibitor that binds to ROR γ t to block downstream gene expression such as IL-17A/F, IL-22, IL-23R, CCR6, but also prevent ROR γ t inhibitory effect on T-bet and GATA3 gene expression (39). TMP778 suppressed IL-17 and IFN- γ co-production and diminished the CD146/CCR5 double positive subset not only from differentiated Th17 in vitro (ICOS-induced), but also in an alloreactive context (MLR). Importantly, TMP778 administration to mice receiving WT splenocytes alleviated lung cGvHD. Similarly, we observed BO alleviation when using anti-IL-17 blocking antibody, partly mimicking downstream effect of TMP778. In addition, ROR γ t program expression is dependent

of STAT3 axis (59), as attested by reports on STAT3 deficiency (60) or STAT3 inhibitors (38, 61) inducing ROR γ t inhibition and Th17 deficiency. Thus, we administered Cucurbitacin I, a potent STAT3 inhibitor, to evaluate upstream ROR γ t inhibition and observed BO alleviation at a similar level to TMP778 or 146KO.

In summary, our study provides data supporting the role of CD146 expressing CD4 T cells in the pathogenesis of cGvHD showing enhanced Th17 features, also involved in other autoimmune diseases (47, 62). This proposed new cellular biomarker of cGvHD would require to be prospectively validated in order to justify clinical applications of ROR γ t inhibitors showing promising pre-clinical results.

Material and Methods

Mice

C57BL/6 (B6; H2^b) mice were purchased from the National Cancer Institute. B10.BR (H2^k) mice were purchased from Jackson Laboratories. CD146 knockout (KO) mice (on the H2^b background) were provided for this study by Hong Wei Chu (National Jewish Health, Denver, Colorado, USA). Mice were housed in a specific pathogen-free facility and used with the approval of the University of Minnesota's institution's animal care committee.

CD146 expression on CD4 T cells in a murine allogeneic aGVHD model

T cells from C57BL/6 mice (H-2^b) were used to induce GVHD in C3H.SW (H-2^b, minor histocompatibility antigen-mismatched) recipient mice as previously described (63). Briefly, a day after lethal irradiation at 1100 cGy, C3H.SW (8–10 weeks of age) recipient mice were injected intravenously (IV) with bone marrow cells (5×10^6) and splenic T cells (2×10^6) from C3H.SW (syngeneic group) or C57BL/6 (allogeneic group) mice. Donor T cells were purified using the murine Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi). Mice were housed in sterilized microisolator cages and maintained on acidified water (pH<3) for 3 weeks as described previously (64). Small and large intestines, liver, mesenteric lymph nodes, and spleen were harvested from syngeneic and allogeneic recipient mice euthanized on day 14, day 21, and day 35 after HSCT. Preparation of single cell suspensions of intestinal cells was as described previously (63). Mononuclear cells from liver were isolated by 40% Percoll gradient centrifugation at 850g for 20 min at 4°C without braking. Cells were stained with Cell Viability Dye (eBioscience) and antibodies against CD3, CD4, and CD146. Animal protocols were

approved by the Indiana University School of Medicine institutional animal care (IACUC protocol # 10488).

Bone Marrow Transplant and Therapeutic interventions

B10.BR recipients were transplanted as previously described (31). Briefly, mice were given 2 doses of Cyclophosphamide (120 mg/Kg) intraperitoneally (IP). and TBI (8.3 Gy). Mice were transplanted with 1×10^7 WT C57BL/6 bone marrow cells supplemented with or without $0.6-0.8 \times 10^5$ T cells from either WT or CD146 KO C57BL/6, where indicated. Where specified, cGVHD recipients were given anti-IL-17 IP (250 μ g/mice, twice a week for 3 weeks), TMP778 subcutaneously (SC) (600 μ g/mice twice daily for 14 days) or Cucurbitacin I IP (1mg/kg/day from day 28 to day 60). Cucurbitacin I was dissolved in DMSO and delivered in a volume of 200 μ L (10% DMSO) to cGVHD mice in vivo by IP injections. Anti-IL17 blocking antibody (5.1 mg/ml) or isotype (4.9 mg/ml) diluted in PBS were injected IP twice a week for 3 weeks.

Pulmonary function tests

Anesthetized mice were weighed, un-blinded animals were intubated, and lung function assessed by whole body plethysmography using the Flexivent system (SCIREQ) and analyzed using the Flexivent software version 7.3.

Flow Cytometry

Spleens, Lymph Nodes, Lungs and Livers were harvested for IL-17 analysis on day 28, 42, and 56 and single cell suspensions were made. The cells were stimulated with Cell Stimulation Cocktail plus Protein Transport Inhibitors (eBioscience: 00-4975-93)

for 5 hours at 37 degrees in complete-RPMI. Cells were stained with fixable viability dye eF780, anti-CD4, anti-IFN- γ (clone: XMG1.2), anti-IL-17A (clone: eBio17B7), anti-CCR5 (clone: HM-CCR5 (7A4)), anti-CD146 (clone: ME-9F1) and anti-CD45.2 (clone: 104). All cells were fixed and permeabilized by the FOXP3 Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent kit (eBioscience: 00-5521-00).

Frozen tissue preparation

All organs harvested were embedded in Optimal Cutting Temperature compound (OCT), snap frozen in liquid nitrogen, and stored in -80°. Lungs were inflated by infusing 1 ml of OCT: PBS (3:1) intratracheally prior to harvest.

Histology and trichrome staining

6 μ m cryosections were fixed for 5 minutes in acetone and stained with hematoxylin and eosin to determine pathology and with the Masson's trichrome staining kit (Sigma) for detection of collagen deposition. Histopathology scores were assigned as previously described (49). Collagen deposition was quantified on trichrome stained sections as a ratio of area of blue staining to area of total staining using the Adobe Photoshop CS3 analysis tool. Collagen content was quantified by Hydroxyproline assay (Sigma). Briefly, the left lobe of each mouse was homogenized in 200ul DI water and then hydrolyzed in hydrochloric acid at 120 C, 5-10 μ l of supernatant was transferred to a 96 well plate and evaporated to dryness. The amount of Hydroxyproline in the lung homogenate aliquot was measured by the Hydroproline assay according to the protocol (65).

Patient Characteristics

Laboratory studies were performed on frozen samples from 40 patients who underwent allogeneic HSCT at the Dana-Farber Cancer Institute and Brigham and Women's Hospital (Boston, MA). Clinical characteristics of these patients are summarized in **Table 1**. Chronic GvHD grade was established at the time of sample collection using NIH guidelines (66) and summarized in **Table 1**. All patients and healthy donors were enrolled in clinical research protocols approved by the Human Subjects Protection Committee of the Dana-Farber/Harvard Cancer Center. Written informed consent was obtained prior to sample collection, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Flow Cytometry for human studies

Thawed human PBMC were first stained using a viability dye (eBioscience). A panel of surface markers was then used at 4°C for 20 minutes with fluorochrome-conjugated antibodies. The following reagents were used: CD3 (clone UCHT1), CD4 (SK3), CD25 (M-A251), CD146 (P1H12) and CCR5 (2D7) from BD Bioscience; CD45RA (IMU2711) from Beckman; CD127 (eBioRDR5, eBioscience). To evaluate T cell polarization, PBMC were stained using antibodies targeting intracellular antigens specific for Treg (FoxP3, PCH101, eBioscience), Th1 (T-bet, 4B10, BioLegend) and Th17 (ROR γ t, Q21-559, BD) with the FoxP3 / Transcription Factor Staining kit (eBioscience). For cytokine flow cytometry, PBMC were stimulated with PMA (50 ng/mL) ionomycin (1 μ M) (from Sigma-Aldrich) in the presence of Brefeldin A (BD) for 5h in RPMI1640, supplemented with 10% FBS, L-Glutamine and Pencilline/Streptomycin. Cells were then fixed and permeabilized with BD Cytofix/Cytoperm kit and stained with cytokine-specific antibodies: IFN- γ (clone B27) from BD and IL-17 (clone eBio64Dec17) from

eBioscience. Flow cytometry standards and quality controls were run regularly to ensure stability of the analytical instruments. A minimum of 150,000 events were recorded in the lymphocyte gate. Cells were analyzed using LSR Fortessa (BD Bioscience) and FlowJo v.10 software (Treestar). For Treg suppression assay: PBMC from leukopacks (Healthy Donors) were enriched for CD4⁺ T cells (MACS negative selection) and stained with CD4, CD25, CD127, CD146. The following subsets were sorted using Aria : Tcon (CD8-CD14-CD19-CD4⁺CD25-CD127⁺), Treg CD146⁺ (CD8-CD14-CD19-CD4⁺CD25^{hi}CD127-CD146⁺) and Treg CD146⁻ (CD8-CD14-CD19-CD4⁺CD25^{hi}CD127-CD146⁻). Purity of sorted subsets was > 95%. Tcon were stained with CFSE (1 μ M). Treg and Tcon subsets were co-cultured for 5 days at different ratios upon stimulation with coated α CD3 (Cf=5 μ g/mL) and soluble α CD28 (Cf=3 μ g/mL). At Day 5, cells were stained with a viability dye and read on Fortessa. For suppression, formula = (Tcon alone - Tcon+Treg)/(Tcon alone)*100.

ROR γ t and IL17 targeting reagents.

TMP778 powder, synthesized by Tempero Pharmaceuticals (a GlaxoSmithKline company) and kindly provided by Dr. Jianfei Yang, was dissolved in DMSO at 808.76 mM and stored at -80°C as aliquots. Immediately before use, aliquot of TMP778 stock solution was diluted in DMSO to 0.01 mM, 0.1 mM and 1 mM and then further diluted by a factor of 1000 in culture medium to final concentrations of 0.01 μ M, 0.1 μ M, and 1 μ M, respectively. DMSO at 0.1% was used as vehicle control. For in vitro treatment, PBMCs were prepared from leukopacks of HD (Central Indiana Blood Bank) by Ficoll-Paque density grade centrifugation (GE Amersham). Total CD4 T cells were positively isolated using human CD4 microbeads (Miltenyi) and activated for 6 days with anti-CD3/anti-ICOS antibody-coated Dynabeads M-450 Tosylactivated (Life Technologies)

at a bead-to-cell ratio of 1:5 under the Th17-polarizing conditions: IL-1 β (20 ng/ml), IL-6 (30 ng/ml), IL-23 (30 ng/ml), TGF- β (2 ng/ml), and neutralizing antibodies against IL-4 (5 μ g/ml) and IFN- γ (2 μ g/ml) (eBioscience). Exposure to differentiating cytokines (all from R&D Systems) and blocking antibodies was maintained throughout the culture period. For allogeneic mixed lymphocyte reactions (MLR), irradiated (3000 cGy) PBMCs from one donor were used as the stimulator and mixed in a 1:1 ratio with PBMCs from another donor, used as the responder for 8-10 days. TMP778 or DMSO vehicle control was added to the Th17 and MLR cultures on day 0, replenished every 3 days, and maintained throughout the culture period. TMP778-treated Th17 or MLR cells were analyzed by flow cytometry for cell surface expression of CD4, CD146, and CCR5. For intracellular cytokine staining of IL-17 and IFN- γ , cells were stimulated with PMA (50 ng/ml; Sigma-Aldrich) and ionomycin (1 μ g/ml; Sigma-Aldrich), and brefeldin A (3 μ g/ml) (eBioscience) for 5 h. Intracellular cytokines were stained with the intracellular fixation and permeabilization buffer set (eBioscience). All staining antibodies were obtained from eBioscience. Stained cells were analyzed using an Attune Flow Cytometer (Life Technologies) and FlowJo software.

Statistical analysis

Baseline clinical characteristics were compared between groups using either Fisher's exact test or Chi-square test for categorical variables or Wilcoxon-rank-sum test for continuous variables. Phenotypic and functional data were compared using Wilcoxon-rank-sum test for unpaired group comparison and Wilcoxon-signed-rank test for paired comparison. Prior to analysis, the normality assumption was examined. Correlation studies were performed using the non-parametric Spearman-rank test. All tests were

two-sided at the significance level of 0.05 and multiple comparisons were not considered. All statistical analyses and graphs were performed using Prism software (GraphPad, San Diego, CA).

Acknowledgments

This work was supported by the NIH (R01 CA183559, R01 CA183560, R01 CA168814, P01 CA142106, P01 AI056299), the Leukemia & Lymphoma Society Scholar Award, the Lilly Physician Scientist Initiative Award, the Ted and Eileen Pasquarello Research Fund, the MD-PhD program (University Hospital of Bordeaux, France), the French Society of Hematology (SFH) and Association Laurette Fugain.

Figures and Tables

Table 1. Clinical characteristics of HSCT patients

		Active cGVHD N=20	No cGVHD N=20
Age	<i>Median (range)</i>	59 (25.9 – 75.6)	60.4 (32.6 – 74.9)
Sex ratio	<i>M/F</i>	1.85	1
Conditioning regimen	<i>MAC</i>	6	9
	<i>RIC</i>	14	11
Graft Source	<i>BM</i>	1	5
	<i>PBSC</i>	19	15
Donor	<i>MRD</i>	6	8
	<i>MUD</i>	11	10
	<i>mmUD</i>	3	2
Time from SCT (months)	<i>Median (range)</i>	31.4 (11.5 – 123.8)	37.7 (12 – 140.9)
aGVHD (%)	Grade 2-4	10 (50)	3 (15)
cGVHD NIH grade (%)	Mild	8 (40)	N/A
	<i>Moderate</i>	8 (40)	N/A
	<i>Severe</i>	4 (20)	N/A
IST at the time of sample	<i>Yes (%)</i>	14 (70)	1 (5)
Steroid at the time of sample	<i>Yes (%)</i>	8 (40)	0
Mean steroid dose	<i>mg/kg/day</i>	0.18	N/A

M = Male; F = Female; MAC = Myeloablative Conditioning; RIC = Reduced Intensity Conditioning; MRD = Matched Related Donor; MUD = Matched Unrelated Donor; mmUD = Mismatched Unrelated Donor; PBSC = Peripheral Blood Stem Cell; BM = Bone Marrow; SCT = Stem Cell Transplantation; aGVHD = acute GVHD; cGVHD = chronic GVHD; NIH = National Institute of Health; IST = Immunosuppressive Therapy; ns = not significant.

Figure 1

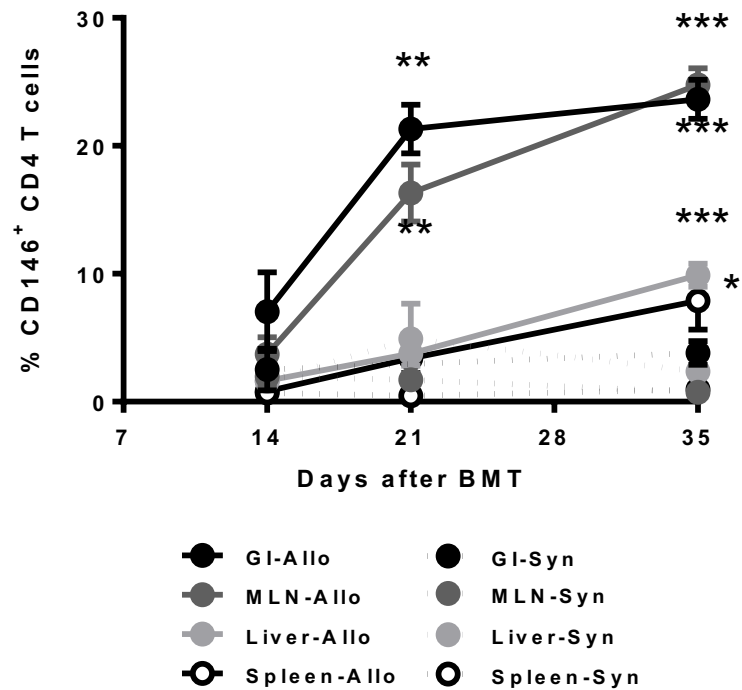


Figure 1. Kinetics of CD146 expression on CD4 T cells in murine GVHD. Lethally irradiated C3H.SW mice were transplanted with either syngeneic or allogeneic C57BL/6 bone marrow and T cells and analyzed by flow cytometry for CD146 expression on CD4 T cells from different organs on the indicated days post transplantation. Data shown are mean \pm SEM of the percentage of CD146 expressing CD4 T cells in syngeneic (dash lines, n=3-5) and allogeneic (solid lines, n=4-6) groups. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, unpaired *t*-test comparing the percentage of CD146 at day 21 and day 35 versus day 14 in each organ.

Figure 2

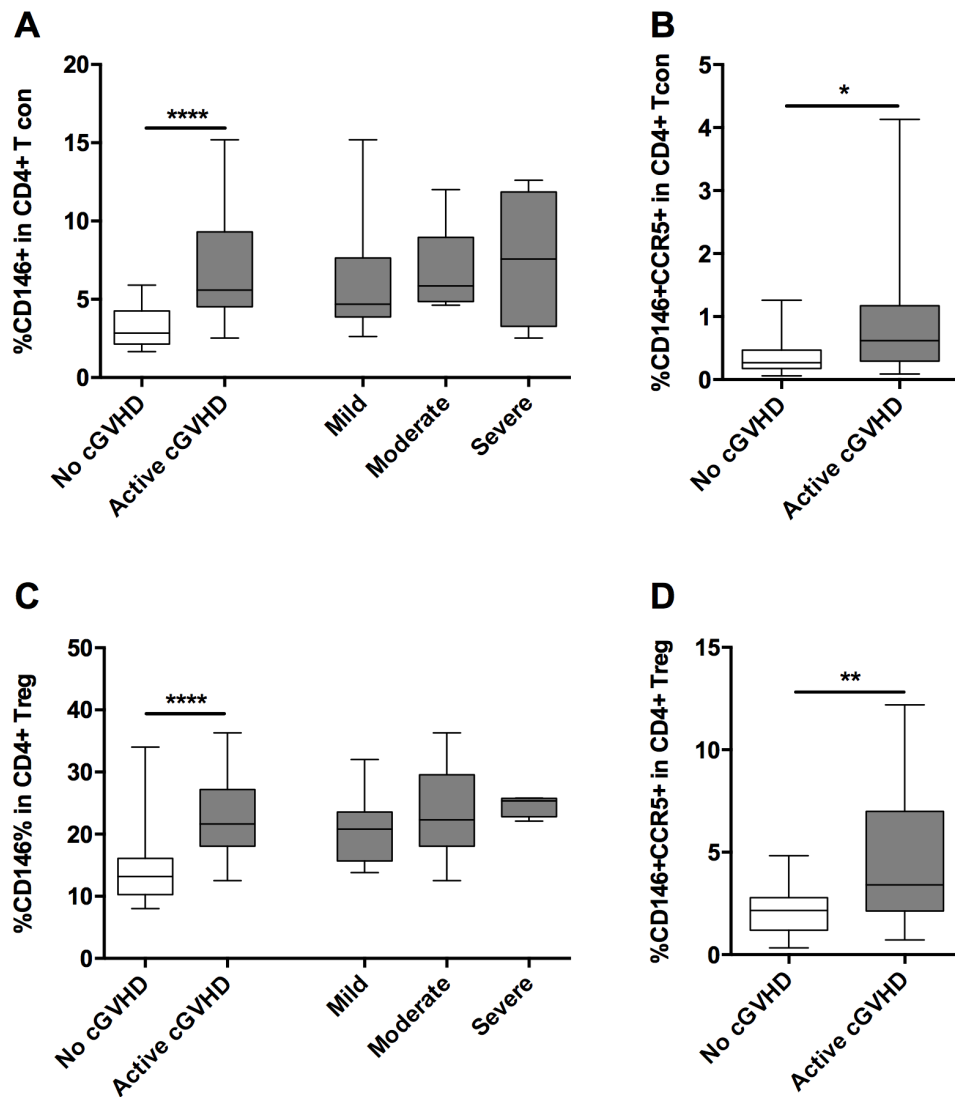


Figure 2. CD146 and CCR5 expression within CD4+ Tcon (non CD25^{hi}CD127^{low} within CD4+ T cells) and Treg (CD25^{hi}FoxP3⁺ within CD4+ T cells) subsets. Data shown are box and whiskers according to different clinical groups: No (n=20) or Active cGVHD (n=20) and different clinical grades of cGVHD according to NIH criteria (mild n=8; moderate n=8; severe n=4). * p<0.05, ** p<0.01, **** p<10⁻⁴, unpaired *t*-test comparing the frequencies between groups.

Figure 3

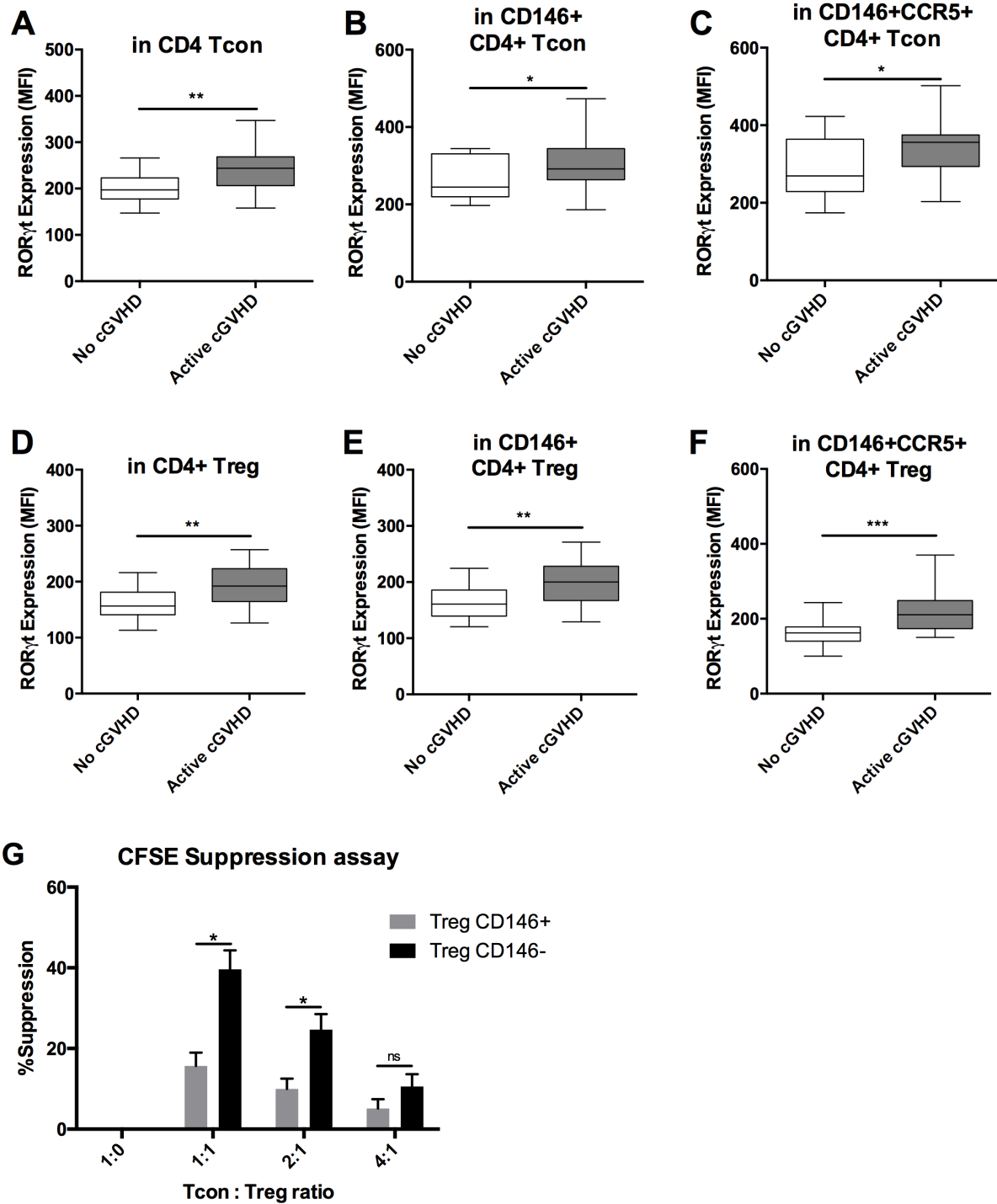
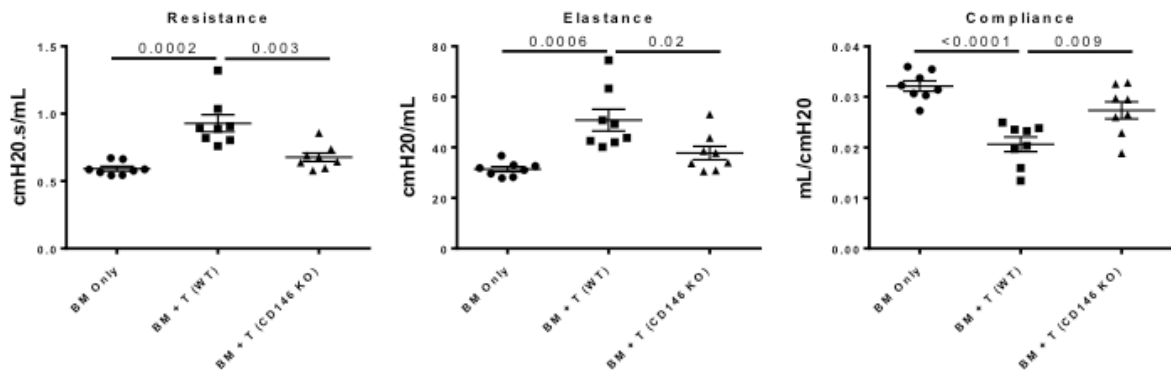


Figure 3. (A-F) ROR γ t intra-cellular staining in CD146+ and CD146+CCR5+ subsets (Tcon and Treg) revealed a skewed polarization towards a Th17 profile in cGVHD patients. Data shown are box and whiskers according to different clinical groups: No (n=18) or Active cGVHD (n=18). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.0001, unpaired *t*-test comparing ROR γ t MFI between groups.

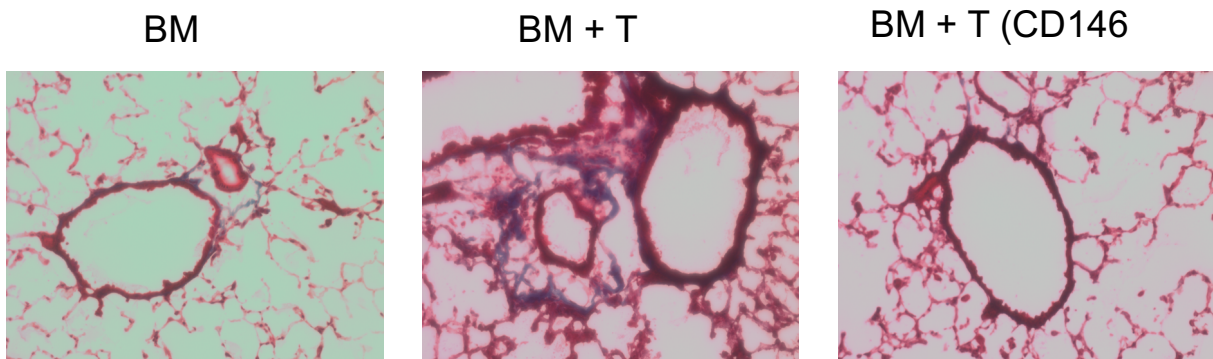
(G) Treg were sorted according to the expression of CD146 and co-cultured with CFSE-labelled Tcon for 5 days at different ratios (see legend) upon stimulation with coated α CD3 and soluble α CD28. Bar graph representing mean \pm SEM values after 6 experiments. * $p < 0.05$, ns: not significant, paired *t*-test.

Figure 4

A.



B.



C.

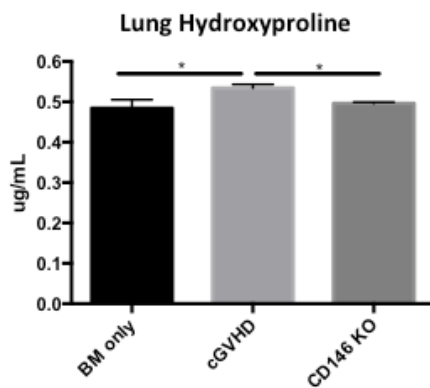


Figure 4. CD146 expressing T cells are necessary for cGvHD. B10.BR mice were transplanted with WT B6 BM and WT B6 T cells or B6 CD146 KO T cells. (A) Mice were evaluated at day 60 for pulmonary function. (B) Lung sections were stained with Trichrome for collagen deposition. Representative data from 3 experiments; (C) Hydroxyproline quantitative measure in the lung of euthanized mice. $n = 3-6$ mice per group. Paired t -test $*P < .01$, $***P < .001$.

Figure 5

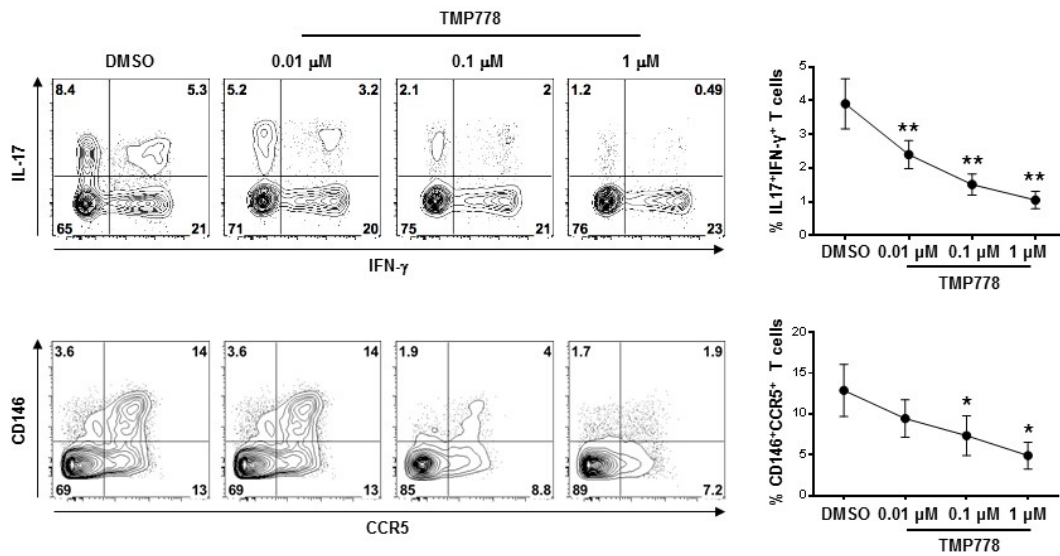


Figure 5. Effect of ROR γ t inhibitor TMP778 on generation of Th1* cells and CD146+CCR5+ T cells among ICOS-differentiated Th17 cells. CD4 T cells from healthy donors were activated with anti-CD3/anti-ICOS-coated beads under Th17-polarizing conditions in the presence of indicated concentrations of TMP778 and vehicle control DMSO. After 6 days, the expression of IL-17, IFN- γ , CD14, and CCR5 on T cells were measured by flow cytometry. **(A)**(Top panels) Representative plots of IL-17 and IFN- γ expression and a bar graph depicting mean \pm SEM values for frequency of IL-17⁺IFN- γ ⁺ T cells (n=8). **(B)**(Bottom panels) Representative plots of CD146 and CCR5 expression and a bar graph depicting mean \pm SEM values for frequency of CD146⁺CCR5⁺ T cells (n=5). Paired t test.

Figure 6

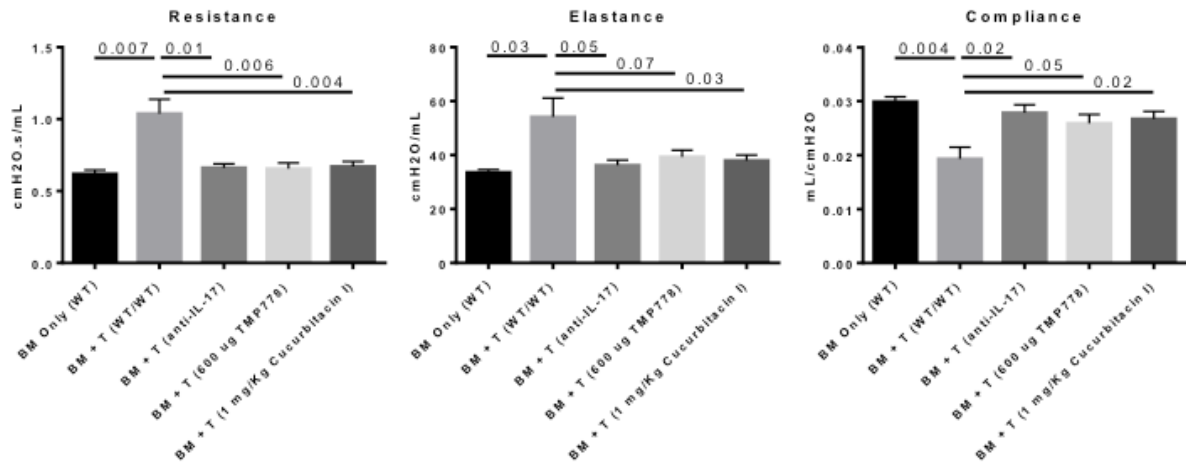
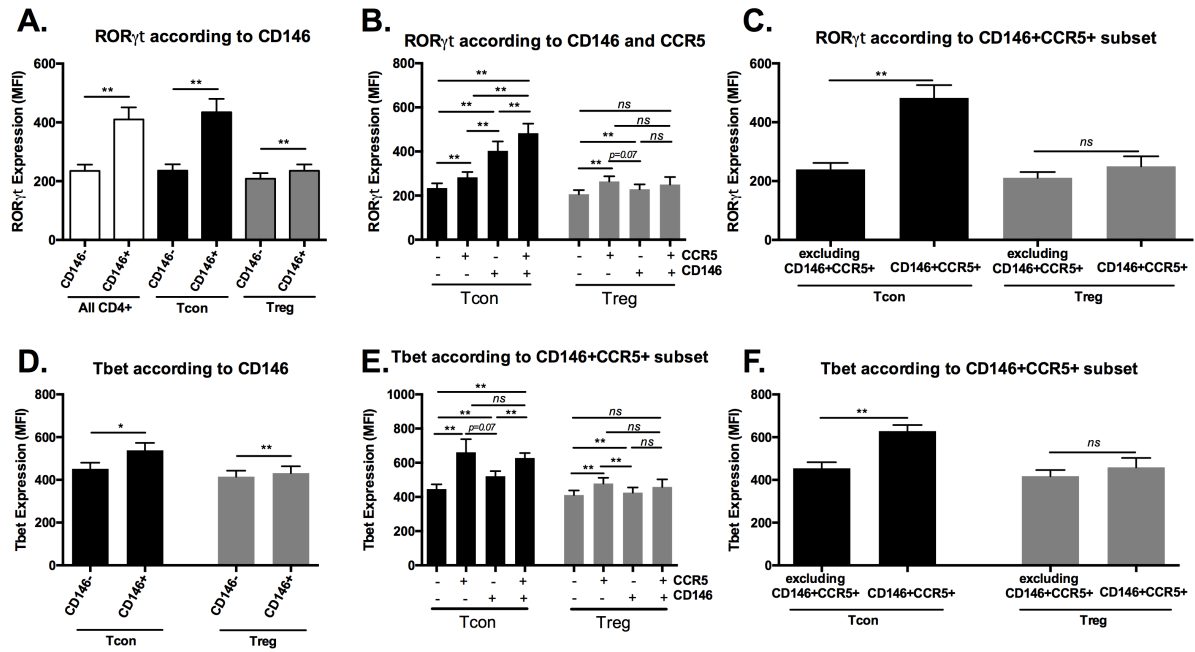


Figure 6. IL-17 blocking antibody and ROR γ t inhibitor (TMP778) alleviates cGVHD. B10.BR mice were transplanted with WT B6 BM only or with WT B6 T cells. Some recipients received either an IL17 blocking antibody, or ROR γ t inhibitor (TMP778) or Cucurbitacin I. Mice were evaluated at day 60 for pulmonary function. Representative data from 3 experiments; n = 4-7 mice per group.

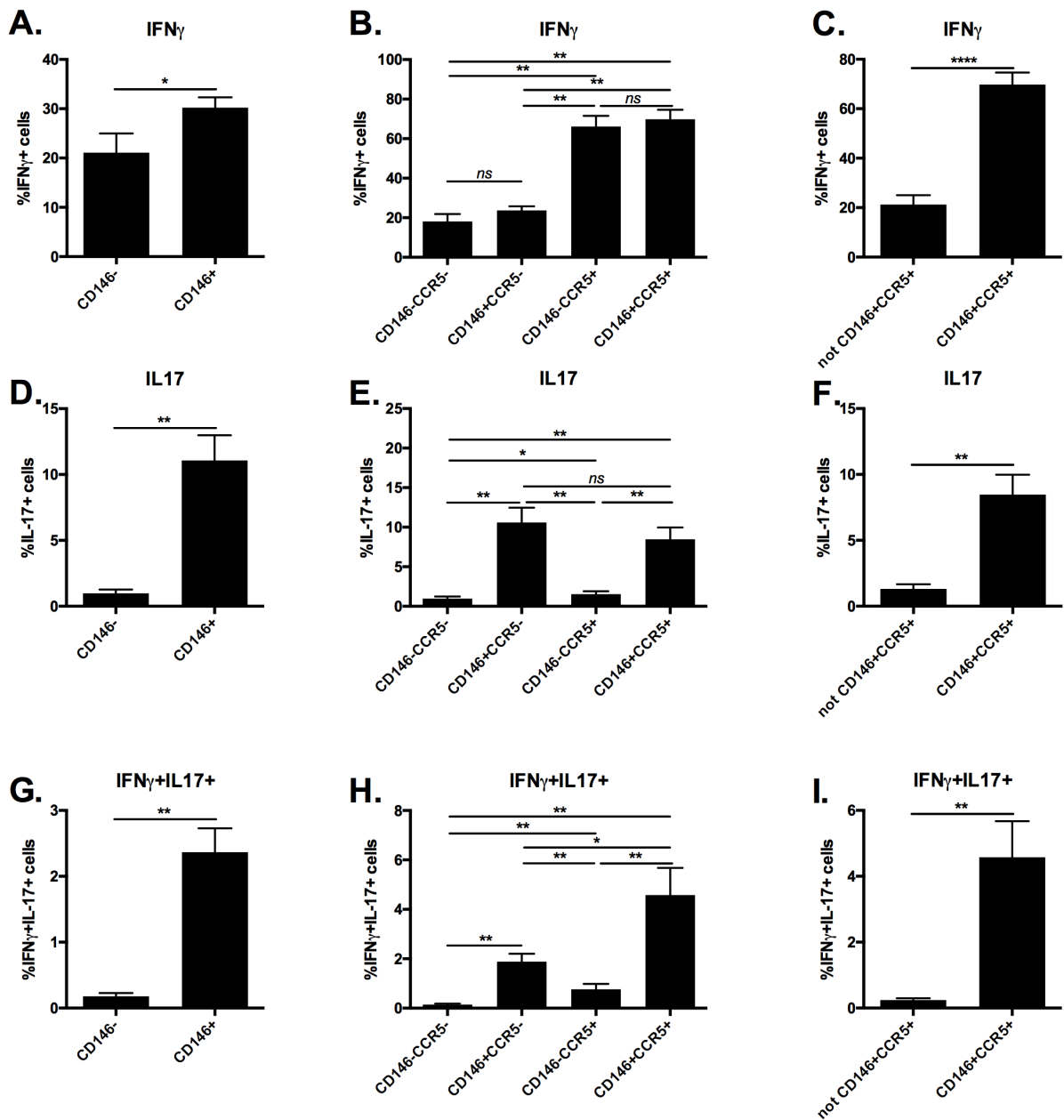
Supplemental Figures

Supplemental Figure 1



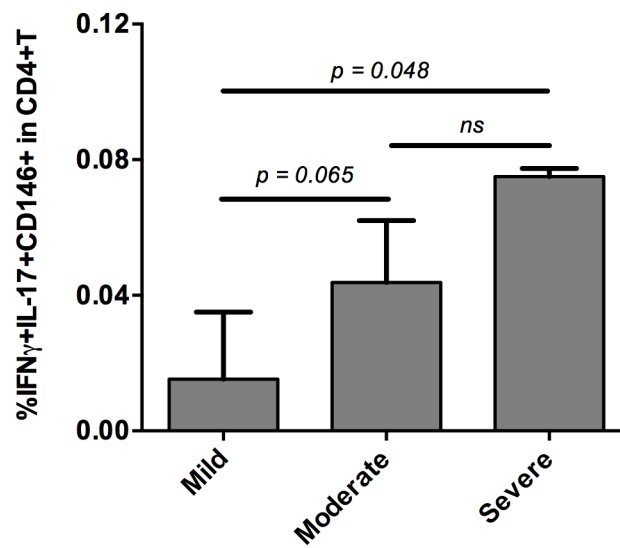
Supplemental Figure 1. ROR γ t and Tbet expression is associated with CD146 expressing subsets. ROR γ t and Tbet expression (MFI) were evaluated by flow cytometry according to T cell subsets expressing CD146 and/or CCR5 or not, in a set of 8 healthy donors. Tcon: non-CD25^{hi}CD127^{low} within CD4⁺ T cells, and Treg: CD25^{hi}FoxP3⁺ within CD4⁺ T cells. Histograms represent mean \pm SEM of MFI. Paired *t* test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *ns* = not significant.

Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 2. IFN γ and IL-17 production is associated with CD146 and CCR5 expression. IFN γ and IL-17 production (% of positive cells) were evaluated by flow cytometry upon stimulation by PMA ionomycine for 5 hours in presence of Brefeldin A (n=8 healthy donors). Histogram bars represent cytokine production according to T cell subsets expressing CD146 and/or CCR5 or not, in a set of 8 healthy donors. Data represent mean \pm SEM. Paired *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *ns* = not significant.

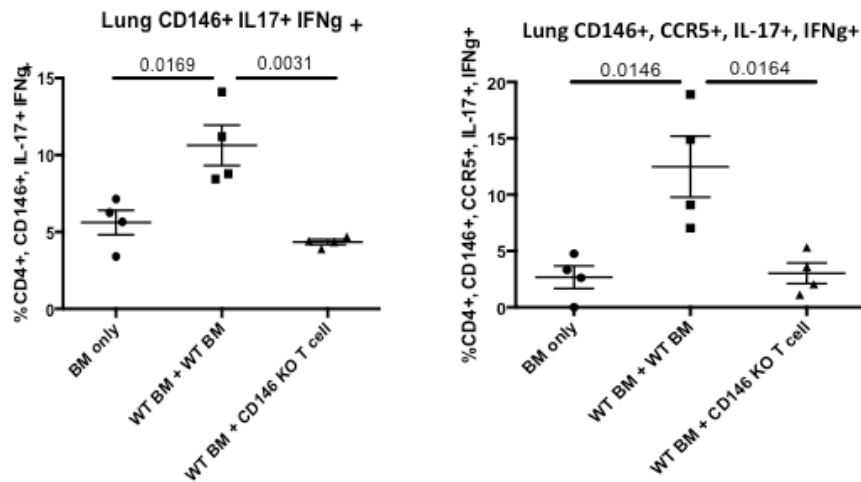
Supplemental Figure 3



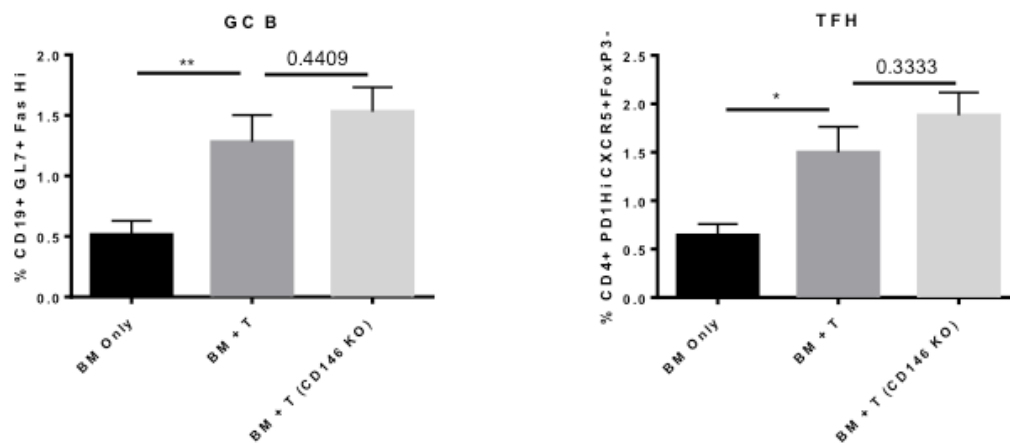
Supplemental Figure 3. Frequency of IFN γ +IL-17+CD146+CCR5+ within CD4+ T cells evaluated by flow cytometry upon stimulation by PMA ionomycine in presence of Brefeldin A. Histogram bars represent median % and interquartile range according to clinical groups. Unpaired *t*-test.

Supplemental Figure 4

A.



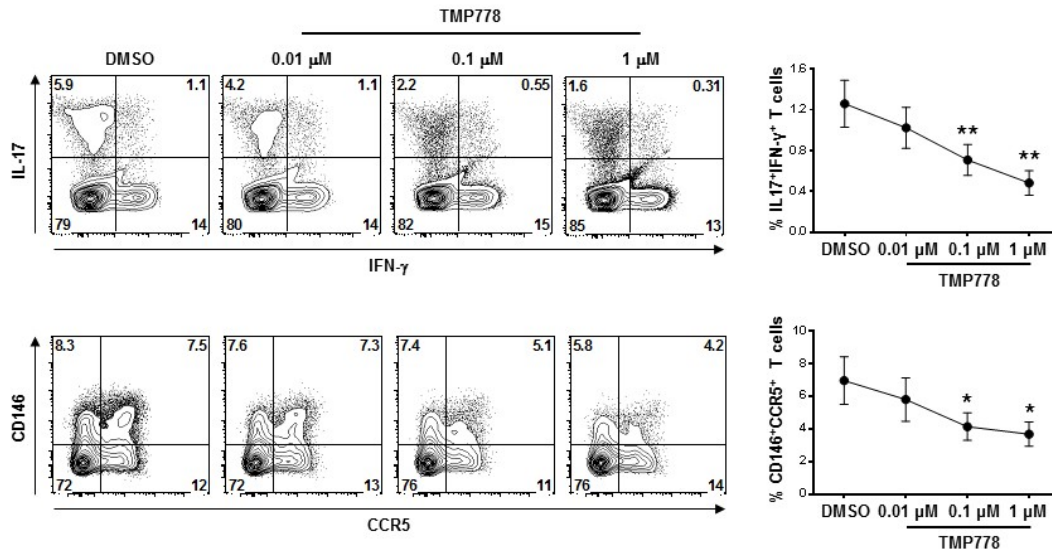
B.



Supplemental Figure 4. (A) Flow cytometry was performed on single-cell suspension from lung of different animal groups, after stimulation with PMA-ionomycin in the presence of protein transport inhibitor. Data represent frequencies (mean and SEM) of IFN γ +IL-17+ subset within CD146+ (left panel) or CD146+CCR5+ fractions (right panel).

(B) CD146 KO does not impact T-B cross talk within lymphoid organ. GC B cells (CD19+GL7+Fas^{hi}) and TFH (CD4+CXCR5+PD1^{hi}FoXP3⁻) were analyzed by flow cytometry after spleen digestion at day 56 after transplant in animals receiving BM only, BM + WT splenocytes or BM + CD146 KO splenocytes. N =3-7 mice per group. Paired *t*-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Supplemental Figure 5



Supplemental Figure 5. Effect of ROR γ t inhibitor TMP778 on generation of Th1* cells and CD146+CCR5+ CD4 T cells from mixed lymphocyte reactions (MLRs). MLRs were carried out in the presence of indicated concentrations of TMP778 and vehicle control DMSO for 8-10 days. **(A)**(Top panels) Representative plots of IL-17 and IFN- γ expression and a bar graph depicting mean \pm SEM values for frequency of IL-17⁺IFN- γ ⁺ T cells (n=7). **(B)**(Bottom panels) Representative plots of CD146 and CCR5 expression and a bar graph depicting mean \pm SEM values for frequency of CD146⁺CCR5⁺ T cells (n=5). Paired *t*-test.

DISCUSSION et CONCLUSION

La GVH chronique est une complication fréquente survenant chez près de la moitié des patients après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Leur pronostic est réservé dans les formes sévères et/ou cortico-résistantes. Chez ces patients, une meilleure compréhension de la physiopathologie de la cGVHD s'impose pour enrayer sa progression, éviter le développement de lésions fibrosantes difficilement réversibles et développer de nouvelles thérapeutiques.

Ce travail de thèse s'est déroulé en association avec mon unité de rattachement (UMR CNRS 5164) dans laquelle l'équipe du Professeur Patrick Blanco étudie les mécanismes immunologiques impliqués dans les maladies auto-immunes dont le Lupus Erythémateux Systémique (LES). La cGVHD présente de nombreuses similitudes avec les maladies auto-immunes permettant de faire des parallèles entre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu et évoqués en introduction. Cependant, la cGVHD comporte un caractère expérimental dont le délai de survenu est approximativement connu. Ceci a conduit de nombreuses études dites longitudinales à suivre l'évolution de marqueurs biologiques et d'envisager leur imputabilité dans la survenue de la cGVHD en fonction de leur variation numérique, pour des marqueurs biologiques (38, 71), ou de leur variation phénotypique, pour des marqueurs cellulaires (44, 45, 63, 214). Ces études longitudinales représentent un élément important dans la validation des biomarqueurs énoncés comme tels selon les recommandations du NIH (215). Elles ne sont, cependant, pas suffisantes puisqu'une validation dans une deuxième cohorte est nécessaire. Ainsi, les études réalisées dans cette thèse proposent des biomarqueurs candidats qui devront être validés dans une deuxième cohorte de façon prospective.

L'analyse des populations biologiques après allogreffe de CSH nécessite de tenir compte de la cinétique de reconstitution immunitaire, pouvant avoir un impact direct sur les fréquences et valeurs absolues observées. En effet, la reconstitution immunitaire est un processus dynamique. Ainsi, le temps nécessaire pour atteindre des valeurs dites normales varie selon les populations (3 mois pour les NK, jusqu'à 2 ans pour les LT CD4+), ceci pouvant avoir un impact sur les valeurs observées au cours d'une étude transversale. En ce sens, nous avons intégré des éléments de reconstitution des cTFH en post-allogreffe dans la version

initiale du manuscrit (**Annexe 2**). Bien qu'il ne s'agissait pas d'une véritable étude longitudinale, cette étude parallèle nous a permis d'éviter tout biais de reconstitution.

L'étude sur sang comme support à la compréhension des phénomènes biologiques soulève certaines questions. En effet, bien que des anomalies soient observées au niveau sanguin, la majorité des phénomènes immunitaires se déroulent au niveau des tissus périphériques, siège des lésions, et au niveau des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, MALT). Par conséquent, la prudence est nécessaire dans l'interprétation des phénomènes observés au niveau sanguin représentant une zone de transit le plus souvent. Ainsi, de plus en plus d'études chez l'homme cherchent à confronter l'analyse du sang et des tissus. Nous citerons notamment les études du National Cancer Institute (50, 58) et du groupe autrichien (61) qui ont réalisées de telles études pour l'analyse des Treg et des LT helpers au niveau de la bouche et de la peau. Par ailleurs, les études sur sang ont été enrichies par la caractérisation de chimiokines et de leurs récepteurs. Ces combinaisons de marqueurs ont fait l'objet de consensus (216, 217), mais soulèvent aussi des questions de relevance biologique quant à l'analyse de populations de très petite taille (218, 219) aujourd'hui favorisée par les nouvelles technologies comme la cytométrie de masse ou CyTOF (Cytometry by Time Of Flight) (220). L'analyse des populations immunitaires basée sur ces récepteurs aux chimiokines apportent alors un élément dynamique de migration cellulaire, encore appelée homing ou trafficking (221, 222). C'est ce que nous avons voulu proposer dans le premier papier avec l'analyse conjointe des cTFH et de CXCL13. La diminution des cTFH au cours de la cGVHD associée à une augmentation des valeurs plasmatiques de CXCL13 suggéraient une augmentation du homing des cTFH ou leur séquestration au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Plus récemment, des données provenant de l'équipe de Crotty *and coll* ont corroboré nos résultats (121). Leur étude chez la souris a permis une étude conjointe des organes lymphoïdes secondaires et du sang permettant d'attester l'augmentation des TFH au niveau du CG associée à l'augmentation de CXCL13 dans les suites d'un modèle d'immunisation.

Nos objectifs de travail au cours de cette thèse étaient multiples mais visaient dans l'ensemble à améliorer les connaissances sur l'immunobiologie de la GVH chronique. Ces travaux ont cherché à mieux caractériser les LT au cours de la cGVHD, par l'étude des TFH et des TH17, et d'apporter des éléments permettant de comprendre leur rôle dans la coordination de la réponse B alloréactive. Par ailleurs, proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant des molécules ou des populations pathologiques demeure un objectif final pour envisager un transfert en pratique clinique.

Ainsi, la première partie de ce travail porte sur l'analyse de la réaction du centre germinatif comme élément clé de la cGVHD par l'analyse des TFH circulants. Le rationnel de ce travail repose sur la nécessité d'expliquer le profil phénotypique des LB au cours de la cGVHD. En effet, les LB présentent un profil activé et mémoire suggérant leur engagement dans la réaction du CG. Comme nous l'avons vu en introduction, la réaction du CG est le site privilégié de la maturation d'affinité aboutissant à la production d'anticorps de haute affinité de type IgG après avoir subi les phénomènes d'hypermutation somatique et de switch de classe. Cependant, ce phénomène de maturation d'affinité a aussi été décrit pour les LB de la réponse innée (MZB et B1), au décours d'une réponse thymo-indépendante ou après passage par le CG (105). Nous retiendrons, malgré tout, que ce processus se fait de façon majoritaire au niveau du CG, aboutissant à la production de plus de 80% des LB de haute affinité.

L'implication des TFH était donc suggérée par le profil des LB observé au cours de la cGVHD (70, 74, 83) et des publications antérieures dans le cadre des maladies auto-immunes (129, 223, 224). Le groupe de Minneapolis a par la suite démontré l'implication des TFH dans des modèles murins de cGVHD présentant une BO (171), confirmée par une autre équipe dans un autre modèle murin (225). La publication de Zeng *and coll* après notre étude est venue nuancer le rôle des LB du donneur et du CG proposé par Blazar *and coll* dans la cGVHD (226). En effet, ils ont utilisé un modèle murin de cGVHD multi-systémique (atteinte cutanée, rénale, bronchiolaire, et hépatique) survivant au-delà de 40 jours par la modulation de la dose de splénocytes. En utilisant des splénocytes de donneur $IgH^{u\gamma 1}$ (LB incapables de sécréter des anticorps, mais conservant leur fonction de cellules présentatrices d'antigène), leurs données montrent que les cellules productrices d'anticorps du donneur (donneur-ASC) ne sont pas responsables de l'initiation d'une cGVHD mais de son entretien. En effet, les donneur-ASC seraient responsables de la destruction des organes lymphoïdes secondaires (diminution des CG) et du thymus à l'origine d'un défaut de tolérance centrale. Par ailleurs, elles favoriseraient l'infiltration de la peau par des Th1, la sécrétion locale de facteurs d'attraction des Th17 (CCL20) et la polarisation Th17 par les DC au niveau cutané. Ces discordances reflètent bien la multiplicité des modèles murins disponibles pour la cGVHD (21, 227). Même si de nombreux progrès ont été faits pour rassembler des manifestations multi-organes, notamment bronchiolaires, les apprentissages des travaux chez la souris doivent être confrontés aux données chez les patients et ne permettent pas toujours une translation clinique ou thérapeutique (228).

Dans le deuxième papier, nous nous sommes intéressés aux mécanismes régulant la réaction du CG. Bien que plusieurs mécanismes aient été décrits (139), nous nous sommes intéressés aux TFR permettant ainsi de coupler notre expérience sur les TFH et l'expérience ancienne du laboratoire sur les Treg. Les TFR partagent à la fois les deux programmes (Treg et TFH) expliquant la co-expression de BCL-6 et FoxP3. De façon similaire au travail sur les TFH, nous avons étudié le contingent circulant des TFR (cTFR), retrouvant une diminution des cTFR dans le sang au cours de la cGVHD. De façon à rendre compte d'un effet de homing différentiel entre les cTFH et les cTFR, nous avons évalué les capacités de résistance à l'apoptose et de prolifération. Nous avons observé une expression diminuée de BCL-2 et une diminution des cTFR en cycle (Ki67+) suggérant un défaut de maintenance. De façon similaire à notre première étude, nous aurions souhaité étudier directement la fonction des cTFR provenant de patients, cependant une telle étude paraît difficile devant la faible représentation d'une telle population dans le sang périphérique. Malgré tout, Dhaeze *et al* ont analysé la capacité suppressive des cTFR sur des T effecteurs à partir d'échantillons de patients ayant une sclérose en plaques et ont pu observer un défaut de fonction.

Les réactions immunitaires peuvent être régulées par des populations inhibitrices, mais aussi par l'implication de populations moins fonctionnelles. Nous avons observé une réduction des cTFH Th1 au cours de la cGVHD inversement corrélé à la sévérité de la maladie. Cette sous-population présente une capacité d'aide pour les LB diminuée. Les TFH Th1 sécrètent de l'IFN- γ , mais pas d'IL-4 ou IL-17. L'IFN- γ est capable d'induire rapidement une expression de PD-L1 par les cellules présentatrices d'antigène (229), dont le signal de rétrocontrôle négatif pour les TFH exprimant hautement PD1 a été observé chez les patients VIH (152). L'expression de T-bet au niveau des TFH jouerait un rôle dans leur différenciation précoce, sous le contrôle de IRF4 régulant la transition entre un profil Th1 et TFH. La co-expression de BCL-6 et T-bet semble réguler la fonction d'aide pour les LB par une réduction des molécules d'aide (ICOS, IL-21 et CD40L) (150). Ces TFH exprimant T-bet et/ou CXCR3 font l'objet actuellement d'intenses recherches.

Le troisième papier est le fruit d'une collaboration avec le groupe du Professeur Blazar, apportant son expertise des modèles murins de cGVHD, le groupe du Professeur Paczesny, apportant son expertise en protéomique et biomarqueurs, et notre groupe, celui du Professeur Ritz apportant l'étude biologique humaine. Cette étude apporte de nouveaux éléments dans la caractérisation des Th17 au cours de la cGVHD. En effet, plusieurs études pré-cliniques étaient en faveur de leur implication, mais les études humaines étaient rares. Cette population de LT CD4+CD146+ présente une capacité à migrer au travers des barrières endothéliales pour atteindre les sites inflammatoires (211, 212). Elle représente

donc une population candidate de l'alloréactivité observée au cours de la cGVHD qui pourrait être ciblée de façon thérapeutique. Cette population est composée d'un sous-groupe au phénotype mixte (Th1/Th17) précédemment décrites comme pathogéniques dans des modèles d'auto-immunité (189). Par ailleurs, les LT CD4+CD146+ sont polarisés vers un profil Th17, y compris les Treg. L'étude de la fonction des Treg selon l'expression de CD146 a montré une diminution de la capacité suppressive des Treg CD146+, corrélant avec l'up-régulation de ROR γ t, suggérant ainsi une anomalie fonctionnelle des Treg (en plus de leur déficit quantitatif) au cours de la cGVHD. Dans cette étude, nous avons évalué le rôle de la molécule CD146 exprimée par les LT, et dont la délétion génétique a permis d'améliorer le score de cGVHD dans des modèles murins. De la même manière, l'inhibition de ROR γ t par le TMP778 est capable d'améliorer la cGVHD chez la souris et d'inhiber la différenciation des LT vers un profil Th1/Th17. Notre étude propose donc une nouvelle arme thérapeutique ciblant une population pathogène et précédemment décrite au niveau de la peau chez l'homme et la souris (61, 226), suggérant son utilisation chez les patients présentant une cGVHD cortico-résistante.

La relation entre ces différentes études pourrait être abordée par le biais de la plasticité décrite entre les différentes populations de LT CD4+. En effet, de précédents rapports ont décrit la plasticité entre les Treg et les Th17 (114) ou entre les Th17 et les TFH (191). Cette plasticité demeure difficile à évaluer *in vivo* chez l'homme mais les modèles murins trouvent alors leur place dans ces études mécanistiques. Comme mentionné plus haut, des Th17 ont été détectés au sein de tissus siège de lésions de cGVHD. Cette environnement pro-inflammatoire pourrait favoriser la constitution de structures lymphoïdes tertiaires comme décrit dans le contexte de néphrite lupique (230). Ainsi, la migration de Th17 vers les tissus, après interaction avec l'endothélium (via CD146), pourrait favoriser localement une réponse de type Centre Germinatif produisant des anticorps dont le caractère pathologique local dans des lésions lichénoïdes de cGVHD a déjà été suggéré (231).

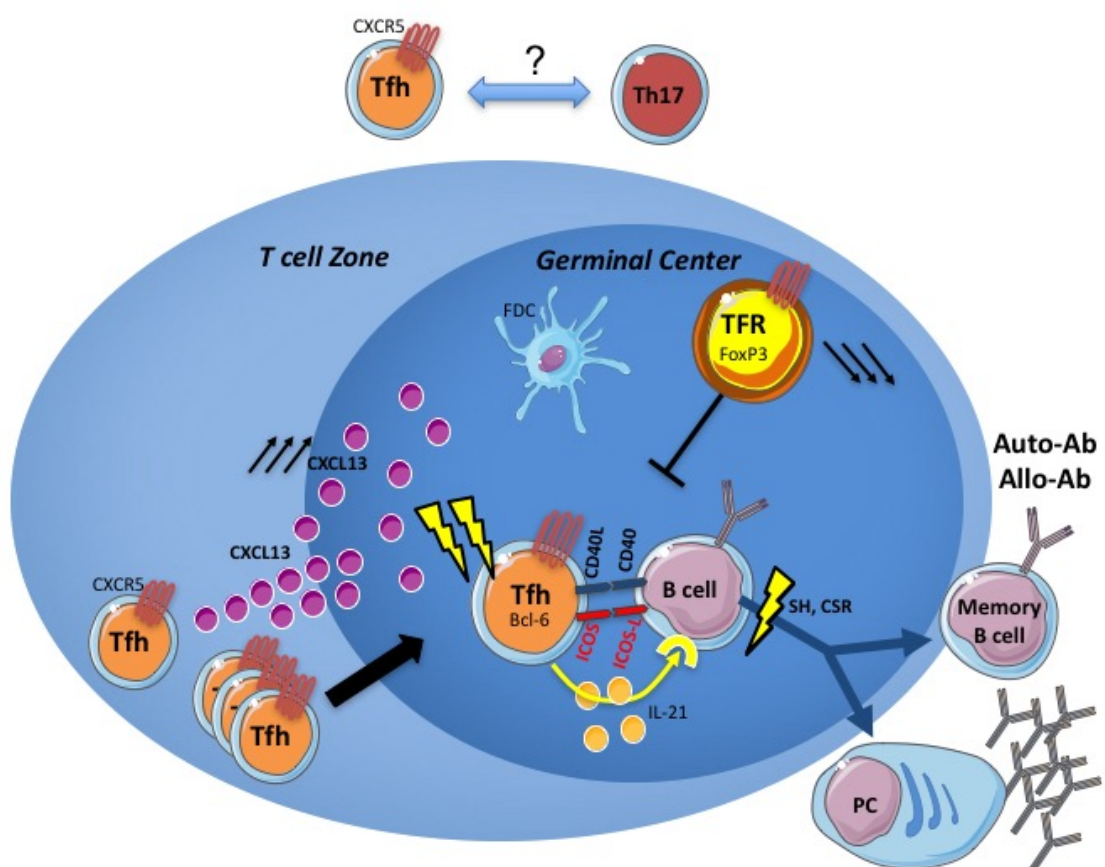
De telles hypothèses devront être confrontées dans des modèles pré-cliniques et/ou par l'analyse conjointe du sang et des tissus chez l'homme.

Au total, nos travaux translationnels apportent de nouvelles données sur la cGVHD humaine, permettant de mieux comprendre la coopération entre les LT et les LB dans cette pathologie et d'expliquer le phénotype lymphocytaire B observé. La mise en évidence de défaut des

mécanismes de régulation du CG et l'implication de l'axe Th17/ROR γ t suggèrent tous deux d'évaluer de nouvelles thérapeutiques permettant respectivement, d'amplifier les mécanismes régulateurs, et de bloquer la réponse effectrice.

Malgré tout, notre modèle souffre encore d'éléments non élucidés. En effet, restent à expliquer : les mécanismes impliqués dans la génération et l'activation des TFH au cours de la cGVHD ; la période d'implication des TFH au cours de la cGVHD : induction *versus* entretien (133, 226) ; l'échappement de clones B auto-réactifs au cours de la cGVHD.

La **Figure 6** modélise les connaissances apportées par nos travaux au cours de cette thèse.



ANNEXES

ANNEXE 1

Echelle des signes et symptômes de GVH chronique, selon
Jagasia *et al*, Biol Blood Marrow Transplant. **2015** Mar;21(3):389-401

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
PERFORMANCE SCORE: <input type="text"/> KPS ECOG LPS	<input type="checkbox"/> Asymptomatic and fully active (ECOG 0; KPS or LPS 100%)	<input type="checkbox"/> Symptomatic, fully ambulatory, restricted only in physically strenuous activity (ECOG 1, KPS or LPS 80-90%)	<input type="checkbox"/> Symptomatic, ambulatory, capable of self-care, >50% of waking hours out of bed (ECOG 2, KPS or LPS 60-70%)	<input type="checkbox"/> Symptomatic, limited self-care, >50% of waking hours in bed (ECOG 3-4, KPS or LPS <60%)
SKIN† SCORE % BSA <input type="text"/> <u>GVHD features to be scored by BSA:</u> Check all that apply: <input type="checkbox"/> Maculopapular rash/erythema <input type="checkbox"/> Lichen planus-like features <input type="checkbox"/> Sclerotic features <input type="checkbox"/> Papulosquamous lesions or ichthyosis <input type="checkbox"/> Keratosis pilaris-like GVHD	<input type="checkbox"/> No BSA involved	<input type="checkbox"/> 1-18% BSA	<input type="checkbox"/> 19-50% BSA	<input type="checkbox"/> >50% BSA
SKIN FEATURES SCORE:	<input type="checkbox"/> No sclerotic features		<input type="checkbox"/> Superficial sclerotic features “not hidebound” (able to pinch)	Check all that apply: <input type="checkbox"/> Deep sclerotic features <input type="checkbox"/> “Hidebound” (unable to pinch) <input type="checkbox"/> Impaired mobility <input type="checkbox"/> Ulceration
<u>Other skin GVHD features (NOT scored by BSA)</u> Check all that apply: <input type="checkbox"/> Hyperpigmentation <input type="checkbox"/> Hypopigmentation <input type="checkbox"/> Poikiloderma <input type="checkbox"/> Severe or generalized pruritus <input type="checkbox"/> Hair involvement <input type="checkbox"/> Nail involvement <input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify): _____				
MOUTH <i>Lichen planus-like features present:</i> <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify): _____	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild symptoms with disease signs but not limiting oral intake significantly	<input type="checkbox"/> Moderate symptoms with disease signs with partial limitation of oral intake	<input type="checkbox"/> Severe symptoms with disease signs on examination with major limitation of oral intake

Figure 1. Organ scoring of chronic GVHD. ECOG indicates Eastern Cooperative Oncology Group; KPS, Karnofsky Performance Status; LPS, Lansky Performance Status; BSA, body surface area; ADL, activities of daily living; LFTs, liver function tests; AP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; ULN, normal upper limit. *Weight loss within 3 months. †Skin scoring should use both percentage of BSA involved by disease signs and the cutaneous features scales. When a discrepancy exists between the percentage of total body surface (BSA) score and the skin feature score, OR if superficial sclerotic features are present (Score 2), but there is impaired mobility or ulceration (Score 3), the higher level should be used for the final skin scoring. ‡To be completed by specialist or trained medical providers (see Supplemental Figure). **Lung scoring should be performed using both the symptoms and FEV1 scores whenever possible. FEV1 should be used in the final lung scoring where there is discrepancy between symptoms and FEV1 scores.

- H. Genitalia: New criteria are proposed for scoring severity based on signs as an exploratory measure.
- I. Other indicators have been removed, including the category of progressive onset, and cardiac manifestations, such as conduction defects and coronary artery involvement (Figure 1). Weight loss (not due to gastrointestinal involvement by GVHD) has been added to this section.
- J. Attributions of abnormalities not due to GVHD have been incorporated into the organ-specific scoring.

4. The evaluator's opinion regarding overall severity of chronic GVHD has been added to the scoring form (Figure 1).

DIAGNOSIS OF CHRONIC GVHD

Clinical features determine whether the clinical syndrome of GVHD is considered acute or chronic, not the temporal relationship to transplantation [4]. In the 2005 consensus criteria, the simultaneous presence of acute GVHD

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
EYES	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild dry eye symptoms not affecting ADL (requirement of lubricant eye drops ≤ 3 x per day)	<input type="checkbox"/> Moderate dry eye symptoms partially affecting ADL (requiring lubricant eye drops > 3 x per day or punctal plugs), WITHOUT new vision impairment due to KCS	<input type="checkbox"/> Severe dry eye symptoms significantly affecting ADL (special eyewear to relieve pain) OR unable to work because of ocular symptoms OR loss of vision due to KCS
<i>Keratoconjunctivitis sicca (KCS) confirmed by ophthalmologist:</i>	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Not examined			
<input type="checkbox"/> <i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>				
GI Tract	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Symptoms without significant weight loss* ($< 5\%$)	<input type="checkbox"/> Symptoms associated with mild to moderate weight loss* (5-15%) OR moderate diarrhea without significant interference with daily living	<input type="checkbox"/> Symptoms associated with significant weight loss* $> 15\%$, requires nutritional supplement for most calorie needs OR esophageal dilation OR severe diarrhea with significant interference with daily living
Check all that apply:				
<input type="checkbox"/> Esophageal web/proximal stricture or ring				
<input type="checkbox"/> Dysphagia				
<input type="checkbox"/> Anorexia				
<input type="checkbox"/> Nausea				
<input type="checkbox"/> Vomiting				
<input type="checkbox"/> Diarrhea				
<input type="checkbox"/> Weight loss $\geq 5\%$ *				
<input type="checkbox"/> Failure to thrive				
<input type="checkbox"/> <i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>				
LIVER	<input type="checkbox"/> Normal total bilirubin and ALT or AP < 3 x ULN	<input type="checkbox"/> Normal total bilirubin with ALT ≥ 3 to 5 x ULN or AP ≥ 3 x ULN	<input type="checkbox"/> Elevated total bilirubin but ≤ 3 mg/dL or ALT > 5 ULN	<input type="checkbox"/> Elevated total bilirubin > 3 mg/dL
<input type="checkbox"/> <i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>				
LUNGS**				
Symptom score:	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild symptoms (shortness of breath after climbing one flight of steps)	<input type="checkbox"/> Moderate symptoms (shortness of breath after walking on flat ground)	<input type="checkbox"/> Severe symptoms (shortness of breath at rest; requiring O_2)
Lung score:	<input type="checkbox"/> FEV1 $\geq 80\%$	<input type="checkbox"/> FEV1 60-79%	<input type="checkbox"/> FEV1 40-59%	<input type="checkbox"/> FEV1 $\leq 39\%$
% FEV1 <input type="text"/>				
<i>Pulmonary function tests</i>				
<input type="checkbox"/> Not performed				
<input type="checkbox"/> <i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>				

Figure 1. (continued).

features in patients with chronic GVHD was classified as the “overlap” subset of chronic GVHD [4]. This subclassification of chronic GVHD has been a subject of controversy and confusion (see Differential Diagnosis between Acute and Chronic GVHD in the next section). The overlap subcategory of chronic GVHD has been associated with worse survival compared to the “classic” subcategory (absence of acute GVHD features) of chronic GVHD [9,13,20,24], but not in all studies [18]. Hyperbilirubinemia and small intestinal/colonic involvement are known risk factors for increased mortality in chronic GVHD patients (reviewed in [2]) [7,25,26]. Based on current knowledge and in light of the controversy related to the overlap subcategory, including problems identified in clinical practice [22], the 2014 consensus criteria have clarified the overlap subcategory of chronic GVHD and

recommend documentation of all clinical features in patients with chronic GVHD that are relevant for prognostication, treatment guidance, response assessment, biomarker studies, and clinical trials (see “Differential Diagnosis between Acute and Chronic GVHD” and “Clinical Scoring of Organ Systems” sections below).

Throughout this document, *diagnostic* signs and symptoms refer to those manifestations that establish the presence of chronic GVHD without need for further testing or evidence of other organ involvement. *Distinctive* signs and symptoms of chronic GVHD refer to those manifestations that are not ordinarily found in acute GVHD but are not considered sufficient in isolation to establish an unequivocal diagnosis of chronic GVHD. Additional testing, such as a biopsy documenting histological features of chronic GVHD (or

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3			
JOINTS AND FASCIA	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild tightness of arms or legs, normal or mild decreased range of motion (ROM) AND not affecting ADL	<input type="checkbox"/> Tightness of arms or legs OR joint contractures, erythema thought due to fasciitis, moderate decrease ROM AND mild to moderate limitation of ADL	<input type="checkbox"/> Contractures WITH significant decrease of ROM AND significant limitation of ADL (unable to tie shoes, button shirts, dress self etc.)			
P-ROM score (see below)							
Shoulder (1-7): ___							
Elbow (1-7): ___							
Wrist/finger (1-7): ___							
Ankle (1-4): ___							
<input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):							
GENITAL TRACT (See Supplemental figure [†])	<input type="checkbox"/> No signs	<input type="checkbox"/> Mild signs [‡] and females with or without discomfort on exam	<input type="checkbox"/> Moderate signs [‡] and may have symptoms with discomfort on exam	<input type="checkbox"/> Severe signs [‡] with or without symptoms			
<input type="checkbox"/> Not examined							
Currently sexually active							
<input type="checkbox"/> Yes							
<input type="checkbox"/> No							
<input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):							
Other indicators, clinical features or complications related to chronic GVHD (check all that apply and assign a score to severity (0-3) based on functional impact where applicable none – 0, mild -1, moderate -2, severe – 3)							
<input type="checkbox"/> Ascites (serositis) ___	<input type="checkbox"/> Myasthenia Gravis ___						
<input type="checkbox"/> Pericardial Effusion ___	<input type="checkbox"/> Peripheral Neuropathy ___	<input type="checkbox"/> Eosinophilia > 500/μl ___					
<input type="checkbox"/> Pleural Effusion(s) ___	<input type="checkbox"/> Polymyositis ___	<input type="checkbox"/> Platelets <100,000/μl ___					
<input type="checkbox"/> Nephrotic syndrome	<input type="checkbox"/> Weight loss >5%* without GI symptoms	<input type="checkbox"/> Others (specify):					
Overall GVHD Severity (Opinion of the evaluator)							
	<input type="checkbox"/> No GVHD	<input type="checkbox"/> Mild	<input type="checkbox"/> Moderate	<input type="checkbox"/> Severe			
Photographic Range of Motion (P-ROM)							
	1 (Worst)	2	3	4	5	6	7 (Normal)
Shoulder							
Elbow							
Wrist/finger							
Ankle							

Figure 1. (continued).

at least “likely” chronic GVHD, see Histopathology document), is needed to establish the diagnosis of chronic GVHD. *Other features or unclassified manifestations* of chronic GVHD define the rare, controversial, or nonspecific features of chronic GVHD that cannot be used to establish the diagnosis of chronic GVHD. Signs and symptoms found in both chronic and acute GVHD are referred as *common* features (Table 1).

Characteristics of the clinical features that establish the diagnosis of chronic GVHD might not serve as the most appropriate parameters for assessing severity of chronic GVHD. Valid and reliable diagnostic criteria might not be sufficiently sensitive to change to be useful as criteria for response after treatment. Conversely, a sensitive measure of chronic GVHD response might not necessarily serve as an appropriate diagnostic and scoring measure.

The Working Group recommends that the diagnosis of chronic GVHD requires at least 1 diagnostic manifestation of chronic GVHD or at least 1 distinctive manifestation plus a pertinent biopsy, laboratory, or other tests (eg, pulmonary

function tests [PFT], Schirmer’s test), evaluation by a specialist (ophthalmologist, gynecologist), or radiographic imaging showing chronic GVHD in the same or another organ, unless stated otherwise. As in acute GVHD, infection and other causes may confound or complicate the differential diagnosis of chronic GVHD and must be excluded (eg, nail dystrophy due to onychomycosis, herpes simplex, or *Candida albicans* infections of the oral cavity, drug toxicity). Diagnostic and distinctive features of chronic GVHD can be found in the skin and appendages, mouth, eyes, genitalia, esophagus, lungs, and connective tissues. Biopsy or other testing is always encouraged and often valuable to confirm the presence of chronic GVHD, but it is not always feasible and is not mandatory if the patient has at least 1 of the diagnostic findings of chronic GVHD (Table 1).

ORGAN-SPECIFIC MANIFESTATIONS OF CHRONIC GVHD

In all cases, drug reaction, infection, recurrent or new malignancy and other causes must be excluded. Diagnostic

Table 1
Signs and Symptoms of chronic GVHD

Organ or Site	Diagnostic (Sufficient to Establish the Diagnosis of chronic GVHD)	Distinctive* (Seen in chronic GVHD, but Insufficient Alone to Establish a Diagnosis)	Other Features or Unclassified Entities†	Common‡ (Seen with Both Acute and chronic GVHD)
Skin	Poikiloderma Lichen planus–like features Sclerotic features Morphea-like features Lichen sclerosus–like features	Depigmentation Papulosquamous lesions	Sweat impairment Ichthyosis Keratosis pilaris Hypopigmentation Hyperpigmentation	Erythema Maculopapular rash Pruritus
Nails		Dystrophy Longitudinal ridging, splitting or brittle features Onycholysis Pterygium unguis Nail loss (usually symmetric, affects most nails)		
Scalp and body hair		New onset of scarring or nonscarring scalp alopecia (after recovery from chemoradiotherapy) Loss of body hair Scaling	Thinning scalp hair, typically patchy, coarse or dull (not explained by endocrine or other causes) Premature gray hair	
Mouth	Lichen planus–like changes	Xerostomia Mucocoeles Mucosal atrophy Ulcers Pseudomembranes		Gingivitis Mucositis Erythema Pain
Eyes		New onset dry, gritty, or painful eyes Cicatrical conjunctivitis KCS Confluent areas of punctate keratopathy	Photophobia Periorbital hyperpigmentation Blepharitis (erythema of the eyelids with edema)	
Genitalia	Lichen planus–like features Lichen sclerosus–like features	Erosions Fissures Ulcers		
Females	Vaginal scarring or clitoral/labial agglutination			
Males	Phimosis or urethral/meatus scarring or stenosis			
GI Tract	Esophageal web Strictures or stenosis in the upper to mid third of the esophagus		Exocrine pancreatic insufficiency	Anorexia Nausea Vomiting Diarrhea Weight loss Failure to thrive (infants and children Total bilirubin, alkaline phosphatase > 2 × upper limit of normal ALT > 2 × upper limit of normal
Liver				
Lung	Bronchiolitis obliterans diagnosed with lung biopsy BOS§	Air trapping and bronchiectasis on chest CT	Cryptogenic organizing pneumonia Restrictive lung disease	
Muscles, fascia, joints	Fasciitis Joint stiffness or contractures secondary to fasciitis or sclerosis	Myositis or polymyositis¶	Edema Muscle cramps Arthralgia or arthritis Thrombocytopenia Eosinophilia Lymphopenia Hypo- or hyper-gammaglobulinemia Autoantibodies (AIHA, ITP) Raynaud's phenomenon Pericardial or pleural effusions Ascites Peripheral neuropathy Nephrotic syndrome Myasthenia gravis Cardiac conduction abnormality or cardiomyopathy	
Hematopoietic and Immune				
Other				

ALT indicates alanine aminotransferase; AIHA, autoimmune hemolytic anemia; ITP, idiopathic thrombocytopenic purpura.

* In all cases, infection, drug effect, malignancy, or other causes must be excluded.

† Can be acknowledged as part of the chronic GVHD manifestations if diagnosis is confirmed.

‡ Common refers to shared features by both acute and chronic GVHD.

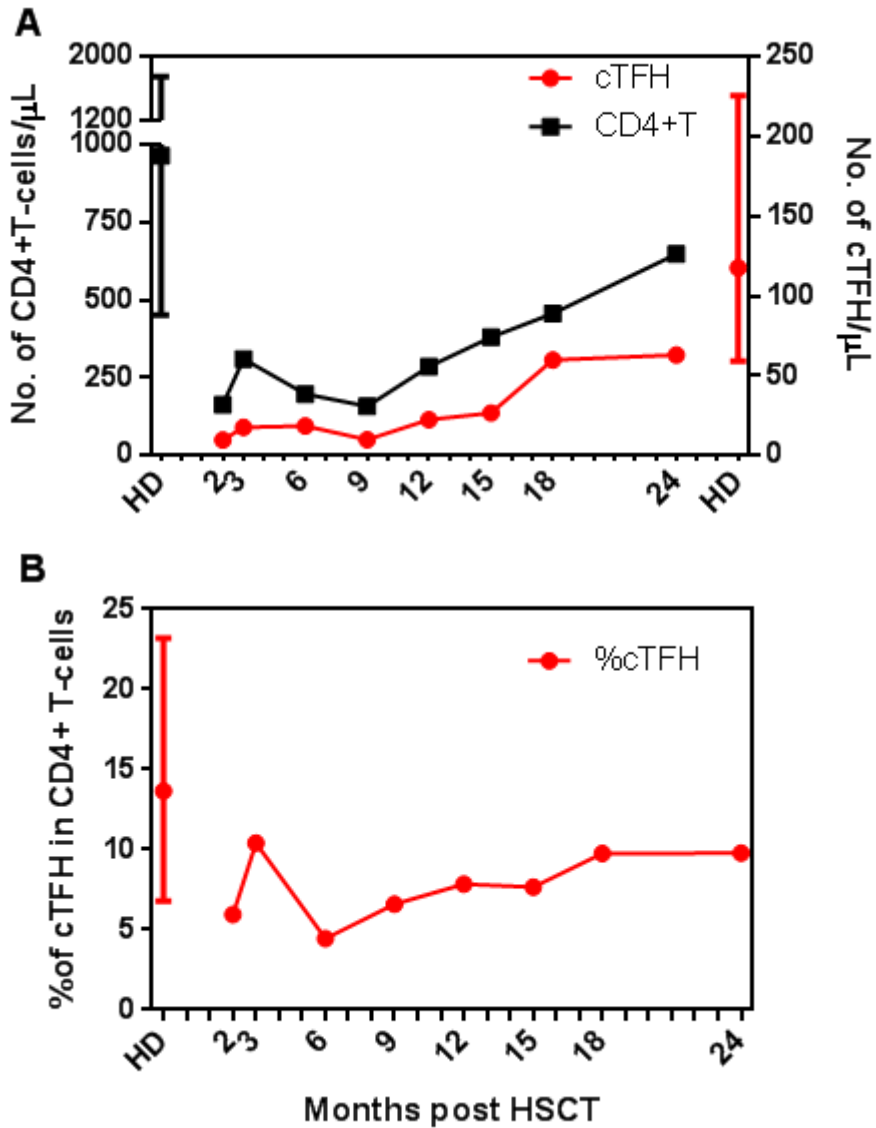
§ BOS can be diagnostic for lung chronic GVHD only if distinctive sign or symptom present in another organ (see text).

|| Pulmonary entities under investigation or unclassified.

¶ Diagnosis of chronic GVHD requires biopsy.

ANNEXE 2

Cinétique de reconstitution des cTFH après allogreffe de CSH



Légende : Les valeurs de cTFH (parmi les CD4+) ont été évalués chez 22 donneurs sains (HD) et 73 patients après allogreffe de CSH. La figure A représente l'évolution de la valeur absolue (par μ L de sang) de cTFH (*rouge*) et de CD4+ (*noir*) en fonction du temps (en mois). La figure B représente l'évolution du pourcentage de cTFH parmi les CD4+.

ANNEXE 3

Participation à des publications scientifiques au cours de la période de thèse doctorale.

BIBLIOGRAPHIE

1. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *The New England journal of medicine*. 2006;354(17):1813-26.
2. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, and Storb R. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *The New England journal of medicine*. 1979;300(19):1068-73.
3. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattan A, and Schneider M. Haematopoietic Chimera in Man after Allogenic (Homologous) Bone-Marrow Transplantation. (Control of the Secondary Syndrome. Specific Tolerance Due to the Chimerism). *British medical journal*. 1963;2(5373):1633-5.
4. Atkinson K, Shulman HM, Deeg HJ, Weiden PL, Graham TC, Thomas ED, and Storb R. Acute and chronic graft-versus-host disease in dogs given hemopoietic grafts from DLA-nonidentical littermates. Two distinct syndromes. *The American journal of pathology*. 1982;108(2):196-205.
5. Lee SJ, Vogelsang G, and Flowers ME. Chronic graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2003;9(4):215-33.
6. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, Hackman R, Tsoi MS, Storb R, and Thomas ED. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *The American journal of medicine*. 1980;69(2):204-17.
7. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2005;11(12):945-56.
8. Flowers ME, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW, Pereira SE, Nash RA, Mielcarek M, Fero ML, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 2011;117(11):3214-9.
9. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, Palmer J, Weisdorf D, Treister NS, Cheng GS, et al. 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. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(3):389-401 e1.
10. Kroger N, Solano C, Wolschke C, Bandini G, Patriarca F, Pini M, Nagler A, Selleri C, Risitano A, Messina G, et al. Antilymphocyte Globulin for Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease. *The New England journal of medicine*. 2016;374(1):43-53.

11. Socie G, Schmoor C, Bethge WA, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, Volin L, Ruutu T, Heim DA, Schwerdtfeger R, et al. Chronic graft-versus-host disease: long-term results from a randomized trial on graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin ATG-Fresenius. *Blood*. 2011;117(23):6375-82.
12. Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn JY, Carabasi MH, Gale RP, Giral S, Hale GA, et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood*. 2002;100(2):406-14.
13. Arora M, Klein JP, Weisdorf DJ, Hassebroek A, Flowers ME, Cutler CS, Urbano-Ispizua A, Antin JH, Bolwell BJ, Boyiadzis M, et al. Chronic GVHD risk score: a Center for International Blood and Marrow Transplant Research analysis. *Blood*. 2011;117(24):6714-20.
14. Weisdorf D, Zhang MJ, Arora M, Horowitz MM, Rizzo JD, and Eapen M. Graft-versus-host disease induced graft-versus-leukemia effect: greater impact on relapse and disease-free survival after reduced intensity conditioning. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2012;18(11):1727-33.
15. Thepot S, Zhou J, Perrot A, Robin M, Xhaard A, de Latour RP, Ades L, Ribaud P, Petropoulou AD, Porcher R, et al. The graft-versus-leukemia effect is mainly restricted to NIH-defined chronic graft-versus-host disease after reduced intensity conditioning before allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2010;24(11):1852-8.
16. Lee SJ, Zahrieh D, Alyea EP, Weller E, Ho VT, Antin JH, and Soiffer RJ. Comparison of T-cell-depleted and non-T-cell-depleted unrelated donor transplantation for hematologic diseases: clinical outcomes, quality of life, and costs. *Blood*. 2002;100(8):2697-702.
17. Devillier R, Bramanti S, Furst S, Sarina B, El-Cheikh J, Crocchiolo R, Granata A, Chabannon C, Morabito L, Harbi S, et al. T-replete haploidentical allogeneic transplantation using post-transplantation cyclophosphamide in advanced AML and myelodysplastic syndromes. *Bone marrow transplantation*. 2016;51(2):194-8.
18. Devillier R, Granata A, Furst S, Harbi S, Faucher C, Weiller PJ, Chabannon C, Castagna L, and Blaise D. Low incidence of chronic GVHD after HLA-haploidentical peripheral blood stem cell transplantation with post-transplantation cyclophosphamide in older patients. *Br J Haematol*. 2016.
19. Wolff D, Gerbitz A, Ayuk F, Kiani A, Hildebrandt GC, Vogelsang GB, Elad S, Lawitschka A, Socie G, Pavletic SZ, et al. Consensus conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): first-line and topical treatment of chronic GVHD. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2010;16(12):1611-28.
20. Wolff D, Schleuning M, von Harsdorf S, Bacher U, Gerbitz A, Stadler M, Ayuk F, Kiani A, Schwerdtfeger R, Vogelsang GB, et al. Consensus Conference on Clinical Practice in Chronic GVHD: Second-Line Treatment of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2011;17(1):1-17.
21. Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S, Hakim FT, Jagasia M, Fowler DH, van den Brink MR, Hansen JA, Parkman R, Miklos DB, et al. The Biology of Chronic Graft-

- Versus-Host Disease: a Task Force Report From the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2016.
22. Tsoi MS, Storb R, Dobbs S, Medill L, and Thomas ED. Cell-mediated immunity to non-HLA antigens of the host by donor lymphocytes in patients with chronic graft-vs-host disease. *Journal of immunology*. 1980;125(5):2258-62.
 23. Parkman R. Clonal analysis of murine graft-vs-host disease. I. Phenotypic and functional analysis of T lymphocyte clones. *Journal of immunology*. 1986;136(10):3543-8.
 24. Akatsuka Y, Morishima Y, Kuzushima K, Kodera Y, and Takahashi T. Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions. *Cancer Sci*. 2007;98(8):1139-46.
 25. Zorn E, Miklos DB, Floyd BH, Mattes-Ritz A, Guo L, Soiffer RJ, Antin JH, and Ritz J. Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(8):1133-42.
 26. Maraninchi D, Gluckman E, Blaise D, Guyotat D, Rio B, Pico JL, Leblond V, Michallet M, Dreyfus F, Ifrah N, et al. Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet*. 1987;2(8552):175-8.
 27. Wagner JE, Thompson JS, Carter SL, Kernan NA, and Unrelated Donor Marrow Transplantation T. 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*. 2005;366(9487):733-41.
 28. Pavletic SZ, Carter SL, Kernan NA, Henslee-Downey J, Mendizabal AM, Papadopoulos E, Gingrich R, Casper J, Yanovich S, Weisdorf D, et al. Influence of T-cell depletion on chronic graft-versus-host disease: results of a multicenter randomized trial in unrelated marrow donor transplantation. *Blood*. 2005;106(9):3308-13.
 29. Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino PE, di Bartolomeo P, Oneto R, Bruno B, Barbanti M, Sacchi N, et al. Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood*. 2001;98(10):2942-7.
 30. Walker I, Panzarella T, Couban S, Couture F, Devins G, Elemetry M, Gallagher G, Kerr H, Kuruvilla J, Lee SJ, et al. Pretreatment with anti-thymocyte globulin versus no anti-thymocyte globulin in patients with haematological malignancies undergoing haemopoietic cell transplantation from unrelated donors: a randomised, controlled, open-label, phase 3, multicentre trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(2):164-73.
 31. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, Volin L, Ruutu T, Heim DA, Schwerdtfeger R, et al. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(9):855-64.

32. Wu T, Young JS, Johnston H, Ni X, Deng R, Racine J, Wang M, Wang A, Todorov I, Wang J, et al. Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of immunology*. 2013;191(1):488-99.
33. Zhang Y, Hexner E, Frank D, and Emerson SG. CD4+ T cells generated de novo from donor hemopoietic stem cells mediate the evolution from acute to chronic graft-versus-host disease. *Journal of immunology*. 2007;179(5):3305-14.
34. Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S, Takeuchi K, Harada M, Tanimoto M, and Teshima T. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2007;109(4):1756-64.
35. Toubert A, Glauzy S, Douay C, and Clave E. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. *Tissue Antigens*. 2012;79(2):83-9.
36. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, Agura E, Hill BJ, Smogorzewska M, Koup RA, Betts MR, Collins RH, and Douek DC. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2001;97(5):1458-66.
37. Clave E, Rocha V, Talvensaari K, Busson M, Douay C, Appert ML, Rabian C, Carmagnat M, Garnier F, Filion A, et al. Prognostic value of pretransplantation host thymic function in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2005;105(6):2608-13.
38. Clave E, Busson M, Douay C, Peffault de Latour R, Berrou J, Rabian C, Carmagnat M, Rocha V, Charron D, Socie G, et al. Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009;113(25):6477-84.
39. Vignali DA, Collison LW, and Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(7):523-32.
40. Leveque-EI Mouttie L, Koyama M, Le Texier L, Markey KA, Cheong M, Kuns RD, Lineburg KE, Teal BE, Alexander KA, Clouston AD, et al. Corruption of dendritic cell antigen presentation during acute GVHD leads to regulatory T-cell failure and chronic GVHD. *Blood*. 2016;128(6):794-804.
41. Chen X, Vodanovic-Jankovic S, Johnson B, Keller M, Komorowski R, and Drobyski WR. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2007;110(10):3804-13.
42. Zhao D, Zhang C, Yi T, Lin CL, Todorov I, Kandeel F, Forman S, and Zeng D. In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2008;112(5):2129-38.
43. Clark FJ, Gregg R, Piper K, Dunnion D, Freeman L, Griffiths M, Begum G, Mahendra P, Craddock C, Moss P, et al. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4+CD25high regulatory T cells. *Blood*. 2004;103(6):2410-6.

44. Alho AC, Kim HT, Chammas MJ, Reynolds CG, Matos TR, Forcade E, Whangbo J, Nikiforow S, Cutler CS, Koreth J, et al. Unbalanced recovery of regulatory and effector T cells after allogeneic stem cell transplantation contributes to chronic GVHD. *Blood*. 2016;127(5):646-57.
45. Matsuoka K, Kim HT, McDonough S, Bascug G, Warshauer B, Koreth J, Cutler C, Ho VT, Alyea EP, Antin JH, et al. Altered regulatory T cell homeostasis in patients with CD4+ lymphopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(5):1479-93.
46. Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, Bellucci R, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ, et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2005;106(8):2903-11.
47. Murase K, Kim HT, Bascug OR, Kawano Y, Ryan J, Matsuoka K, Davids MS, Koreth J, Ho VT, Cutler C, et al. Increased mitochondrial apoptotic priming of human regulatory T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2014;99(9):1499-508.
48. Rieger K, Loddenkemper C, Maul J, Fietz T, Wolff D, Terpe H, Steiner B, Berg E, Miehke S, Bornhauser M, et al. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GVHD. *Blood*. 2006;107(4):1717-23.
49. Malard F, Bossard C, Brissot E, Chevallier P, Guillaume T, Delaunay J, Mosnier JF, Moreau P, Gregoire M, Gaugler B, et al. Increased Th17/Treg ratio in chronic liver GVHD. *Bone marrow transplantation*. 2014;49(4):539-44.
50. Imanguli MM, Cowen EW, Rose J, Dhamala S, Swaim W, Lafond S, Yagi B, Gress RE, Pavletic SZ, and Hakim FT. Comparative analysis of FoxP3(+) regulatory T cells in the target tissues and blood in chronic graft versus host disease. *Leukemia*. 2014;28(10):2016-27.
51. Peccatori J, Forcina A, Clerici D, Crocchiolo R, Vago L, Stanghellini MT, Noviello M, Messina C, Crotta A, Assanelli A, et al. Sirolimus-based graft-versus-host disease prophylaxis promotes the in vivo expansion of regulatory T cells and permits peripheral blood stem cell transplantation from haploidentical donors. *Leukemia*. 2015;29(2):396-405.
52. Choi SW, Gatza E, Hou G, Sun Y, Whitfield J, Song Y, Oravec-Wilson K, Tawara I, Dinarello CA, and Reddy P. Histone deacetylase inhibition regulates inflammation and enhances Tregs after allogeneic hematopoietic cell transplantation in humans. *Blood*. 2015;125(5):815-9.
53. Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP, 3rd, Armand P, Cutler C, Ho VT, Treister NS, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *The New England journal of medicine*. 2011;365(22):2055-66.
54. Matsuoka K, Koreth J, Kim HT, Bascug G, McDonough S, Kawano Y, Murase K, Cutler C, Ho VT, Alyea EP, et al. Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Science translational medicine*. 2013;5(179):179ra43.
55. Nikiforow S, Kim HT, Daley H, Reynolds C, Jones KT, Armand P, Ho VT, Alyea EP, 3rd, Cutler CS, Ritz J, et al. A phase I study of CD25/regulatory T cell-depleted donor

- lymphocyte infusion for relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2016.
56. Yamashita K, Choi U, Woltz PC, Foster SF, Sneller MC, Hakim FT, Fowler DH, Bishop MR, Pavletic SZ, Tamari M, et al. Severe chronic graft-versus-host disease is characterized by a preponderance of CD4(+) effector memory cells relative to central memory cells. *Blood*. 2004;103(10):3986-8.
 57. D'Asaro M, Dieli F, Caccamo N, Musso M, Porretto F, and Salerno A. Increase of CCR7- CD45RA+ CD8 T cells (T(EMRA)) in chronic graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2006;20(3):545-7.
 58. Imanguli MM, Swaim WD, League SC, Gress RE, Pavletic SZ, and Hakim FT. Increased T-bet+ cytotoxic effectors and type I interferon-mediated processes in chronic graft-versus-host disease of the oral mucosa. *Blood*. 2009;113(15):3620-30.
 59. Kitko CL, Levine JE, Storer BE, Chai X, Fox DA, Braun TM, Couriel DR, Martin PJ, Flowers ME, Hansen JA, et al. Plasma CXCL9 elevations correlate with chronic GVHD diagnosis. *Blood*. 2014;123(5):786-93.
 60. Dander E, Balduzzi A, Zappa G, Lucchini G, Perseghin P, Andre V, Todisco E, Rahal D, Migliavacca M, Longoni D, et al. Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation*. 2009;88(11):1261-72.
 61. Bruggen MC, Klein I, Greinix H, Bauer W, Kuzmina Z, Rabitsch W, Kalhs P, Petzelbauer P, Knobler R, Stingl G, et al. Diverse T-cell responses characterize the different manifestations of cutaneous graft-versus-host disease. *Blood*. 2014;123(2):290-9.
 62. Cancro MP. Signalling crosstalk in B cells: managing worth and need. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(9):657-61.
 63. Jacobson CA, Sun L, Kim HT, McDonough SM, Reynolds CG, Schowalter M, Koreth J, Cutler CS, Ho VT, Alyea EP, et al. Post-transplantation B cell activating factor and B cell recovery before onset of chronic graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2014;20(5):668-75.
 64. Tangye SG, Bryant VL, Cuss AK, and Good KL. BAFF, APRIL and human B cell disorders. *Seminars in immunology*. 2006;18(5):305-17.
 65. Brink R. Regulation of B cell self-tolerance by BAFF. *Seminars in immunology*. 2006;18(5):276-83.
 66. Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Koder M, Takehara K, and Sato S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(1):192-201.
 67. Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, and Stohl W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(6):1313-9.

68. Cyster JG, and Goodnow CC. Antigen-induced exclusion from follicles and anergy are separate and complementary processes that influence peripheral B cell fate. *Immunity*. 1995;3(6):691-701.
69. Goodnow CC, Cyster JG, Hartley SB, Bell SE, Cooke MP, Healy JI, Akkaraju S, Rathmell JC, Pogue SL, and Shokat KP. Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. *Advances in immunology*. 1995;59(279-368).
70. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Cutler CS, Bhuiya NS, Schowalter M, Ho VT, Alyea EP, Koreth J, Blazar BR, et al. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;113(16):3865-74.
71. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Bhuiya NS, Cutler CS, Soiffer RJ, Antin JH, and Ritz J. High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(20):6107-14.
72. Glauzy S, Soret J, Fournier I, Douay C, Moins-Teisserenc H, Peffault de Latour R, Maki G, Robin M, Socie G, Toubert A, et al. Impact of acute and chronic graft-versus-host disease on human B-cell generation and replication. *Blood*. 2014;124(15):2459-62.
73. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, Brink R, Mackay F, Hodgkin PD, and Tangye SG. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(2):286-97.
74. Allen JL, Fore MS, Wooten J, Roehrs PA, Bhuiya NS, Hoffert T, Sharf A, Deal AM, Armistead P, Coghill J, et al. B cells from patients with chronic GVHD are activated and primed for survival via BAFF-mediated pathways. *Blood*. 2012;120(12):2529-36.
75. Patriarca F, Skert C, Sperotto A, Zaja F, Falletti E, Mestroni R, Kikic F, Calistri E, Fili C, Geromin A, et al. The development of autoantibodies after allogeneic stem cell transplantation is related with chronic graft-vs-host disease and immune recovery. *Experimental hematology*. 2006;34(3):389-96.
76. Kapur R, Ebeling S, and Hagenbeek A. B-cell involvement in chronic graft-versus-host disease. *Haematologica*. 2008;93(11):1702-11.
77. Svegliati S, Olivieri A, Campelli N, Luchetti M, Poloni A, Trappolini S, Moroncini G, Bacigalupo A, Leoni P, Avvedimento EV, et al. Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2007;110(1):237-41.
78. Miklos DB, Kim HT, Miller KH, Guo L, Zorn E, Lee SJ, Hochberg EP, Wu CJ, Alyea EP, Cutler C, et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood*. 2005;105(7):2973-8.
79. Nakasone H, Tian L, Sahaf B, Kawase T, Schoenrock K, Perloff S, Ryan CE, Paul J, Popli R, Wu F, et al. Allogeneic HY antibodies detected 3 months after female-to-male HCT predict chronic GVHD and nonrelapse mortality in humans. *Blood*. 2015;125(20):3193-201.

80. Arce E, Jackson DG, Gill MA, Bennett LB, Banchereau J, and Pascual V. Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology*. 2001;167(4):2361-9.
81. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, Lipsky PE, Radbruch A, and Dorner T. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology*. 2000;165(10):5970-9.
82. Kuzmina Z, Krenn K, Petkov V, Kormoczi U, Weigl R, Rottal A, Kalhs P, Mitterbauer M, Ponhold L, Dekan G, et al. CD19(+)CD21(low) B cells and patients at risk for NIH-defined chronic graft-versus-host disease with bronchiolitis obliterans syndrome. *Blood*. 2013;121(10):1886-95.
83. Allen JL, Tata PV, Fore MS, Wooten J, Rudra S, Deal AM, Sharf A, Hoffert T, Roehrs PA, Shea TC, et al. Increased BCR responsiveness in B cells from patients with chronic GVHD. *Blood*. 2014;123(13):2108-15.
84. Dubovsky JA, Flynn R, Du J, Harrington BK, Zhong Y, Kaffenberger B, Yang C, Towns WH, Lehman A, Johnson AJ, et al. Ibrutinib treatment ameliorates murine chronic graft-versus-host disease. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(11):4867-76.
85. Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgitt WA, Fairfax KA, and Mackay F. The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(3):203-15.
86. Chasset F, de Masson A, Le Buanec H, Xhaard A, de Fontbrune FS, Robin M, Rybojad M, Parquet N, Brignier AC, Coman T, et al. APRIL levels are associated with disease activity in human chronic graft-versus-host disease. *Haematologica*. 2016;101(7):e312-5.
87. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, and Mauri C. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 2010;32(1):129-40.
88. de Masson A, Bouaziz JD, Le Buanec H, Robin M, O'Meara A, Parquet N, Rybojad M, Hau E, Monfort JB, Branchtein M, et al. CD24(hi)CD27(+) and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2015;125(11):1830-9.
89. Khoder A, Sarvaria A, Alsuliman A, Chew C, Sekine T, Cooper N, Mielke S, de Lavallade H, Muftuoglu M, Fernandez Curbelo I, et al. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. *Blood*. 2014;124(13):2034-45.
90. Sarvaria A, Basar R, Mehta RS, Shaim H, Muftuoglu M, Khoder A, Sekine T, Gokdemir E, Kondo K, Marin D, et al. IL-10+ regulatory B cells are enriched in cord blood and may protect against cGVHD after cord blood transplantation. *Blood*. 2016;128(10):1346-61.
91. Zhang C, Todorov I, Zhang Z, Liu Y, Kandeel F, Forman S, Strober S, and Zeng D. Donor CD4+ T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestations. *Blood*. 2006;107(7):2993-3001.

92. Young JS, Wu T, Chen Y, Zhao D, Liu H, Yi T, Johnston H, Racine J, Li X, Wang A, et al. Donor B cells in transplants augment clonal expansion and survival of pathogenic CD4+ T cells that mediate autoimmune-like chronic graft-versus-host disease. *Journal of immunology*. 2012;189(1):222-33.
93. Srinivasan M, Flynn R, Price A, Ranger A, Browning JL, Taylor PA, Ritz J, Antin JH, Murphy WJ, Luznik L, et al. Donor B-cell alloantibody deposition and germinal center formation are required for the development of murine chronic GVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood*. 2012;119(6):1570-80.
94. Rolink AG, Thalmann P, Berger C, Radaszkiewicz T, and Melchers F. Autoreactive B-cell repertoire in mice with chronic graft versus host disease. *Mol Immunol*. 1988;25(11):1217-22.
95. Cutler C, Miklos D, Kim HT, Treister N, Woo SB, Bienfang D, Klickstein LB, Levin J, Miller K, Reynolds C, et al. Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2006;108(2):756-62.
96. Mohty M, Marchetti N, El-Cheikh J, Faucher C, Furst S, and Blaise D. Rituximab as salvage therapy for refractory chronic GVHD. *Bone marrow transplantation*. 2008;41(10):909-11.
97. Cutler C, Kim HT, Bindra B, Sarantopoulos S, Ho VT, Chen YB, Rosenblatt J, McDonough S, Watanaboonyongcharoen P, Armand P, et al. Rituximab prophylaxis prevents corticosteroid-requiring chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: results of a phase 2 trial. *Blood*. 2013;122(8):1510-7.
98. Koreth J, Kim HT, Lange PB, Bindra B, Reynolds CG, Chammas MJ, Armand P, Cutler CS, Ho VT, Glotzbecker B, et al. A Bortezomib-Based Regimen Offers Promising Survival and Graft-versus-Host Disease Prophylaxis in Myeloablative HLA-Mismatched and Unrelated Donor Transplantation: A Phase II Trial. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(11):1907-13.
99. Koreth J, Stevenson KE, Kim HT, Garcia M, Ho VT, Armand P, Cutler C, Ritz J, Antin JH, Soiffer RJ, et al. Bortezomib, tacrolimus, and methotrexate for prophylaxis of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation from HLA-mismatched unrelated donors. *Blood*. 2009;114(18):3956-9.
100. Koreth J, Stevenson KE, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Armand P, Ho VT, Cutler C, Blazar BR, Antin JH, et al. Bortezomib-based graft-versus-host disease prophylaxis in HLA-mismatched unrelated donor transplantation. *J Clin Oncol*. 2012;30(26):3202-8.
101. Herrera AF, Kim HT, Bindra B, Jones KT, Alyea EP, 3rd, Armand P, Cutler CS, Ho VT, Nikiforow S, Blazar BR, et al. A phase II study of bortezomib plus prednisone for initial therapy of chronic graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2014;20(11):1737-43.
102. Flynn R, Allen JL, Luznik L, MacDonald KP, Paz K, Alexander KA, Vulic A, Du J, Panoskaltsis-Mortari A, Taylor PA, et al. Targeting Syk-activated B cells in murine and human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2015;125(26):4085-94.

103. LeBien TW, and Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008;112(5):1570-80.
104. Harwood NE, and Batista FD. Early events in B cell activation. *Annual review of immunology*. 2010;28(185-210).
105. Cerutti A, Cols M, and Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(2):118-32.
106. Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, and Gerstein RM. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity*. 2004;21(3):379-90.
107. Kurosaki T, Kometani K, and Ise W. Memory B cells. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(3):149-59.
108. Griffin DO, and Rothstein TL. A small CD11b(+) human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(13):2591-8.
109. Allen CD, Okada T, and Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*. 2007;27(2):190-202.
110. Aguzzi A, Kranich J, and Krautler NJ. Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease. *Trends Immunol*. 2014;35(3):105-13.
111. Victora GD, and Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annual review of immunology*. 2012;30(429-57).
112. Victora GD. SnapShot: the germinal center reaction. *Cell*. 2014;159(3):700- e1.
113. Abbas AK, Murphy KM, and Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;383(6603):787-93.
114. DuPage M, and Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(3):149-63.
115. Zhou L, Chong MM, and Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009;30(5):646-55.
116. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology*. 1994;12(991-1045).
117. Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, and Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(11):1553-62.
118. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, and Forster R. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(11):1545-52.
119. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, and Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-

- localized subset of CXCR5+ T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2001;193(12):1373-81.
120. Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, and Cyster JG. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *The Journal of experimental medicine*. 1999;190(8):1123-34.
 121. Havenar-Daughton C, Lindqvist M, Heit A, Wu JE, Reiss SM, Kendrick K, Belanger S, Kasturi SP, Landais E, Akondy RS, et al. CXCL13 is a plasma biomarker of germinal center activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(10):2702-7.
 122. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, Dent AL, Craft J, and Crotty S. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*. 2009;325(5943):1006-10.
 123. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, Wang YH, and Dong C. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science*. 2009;325(5943):1001-5.
 124. Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, Srivastava M, Linterman M, Zheng L, Simpson N, et al. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity*. 2009;31(3):457-68.
 125. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity*. 2008;29(1):138-49.
 126. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, Verma NK, Smyth MJ, Rigby RJ, and Vinuesa CG. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(2):353-63.
 127. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, Corcoran LM, Godfrey DI, Toellner KM, Smyth MJ, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(2):365-78.
 128. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 2014;41(4):529-42.
 129. Ueno H, Banachereau J, and Vinuesa CG. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nature immunology*. 2015;16(2):142-52.
 130. Goenka R, Barnett LG, Silver JS, O'Neill PJ, Hunter CA, Cancro MP, and Laufer TM. Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. *Journal of immunology*. 2011;187(3):1091-5.
 131. Schmitt N, Morita R, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski SM, Banachereau J, and Ueno H. Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. *Immunity*. 2009;31(1):158-69.

132. Choi YS, Kageyama R, Eto D, Escobar TC, Johnston RJ, Monticelli L, Lao C, and Crotty S. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity*. 2011;34(6):932-46.
133. Jacquemin C, Schmitt N, Contin-Bordes C, Liu Y, Narayanan P, Seneschal J, Maurouard T, Dougall D, Davizon ES, Dumortier H, et al. OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity*. 2015;42(6):1159-70.
134. Choi YS, Eto D, Yang JA, Lao C, and Crotty S. Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. *Journal of immunology*. 2013;190(7):3049-53.
135. Pepper M, Pagan AJ, Igyarto BZ, Taylor JJ, and Jenkins MK. Opposing signals from the Bcl6 transcription factor and the interleukin-2 receptor generate T helper 1 central and effector memory cells. *Immunity*. 2011;35(4):583-95.
136. Schmitt N, Liu Y, Bentebibel SE, Munagala I, Bourdery L, Venuprasad K, Banchereau J, and Ueno H. The cytokine TGF-beta co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nature immunology*. 2014;15(9):856-65.
137. Ballesteros-Tato A, Leon B, Graf BA, Moquin A, Adams PS, Lund FE, and Randall TD. Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity*. 2012;36(5):847-56.
138. Johnston RJ, Choi YS, Diamond JA, Yang JA, and Crotty S. STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(2):243-50.
139. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annual review of immunology*. 2011;29(621-63).
140. Crotty S, Johnston RJ, and Schoenberger SP. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nature immunology*. 2010;11(2):114-20.
141. Fazilleau N, McHeyzer-Williams LJ, Rosen H, and McHeyzer-Williams MG. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nature immunology*. 2009;10(4):375-84.
142. Bentebibel SE, Schmitt N, Banchereau J, and Ueno H. Human tonsil B-cell lymphoma 6 (BCL6)-expressing CD4+ T-cell subset specialized for B-cell help outside germinal centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(33):E488-97.
143. Bentebibel SE, Lopez S, Obermoser G, Schmitt N, Mueller C, Harrod C, Flano E, Mejias A, Albrecht RA, Blankenship D, et al. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Science translational medicine*. 2013;5(176):176ra32.
144. Chevalier N, Jarrossay D, Ho E, Avery DT, Ma CS, Yu D, Sallusto F, Tangye SG, and Mackay CR. CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *Journal of immunology*. 2011;186(10):5556-68.

145. He J, Tsai LM, Leong YA, Hu X, Ma CS, Chevalier N, Sun X, Vandenberg K, Rockman S, Ding Y, et al. Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity*. 2013;39(4):770-81.
146. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, Su LF, Cubas R, Davis MM, Sette A, et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*. 2013;39(4):758-69.
147. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, Foucat E, Dullaers M, Oh S, Sabzghabaei N, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. 2011;34(1):108-21.
148. Schmitt N, and Ueno H. Blood Tfh cells come with colors. *Immunity*. 2013;39(4):629-30.
149. Boswell KL, Paris R, Boritz E, Ambrozak D, Yamamoto T, Darko S, Wloka K, Wheatley A, Narpala S, McDermott A, et al. Loss of circulating CD4 T cells with B cell helper function during chronic HIV infection. *PLoS pathogens*. 2014;10(1):e1003853.
150. Schmitt N, Liu Y, Bentebibel SE, and Ueno H. Molecular Mechanisms Regulating T Helper 1 versus T Follicular Helper Cell Differentiation in Humans. *Cell Rep*. 2016;16(4):1082-95.
151. Bentebibel SE, Khurana S, Schmitt N, Kurup P, Mueller C, Obermoser G, Palucka AK, Albrecht RA, Garcia-Sastre A, Golding H, et al. ICOS(+)PD-1(+CXCR3(+) T follicular helper cells contribute to the generation of high-avidity antibodies following influenza vaccination. *Scientific reports*. 2016;6(26494).
152. Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, Perreau M, van Grevenynghe J, Metcalf T, Connick E, Meditz A, Freeman GJ, Abesada-Terk G, Jr., et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med*. 2013;19(4):494-9.
153. Lin W, Truong N, Grossman WJ, Haribhai D, Williams CB, Wang J, Martin MG, and Chatila TA. Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(5):1106-15.
154. Tsuda M, Torgerson TR, Selmi C, Gambineri E, Carneiro-Sampaio M, Mannurita SC, Leung PS, Norman GL, and Gershwin ME. The spectrum of autoantibodies in IPEX syndrome is broad and includes anti-mitochondrial autoantibodies. *Journal of autoimmunity*. 2010;35(3):265-8.
155. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, and Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Journal of immunology*. 2005;175(7):4180-3.
156. Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, Wang YH, Lim H, Reynolds JM, Zhou XH, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med*. 2011;17(8):983-8.
157. Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, Srivastava M, Divekar DP, Beaton L, Hogan JJ, et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med*. 2011;17(8):975-82.

158. Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernandez A, Almeida C, Oliveira VG, Faro J, and Graca L. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3⁺ follicular regulatory T cells. *Journal of immunology*. 2011;187(9):4553-60.
159. Sage PT, Francisco LM, Carman CV, and Sharpe AH. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nature immunology*. 2013;14(2):152-61.
160. Sage PT, Paterson AM, Lovitch SB, and Sharpe AH. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity*. 2014;41(6):1026-39.
161. Wing JB, Ise W, Kurosaki T, and Sakaguchi S. Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4. *Immunity*. 2014;41(6):1013-25.
162. Flynn R, Paz K, Du J, Reichenbach DK, Taylor PA, Panoskaltis-Mortari A, Vulic A, Luznik L, MacDonald KK, Hill GR, et al. Targeted Rho-associated kinase 2 inhibition suppresses murine and human chronic GVHD through a Stat3-dependent mechanism. *Blood*. 2016;127(17):2144-54.
163. Dhaeze T, Peelen E, Hombrouck A, Peeters L, Van Wijmeersch B, Lemkens N, Lemkens P, Somers V, Lucas S, Broux B, et al. Circulating Follicular Regulatory T Cells Are Defective in Multiple Sclerosis. *Journal of immunology*. 2015;195(3):832-40.
164. Sage PT, Alvarez D, Godec J, von Andrian UH, and Sharpe AH. Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(12):5191-204.
165. Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K, Bruns A, Burmester GR, Radbruch A, Valet G, Lipsky PE, and Dorner T. Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(5):1332-42.
166. Le Coz C, Joublin A, Pasquali JL, Korganow AS, Dumortier H, and Monneaux F. Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease. *PLoS One*. 2013;8(9):e75319.
167. Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, Manku H, Vyse TJ, Roncador G, Huttley GA, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(1):234-44.
168. Liu R, Wu Q, Su D, Che N, Chen H, Geng L, Chen J, Chen W, Li X, and Sun L. A regulatory effect of IL-21 on T follicular helper-like cell and B cell in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6):R255.
169. Wang J, Shan Y, Jiang Z, Feng J, Li C, Ma L, and Jiang Y. High frequencies of activated B cells and T follicular helper cells are correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2013;174(2):212-20.
170. Xu X, Shi Y, Cai Y, Zhang Q, Yang F, Chen H, Gu Y, Zhang M, Yu L, and Yang T. Inhibition of increased circulating Tfh cell by anti-CD20 monoclonal antibody in patients with type 1 diabetes. *PLoS One*. 2013;8(11):e79858.

171. Flynn R, Du J, Veenstra RG, Reichenbach DK, Panoskaltsis-Mortari A, Taylor PA, Freeman GJ, Serody JS, Murphy WJ, Munn DH, et al. Increased T follicular helper cells and germinal center B cells are required for cGVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood*. 2014;123(25):3988-98.
172. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, and Romagnani S. Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends Immunol*. 2012;33(10):505-12.
173. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, and Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006;441(7090):231-4.
174. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, and Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24(2):179-89.
175. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature*. 2010;467(7318):967-71.
176. Patel DD, and Kuchroo VK. Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions. *Immunity*. 2015;43(6):1040-51.
177. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, and Littman DR. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33.
178. Dong C. IL-23/IL-17 biology and therapeutic considerations. *J Immunotoxicol*. 2008;5(1):43-6.
179. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, and Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(9):585-600.
180. Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L, Takahashi H, Sun HW, Kanno Y, Powrie F, et al. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*. 2010;32(5):605-15.
181. Schraml BU, Hildner K, Ise W, Lee WL, Smith WA, Solomon B, Sahota G, Sim J, Mukasa R, Cemurski S, et al. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature*. 2009;460(7253):405-9.
182. Brustle A, Heink S, Huber M, Rosenplanter C, Stadelmann C, Yu P, Arpaia E, Mak TW, Kamradt T, and Lohoff M. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nature immunology*. 2007;8(9):958-66.
183. Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, Agarwal A, Huang W, Parkhurst CN, Muratet M, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell*. 2012;151(2):289-303.
184. Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen HR, et al. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell*. 2011;146(5):772-84.
185. Muranski P, and Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*. 2013;121(13):2402-14.

186. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, and Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(12):1875-86.
187. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov, II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature*. 2008;453(7192):236-40.
188. Lexberg MH, Taubner A, Forster A, Albrecht I, Richter A, Kamradt T, Radbruch A, and Chang HD. Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *European journal of immunology*. 2008;38(10):2654-64.
189. Annunziato F, Cosmi L, Santarasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(8):1849-61.
190. Wei G, Wei L, Zhu J, Zang C, Hu-Li J, Yao Z, Cui K, Kanno Y, Roh TY, Watford WT, et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity*. 2009;30(1):155-67.
191. Hirota K, Turner JE, Villa M, Duarte JH, Demengeot J, Steinmetz OM, and Stockinger B. Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. *Nature immunology*. 2013;14(4):372-9.
192. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314(5804):1461-3.
193. Serody JS, and Hill GR. The IL-17 differentiation pathway and its role in transplant outcome. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2012;18(1 Suppl):S56-61.
194. Murphy WJ, Welniak LA, Taub DD, Wiltout RH, Taylor PA, Vallera DA, Kopf M, Young H, Longo DL, and Blazar BR. Differential effects of the absence of interferon-gamma and IL-4 in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(9):1742-8.
195. Carlson MJ, West ML, Coghill JM, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, and Serody JS. In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood*. 2009;113(6):1365-74.
196. Kappel LW, Goldberg GL, King CG, Suh DY, Smith OM, Ligh C, Holland AM, Grubin J, Mark NM, Liu C, et al. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;113(4):945-52.
197. Yi T, Chen Y, Wang L, Du G, Huang D, Zhao D, Johnston H, Young J, Todorov I, Umetsu DT, et al. Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;114(14):3101-12.
198. Yu Y, Wang D, Liu C, Kaosaard K, Semple K, Anasetti C, and Yu XZ. Prevention of GVHD while sparing GVL effect by targeting Th1 and Th17 transcription factor T-bet and RORgammat in mice. *Blood*. 2011;118(18):5011-20.

199. Chen X, Das R, Komorowski R, Beres A, Hessner MJ, Mihara M, and Drobyski WR. Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;114(4):891-900.
200. Das R, Komorowski R, Hessner MJ, Subramanian H, Huettner CS, Cua D, and Drobyski WR. Blockade of interleukin-23 signaling results in targeted protection of the colon and allows for separation of graft-versus-host and graft-versus-leukemia responses. *Blood*. 2010;115(25):5249-58.
201. Bucher C, Koch L, Vogtenhuber C, Goren E, Munger M, Panoskaltsis-Mortari A, Sivakumar P, and Blazar BR. IL-21 blockade reduces graft-versus-host disease mortality by supporting inducible T regulatory cell generation. *Blood*. 2009;114(26):5375-84.
202. Broady R, Yu J, Chow V, Tantiworawit A, Kang C, Berg K, Martinka M, Ghoreishi M, Dutz J, and Levings MK. Cutaneous GVHD is associated with the expansion of tissue-localized Th1 and not Th17 cells. *Blood*. 2010;116(25):5748-51.
203. Liu Y, Cai Y, Dai L, Chen G, Ma X, Wang Y, Xu T, Jin S, Wu X, Qiu H, et al. The expression of Th17-associated cytokines in human acute graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2013;19(10):1421-9.
204. Radojicic V, Pletneva MA, Yen HR, Ivcevic S, Panoskaltsis-Mortari A, Gilliam AC, Drake CG, Blazar BR, and Luznik L. STAT3 signaling in CD4+ T cells is critical for the pathogenesis of chronic sclerodermatous graft-versus-host disease in a murine model. *Journal of immunology*. 2010;184(2):764-74.
205. Hill GR, Olver SD, Kuns RD, Varelias A, Raffelt NC, Don AL, Markey KA, Wilson YA, Smyth MJ, Iwakura Y, et al. Stem cell mobilization with G-CSF induces type 17 differentiation and promotes scleroderma. *Blood*. 2010;116(5):819-28.
206. Alexander KA, Flynn R, Lineburg KE, Kuns RD, Teal BE, Olver SD, Lor M, Raffelt NC, Koyama M, Leveque L, et al. CSF-1-dependant donor-derived macrophages mediate chronic graft-versus-host disease. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(10):4266-80.
207. Sarantopoulos S, Blazar BR, Cutler C, and Ritz J. B cells in chronic graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(1):16-23.
208. Socie G, and Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2014;124(3):374-84.
209. Kawano Y, Kim HT, Matsuoka K, Bascug G, McDonough S, Ho VT, Cutler C, Koreth J, Alyea EP, Antin JH, et al. Low telomerase activity in CD4+ regulatory T cells in patients with severe chronic GVHD after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;118(18):5021-30.
210. Koreth J, Kim HT, Jones KT, Lange PB, Reynolds CG, Chammas MJ, Dusenbury K, Whangbo J, Nikiforow S, Alyea EP, 3rd, et al. Efficacy, durability, and response predictors of low-dose interleukin-2 therapy for chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2016;128(1):130-7.

211. Guezguez B, Vigneron P, Lamerant N, Kieda C, Jaffredo T, and Dunon D. Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor. *Journal of immunology*. 2007;179(10):6673-85.
212. Li W, Liu L, Gomez A, Zhang J, Ramadan A, Zhang Q, Choi SW, Zhang P, Greenson JK, Liu C, et al. Proteomics analysis reveals a Th17-prone cell population in presymptomatic graft-versus-host disease. *JCI Insight*. 2016;1(6).
213. Yu J, Storer BE, Kushekhar K, Abu Zaid M, Zhang Q, Gafken PR, Ogata Y, Martin PJ, Flowers ME, Hansen JA, et al. Biomarker Panel for Chronic Graft-Versus-Host Disease. *J Clin Oncol*. 2016;34(22):2583-90.
214. Xhaard A, Moins-Teisserenc H, Busson M, Robin M, Ribaud P, Dhedin N, Abbes S, Carmagnat M, Kheav VD, Maki G, et al. Reconstitution of regulatory T-cell subsets after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone marrow transplantation*. 2014;49(8):1089-92.
215. Paczesny S, Hakim FT, Pidala J, Cooke KR, Lathrop J, Griffith LM, Hansen J, Jagasia M, Miklos D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: III. The 2014 Biomarker Working Group Report. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(5):780-92.
216. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, and Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*. 2008;73(11):975-83.
217. Maecker HT, McCoy JP, and Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(3):191-200.
218. Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Herzenberg LA, and Parks DR. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nature immunology*. 2006;7(7):681-5.
219. Roederer M. How many events is enough? Are you positive? *Cytometry A*. 2008;73(5):384-5.
220. Bjornson ZB, Nolan GP, and Fantl WJ. Single-cell mass cytometry for analysis of immune system functional states. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(4):484-94.
221. Comerford I, Kara EE, McKenzie DR, and McColl SR. Advances in understanding the pathogenesis of autoimmune disorders: focus on chemokines and lymphocyte trafficking. *Br J Haematol*. 2014;164(3):329-41.
222. Girard JP, Moussion C, and Forster R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(11):762-73.
223. Vinuesa CG, Cook MC, Angelucci C, Athanasopoulos V, Rui L, Hill KM, Yu D, Domaschensz H, Whittle B, Lambe T, et al. A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature*. 2005;435(7041):452-8.
224. Linterman MA, Rigby RJ, Wong RK, Yu D, Brink R, Cannons JL, Schwartzberg PL, Cook MC, Walters GD, and Vinuesa CG. Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(3):561-76.

225. Shao L, Lie AK, Zhang Y, Wong CH, and Kwong YL. Aberrant germinal center formation, follicular T-helper cells, and germinal center B-cells were involved in chronic graft-versus-host disease. *Ann Hematol.* 2015;94(9):1493-504.
226. Jin H, Ni X, Deng R, Song Q, Young J, Cassady K, Zhang M, Forman S, Martin PJ, Liu Q, et al. Antibodies from donor B cells perpetuate cutaneous chronic graft-versus-host disease in mice. *Blood.* 2016;127(18):2249-60.
227. Chu YW, and Gress RE. Murine models of chronic graft-versus-host disease: insights and unresolved issues. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2008;14(4):365-78.
228. Zeiser R, and Blazar BR. Preclinical models of acute and chronic graft-versus-host disease: how predictive are they for a successful clinical translation? *Blood.* 2016;127(25):3117-26.
229. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, and Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology.* 2008;26(677-704).
230. Liarski VM, Kaverina N, Chang A, Brandt D, Yanez D, Talasnik L, Carlesso G, Herbst R, Utset TO, Labno C, et al. Cell distance mapping identifies functional T follicular helper cells in inflamed human renal tissue. *Science translational medicine.* 2014;6(230):230ra46.
231. Girolomoni G, Pincelli C, Zambruno G, Andreani M, Giardini C, Lucarelli G, and Giannetti A. Immunohistochemistry of cutaneous graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *The Journal of dermatology.* 1991;18(6):314-23.

References

1. Lee SJ, Vogelsang G, and Flowers ME. Chronic graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2003;9(4):215-33.
2. Socie G, and Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2014;124(3):374-84.
3. Paczesny S. Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers. *Blood*. 2013;121(4):585-94.
4. Paczesny S, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: III. The 2014 Biomarker Working Group Report. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(5):780-92.
5. Matsuoka K, et al. Altered regulatory T cell homeostasis in patients with CD4+ lymphopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(5):1479-93.
6. Sarantopoulos S, et al. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;113(16):3865-74.
7. Yu J, et al. Biomarker Panel for Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(22):2583-90.
8. Coghill JM, Sarantopoulos S, Moran TP, Murphy WJ, Blazar BR, and Serody JS. Effector CD4+ T cells, the cytokines they generate, and GVHD: something old and something new. *Blood*. 2011;117(12):3268-76.
9. Cooke KR, et al. The Biology of Chronic Graft-Versus-Host Disease: a Task Force Report From the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2016.
10. Koreth J, et al. Efficacy, durability, and response predictors of low-dose interleukin-2 therapy for chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2016;128(1):130-7.
11. Allen JL, et al. B cells from patients with chronic GVHD are activated and primed for survival via BAFF-mediated pathways. *Blood*. 2012;120(12):2529-36.
12. Sarantopoulos S, et al. Recovery of B-cell homeostasis after rituximab in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2011;117(7):2275-83.
13. Flynn R, et al. Targeting Syk-activated B cells in murine and human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2015;125(26):4085-94.
14. Dubovsky JA, et al. Ibrutinib treatment ameliorates murine chronic graft-versus-host disease. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(11):4867-76.
15. DuPage M, and Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(3):149-63.
16. Ivanov, II, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33.
17. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, and Romagnani S. Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends in immunology*. 2012;33(10):505-12.

18. Wang C, *et al.* CD5L/AIM Regulates Lipid Biosynthesis and Restrains Th17 Cell Pathogenicity. *Cell*. 2015;163(6):1413-27.
19. Furlan SN, *et al.* Systems analysis uncovers inflammatory Th/Tc17-driven modules during acute GVHD in monkey and man. *Blood*. 2016.
20. Serody JS, and Hill GR. The IL-17 differentiation pathway and its role in transplant outcome. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2012;18(1 Suppl):S56-61.
21. Kappel LW, *et al.* IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;113(4):945-52.
22. Yi T, *et al.* Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2008;112(5):2101-10.
23. Dander E, *et al.* Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation*. 2009;88(11):1261-72.
24. Ratajczak P, *et al.* Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood*. 2010;116(7):1165-71.
25. Broady R, *et al.* Cutaneous GVHD is associated with the expansion of tissue-localized Th1 and not Th17 cells. *Blood*. 2010;116(25):5748-51.
26. Chen X, Vodanovic-Jankovic S, Johnson B, Keller M, Komorowski R, and Drobyski WR. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2007;110(10):3804-13.
27. Carlson MJ, West ML, Coghill JM, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, and Serody JS. In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood*. 2009;113(6):1365-74.
28. Hill GR, *et al.* Stem cell mobilization with G-CSF induces type 17 differentiation and promotes scleroderma. *Blood*. 2010;116(5):819-28.
29. Alexander KA, *et al.* CSF-1-dependant donor-derived macrophages mediate chronic graft-versus-host disease. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(10):4266-80.
30. Radojicic V, *et al.* STAT3 signaling in CD4+ T cells is critical for the pathogenesis of chronic sclerodermatous graft-versus-host disease in a murine model. *Journal of immunology*. 2010;184(2):764-74.
31. Flynn R, *et al.* Targeted Rho-associated kinase 2 inhibition suppresses murine and human chronic GVHD through a Stat3-dependent mechanism. *Blood*. 2016;127(17):2144-54.
32. Bruggen MC, *et al.* Diverse T-cell responses characterize the different manifestations of cutaneous graft-versus-host disease. *Blood*. 2014;123(2):290-9.
33. Li W, *et al.* Proteomics analysis reveals a Th17-prone cell population in presymptomatic graft-versus-host disease. *JCI insight*. 2016;1(6).
34. Baeten D, *et al.* Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis. *The New England journal of medicine*. 2015;373(26):2534-48.
35. Langley RG, *et al.* Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *The New England journal of medicine*. 2014;371(4):326-38.
36. Sandborn WJ, *et al.* Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *The New England journal of medicine*. 2012;367(16):1519-28.

37. Weiss JM, *et al.* ROCK2 signaling is required to induce a subset of T follicular helper cells through opposing effects on STATs in autoimmune settings. *Sci Signal.* 2016;9(437):ra73.
38. Zanin-Zhorov A, *et al.* Selective oral ROCK2 inhibitor down-regulates IL-21 and IL-17 secretion in human T cells via STAT3-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014;111(47):16814-9.
39. Xiao S, *et al.* Small-molecule ROR γ antagonists inhibit T helper 17 cell transcriptional network by divergent mechanisms. *Immunity.* 2014;40(4):477-89.
40. Patel DD, and Kuchroo VK. Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions. *Immunity.* 2015;43(6):1040-51.
41. Skepner J, *et al.* Pharmacologic inhibition of ROR γ regulates Th17 signature gene expression and suppresses cutaneous inflammation in vivo. *Journal of immunology.* 2014;192(6):2564-75.
42. Despoix N, *et al.* Mouse CD146/MCAM is a marker of natural killer cell maturation. *European journal of immunology.* 2008;38(10):2855-64.
43. Duan H, *et al.* Targeting endothelial CD146 attenuates neuroinflammation by limiting lymphocyte extravasation to the CNS. *Scientific reports.* 2013;3(1687).
44. Larochelle C, *et al.* Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain : a journal of neurology.* 2012;135(Pt 10):2906-24.
45. Kunkel EJ, and Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity.* 2002;16(1):1-4.
46. Guezguez B, Vigneron P, Lamerant N, Kieda C, Jaffredo T, and Dunon D. Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor. *Journal of immunology.* 2007;179(10):6673-85.
47. Dagur PK, *et al.* MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity.* 2011;37(4):319-27.
48. Loetscher P, *et al.* CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature.* 1998;391(6665):344-5.
49. Srinivasan M, *et al.* Donor B-cell alloantibody deposition and germinal center formation are required for the development of murine chronic GVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood.* 2012;119(6):1570-80.
50. Flynn R, *et al.* Increased T follicular helper cells and germinal center B cells are required for cGVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood.* 2014;123(25):3988-98.
51. Durant L, *et al.* Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity.* 2010;32(5):605-15.
52. Miklossy G, Hilliard TS, and Turkson J. Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. *Nature reviews Drug discovery.* 2013;12(8):611-29.
53. Dagur PK, and McCoy JP, Jr. Endothelial-binding, proinflammatory T cells identified by MCAM (CD146) expression: Characterization and role in human autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews.* 2015;14(5):415-22.
54. Morita NI, Matsumura Y, Morita K, and Miyachi Y. Expression of CCR5 in graft-versus-host disease (GVHD) of the skin: immunohistochemical staining of 38 cases. *The Journal of dermatology.* 2007;34(4):254-7.

55. Annunziato F, *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(8):1849-61.
56. Nistala K, *et al.* Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(33):14751-6.
57. Nishimori H, *et al.* Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17. *Blood*. 2012;119(1):285-95.
58. Burlingham WJ, *et al.* IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(11):3498-506.
59. Harris TJ, *et al.* Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *Journal of immunology*. 2007;179(7):4313-7.
60. Ma CS, *et al.* Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(7):1551-7.
61. Park JS, *et al.* STA-21, a promising STAT-3 inhibitor that reciprocally regulates Th17 and Treg cells, inhibits osteoclastogenesis in mice and humans and alleviates autoimmune inflammation in an experimental model of rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatology*. 2014;66(4):918-29.
62. Wu C, Goodall JC, Busch R, and Gaston JS. Relationship of CD146 expression to secretion of interleukin (IL)-17, IL-22 and interferon-gamma by CD4(+) T cells in patients with inflammatory arthritis. *Clinical and experimental immunology*. 2015;179(3):378-91.
63. Zhang J, *et al.* ST2 blockade reduces sST2-producing T cells while maintaining protective mST2-expressing T cells during graft-versus-host disease. *Science translational medicine*. 2015;7(308):308ra160.
64. Reddy P, *et al.* Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(7):2562-73.
65. Panoskaltsis-Mortari A, Tram KV, Price AP, Wendt CH, and Blazar BR. A new murine model for bronchiolitis obliterans post-bone marrow transplant. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(7):713-23.
66. Jagasia MH, *et al.* 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. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(3):389-401 e1.