



**HAL**  
open science

# Étude des propriétés régulatrices d'une population de précurseurs de cellules dendritiques plasmacytoïdes conditionnée par le CpG dans le cadre de réponses auto-immune et allogénique

Hélène Letscher

► **To cite this version:**

Hélène Letscher. Étude des propriétés régulatrices d'une population de précurseurs de cellules dendritiques plasmacytoïdes conditionnée par le CpG dans le cadre de réponses auto-immune et allogénique. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCB058 . tel-02510077

**HAL Id: tel-02510077**

**<https://theses.hal.science/tel-02510077v1>**

Submitted on 17 Mar 2020

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

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

**Université Paris Descartes**

**École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité**

Institut Necker Enfants Malades INSERM U1151 CNRS 8253

**Étude des propriétés régulatrices d'une population  
de précurseurs de cellules dendritiques plasmacytoïdes  
conditionnée par le CpG dans le cadre de réponses auto-immune et allogénique**

**Hélène LETSCHER**

**Sous la direction de Flora ZAVALA**

Thèse de doctorat en vue de l'obtention du diplôme de

**Docteur en Immunologie de l'Université Paris Descartes**

Thèse soutenue publiquement le 25 septembre 2018

Devant un jury composé de :

Docteur Maria-Cristina CUTURI

**Président du Jury**

Professeur Stéphanie HUGUES

**Rapporteur**

Professeur Bruno CANQUE

**Rapporteur**

Docteur Saoussen KARRAY

**Examineur**

Professeur José COHEN

**Examineur**

Docteur Flora ZAVALA

**Directeur de Thèse**



Ce livre est à moi  
Comme la France est au roi  
Si tenté du démon  
Tu dérobes ce livre  
Apprends que tout fripon  
Est indigne de vivre  
Et je te ferai sans sommation  
Descendre chez Pluton  
En cas de perte  
Voici mon nom

À Madame Clothilde MORABET

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement le docteur Flora ZAVALA de m'avoir acceptée dans l'équipe, de m'avoir permis de réaliser cette thèse et de rentrer dans le monde scientifique. Vos encouragements et votre patience (surtout pour la relecture de cette thèse) m'ont permis de mener à bien ce travail tout en me fournissant le cadre scientifique et matériel nécessaire. Vos récits et photos du Japon m'ont fait rêver et ne font que me donner encore plus envie d'y aller ! Merci également à Sophie EZINE d'avoir toujours été disponible pour discuter d'immunologie et nous apporter des bonbons en douce dans le bureau.

Je remercie tous les membres de mon jury, le Dr Maria Cristina CUTURI, le Dr Stéphanie HUGUES, le Pr Bruno CANQUE, le Dr Saoussen KARRAY ainsi que le Pr José COHEN d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie en particulier le Dr Stéphanie HUGUES et le Pr Bruno CANQUE d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse en ces mois de juillet-août.

Je tiens également à remercier particulièrement Christophe et Sarantis qui m'ont tout appris au cours de ma thèse (et d'avoir chanté le générique de Jeanne et Serge jusqu'à temps que ça me rentre dans le crâne et que ça ne veuille plus sortir...). Merci pour votre patience, votre disponibilité, les coups de main mais également le cadre scientifique comme un-peu-moins-scientifique que vous m'avez donné jusqu'à la fin de ma thèse.

Un grand merci à Manu pour ton aide énorme, ta capacité d'écoute et pour ta patience quand on se faisait des journées « pattes et hanches ». Merci de t'être rendu disponible au maximum, même quand nous avons un peu prévu des manip « sur un coin de bureau » bien que tu aies eu ton propre sujet. Merci pour ces longues discussions parfois animées de politique, socio, musique, cinéma (et j'en passe) en pièce de culture et même pour ton *humour* (et tes calembours pourris) !

Merci également à Victoria et Priscillia (la team doctorante) pour les discussions « art conceptuel des figures de papier » et votre bonne humeur. Un merci particulier à Victoria pour tes conseils, trucs et astuces sur la façon d'écrire une thèse qui m'ont été particulièrement utiles ! Je remercie et je passe le témoin à Viviane. Je te souhaite plein de courage et de réussite pour ce marathon qui vaut le coup !

Ce travail a également été possible grâce à l'aide de Chantal, Agnès, Marie et Véronique qui ont toujours répondu présentes pour me donner un coup de main que cela ait été pour préparer des os, m'apprendre à utiliser SAFIR ou discuter de mon sujet.

Je tiens également à remercier tous les membres des plateformes : Jérôme, Sylvie, Amandine, Corinne, Nadia, Rachid et Patricia. Merci de m'avoir beaucoup appris et d'avoir parfois été patients avec mes histoires inextricables de commandes.

Je tiens également à remercier Hélène-bis (c'est moi la plus vieille dans cette histoire, c'est toi la « bis » namého !) et Ludo d'avoir été là pendant ces quatre années (et même beaucoup plus) même quand j'étais ronchonchon. Merci à toute l'équipe de robotique de m'avoir acceptée dans le groupe même si je n'y comprends pas toujours tout (oui c'est un euphémisme). Les coupes de France de robotiques déjantées et les soirées à coup de *mort bubite* ont été de vrais bols d'air frais.

Un immense merci à mes parents Didier et Geneviève d'avoir toujours été là, de m'avoir toujours aidée et de m'avoir toujours soutenue. Je ne pourrai jamais assez vous dire combien je tiens à vous ni vous remercier assez alors j'essaye juste de vous rendre fiers. Un tout aussi immense merci à mes frères et sœur : Thomas, Camille et Benjamin. Ah, vous m'avez charriée, hein ! Ah, vous m'avez dit que j'avais un humour de chercheur (depuis le collège) ! Et ben voilà ! Merci d'avoir toujours été là (même pour me distraire de mon travail avec Diablo III, parlons peu parlons geek...). Vespasien ! Merci aussi à tous les membres de la famille de m'avoir écoutée patiemment quand je vous racontais ma thèse aux réunions de famille.

Enfin, je remercie mon Guillaume, toi qui as toujours été là pour les meilleurs moments mais aussi quand j'étais VRAIMENT ronchonchon (oui, là aussi c'est un euphémisme). Merci de m'avoir (ré)appris à souder, merci d'avoir toujours été patient avec moi-même quand « j'oubliais mon cerveau au labo », merci de m'avoir fait découvrir tant de choses (dont la robotique, l'impression 3D et la vie des baleiniers au XX<sup>e</sup> siècles... Parce que). Mille mercis pour ta bonne humeur indéfectible, ta curiosité de chaque instant, ton relativisme dans les moments les plus durs de ma thèse et de m'avoir obligée à manger autre chose que des nouilles instantanées. En bref, merci pour ces années merveilleuses !

# Contenu

Contenu.....	6
Table des illustrations.....	8
Table des tableaux.....	8
Avant-propos.....	10
I/Cellules immatures : de nouvelles possibilités pour traiter les déficiences immunes.....	12
1) L'hématopoïèse.....	12
<i>i) Organisation de l'hématopoïèse.....</i>	12
a) Organisation des étapes précoces de l'hématopoïèse.....	13
b) Emergence des différentes cellules dendritiques.....	18
<i>ii) L'hématopoïèse « d'urgence ».....</i>	28
a) Les cellules immatures circulent hors des sites d'hématopoïèse.....	28
b) Sensibilité au milieu : les TLR.....	29
c) Hématopoïèse de stress et hématopoïèse inflammatoire.....	35
2) Fonction régulatrice et cellules immatures.....	38
<i>i) La tolérance immunitaire.....</i>	38
a) La tolérance centrale.....	39
b) L'ignorance, la délétion clonale et l'anergie.....	41
c) La tolérance périphérique.....	44
d) Les sites immuno-privilegiés.....	46
<i>ii) Régulation par des cellules immatures.....</i>	48
a) Les MDSC.....	49
b) Les MSC.....	50
c) Les MPP.....	51
d) Les CpG-ProB.....	52
e) Les cellules dendritiques conventionnelles immatures.....	53
f) Utilisation de pDC immatures.....	54
II/ Présentation des pathologies étudiées.....	56
1) Un modèle de sclérose en plaques : l'Encéphalite Auto-immune Expérimentale (EAE).....	56
<i>i) Épidémiologie et étiologie de la sclérose en plaques.....</i>	56
<i>ii) Développement de la maladie.....</i>	59
a) Le paradigme Th1/Th17.....	60
b) Les lymphocytes T CD8.....	62
c) Les Lymphocytes B.....	64
d) Les DC pathogènes.....	66
<i>iii) Régulation de la maladie.....</i>	70
a) Les lymphocytes T CD4 régulateurs.....	70

b)	L'équilibre Th1/Th2 et les cytokines Th2 .....	75
c)	Les lymphocytes T CD8 régulateurs .....	76
d)	Les lymphocytes B régulateurs .....	77
e)	Les DC tolérogènes.....	78
f)	Le rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	85
iv)	<i>Modèle murin</i> .....	90
v)	<i>Traitements possibles de la sclérose en plaques</i> .....	94
a)	Les traitements conventionnels.....	94
b)	La greffe de cellules souches hématopoïétiques .....	96
c)	La faisabilité d'un traitement par thérapie cellulaire .....	99
2)	<i>La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)</i> .....	103
i)	<i>la GVHD est une conséquence du transfert de cellules souches hématopoïétiques</i> .....	105
ii)	<i>La GVHD aiguë</i> .....	107
a)	La tempête cytokinique .....	108
b)	Les cellules présentatrices d'antigènes de l'hôte .....	111
c)	L'axe Th1/Th17.....	114
d)	Les CD8.....	116
e)	Les lymphocytes B.....	117
f)	Les T régulateurs .....	118
g)	Les cellules dendritiques plasmacytoïdes .....	121
iii)	<i>La GVH chronique</i> .....	123
iv)	<i>Différents modèles de GVHD</i> .....	123
a)	Modèle in vitro : la Mixed Lymphocyte reaction (MLR) .....	124
b)	Modèle in vivo murin .....	125
v)	<i>Traitement de la GVHD aiguë</i> .....	127
a)	Traitements conventionnels .....	127
b)	Traitements par thérapie cellulaire .....	128
III/	<i>Problématique et objectifs de l'étude</i> .....	132
1)	Problématique .....	132
2)	Comparaison des deux modèles d'étude.....	132
3)	Démarche expérimentale .....	132
Article n°1.....		133
DISCUSSION ET PERSPECTIVES PARTIE 1.....		153
Partie 2.....		163
DISCUSSION ET PERSPECTIVES PARTIE 2.....		177
DISCUSSION ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES.....		184
Annexe: Article n°2 .....		193



## Table des illustrations

<b>Figure 1</b> : Modèle de l'hématopoïèse chez les mammifères.....	13
<b>Figure 2</b> : La niche hématopoïétique nécessite la participation de nombreuses cellules non hématopoïétiques. ....	15
<b>Figure 3</b> : Le compartiment des HSC.....	16
<b>Figure 4</b> : Différenciation des cellules dendritiques à partir du précurseur commun.....	20
<b>Figure 5</b> : Voies de différenciation des cellules présentatrices d'antigènes (DC et pDC) chez la souris .....	26
<b>Figure 6</b> : Les voies de signalisation des TLR via leurs molécules partenaires.....	30
<b>Figure 7</b> : Récepteurs de cytokines et TLR portés par les cellules immatures lors de l'hématopoïèse.....	35
<b>Figure 8</b> : La différenciation des CD4+ en différents lignages .....	59
<b>Figure 9</b> : Attaque des gaines de myéline et des neurones.....	61
<b>Figure 10</b> : Mécanisme de l'auto-réactivité des CD8 dans la SEP. ....	64
<b>Figure 11</b> : L'épitope spreading .....	68
<b>Figure 12</b> : Plasticité des T helper. ....	75
<b>Figure 14</b> : Les deux visages des lymphocytes B.....	78
<b>Figure 15</b> : Les deux voies distinctes de semi-maturation induisent différents types de T régulateurs.....	80
<b>Figure 16</b> : Les voies de tolérisation des DC .....	82
<b>Figure 17</b> : Cinétique de reconstitution des cellules immunitaires après greffe.....	106
<b>Figure 18</b> : Physiopathologie de la GVHD.....	112

## Table des tableaux

<b>Tableau 1</b> : risques d'incidence de la SEP suivant le degré de parenté des personnes considérées.....	58
<b>Tableau 2</b> : Effectif des patients atteints de cancer hématologiques en France pour l'année 2011. ....	104
<b>Tableau 3</b> : Méthode de score pour la GVHD humaine de Glucksberg.....	108

## Liste des abréviations

aHSC : transfert de cellules souches  
hématopoïétiques allogénique  
APC : cellule présentatrice d'antigène spécialisée

B : lymphocytes B  
BBB : barrière hémato-encéphalique  
BCR : récepteur des cellules B

CCR : récepteur de chimiokines  
cDC : cellule dendritique conventionnelle  
CDP : précurseur commun des cellules  
dendritiques  
CLP : progéniteur commun lymphoïde  
CMP : progéniteur commun myéloïde  
CpG : oligonucléotide de type CpG  
CTL : lymphocytes T cytotoxiques  
CXCL : chimiokine/ ligand du récepteur

DC : cellules dendritiques

EAE : encéphalite auto-immune expérimentale

Flt3L: fms related tyrosine kinase 3 ligand  
Foxp3: Forkhead box p3

G-CSF: facteur de croissance des granulocytes  
GM-CSF : facteur de croissance des granulocyte-  
macrophage  
aGVHD : maladie du greffon contre l'hôte aiguë

HSC : cellules souches hématopoïétiques

IFN : interféron  
IL- : interleukine  
IRF : interferon regulatory factor  
LN : ganglion lymphatique  
LT-HSC : cellules souches hématopoïétiques  
reconstituant à long terme

MDSC : cellules suppressives de type myéloïde

MeIS : microenvironnement immunosuppresseur  
MLR : réaction lymphocytaire mixte  
MOG : glycoprotéine de la myéline issue des  
oligodendrocytes  
MPP : progéniteurs multipotents  
MSC : cellules souches mésenchymateuses

NK : natural killer  
NKT : natural killer à TCR invariant

PBMC : cellules totales nucléées du sang  
pDC : cellule dendritique plasmacytoïde  
PD-L : ligand de mort programmée  
PTX : toxine de pertussis

ROS: espèces réactives de l'oxygène

SCF : stem cell factor  
SEP : sclérose en plaques  
SNC: système nerveux central  
STAT: signal transducer and activator of  
transcription  
ST-HSC : cellules souches hématopoïétiques à  
court terme

T CD4: lymphocytes T CD4+  
T CD8 : lymphocytes T CD8+  
Tbet: T box transcription factor TBX21  
TCR: récepteur des cellules T  
Teff : lymphocytes T CD4+ effecteurs  
TGF : facteur de croissance transformant  
Th- : lymphocyte T CD4 helper  
TLR: toll like receptor  
TNF : facteur de nécrose des tumeurs  
tolDC : cellules dendritiques tolérogènes  
TPO: thrombopoïétine  
TRAIL : facteur d'apoptose de la famille du TNF

WT : phénotype sauvage

## Avant-propos

Du point de vue du système immunitaire, il existe deux types de pathologies : l'incapacité à contrôler un agent pathogène et la suractivation immunitaire. La régulation de l'activation excessive du système immunitaire est donc une voie thérapeutique majeure pour traiter un ensemble de pathologies auto-immunes ou de maladies inflammatoires chroniques. Il s'agira ainsi de rétablir ou de mettre en place la tolérance du système immunitaire vis-à-vis de certains antigènes. En condition physiologique, la tolérance du système immunitaire est assurée par un certain nombre de mécanismes complémentaires : la tolérance centrale (élimination des cellules dangereuses) et la tolérance périphérique (éducation tolérogène du système immunitaire). En conditions inflammatoires pathologiques, ces processus sont dépassés et le retour à l'homéostasie immunitaire est difficile voire impossible sans intervention extérieure. Il est cependant possible d'éteindre une réaction aberrante du système immunitaire par le biais d'anti-inflammatoires ou d'immunosuppresseurs. Malgré leur efficacité prouvée, ces voies thérapeutiques comportent un certain nombre de risques associés. Le premier d'entre eux étant une suppression trop généralisée qui expose le patient aux infections opportunistes ou au cancer par exemple.

Ces dernières années ont vu émerger le concept de médecine personnalisée qui cherche à mettre en place un traitement adapté à chaque pathologie, propre à chaque patient, afin de limiter les effets indésirables. Parmi les axes de recherche, la thérapie cellulaire occupe une place de choix. En effet, elle peut s'auto-entretenir suivant les types cellulaires choisis, être issue directement du patient concerné et être de spécificité antigénique définie. Afin que la thérapie soit sûre, ces cellules doivent disposer de deux caractéristiques essentielles : être phénotypiquement et fonctionnellement stables. Dans la grande majorité des cas, les thérapies cellulaires mises en place utilisent des cellules matures en partie du fait qu'elles sont relativement abondantes et robustes ce qui rend leur purification relativement commode. Par ailleurs, il est souvent considéré que des cellules matures sont associées à un phénotype immuable et une fonction définie. Ces deux propriétés semblent donc faire des cellules matures d'excellentes candidates pour la thérapie cellulaire. Cependant, il s'est avéré depuis que le phénotype et la fonction des cellules, même matures, restent profondément tributaires de l'environnement cellulaire et moléculaire auquel elles sont confrontées. Ainsi des cellules pourtant initialement décrites comme régulatrices pouvaient, après injection, devenir elles-mêmes pathogènes et concourir à la maladie qu'elles étaient sensées limiter.

Récemment, une nouvelle approche de la thérapie cellulaire s'intéresse à conditionner des cellules afin de leur imprimer un phénotype tolérogène robuste. Le principe repose sur le développement d'une « mémoire » épigénétique qui assurerait la stabilité du phénotype régulateur y compris dans des environnements inflammatoires. Ces modifications épigénétiques ont une persistance temporelle variable allant de quelques minutes à plusieurs années et dont certaines formes, comme la méthylation de l'ADN,

sont transmissibles aux cellules filles. Les interactions hôte-pathogènes sont capables d'apporter ce type de modification du programme transcriptionnel chez certaines cellules, en particulier immunitaires. Cela se traduit par l'acquisition de mécanismes spécifiques adaptés pour la défense de l'organisme et peut aboutir au développement de nouvelles fonctions, y compris régulatrices.

Dans ce travail, nous étudions la possibilité de conditionner des précurseurs de cellules dendritiques plasmacytoïdes avec un signal inné, le CpG, afin de les rendre tolérogènes.

Pour tester les capacités et les limites de la tolérance permise par ces cellules, nous avons comparé deux modèles pathologiques inflammatoires distincts. Dans un premier temps, nous avons testé les capacités protectrices des cellules conditionnées dans le cadre de l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle murin de sclérose en plaques. Cette pathologie est limitée à un organe, la moelle épinière chez la souris, et connaît un seul épisode inflammatoire dont les symptômes peuvent s'améliorer spontanément. Ce modèle est essentiellement dépendant des lymphocytes T CD4 et partage un certain nombre de similitudes fonctionnelles avec la pathologie humaine. Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer si ces mêmes cellules conditionnées sont également capables de réguler une pathologie généralisée et cette fois, allogénique. Dans ce but, nous avons choisi le modèle de la maladie du greffon contre l'hôte dont la pathogénèse fait intervenir à la fois les lymphocytes T CD4 et les CD8 et qui se caractérise par un état inflammatoire nettement plus violent que l'EAE.

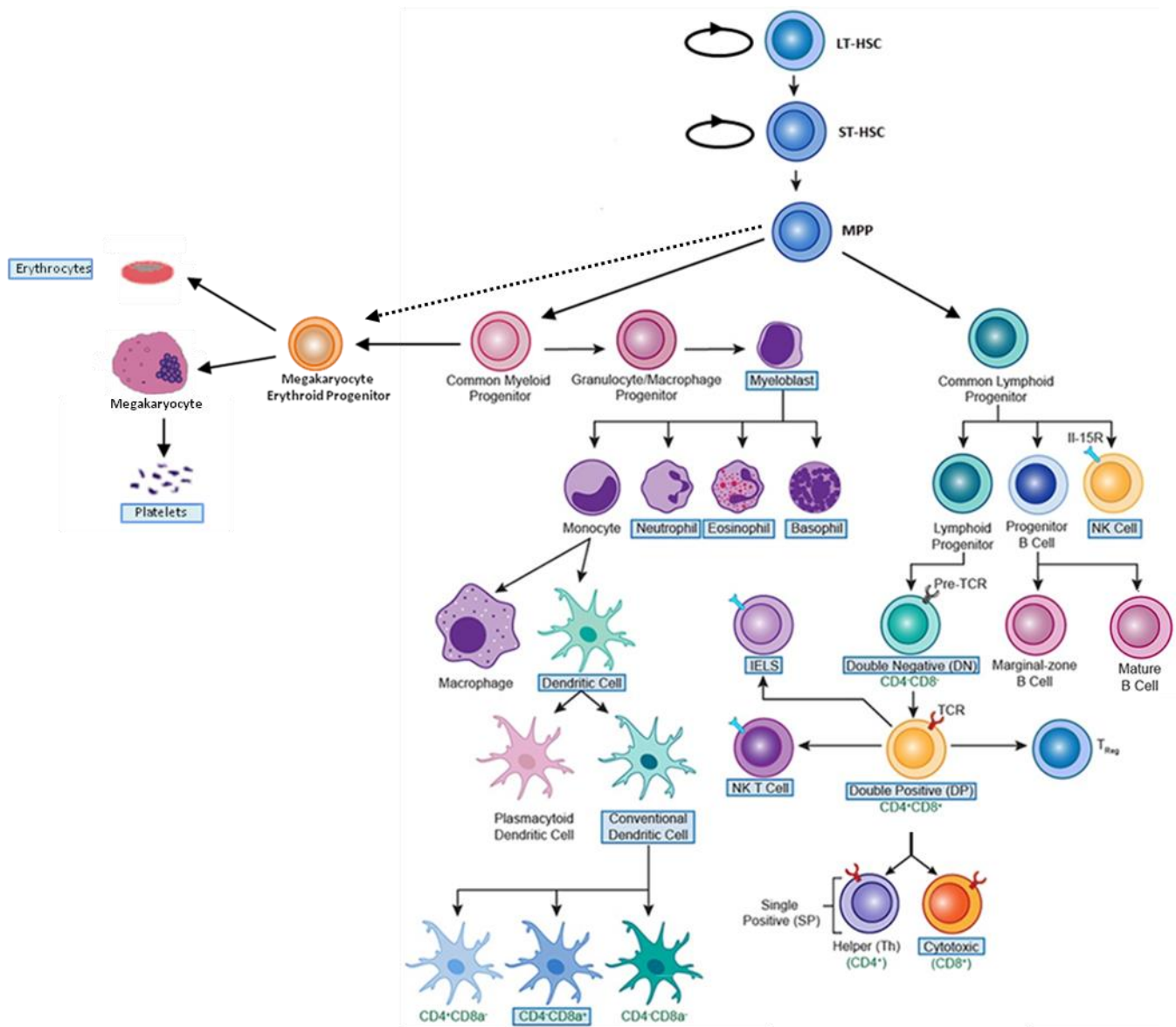
L'étude bibliographique précédant les résultats sera ainsi subdivisée en trois parties : tout d'abord une approche générale de l'hématopoïèse et des ses facultés dynamiques d'adaptation à l'état de l'organisme. Dans un second temps, nous traiterons les deux modèles pathologiques étudiés en envisageant pour chacun à la fois les cellules pathogènes et régulatrices. Nous traiterons également un certain nombre de modèles murins disponibles pour ces pathologies mais également les thérapies disponibles y compris les thérapies cellulaires. Enfin, dans un dernier temps, l'organisation des résultats obtenus dans cette étude sera présentée.

## I/Cellules immatures : de nouvelles possibilités pour traiter les déficiences immunes

### 1) L'hématopoïèse

#### *i) Organisation de l'hématopoïèse*

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes qui permet de maintenir le compartiment sanguin fonctionnel tout au long de la vie. Elle débute dans le sac vitellin (d'E8 à E13 chez la souris ou entre la quatrième et la huitième semaine de grossesse chez l'Homme) où elle génère essentiellement des cellules érythroïdes. Une partie de l'hématopoïèse se déroulera également au niveau d'autres sites tels que le placenta, l'allantoïde ou la région para-aortique. Après le jour E11.5 chez l'embryon de souris (la cinquième semaine pour l'Homme), l'hématopoïèse commence à se dérouler également dans le foie fœtal par vagues de colonisation successives. Là, les premières cellules immunitaires commencent à être produites. Au-delà entre E14 et E16 (entre le 5<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> mois de grossesse pour l'Homme), l'hématopoïèse hépatique commence à ralentir et débute au niveau de la moelle osseuse (et transitoirement au niveau de la rate). Le sang est un tissu dont les cellules se renouvellent très rapidement en raison d'une durée de vie relativement courte pour certaines cellules (environ 120 jours pour une hématie). L'hématopoïèse est donc un processus très actif et permanent qui produit environ un million de cellules par seconde chez un humain adulte en bonne santé. Majoritairement, il s'agit de deux types de cellules : les hématies dont le rôle est de transporter le dioxygène, et les cellules immunitaires qui défendent l'organisme contre les agressions extérieures et intérieures. L'ensemble de l'hématopoïèse est maintenue tout au long de la vie grâce aux cellules souches hématopoïétiques (HSC) qui se trouvent au niveau de la moelle osseuse (Figure 1).



**Figure 1 :** Modèle de l'hématopoïèse chez les mammifères. Les HSC sont des cellules à haut potentiel d'auto-renouvellement et soutiennent l'hématopoïèse toute la vie de l'animal (LT-HSC). Celles-ci se différencient en cellules dont le potentiel à reconstituer un hôte irradié est de moindre durée (ST-HSC). Ces cellules donnent des progéniteurs multipotents (MPP) qui, eux-mêmes se différencient en progéniteurs oligopotents. Parmi ceux-ci, les progéniteurs communs lymphoïdes (CLP) donnent naissance à l'intégralité des cellules de type lymphoïde (LT, LB, NK) et les progéniteurs communs myéloïdes (CMP) donnent naissance à toutes les cellules de la lignée myéloïde (monocytes, macrophages, granulocytes, mégacaryocytes/plaquettes et érythrocytes). Tant les CMP que les CLP peuvent donner des cellules dendritiques (DC) et peuvent se différencier en DC conventionnelles (cDC) et en DC plasmacytoïdes (pDC). (Modifié d'après Moresco, 2012)

### a) Organisation des étapes précoces de l'hématopoïèse

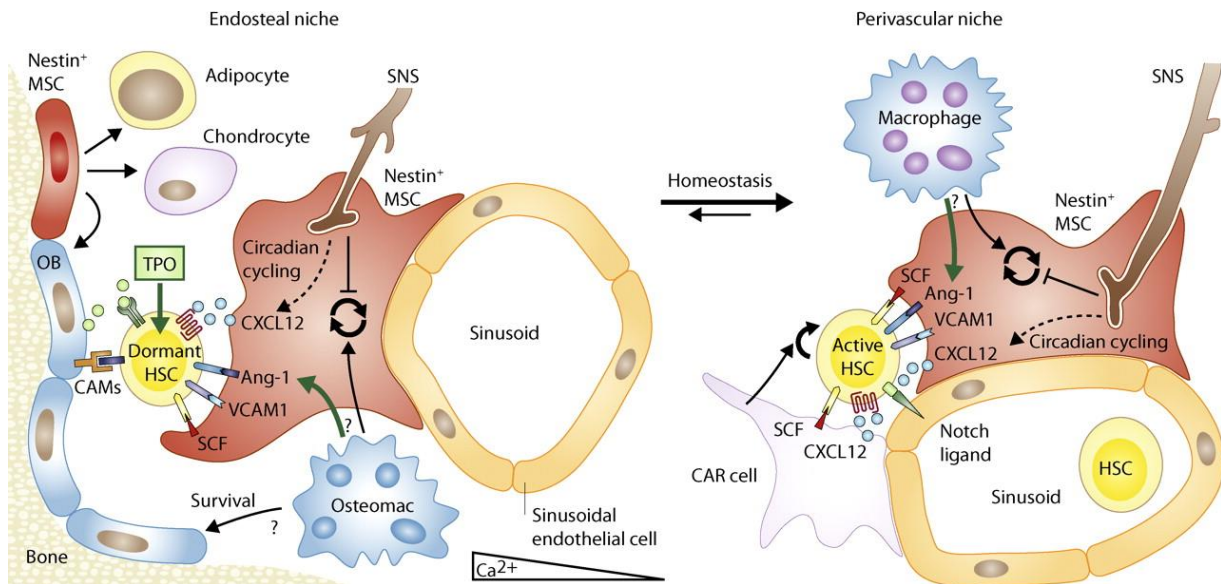
Identifiées phénotypiquement en 1988 par l'équipe d'Irving Weissman grâce à la toute nouvelle technique de fluorescence-activated cell sorting (FACS), les cellules souches hématopoïétiques (Figure 1) sont initialement décrites comme  $\text{Thy1}^{\text{low}}\text{Sca}^+\text{Lin}^-$  et représentent environ 0.05% de la moelle osseuse totale (Spangrude et al., 1988). À l'état basal, 90% à 95% de ces cellules sont quiescentes (G0) et seule une fraction est activée à un temps donné. Ainsi, la transplantation de seulement  $10^5$  cellules de moelle osseuse totale,

soit environ un millième de la quantité normale, est suffisante pour permettre une reconstitution à long terme d'un hôte murin du fait de leur forte capacité de prolifération.

Pourtant dès 1963, Till et al, définissent des colonies spléniques « précoces » et « tardives » impliquant l'idée que certaines cellules, bien que capables de reconstituer l'ensemble la lignée hématopoïétique sont plus avancées dans leur maturation que d'autres. C'est ainsi qu'en 1994, il est mis en évidence que le phénotype  $\text{Thy1}^{\text{low}}\text{Sca}^+\text{Lin}^-$  recoupe en réalité trois populations de progéniteurs distincts phénotypiquement et par leur capacités à reconstituer un hôte irradié : les LT-HSC , ST-HSC et les MPP (Morrison and Weissman, 1994).

Actuellement, la définition phénotypique fine des HSC s'est enrichie de nouveaux marqueurs plus spécifiques : les cellules murines sont désormais définies par  $\text{c-kit}^+\text{sca-1}^+\text{lin}^-\text{Thy1.1}^{\text{low}}\text{CD34}^-\text{Flk-2}^-$  (Adolfsson et al., 2001; Osawa et al., 1996) et l'équivalent humain par  $\text{Lin}^-\text{CD34}^+\text{CD38}^-\text{CD45RA}^-\text{Thy1}^-\text{CD49f}^+$  (Notta et al., 2011). Des marqueurs relativement récents tels que l'expression de CD150 et la répression de CD48 ( famille des SLAM), ont également permis d'affiner davantage la définition des HSC notamment en permettant de différencier les *HSC bona fide* des cellules souches embryonnaires (Kiel et al., 2007).

L'engagement et différenciation des HSC sont régis par des mécanismes complexes. L'utilisation de souris déficientes pour certains facteurs cellulaires ou solubles permet l'émergence du concept de niche hématopoïétique (Figure 2), un milieu cellulaire complexe nécessaire à la définition du devenir des HSC. En 1990, deux éléments centraux de la régulation par la niche hématopoïétique sont caractérisés : la tyrosine kinase c-Kit (Reith et al., 1990) et son ligand, le Stem Cell Factor (SCF) (Zsebo et al., 1990) dont la liaison permet le maintien en quiescence des HSC. Rapidement il a été mis en évidence que le fonctionnement de la niche cellulaire requière la participation de nombreuses cellules telles celles de l'endostéum, l'épithélium ou encore les cellules stromales de la moelle osseuse. Ces cellules produisent des facteurs solubles tels que la thrombopoïétine (TPO), CXCL12, l'IL-3, l'IL-7, Wnt3a, les colony stimulating factor (CSF) ou le ligand de la fms like tyrosine kinase 3 (Flt3-L) mais aussi des facteurs de contact cellulaire tel que les ligands de Notch. La combinaison de ces signaux émis par la niche définit le devenir des HSC à savoir leur engagement en différenciation, leur prolifération et leur survie ou le maintien en quiescence.



**Figure 2 :** La niche hématopoïétique nécessite la participation de nombreuses cellules non hématopoïétiques. La dormance, l'activation et la durée des cycles de vie des HSC sont régulées par l'intégration du signal soluble et non soluble de la niche. En particulier la production de TPO et de SCF sont des signaux forts mais dont l'effet peut varier selon la quantité de facteurs présents dans l'environnement proche de la HSC. Certaines molécules comme le CXCL12, Ang-1 ou VCAM-1 participent à garder les HSC dans leur niche tandis que d'autres comme l'IL-6 ou Flt3L participent à l'engagement des HSC. (D'après Ehninger et Trumpp, 2011.)

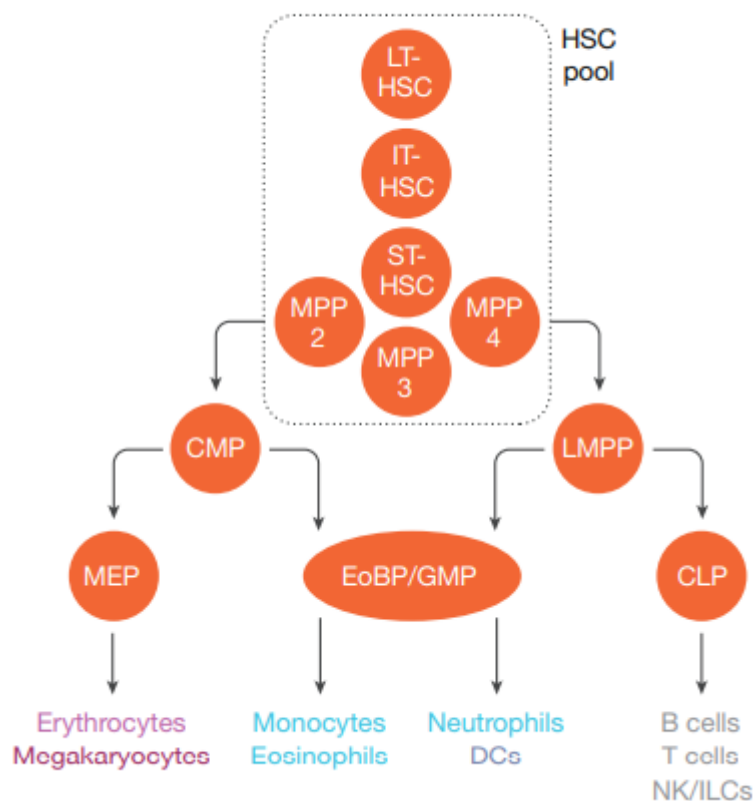
Si les conditions requises pour l'engagement des cellules sont réunies, les HSC vont alors entrer en cycle et donneront naissance aux différents types de cellules souches hématopoïétiques regroupées sous le terme LSK ( $lin^- sca-1^+, c-Kit^+$ ). Celles-ci se divisent en deux catégories : les HSC à long terme (LT-HSC ;  $LSK CD34^{low}/Flk2^- Thy1.1^{low}$ ), capables de maintenir le compartiment hématopoïétique durant toute la durée de la vie, et les HSC à court terme (ST-HSC ;  $LSK CD34^+Flk2^+Flt3L^- Thy1.1^{low}$ ) qui sont toujours multipotentes mais dotées d'une capacité d'auto-renouvellement limitée (Christensen and Weissman, 2001). Les HSC se différencient ensuite en progéniteurs multipotents (MPP ;  $LSK Thy1.1-CD34^+Flt3L^+$ ). Les progéniteurs multipotents ont des capacités d'autorenouvellement très faibles mais peuvent toujours se différencier en chacune des différentes cellules du compartiment hématopoïétique d'un hôte.

Plusieurs modèles s'affrontent quant à savoir comment se subdivisent les sous catégories de MPP, en particulier si leur émergence est séquentielle ou parallèle. Le modèle le plus récent propose que les MPP sont des sous-populations produites en parallèle et dont l'identification repose sur l'expression différentielle de trois marqueurs : CD48, CD150 et Flk2 (Wilson et al., 2008). Ces deux marqueurs définissent ainsi quatre populations: les MPP1 ( $LSK Flk2^-CD150^+CD48^-$ ), MPP2 ( $LSK Flk2^-CD150^+CD48^+$ ), MPP3 ( $LSK Flk2^-CD150^-CD48^+$ ) et MPP4 ( $LSK Flk2^+CD150^-CD48^+$ ).

Ces MPP ont des capacités à donner des cellules myéloïdes et lymphoïdes différentes. Ainsi, seuls les MPP1 gardent un réel potentiel pour produire tous les lignages cellulaires de la famille hématopoïétique. Les MPP2 et MPP3 sont les cellules disposant du biais myéloïde le plus important avec la capacité à donner des granulocytes/macrophages en parallèle des autres cellules myéloïdes en culture et *in vivo*. Les proportions



des différents types cellulaires sont en revanche inégales entre les MPP2 et MPP3, ces derniers produisant des proportions de granulocytes/macrophages très importantes. La capacité à se différencier en précurseur commun aux mégacaryocytes et aux érythrocytes est en revanche beaucoup plus importante chez les MPP2 que chez les MPP3. Bien que les MPP2 et MPP3 soient capables de donner des lymphocytes B et des thymocytes immatures, les MPP4 sont les cellules qui disposent d'un réel potentiel lymphoïde (Pietras et al., 2015). Ces cellules donneront d'ailleurs les progéniteurs lymphoïdes multipotents (LMPP, Figure 3).



**Figure 3 :** Le compartiment des HSC est désormais vu comme profondément hétérogène à la fois en terme de capacité d'auto-renouvellement (axe vertical) et en terme de capacité de différenciation (axe horizontal). Les lignages lymphoïdes et myéloïdes restent associés y compris au cours de leur différenciation, le progéniteur commun lymphoïde (LMPP) étant en effet capable de donner à la fois des granulocytes, des macrophages et des cellules dendritiques. Ces derniers sont ainsi très hétérogènes. (D'après Laurenti et Göttens, 2018)

Cette division des tâches en parallèle plutôt qu'en série propose une nouvelle approche de la reconstitution du compartiment sanguin en condition de stress. En effet, le fait que les populations soient toutes issues des HSC et non plus dépendantes les unes des autres permet d'augmenter spécifiquement un sous-type de MPP afin de satisfaire un besoin précis en un type cellulaire, que ce soit pour répondre à un stress hémolytique ou d'origine immunitaire variée.

Il est important de noter que l'acquisition du potentiel de différenciation vers des cellules de la lignée immunitaire s'accompagne de l'expression de PU.1, un facteur de transcription essentiel en particulier aux cellules dendritiques, et qui persiste, à des niveaux différents chez toutes les cellules immunitaires (Nutt et al., 2005). La perte de ce facteur de transcription abroge la différenciation des cellules hématopoïétiques à l'exception des mégacaryocytes et des érythrocytes plus modestement touchés (Iwasaki et al., 2005).

Les CLP et les CMP sont des précurseurs restreints à un lignage, respectivement lymphoïde (lymphocytes T, B et natural killer) et myéloïde (monocytes/macrophages et granulocytes). On présente souvent le CLP comme un précurseur lymphoïde sans biais de développement, cependant, cela n'est vrai qu'*in vitro*. *In vivo*, l'injection de CLP à une souris donne préférentiellement des lymphocytes B (Borghesi et al., 2004). Par ailleurs, il n'est pas possible de retrouver des cellules ayant un phénotype de surface qui correspond au CLP au niveau du thymus (Allman et al., 2003). Il a ainsi été démontré en 2015 que le potentiel T est porté par une population de MPP3 qui surexprime le CCR9, ce qui induit leur sortie de la moelle osseuse vers le sang par réponse à la chimiokine CCL25 produite par le thymus (Zepponi et al., 2015). En chemin, les cellules changent de phénotype et adoptent les marqueurs Lin<sup>-</sup>Thy1.2<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Ce phénotype correspond à celui des pre-T qui pourront entrer au thymus et donner des lymphocytes T (Gautreau et al., 2007).

À l'exception des MPP3 CCR9<sup>hi</sup>, les CLP et les CMP résident dans la moelle osseuse. Il est possible de définir les CLP par le phénotype Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup> IL-7Rα<sup>+</sup> toutefois d'un point de vue moléculaire, la population est très hétérogène. Elle peut être subdivisée davantage en fonction de la protéine λ5, dont l'expression est restreinte aux CLP qui donneront exclusivement des B. Par ailleurs l'expression différentielle des niveaux de Rag1 détermine le potentiel à produire des NK, la population Rag<sup>lo</sup> en étant beaucoup plus capable que la population Rag<sup>hi</sup>, bien que toutes deux retiennent un bon potentiel pour la production de T et B (Mansson et al., 2010). Si la subdivision du CLP est assez récente, l'hétérogénéité du CMP est en revanche connue depuis assez longtemps. Ainsi, il se subdivise en deux populations distinctes en fonction de leur expression de Flt3 : la population positive étant celle capable de donner les granulocytes et les macrophages, dénommée assez sobrement le précurseur des granulocytes-macrophages (GMP) et la population Flt3<sup>-</sup>, le précurseur qui donnera les mégacaryocytes et les érythrocytes (MegE precursor) (Adolfsson et al., 2001).

À l'heure actuelle, plusieurs modèles de différenciation pour les étapes précoces des précurseurs hématopoïétiques coexistent. Les récents travaux proposant des approches globales, plus objectives (comme la transcriptomique), rendent compte d'une complexité de l'hématopoïèse très importante. En particulier des populations présentées comme homogènes par les modèles, comme les LMPP, présentent en réalité une grande diversité de potentiels de différenciation. Il est donc probable que la différenciation hématopoïétique soit en réalité un mélange de plusieurs modèles actuels. Les récents travaux par RNAseq et de modélisation mathématique tendent néanmoins à montrer que les transitions entre les différents stades cellulaires ne sont pas pleinement discrètes mais partiellement continues ce qui peut poser la question de la pertinence des modèles actuels (Macaulay et al., 2016; Zheng et al., 2018).

## **b) Emergence des différentes cellules dendritiques**

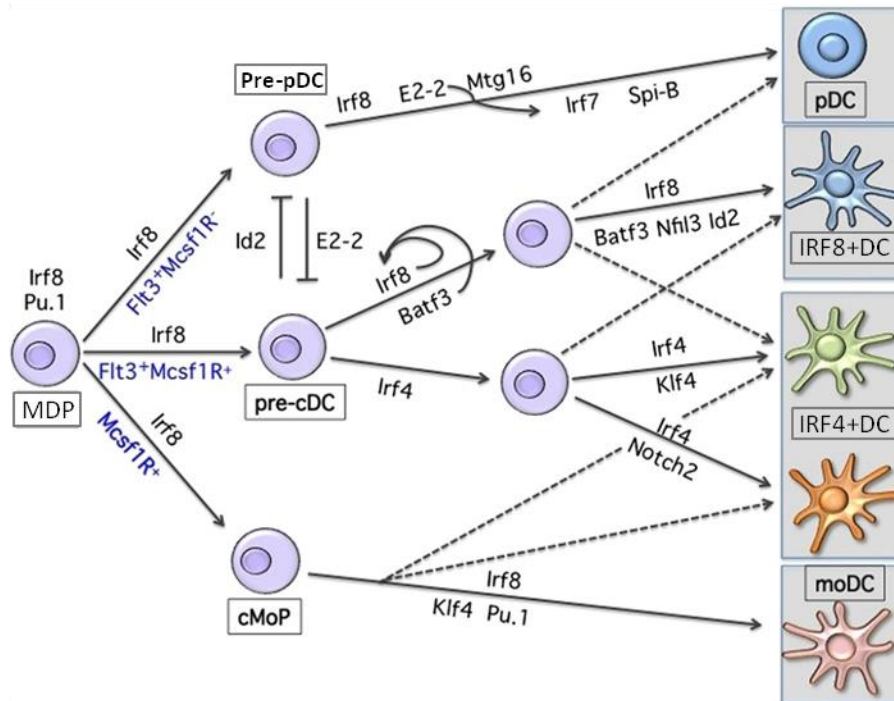
Les cellules dendritiques (DC) sont les cellules présentatrices d'antigène (APC) principales, dites spécialisées. Caractérisées en 1973 par Steinman et Cohn, les cellules dendritiques sont un type cellulaire dont l'existence sera mise en doute pendant plusieurs années, mais sont aujourd'hui reconnues pour leur rôle central dans l'immunité de par leur fonction de pivot entre l'immunité innée et acquise (Steinman and Cohn, 1973). Elles permettent le transport d'antigènes depuis la périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont induire l'activation des cellules du système immunitaire adaptatif. Les DC sont composées de plusieurs sous-classes de cellules qui peuvent être caractérisées par leurs marqueurs de surface, la combinaison de facteurs de transcription contrôlant leur développement mais également par leurs capacités fonctionnelles. Il existe deux grandes sous-classes de DC : les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC).

Du fait de leur durée de vie relativement courte (environ 14 jours, à l'exception des cellules de Langerhans), les DC sont continuellement remplacées grâce à un précurseur circulant. Ce renouvellement est permanent, y compris à l'état basal et est accéléré en condition inflammatoire (Kamath et al., 2002; Geissman et al., 2010). Un précurseur, appelé le précurseur commun des cellules dendritiques (CDP) est caractérisé en 2002 par l'équipe de Carlos Ardavin par le phénotype  $CD11c^+ CMH-II^+ B220^+ CD19^- CD43^+ CD11b^+ Gr-1^- F4/80^-$ . Dépourvues de la capacité de produire des cellules lymphoïdes ou myéloïdes autres que les DC, ces cellules circulent dans le sang (jusqu'à 5% des PBMC) et sont capables de donner à la fois des cellules cDC mais également des pDC en périphérie (Hoyo et al., 2002). Quelques années plus tard, un précurseur en amont du CDP est décrit comme  $Lin^- CD11c^- CX3CR1^+ CD11b^- CD115^+ cKit^+ CD135^+$  et est capable de donner à la fois des macrophages et des DC, d'où son nom de précurseur commun aux macrophages et cellules dendritiques (MDP) (Fogg et al., 2006). Il est démontré que ce MDP est dérivé du CMP et qu'il peut donner le CDP (Liu et al., 2007) et le cMOP, le précurseur des monocytes (Hettinger et al., 2013) (Figure 4). Bien que ce modèle soit assez largement accepté, il est de plus en plus remis en question, du fait d'un manque de preuves concrètes de son développement et de sa régulation. Une étude de culture en dilution limite par l'équipe de Shortman a ainsi mis en évidence que le MDP est en réalité un mélange de précurseurs de monocytes/macrophages majoritaires d'une part et de DC (cDC et pDC) beaucoup plus rares d'autre part (Sathe et al., 2014). Seules des cellules plus immatures, également capables de se différencier en granulocytes, semblent présenter la double potentialité de différenciation macrophage/DC. Il n'est donc pas impossible que les macrophages et les DC (non issues des monocytes) soient deux types cellulaires séparés assez tôt dans leur développement et ne partageant donc pas un précurseur commun exclusif. Il a ainsi été démontré que les « DC » obtenues par la culture de moelle osseuse avec du GM-CSF (BMDC) sont en réalité un mélange des macrophages et de DC (Helft et al., 2015). Cette étude remet en question de

nombreux résultats obtenus jusqu'ici avec des cellules obtenues de cette façon, en particulier les stratégies vaccinales anticancéreuses. Par ailleurs, les modalités de la divergence entre les cDC et les pDC sont encore assez mal comprises aujourd'hui. Cette difficulté est en partie liée au fait que les pDC semblent avoir des origines diverses et présentent un ensemble de gènes qui les rapproche davantage du lignage lymphoïde, comme le réarrangement DJ des chaînes lourdes des immunoglobulines (Shortman et al., 2013a).

Il est connu depuis assez longtemps que les cellules dendritiques peuvent émerger à la fois du CLP et du CMP (Martín et al., 2000; Traver et al., 2000), ce qui est également en contradiction avec la proposition d'un précurseur unique. Si l'origine myéloïde des DC est plutôt bien comprise, l'origine des DC issues du CLP est plus obscure. Il a en revanche été démontré *in vitro* que l'ajout d'agonistes du TLR9 ou du TLR4 à une culture de CLP est capable d'induire la différenciation de DC (Nagai et al., 2006; Welner et al., 2008). L'injection de CLP CD45.1 à des souris CD45.2 suivie par l'injection s.c de Flt3L induit l'expansion à la fois du CLP mais également d'une population de DC issues du CLP (Karsunky et al., 2003) (Figure 4). La contribution du CLP à la génération de DC en condition homéostatique n'est que très peu documentée. Il est cependant intéressant de se demander, à condition que ces DC issues du CLP en conditions inflammatoires existent *in vivo*, si elles ne sont pas une sous-classe de DC à part entière.

Plusieurs cytokines majeures régulent l'homéostasie des DC dont le GM-CSF, impliqué dans la maturation et l'expansion des DC. En effet, il a été démontré que le GM-CSF est capable *in vitro* et *in vivo* d'augmenter le nombre de DC dans les organes à la fois lymphoïdes et non lymphoïdes (Inaba et al., 1992; Vremec et al., 1997). Lors de la caractérisation du MDP, il a été montré que le GM-CSF est capable d'induire l'engagement de ce précurseur dans la production de DC, plaçant le GM-CSF comme une cytokine essentielle dès les étapes très précoces du développement des cellules dendritiques (Fogg et al., 2006). Par ailleurs, à la fois le CMP et le CLP sont sensibles au Flt3L dont le signal induit une relative expansion des précurseurs mais surtout leur engagement dans la voie des DC via le signal mTOR (mammalian Target of Rapamycine). Le Flt3L ne joue pas de rôle dans le maintien ou la différenciation du MDP (Waskow et al., 2008). Le CDP est à la fois positif pour Flt3 (CD135) et le M-CSFR (CD115), ce qui jouera un rôle dans sa différenciation à venir mais pas pour son maintien. *In vitro*, le contrôle de l'engagement du CDP dans la différenciation est opérée par l'IL-4, le TNF $\alpha$  et le GM-CSF (Zhang et al., 2004). Si le GM-CSF et le Flt3L contrôlent l'engagement des précurseurs dans la voie DC, leur survie et leur expansion dépendent d'avantage de l'IL-3. En effet, seule ou en combinaison avec d'autres cytokines telles que le GM-CSF, le Flt3L ou encore l'IL-7, l'IL-3 est capable d'augmenter de manière très importante la production de DC issues de différents précurseurs *in vitro* avant même qu'ils n'acquière la capacité à répondre au GM-CSF (Lutz, 2004). Si de nombreux travaux démontrent le rôle essentiel de l'IL-3 dans la survie des DC et de leurs précurseurs *in vitro*, à l'heure actuelle peu se sont penchés sur son rôle *in vivo* qui reste à confirmer.



**Figure 4 :** Différenciation des cellules dendritiques à partir du précurseur commun. Le MDP se différencie en pre-cDC, pre-pDC et cMoP. Le développement des différentes DC repose sur l'acquisition progressive de l'expression de différents facteurs de transcription. Certains, comme Id2 et E2.2 sont mutuellement exclusifs et dessinent très tôt l'orientation des différentes sous classes de DC. Certains sous-types conservent un relatif potentiel pour donner les autres types de DC (pointillés) mais ces modalités sont encore mal comprises. (Modifié d'après Tussiwand et Gautier, 2015)

Les DC ont été catégorisées en deux sous-groupes DC1 et DC2 suivant qu'elles étaient respectivement capables d'induire la polarisation de Th1 ou Th2 à partir de T naïfs. Bien que toujours utilisée afin de définir les DC fonctionnellement, cette classification est assez peu pertinente du point de vue de leur développement. En effet, chacune des sous catégories de DC est capable de donner à la fois des DC1 et des DC2 ce qui fait de ces caractéristiques davantage une spécialisation terminale des DC suivant le contexte que de réelles sous-classes de DC.

### c-i Les cellules dendritiques conventionnelles (cDC)

Les cellules dendritiques conventionnelles sont caractérisées par leur forte expression de l'intégrine CD11c, du CMH-II et CD45. Il existe un précurseur commun aux cellules dendritiques conventionnelles qui n'est plus capable de donner des pDC *in vivo*. Cette population a été décrite pour la première fois dans la rate comme  $CD11c^{int}CD45RA^{lo}CD43^{int}SIRP-\alpha^{int}CD135^{+}CMH-II^{-}$ , elle est nommée pre-cDC (Naik et al., 2006). Ce précurseur sera plus tard également décrit dans la moelle osseuse puis dans différents organes périphériques (Liu et al., 2009). Le pre-cDC est un précurseur qui se différencie des autres progéniteurs de DC par son expression du facteur de transcription Zbtb46, autrement appelé BTBD4 (Satpathy et al., 2012). Le maintien des DC dans les organes non-lymhoïdes est tributaire de deux mécanismes complémentaires : l'apport continu de pre-cDC depuis le sang mais également l'expansion de ces mêmes précurseurs *in situ*. Des expériences de parabiose ont ainsi pu montrer qu'au bout de 30 jours, le taux de renouvellement des cDC à partir du sang atteint un plateau ne dépassant pas 22%. L'irradiation préalable d'un des deux

parabiontes permet de passer à 100%, ce qui tend à démontrer que des précurseurs issus du sang circulent et sont capables de coloniser les organes lymphoïdes et non lymphoïdes mais qu'à l'état basal ce remplacement est concurrencé par l'expansion de précurseurs de cDC *in situ* (Diao et al., 2006; Liu et al., 2007). L'expansion des DC *in vivo* est contrôlée positivement, au moins en partie, par la lymphotoxine  $\beta$ . Sa suppression *in vivo* conduit à une perte relative de la fraction CD8<sup>-</sup> dans les tissus, ce qui corrèle avec une capacité d'autorenouvellement plus faible des précurseurs infiltrants (Kabashima et al., 2005). Le mécanisme sous-tendant cette régulation n'est toujours pas élucidé, mais les DC portant elles-mêmes le récepteur à la LT $\beta$ , il est possible que l'effet soit direct. Inversement, l'homéostasie de pre-DC, et donc par extension des DC, est également régulée négativement par les Tregs. L'équipe de Rudensky démontre que la perte des Tregs induit une expansion massive des DC (Kim et al., 2007). En 2009, le mécanisme sera en partie éclairci par la démonstration que, si le nombre de pre-cDC ne change pas dans la moelle osseuse après déplétion des Tregs, leur nombre dans la rate et les LN est augmenté respectivement de 2 et 12 fois (Liu et al., 2009). Quelques années plus tard, il est montré que l'IL-2 semble être également un régulateur négatif des DC, en ce que la perte de l'IL-2 entraîne des effets similaires à la suppression des Tregs (Isakson et al., 2012). Plus récemment, Holly Bolton et son équipe récapitulent ces résultats et démontrent que l'expansion des DC en absence d'IL-2 et de Tregs n'est pas un effet direct de ces populations mais est secondaire, associée à l'activation et la prolifération des Th (Bolton et al., 2015).

Si d'un point de vue de leurs facteurs de transcription toutes les DC conventionnelles sont positives à la fois pour Id2 et PU.1 dès le stade pre-DC (Spits et al., 2000), elles peuvent être davantage subdivisées. Deux classes de DC ont été identifiées à ce jour : les cellules IRF8<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> (qui comprennent les cellules CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup>) et les cellules IRF4<sup>+</sup> Sirp $\alpha$ <sup>+</sup>. Ces deux types cellulaires sont mutuellement exclusifs et la divergence entre ces deux sous-populations est assez précoce.

#### Les cellules dendritiques conventionnelles IRF4<sup>+</sup>

Les cellules dendritiques conventionnelles IRF4<sup>+</sup>, souvent appelées DC myéloïdes (mDC) sont situées dans de très nombreux organes où elles expriment certains marqueurs complémentaires qui reflètent leur provenance (par exemple, les cellules de Langerhans, issues de la peau, coexpriment CD1a et la Langerine (CD207)). L'expression de CD4 permet de distinguer les cellules résidant dans les organes lymphoïdes ou non : les cellules CD4<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> demeurent au niveau de la rate et des ganglions et les cellules CD4<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> se situent en périphérie.

Après la rencontre avec des antigènes et la liaison de différents récepteurs, parmi lesquels le TLR2 ou le TLR4, les mDC migrent dans les organes lymphoïdes secondaires par le biais de CCR7, au niveau de la zone marginale et des zones T. Une fois arrivées aux organes lymphoïdes secondaires, elles sont capables d'activer les lymphocytes T d'une façon dépendante de l'antigène considéré.

À des fins de simplification, l'émergence, la fonction et les capacités migratoires de chacune des sous-classes de mDC, propres à chaque organe dont elles sont issues, ne seront pas ici discutées.

En 2000, il est démontré que l'absence de GM-CSF se traduit par une diminution drastique des DC infiltrantes des organes non lymphoïdes mais seulement une diminution modérée du nombre de DC dans les ganglions. Il est alors démontré que les deux types de DC ont des prérequis cytokiniques différents : le GM-CSF est nécessaire essentiellement aux mDC mais moins aux autres classes de DC (Daro et al., 2000). À l'état basal, le GM-CSF circule à de faibles concentrations et permet une production continue de DC. Toutefois en conditions inflammatoires, la concentration de GM-CSF peut se retrouver très augmentée ce qui a pour effet de réorienter la production de DC vers des cellules de type infiltrantes plutôt que résidentes mais également d'induire la différenciation de DC issues des monocytes, induisant la production d'IL-17 (Ko et al., 2014). De façon intéressante, il a été démontré que le M-CSF peut également induire l'émergence de DC CD11b+ (Misawa et al., 2004). Si les DC CD11b sont absolument dépendantes du GM-CSF, elles nécessitent la présence de Flt3L pour leur phase de différenciation à partir du pre-cDC (Harada et al., 2007).

Au cours de leur développement à partir du pre-cDC, les DC CD11b+ acquièrent l'interferon regulatory factor (IRF) 2 et l'IRF4 (Ichikawa et al., 2004; Suzuki et al., 2004). Le rôle de ces deux facteurs de transcription n'est pas complètement clair, mais ils pourraient conférer aux DC CD11b+ une relative résistance à l'arrêt de leur maturation dans des tissus où la concentration d'interféron de type I serait élevée, en stabilisant le signal NF- $\kappa$ B. Par ailleurs les DC CD11b+ expriment également le facteur de transcription RelB. Celui-ci est exprimé très tôt dans le développement des DC CD11b+, et pourrait permettre l'activation de la voie IRF4 qui est une de ses cibles potentielles. Récemment, des travaux utilisant des souris déficientes dans ce facteur de transcription, ont pu mettre en évidence que la perte de ce facteur n'empêche pas cette population d'émerger. Cependant, bien que présentes, ces cellules présentent des défauts fonctionnels, démontrant qu'IRF4 n'est pas indispensable à leur développement mais à leur fonction (Bajaña et al., 2012).

Depuis quelques années, les mDC IRF4+ ont été subdivisées en deux catégories fonctionnelles : les cellules dépendantes de Notch2 et celles dépendantes de Klf4 (Satpathy et al., 2013; Tussiwand et al., 2015). Ces deux populations partagent la plus grande partie de leur développement. La dépendance envers Notch2 ou Klf4 est révélatrice de l'acquisition d'une maturation fonctionnelle des cellules. Les cellules Notch2 sont une source importante et non redondante d'IL-23, une cytokine essentielle pour la défense contre des champignons et des bactéries extracellulaires, en induisant la production d'IL-22 et d'IL-17 (Satpathy et al., 2013). De leur côté, les DC dépendantes de Klf4 sont spécialisées dans l'induction spécifique de réponses de type Th2 in situ afin de protéger l'organisme des parasites et des allergènes au niveau de la peau (Tussiwand et al., 2015). L'étude d'animaux *klf4*<sup>-/-</sup> met en évidence la diminution d'une population CD11b<sup>+</sup> au niveau de la rate des animaux (Park et al., 2012). Dans la mesure où les niveaux de CD11b entre la population périphérique et splénique sont différents, il serait essentiel de détailler le fonctionnement de ces cellules.

En particulier, savoir si ces cellules spléniques sont issues de la migration de cellules provenant d'autres tissus ou si elles représentent une sous-population à part. L'hypothèse de la migration semble soutenue par l'étude de Tussiwand qui démontre que les cellules issues de la peau ont un profil de gènes qui ressemble davantage aux cellules migratoires qu'aux cellules résidentes. Dans le cas où ces cellules seraient effectivement issues de la migration de cellules venues de la périphérie, il serait intéressant de vérifier si elles sont également responsables de la mise en place et/ou de l'entretien d'une immunité de type Th2 au niveau central.

### Les cellules dendritiques conventionnelles IRF8<sup>+</sup>

Les cellules dendritiques IRF8<sup>+</sup>, anciennement appelées « cellules dendritiques lymphoïdes », regroupent les CD8<sup>+</sup>DC, majoritaires, et les CD103<sup>+</sup>DC, qui sont une classe assez rare de DC trouvées en périphérie. Si les cellules IRF8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> sont douées de bonnes capacités migratoires, les cellules IRF8<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> sont résidentes des organes lymphoïdes secondaires. Ces dernières produisent de grandes quantités d'IL-12 et orientent la réponse immunitaire vers Th1. Par ailleurs, leur capacité de cross-présentation des antigènes aux T CD8 et CD4 font d'elles des cellules spécialisées dans la réponse aux pathogènes intracellulaires et aux cellules cancéreuses.

À l'état basal, ces DC existent dans les organes lymphoïdes secondaires à l'état dit immature en ce qu'elles ont des niveaux détectables mais très faibles de la molécule de co-stimulation CD86 mais également un niveau faible de CMH-II (Wilson et al., 2003). Leur différenciation vers un phénotype mature a lieu après leur rencontre avec un antigène du non-soi et comprend l'expression plus importante de CD80, CD86 et CD40 (Vremec and Shortman, 1997). Le développement des CD8<sup>+</sup>DC requiert absolument la présence de Flt3L mais la présence de GM-CSF et M-CSF est dispensable à leur émergence. Toutefois, le GM-CSF et l'activation TLR sont nécessaires pour leur activité, en particulier la présentation croisée (de Brito et al., 2011). La perte du Flt3L chez les souris se traduit par une quantité extrêmement faible de cellules CD8<sup>+</sup>DC (Maraskovsky et al., 1996). À contrario, l'injection de Flt3L à une souris WT augmente entre 20 et 50 fois leur nombre au niveau des organes lymphoïdes secondaires de l'animal au point que les CD8<sup>+</sup>DC deviennent la population de DC majoritaire dans la rate (McKenna et al., 2000). À l'état basal et en condition inflammatoire, le Flt3L nécessaire au maintien de l'homéostasie des DC est produit à la fois par les T activés et les cellules non hématopoïétiques (Saito et al., 2013)

La dichotomie entre les DC IRF4<sup>+</sup> et IRF8<sup>+</sup> est établie assez tôt dans leur développement. En effet, les DC IRF8<sup>+</sup> sont dépendantes de Batf3, un facteur de transcription exprimé par le précurseur des cDC avant même IRF4 ou IRF8 (Aliberti et al., 2003). Sa suppression entraîne la perte spécifique des différentes sous classes de DC IRF8<sup>+</sup>, ce qui démontre sa nécessité pour l'émergence de ce sous-type cellulaire (Hildner et al., 2008). Seules les CD8<sup>+</sup> avec des marqueurs de CD11b<sup>+</sup>, possiblement issues de la conversion de mDC en



CD8+DC sont encore observables (Chandra et al., 2017). De façon très intéressante, bien que présentes, ces cellules n'ont plus la capacité à phagocyter des cellules apoptotiques. Il a été démontré que l'expression de Batf3 déclenche l'expression d'IRF8 et permet son auto-activation qui entretient activement la différenciation du CDP vers le phénotype des DC IRF8+. La perte d'IRF8 ou de Batf3 chez ces cellules se traduit par un échec de la maturation et la bifurcation vers d'autres phénotypes cellulaires (Grajales-Reyes et al., 2015). Toutefois, dans certaines conditions (infection bactérienne ou irradiation), des mécanismes de compensation de Batf3 par Batf1 et Batf2 ont été observés (Seillet et al., 2013; Tussiwand et al., 2012). Il est possible que ce type de mécanismes compensatoires soit des voies alternes assurant l'expansion rapide et assez spécifique des CD8+DC en conditions inflammatoires. Le développement des CD8+DC requiert également d'autres facteurs de transcription comme Nfil3, qui est probablement en amont de Batf3 dans le développement des DC (Kashiwada et al., 2011). Il est probable que Nfil3 soit également capable de réguler Id2, un autre facteur de transcription essentiel des CD8+DC, mais les mécanismes de cette régulation sont encore mal compris.

### **c-ii Les cellules dendritiques plasmacytoïdes**

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont une classe de cellules dendritiques spécialisées dans la réponse antivirale et contre les bactéries intracellulaires. Elles sont le plus souvent caractérisées par le phénotype de surface CD11c<sup>lo</sup> PDCA-1<sup>+</sup> B220<sup>int</sup> chez la souris (et CD45RA<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>BDCA-2<sup>+</sup> chez l'Homme). Il est à noter que les pDC ne possèdent aucun marqueur de surface qui leur soit propre, et seule une combinaison de plusieurs marqueurs permet de les caractériser. Si d'autres marqueurs de surface peuvent être ajoutés suivant les différents tissus dont elles proviennent comme Ly6c, Ly49Q, CD4 ou encore CD8, il a été démontré que ceux-ci sont davantage des marqueurs d'activation que révélateurs de sous-classes distinctes de pDC (O'Keeffe et al., 2002; Omatsu et al., 2005; Vremec et al., 2007). Contrairement aux autres DC, les pDC sont une population relativement homogène phénotypiquement. L'explication avancée pour cela est que le programme développemental des pDC est suffisamment puissant pour passer outre les différences qui pourraient résulter d'origines lymphoïde ou myéloïde différentes, ce qui se traduit par une convergence apparente de leur phénotype et de leur fonction (Shortman et al., 2013b).

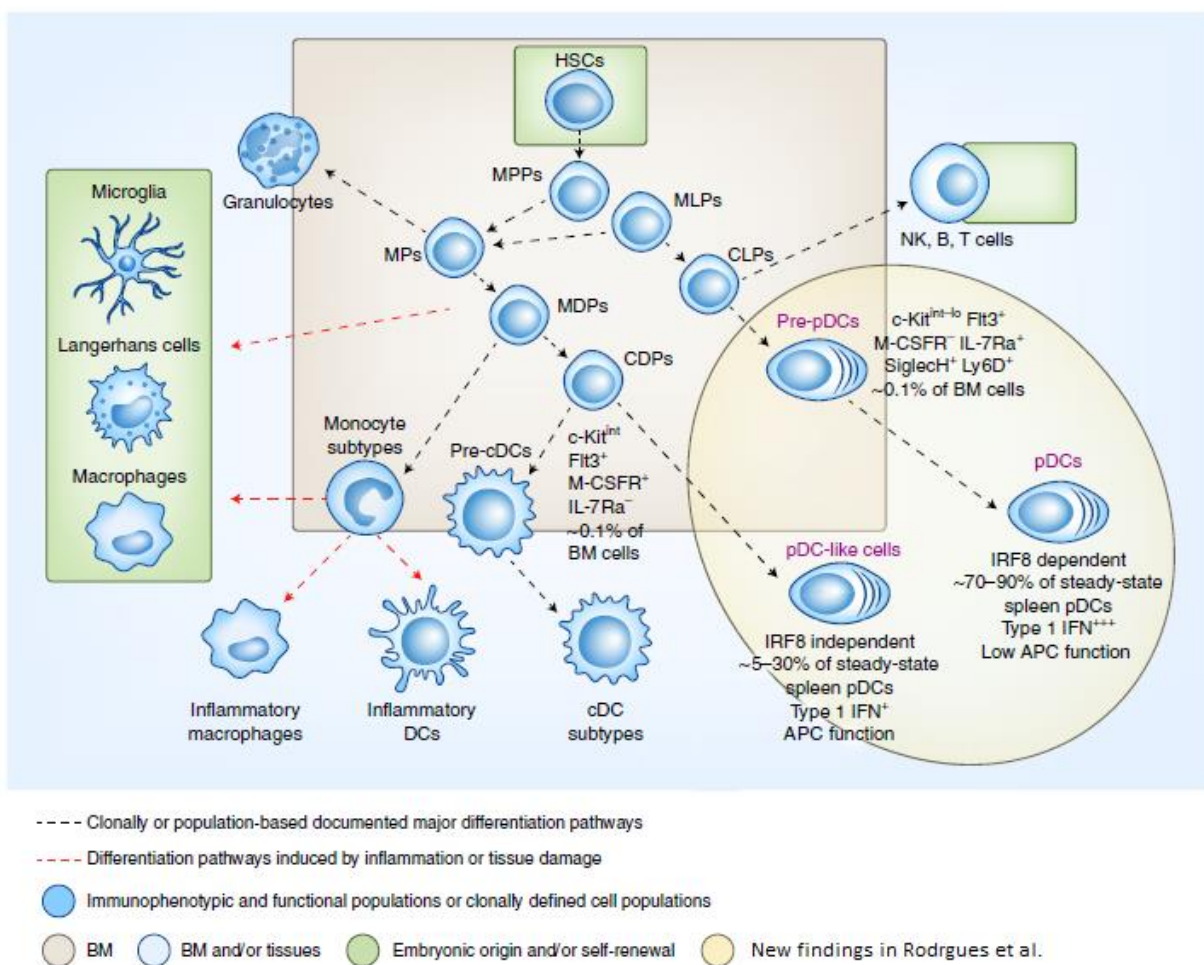
La fonction caractéristique des pDC est leur forte production d'interféron (IFN) de type I et de type III en réponse à l'information génétique virale ou bactérienne via les TLR intracellulaires 3, 7 et 9 (Kelly et al., 2016). Contrairement aux cDC, les pDC présentent peu de dendrites à leur surface et ont une capacité d'endocytose des éléments en suspension faible par comparaison avec les cDC. En revanche les pDC sont particulièrement efficaces pour la prise en charge d'antigènes à partir de cellules encore vivantes exposées à des virus (Lui et al., 2009). À l'état basal, les pDC patrouillent dans le sang et les tissus périphériques. Après activation, elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires au niveau de la zone T. Du fait de leur capacité médiocre à activer les CD4 par comparaison avec les cDC et leur niveau de CMH-II et de molécules

de co-stimulation faible, les pDC ont été initialement caractérisées comme des précurseurs de DC avant d'être définitivement catégorisées comme des cellules matures en 1999 (Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999).

De la même manière que les cDC, les pDC peuvent émerger à la fois du CLP et du CDP chez un animal irradié (Manz et al., 2001). Des caractéristiques lymphoïdes peuvent être retrouvées chez certaines pDC à l'état basal dans la rate par l'expression de Rag1 et la présence des réarrangements DJ sur la chaîne lourde des immunoglobulines. Toutefois ces caractéristiques peuvent être retrouvées chez des pDC d'origine lymphoïde et myéloïde (Pelayo et al., 2005). En 2013, il est démontré qu'à l'état basal, dans la moelle osseuse, les pDC dites lymphoïdes émergent d'un précurseur commun pDC/B caractérisé par  $\text{Lin}^- \text{BST-2}^+ \text{CD11c}^-$ , capable de donner les deux types de cellules *in vivo* (Sathe et al., 2013). Il a par ailleurs été récemment décrit que les pDC présentent au moins deux précurseurs *in vivo* pouvant donner les cellules dérivées du CDP (minoritaire ;  $\text{CD115}^+ \text{CD127}^-$ ) d'une part et dérivées du CLP (majoritaire ;  $\text{CD115}^- \text{CD127}^+ \text{Ly6D}^+ \text{Siglec-H}^+$ ) d'autre part. Ces deux types cellulaires se différencient du point de vue fonctionnel, en particulier au niveau de leur capacité à présenter les antigènes et à produire de l' $\text{IFN}\alpha$ . En effet, les pDC dérivées du CDP sont de meilleures APC mais produisent nettement moins d' $\text{IFN}$  de type I que leur équivalent dérivé du CLP (Rodrigues et al., 2018, Figure 5). Le même groupe a également constaté que, si, à l'état basal, il semble que la plus grande partie des pDC soient issues du CLP (5 à 10 fois plus que le CDP), les pDC issues du CDP et des monocytes représentent une fraction conséquente des pDC en condition inflammatoire et au cours de la reconstitution. Enfin, les pDC semblent présenter des localisations préférentielles suivant le précurseur dont elles sont issues, les pDC issues du CDP colonisant préférentiellement la rate et les pDC issues du CLP présentent une distribution plus large.

De la même manière que pour les  $\text{CD8}^+ \text{DC}$ , la grande majorité des pDC sont strictement dépendantes du Flt3L pour leur développement. La suppression de ce facteur entraîne une perte conséquente mais pas totale du nombre de pDC présentes chez les animaux qui peut être résolue par l'injection de Flt3L (Brawand et al., 2002). Les rares pDC indépendantes du Flt3L ont été caractérisées par l'équipe de Fancke en 2008 et sont en revanche dépendantes du M-CSF (Fancke et al., 2008). Le même groupe met en évidence que la différenciation de pDC *in vitro* est capable d'induire certains marqueurs sur les pDC traditionnellement attribués aux cDC, comme le CD11b. Il serait intéressant de comparer fonctionnellement ces cellules plus « myéloïdes » aux pDC dépendantes de Flt3L. Leurs différentes conditions d'émergence faisant écho à des conditions inflammatoires différentes, il n'est pas impossible que ces deux types de pDC soient capables de mettre en place deux types de réponses immunitaires différentes. De leur côté, le GM-CSF et le  $\text{TNF}\alpha$  régulent négativement la différenciation des cellules dendritiques plasmacytoïdes. Toutefois, le GM-CSF promeut l'accumulation de leur précurseur direct (Ghirelli et al., 2010; Gilliet et al., 2002). Il a été démontré que les pDC sont des cellules qui entrent en apoptose rapidement en culture, à moins d'être en présence

d'IL-3. Leur survie est alors considérablement prolongée grâce à la forte expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-3 à leur surface (Grouard et al., 1997). L'IL-3 n'a pas de rôle dans la différenciation des pDC mais exclusivement dans leur survie. La maturation des pDC est en revanche assurée par la présence de CD40L qui peut également permettre leur conversion en cDC. In vivo, il a été démontré que les pDC sont capables de se convertir à la fois en cDC CD11b+ mais également en CD8+ CX3CR1+ après un signal d'origine virale, la seconde voie étant la plus fréquente (Bar-On et al., 2010; Liou et al., 2008).



**Figure 5 :** Voies de différenciation des cellules présentatrices d'antigènes (DC et pDC) chez la souris. Les voies de différenciation sont finement régulés à la fois par l'environnement et par des signaux cellulaires intrinsèques. Les flèches indiquent les voies de différenciation. Majoritairement les pDC sont issues d'un précurseur CD127+ nouvellement identifié et dérivant du CLP en parallèle de la population déjà décrite émergeant du CLP. Une autre population de cellules, dénommées « pDC like » par Rodrigues et al. est dérivée de manière indépendante du CDP. Cette population est phénotypiquement semblable mais fonctionnellement distincte des pDC issues du CLP. NK : natural killer; IRF8, Interferon regulatoru factor 8; IFN, interferon. Modifié d'après Manz, 2018

Si chaque marqueur de surface des pDC est partagé avec d'autres cellules du compartiment hématopoïétique, le facteur de transcription E2.2 leur est spécifique. En 2010, l'équipe de Boris Reizis démontre que le maintien dans la voie pDC est assuré par l'expression d'E2.2 qui permet l'expression de Bcl11a et réprime spécifiquement Id2 (Ghosh et al., 2010). La perte d'E2.2, et donc l'expression d'Id2, dans

ces cellules s'accompagne de la perte des marqueurs de surface des pDC, de leur fonction et de leur morphologie au profit d'un phénotype ressemblant aux CD8+DC. Les cellules ainsi transformées acquièrent une forte expression du CMH-II et des molécules de co-stimulation qui se traduisent par une capacité à activer efficacement les CD4+. Ces résultats démontrent que le phénotype pDC est activement maintenu là où les cDC sont davantage une voie par défaut. Il a été démontré en 2013 que l'orientation dans la voie pDC est décidée dès le stade CDP par l'acquisition forte d'E2.2 par certaines de ces cellules (Onai et al., 2013). Il n'est pas tout à fait clair si cette population émerge des CDP E2.2<sup>lo</sup> ou directement des LMPP. En revanche, il est connu que l'acquisition d'E2.2 est régie par la présence de M-CSF et de TPO. Au-delà d'E2.2, les pDC expriment également un niveau basal d'IRF7 et fort d'IRF8. Du fait de leur origine différente, il apparaît que la population issue du CLP est plus dépendante d'IRF8 que celle issue du CDP (Rodrigues et al., 2018). S'il est acquis au cours de la différenciation des pDC, IRF8 n'est requis que pour la survie et la fonction de production des IFN de type I mais pas pour l'acquisition du phénotype pDC (Sichien et al., 2016). Il a également été montré que le facteur de transcription Bcl11a est nécessaire pour le développement des pDC en stabilisant le signal Flt3 à des étapes très précoces de leur développement (Wu et al., 2013b). La suppression de ce facteur de transcription entraîne une perte très importante des pDC *in vivo* et *in vitro*, tandis que les cDC sont en partie protégées du fait qu'elles peuvent se différencier normalement avec le GM-CSF.

À l'instar des DC, il existe deux catégories nommées pDC1 et pDC2. Si les pDC2 font effectivement référence aux cellules dendritiques plasmacytoïdes, les pDC1 font en revanche référence aux cellules dendritiques dérivées des monocytes. Il n'est pas inhabituel dans la littérature de parler de l'équilibre pDC1/pDC2 ; les premiers étant classiquement associés à un phénotype inflammatoire, alors que les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont plutôt associées à un phénotype régulateur (hors infection virale). En conditions inflammatoires fortes, les monocytes sont recrutés directement au tissu inflammé via CCR2, CCR5 et CCR6 et peuvent se différencier soit en macrophages soit en cellules dendritiques productrices de grandes quantités d'IL-12 (Imhof and Aurrand-Lions, 2004; León et al., 2007). Cette conversion est dirigée par la présence de GM-CSF (León and Ardavin, 2008; Luo et al., 2005). Ces cellules sont douées de bonnes capacités migratoires et peuvent induire une réponse Th1 et Th17 robuste au niveau des organes lymphoïdes secondaires.

Les cellules dendritiques sont une famille complexe de cellules dont le destin est finement régulé par un réseau de cytokines et de facteurs de transcription. Du fait que les DC sont un pivot dans l'immunité et que le dysfonctionnement d'un petit nombre d'entre elles peut avoir des conséquences massives sur les cellules qu'elles activent, ce contrôle doit être strict mais réussit la prouesse d'offrir la souplesse nécessaire à l'adaptation du système immunitaire, en partie grâce à la durée de vie relativement courte des cellules.

## *ii) L'hématopoïèse « d'urgence »*

L'hématopoïèse est un phénomène dynamique sous l'influence de l'état général de l'organisme au sein duquel elle se déroule. La moelle osseuse étant perméable, les infections, les inflammations aiguës et chroniques ou un déséquilibre homéostatique peuvent réorienter et/ou augmenter l'hématopoïèse dans une voie spécifique afin de répondre au mieux aux exigences immunitaires de l'organisme.

### **a) Les cellules immatures circulent hors des sites d'hématopoïèse**

Dès la fin des années 60, des cellules immatures sont retrouvées dans le sang des souris adultes en parfaite santé (~10/mL) (Barnes and Loutit, 1967). Après une étude minutieuse, il est mis en évidence que ces cellules immatures sanguines sont identiques aux HSC issues de la moelle osseuse récemment décrites. Chez l'animal, il est démontré que ces LT-HSC, désormais caractérisées par Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>, sortent de la moelle osseuse et y retournent en l'espace d'un à deux jours (Wright et al., 2001). La sortie des HSC suit le cycle circadien à la fois chez la souris et chez l'Homme (Haus et al., 1983; Ross et al., 1980). Dans un travail de 2008, il est mis en évidence que la sortie des HSC est inversement corrélée aux évolutions sinusoidales de la production circadienne de CXCL12, produit par les cellules stromales de la niche médullaire (Méndez-Ferrer et al., 2008). Au niveau de cette niche, le CXCL12 agit comme un signal de rétention sur les HSC qui expriment son récepteur, CXCR4. La diminution de la disponibilité de la chimiokine entraîne donc une sortie des HSC le matin, et son augmentation en fin de journée s'accompagne du retour des HSC à la moelle le soir (Méndez-Ferrer et al., 2010). Les auteurs ont démontré que cette évolution est directement liée à la production de norépinephrine par le système nerveux sympathique. Le co-engagement des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques 2 et 3 ne diminue pas seulement la production de CXCL12, mais augmente en parallèle la production de G-CSF qui va favoriser la sortie des HSC. Ceci démontre que la sortie des cellules souches hématopoïétiques vers le sang est activement induite. Cependant, toutes les HSC ne retournent pas à la moelle osseuse et certaines s'établissent en périphérie, comme dans le muscle squelettique (Asakura, 2012) ou encore dans la rate (Coppin et al., 2018). Si dans la rate, elles donnent lieu à une hématopoïèse extra-médullaire adulte, les cellules situées au niveau des organes non lymphoïdes restent quiescentes. Après irradiation de l'animal, ces HSC du muscle sont capables de se réactiver et de reconstituer le tissu hématopoïétique médullaire, ce qui est inhibé par l'ajout de morphogenetic protein 2 (BMP2), une molécule de la famille du TGF $\beta$  (Pang, 2000; Richter et al., 2017). De la même manière, il a été démontré que les HSC en circulation sont capables de recoloniser la niche médullaire en seulement deux semaines après des dommages spécifiques à la moelle osseuse (Cossío et al., 2017). Il a été démontré que l'expression et les capacités d'adhésion des intégrines Very Late Antigen-4 (VLA-4 ;  $\alpha 4\beta 1$ ) et VLA-5 ( $\alpha 5\beta 1$ ) sur les HSC du sang sont contrôlées par la présence de SCF *in vivo* (Hart et al., 2004). Ainsi, les HSC ne peuvent exprimer les

intégrines qu'à proximité de la moelle osseuse ce qui induit une rétention préférentiellement au niveau médullaire.

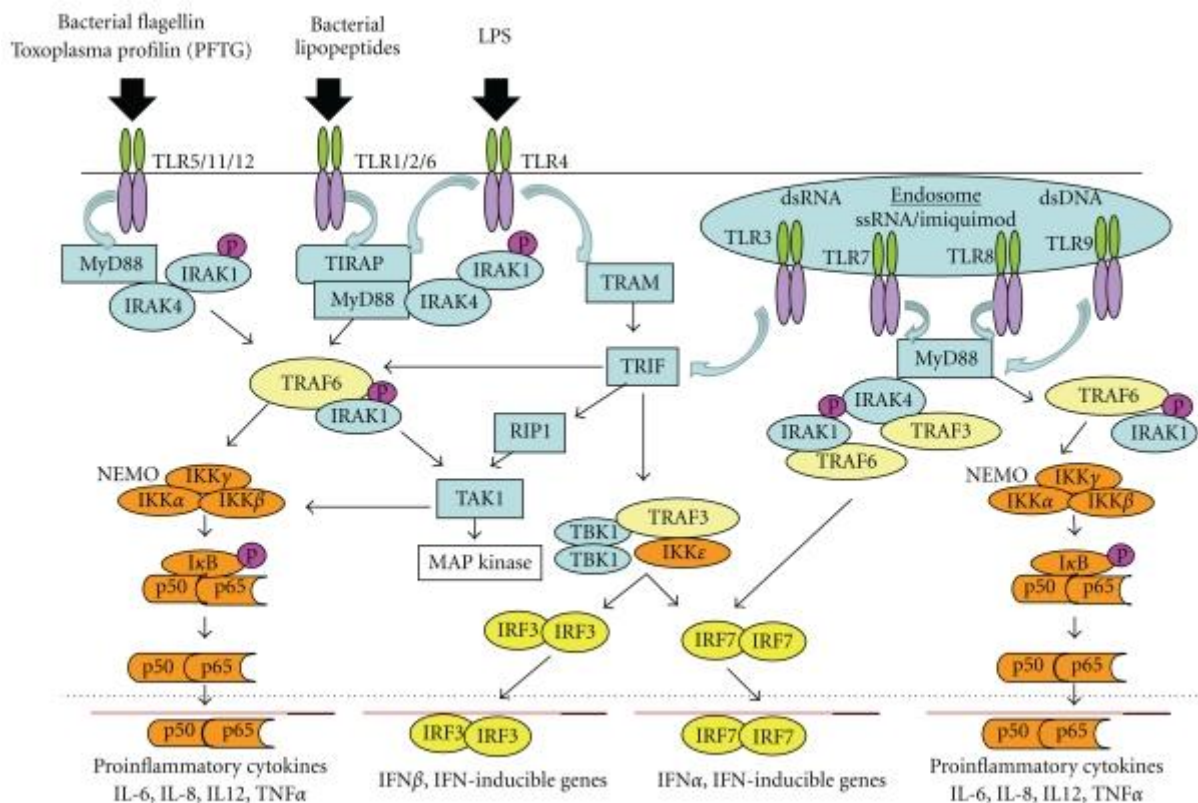
Ce processus actif de migration vers la périphérie et vers la moelle osseuse dirigée par le système nerveux forme une sorte d'axe cerveau-sang-os qui démontre un fonctionnement intégré et dynamique de l'hématopoïèse. Le rôle de ces HSC en circulation serait la surveillance active du bon état du compartiment hématopoïétique mais également une participation à la veille immunitaire.

## **b) Sensibilité au milieu : les TLR**

L'efficacité du système immunitaire repose sur sa capacité d'adaptation à l'état de l'organisme, les signaux révélateurs de la présence de pathogènes sont donc particulièrement importants. La nature de ces signaux est diverse d'un point de vue chimique et structurel. Afin d'y répondre, le système immunitaire et les cellules non hématopoïétiques sont dotés d'un ensemble de récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires invariants (PRR). Les PRR sont capables de reconnaître un ensemble de molécules dénommées motifs associés à la pathogénicité (PAMP) ou motifs associés à la dangerosité (DAMP) nécessaires à la survie et/ou à la pathogénicité des microorganismes. La liaison d'un PAMP/DAMP sur un PRR déclenche ainsi un ensemble de réactions cellulaires comprenant entre autres la phagocytose, l'activation/maturation des cellules ou encore la production de cytokines. Il existe de nombreux PRR tels que les récepteurs de types NOD (NLR), les récepteurs riches en lécithines de type C (CLR) ou encore les récepteurs de types RIG-I (RLR). Chacun de ces récepteurs possède ses voies moléculaires et ses effets propres. Toutefois, ce travail de thèse se focalisant essentiellement sur l'effet de l'activation des récepteurs de type Toll (TLR), seule cette famille de récepteur sera présentée.

À l'heure actuelle on compte treize TLR chez la souris (TLR1 à 13) et dix chez l'Homme. Les TLR 1 à 9 des deux espèces étant des homologues directs, cela sous-entend une forte pression de sélection sur ces molécules. Les TLR sont de la famille des récepteurs de motifs invariants (PRR), capables de reconnaître des motifs associés aux pathogènes (PAMP) ou plus largement des motifs associés au danger (DAMP). La caractéristique principale des DAMP et des PAMP est qu'ils sont invariants du fait de leur absolue nécessité pour la survie d'un organisme, le plus souvent pathogène. Les TLR sont principalement exprimés par les cellules de la lignée immunitaire mais également par de nombreuses cellules formant une interface avec le milieu extérieur comme au niveau des poumons ou du tractus digestif. Leur expression varie suivant le type de signaux auxquels la cellule doit être capable de répondre. L'activation d'un TLR induit toujours le même type de cascade de signalisation (Figure 6):

Liaison du ligand → recrutement de protéines adaptatrices → recrutement de kinases → signal NF-κB



**Figure 6 :** Les voies de signalisation des TLR via leurs molécules partenaires. Il n'existe que trois voies de signalisation des TLR. Celle indépendante de MyD88 est partagée par le TLR4 et le TLR3 et aboutit à la production d'interférons de type I. Il existe deux autres voies dépendantes de la protéine adaptatrice MyD88 : celle dépendante de TRAF6 qui induit la production de cytokines pro-inflammatoires et celle dépendante de TRAF3 qui conduira à la production d'IFN $\alpha$  qui est exclusive aux cellules dendritiques plasmacytoides qui sont de fait les seules cellules à produire cette cytokine par la voie TLR. (Adapté d'après Zhu et Mohan, 2010)

Les TLR sont une famille de récepteurs puissants partagée entre les cellules de l'immunité acquise et innée qui permettent une prise d'information rapide et efficace par les cellules. La liaison de ces récepteurs chez des cellules matures permet l'induction de comportements cellulaires efficaces afin de contenir et éliminer les pathogènes. Toutefois, comme démontré par les mouvements de cellules souches, la moelle osseuse n'est pas un organe isolé du reste de l'organisme. Ainsi, les DAMP et les PAMP peuvent, dans une certaine mesure, entrer dans la moelle osseuse et rencontrer un ensemble de cellules immatures. Par conséquent, si les cellules immatures sont porteuses de PRR, l'hématopoïèse pourra s'en trouver modifiée dans son orientation et/ou sa cinétique. La plasticité de l'hématopoïèse en condition inflammatoire pourrait donc se traduire par une réorientation de la production des cellules hématopoïétiques vers des types cellulaires adaptés à la résolution de l'inflammation.

On distingue deux classes de TLR : les TLR extra-cellulaires (TLR1, 2, 4, 5, et 6) et intra-cellulaires, dans le compartiment endosomal (TLR3, 7, 8 et 9). Les TLR 10, 11, 12 et 13 sont également extra-cellulaires mais leur fonction ou leur ligand ne sont que peu ou pas connus.

## Les TLR extra cellulaires :

### Le TLR4

Le TLR4 est le récepteur aux lipopolysaccharides (LPS) qui constituent la membrane externe des bactéries gram négatives. Le TLR4 est présent à la surface de toutes les cellules de la lignée immunitaire chez la souris, et seules les cellules dendritiques matures ne possèdent pas ce récepteur chez l'Homme. *In vivo*, la cascade de signalisation du TLR4 comporte deux voies possibles suivant les protéines adaptatrices qui viendront se lier aux domaines TIR. La voie dépendante de MyD88 entraînera la production des cytokines pro-inflammatoires IL6, IL8, IL-12 et TNF $\alpha$ . L'autre voie, indépendante de MyD88 fait intervenir IRF3, ce qui induit la production d'interféron de type I, en particulier dans les cellules dendritiques. L'utilisation d'une voie plutôt que l'autre est régie par la capacité d'internalisation du TLR4 : si la cellule est capable d'internaliser le récepteur et de le diriger aux endosomes, la signalisation se fera préférentiellement par la voie indépendante de Myd88 (Yang and Seki, 2012). *In vivo*, l'activation intense du TLR4 est observée majoritairement dans deux types de pathologies : la septicémie et les maladies inflammatoires chroniques, dont la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Dans le cadre de la GVHD, il a été montré que les animaux déficients dans la voie TLR4 sont naturellement plus résistants à la maladie et une rémission est observée après 40 jours (Zhao et al., 2013). Le TLR4 ne semble avoir que peu ou pas d'implication dans la réponse ou la sensibilité à la sclérose en plaques ou à son modèle murin (Urcelay et al., 2007).

### Les TLR 1/2/6

Le TLR2 est une sous unité capable de s'hétérodimériser avec le TLR6 et le TLR1 et de former ainsi les TLR1/2 et TLR2/6 respectivement spécifiques des lipoprotéines triacétylées et biacétylées issues majoritairement des bactéries gram positives. Les deux voies moléculaires sont identiques et passent par les protéines adaptatrices TIRAP/MyD88 et engagent la voie précédemment décrite pour le TLR4 comme MyD88 dépendante ce qui induit la production des cytokines pro-inflammatoires IL6, IL8, IL-12 et TNF $\alpha$ . Ces deux types de récepteurs sont principalement portés par les cellules immunitaires de la lignée innée comme les macrophages et les cellules dendritiques. La liaison de ces dimères de TLR2 sur ces types cellulaires contribue à les activer et induit la maturation dans le cas des cellules dendritiques. Le TLR2 peut également s'hétérodimériser avec d'autres molécules en dehors de la famille des TLR et plus rarement s'homodimériser ce qui permet un spectre de reconnaissance de PAMP très large (plus de 30 ligands connus actuellement) comme le zymosan, l'acide lipothéicoïque, une large variété de lipoprotéines et des lipopolysaccharides (Zähringer et al., 2008).

Les différents dimères de TLR2 sont impliqués dans une grande variété de maladies. Dans la sclérose en plaques, il a été montré que les cellules mononucléées retrouvées au niveau des lésions et du liquide céphalo-rachidien des patients avaient un niveau de TLR2 plus élevé que la normale (Bsibsi et al., 2002) et il



a été démontré qu'une infection bactérienne est capable de déclencher une poussée (Correale et al., 2006). Par ailleurs, de nombreuses cellules non immunitaires telles que les oligodendrocytes, les cellules endothéliales et la microglie expriment le TLR2 à leur surface (Nagyoszi et al., 2010). Le TLR2 est également capable d'induire des effets protecteurs en périphérie en synergisant avec les interférons de type I pour induire la production de cytokines anti-inflammatoires par les DC (Sweeney et al., 2011).

Dans le cadre de la GVHD, il a été trouvé que le TLR2 est augmenté sur les cellules myéloïdes du greffon après le prétraitement au G-CSF pour induire la mobilisation des HSC en périphérie (Joo et al., 2011). Cependant, cela ne semble pas avoir de réel impact dans la maladie, les animaux TLR2<sup>-/-</sup> sont aussi capables que les WT d'induire une GVHD à la fois en tant que greffon ou qu'hôte (Lee et al., 2015). En revanche la présence de TLR2 sur le greffon semble améliorer la prise de greffe.

### Le TLR5

Le TLR5 est un homodimère qui est le récepteur à la flagelline extra-cellulaire, un composant essentiel du filament flagellaire nécessaire à la locomotion de certaines bactéries. Sa signalisation intracellulaire conduit également à la production des cytokines pro-inflammatoires IL6, IL8, IL-12 et TNF $\alpha$ . Le TLR5 est presque exclusivement exprimé par les monocytes, les macrophages, les mDC et dans une moindre mesure par les pDC. Il existe également un autre récepteur à la flagelline, NLRC4, une protéine de la famille des récepteurs de type NOD contenant un domaine CARD. Dans certains cas, ces deux récepteurs travaillent en synergie comme par exemple dans le poumon contre les infections à *Pseudomonas aeruginosa*. La signalisation de concert des deux récepteurs potentialise la production et la diversification des cytokines secrétées par les macrophages pulmonaires (permet la production de l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18).

Chez l'Homme et la souris, le TLR5 est associé à de nombreuses pathologies suivant son niveau d'expression. Une sous-expression de TLR5 semble favoriser la survenue de maladies inflammatoires chroniques telles que la maladie de Crohn. Toutefois, il est retrouvé surexprimé dans les maladies auto-immunes déjà en place. Le rôle du TLR5 n'a été que très peu étudié dans la sclérose en plaques et on ignore s'il est important pour la mise en place ou l'entretien de la maladie. Il est en revanche bien connu des patients que la maladie s'accompagne d'une perte osseuse et de nombreuses fractures associées. Or il a été publié en 2015 par l'équipe d'Ali Kassem que la surexpression du TLR5 est un acteur essentiel de la perte de masse osseuse par l'activation des ostéoclastes via RANKL et pourrait expliquer la fragilité osseuse des patients SEP (Kassem et al., 2015). Aucune étude en ce sens n'a encore été publiée chez l'Homme.

Dans le cadre de la GVHD, le TLR5 a un rôle assez inattendu. En 2008, une équipe démontre que l'administration de CBLB502, un agoniste du TLR5, est capable de protéger les cellules du tractus gastro-intestinal et les cellules souches hématopoïétiques contre une irradiation létale, améliorant ainsi la survie des souris et des singes irradiés (Burdelya et al., 2008). L'injection du CBLB502 n'altère pas la radio-sensibilité

des autres tissus, y compris tumoraux de l'animal, ce qui pourrait s'avérer intéressant pour la préparation des patients avant la mise en place du conditionnement myélo-ablatif.

### Les TLR intracellulaires :

#### Le TLR3

Le TLR3, aussi connu sous le nom de CD283, est situé au niveau des endosomes. Il est le récepteur aux ARN double brins le plus souvent retrouvés dans les virus à ARN. Il est le seul TLR complètement indépendant de MyD88. Sa signalisation passe par IRF3 qui est capable d'activer les deux voies de signalisation dépendante et indépendante de MyD88 décrite pour le TLR4. Ainsi, à la différence du TLR4, le TLR3 est capable d'induire simultanément les cytokines pro-inflammatoires et les interférons de type I. L'expression du TLR3 au sein du système immunitaire est restreinte aux DC (également à quelques sous-types de T exclusivement chez l'Homme) et il a été montré que son engagement améliore les capacités d'APC des DC, en particulier la cross présentation qui active les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (Schulz et al., 2005). Du fait de cette activité on pourrait penser que le TLR3 contribue à la GVHD, mais les souris TLR3<sup>-/-</sup> ont une progression de la maladie et une mortalité associée parfaitement comparables aux souris WT (Toubai et al., 2013a). En revanche, l'effet greffe versus leucémie (GVL) est considérablement diminué, ce qui permet d'envisager d'utiliser le poly I:C, le ligand synthétique du TLR3, comme une solution afin d'augmenter la GVL sans augmenter la GVH. Dans le système nerveux, de nombreuses cellules expriment ce TLR, comme les cellules endothéliales, des neurones, de la microglie, des astrocytes et des oligodendrocytes (Jack et al., 2005; Lafon et al., 2006). Il a été démontré que l'injection de poly I:C dans l'espace intra crânien réduit l'encéphalite expérimentale auto-immune grâce à la production d'interférons de type I qui en résulte (Khorrooshi et al., 2015).

#### Les TLR 7/8

Le TLR7 et le TLR8 forment des homodimères qui reconnaissent tous deux les ARN simple brins endosomaux riches en guanosine et uracile, fréquents pendant une infection virale. Ces deux types de récepteurs sont dépendants de MyD88 et enclenchent la voie de signalisation correspondante. Le TLR7 est exprimé par certains lymphocytes B, toutes les cellules de la famille des cellules dendritiques et en particulier par les pDC. Il est à noter qu'exclusivement dans ces dernières, le TLR7 possède une autre voie d'activation, également dépendante de MyD88 et TRAF6 mais également de TRAF3 et qui est par conséquent capable d'induire l'activation de la voie de l'interféron  $\alpha$  par le biais d'IRF7 (Blasius and Beutler, 2010). Il a été démontré que le traitement des patients atteints de sclérose en plaque avec des interférons  $\beta$  est capable d'augmenter l'expression du TLR7 à la surface des cellules dendritiques (Zhang et al., 2009). Dans ce même travail, les auteurs mettent également en évidence que le TLR est requis pour l'expression de l'IL-27 par les DC induites par l'IFN $\beta$ , mais également pour la répression de la synthèse d'IL-23 et d'IL-1 $\beta$ . Par ailleurs,

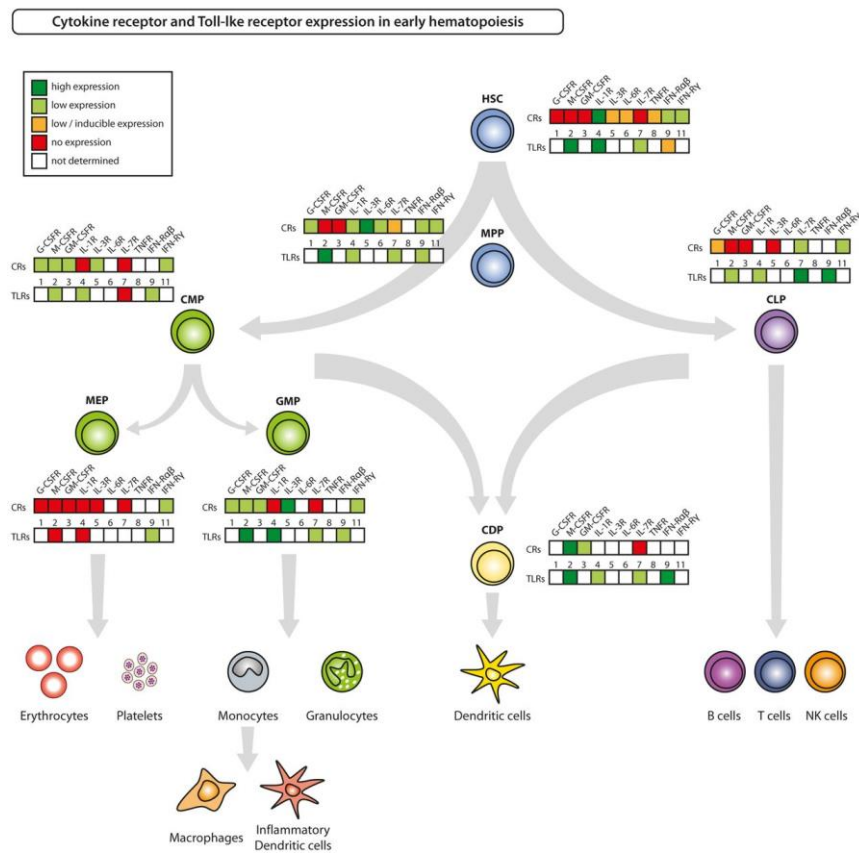
l'expression membranaire du récepteur à l'IL-1 est diminuée après liaison du TLR7 avec son agoniste naturel ou synthétique, le R848. Si, comme pour le TLR7, le TLR8 a été retrouvé augmenté chez les patients traités aux IFN $\beta$ , son rôle n'a cependant pas été démontré (Hundeshagen et al., 2012). Dans le cadre de la GVHD, le rôle du TLR7 est plus contrasté. S'il est absolument requis pour la réponse GVL, la stimulation de ce TLR par de l'imiquimod (un autre agoniste synthétique du TLR7 et 8) aggrave la réponse allogénique au niveau de la peau des individus par l'activation des cellules de Langerhans (Durakovic et al., 2006). Le rôle du TLR8 dans la GVHD est quant à lui très flou et peu étudié probablement du fait qu'il est généralement considéré comme redondant avec le TLR7.

### Le TLR9

Le TLR9 est un homodimère qui reconnaît les ADN double brins riches en motif CpG, ces types d'ADN non méthylés se retrouvant chez de nombreuses bactéries. Le TLR 9 est dépendant de la protéine adaptatrice MyD88 et est capable d'induire les cytokines pro-inflammatoires associées chez toutes les cellules de la lignée myéloïde et principalement par les cellules dendritiques mais également par les lymphocytes B, les plasmocytes et des cellules de la lignée non hématopoïétique comme les cellules épithéliales et endothéliales. De la même manière que pour le TLR7, le TLR9 possède une voie moléculaire de signalisation exclusive dans les pDC qui permet d'initier la production d'IFN $\alpha$ . Il existe trois classes de CpG différents capables d'induire l'une ou l'autre de ces voies : les CpG de classe A (CpG-A et CpG-P) induisent préférentiellement la production d'interférons de type I, le CpG-B est davantage capable d'induire la production de cytokines de la famille de l'IL-12 et une très faible production d'IFN $\alpha/\beta$  là où le CpG-C induit indifféremment les deux voies (Vollmer et al., 2004). Du fait de l'orientation des réponses par ces différents oligonucléotides, les CpG de classe A activent préférentiellement les pDC (Krug et al., 2001) là où le CpG-B sera plutôt capable d'activer les B (Krieg et al., 1995). Du fait de ces deux voies, le TLR9 a un rôle à la fois activateur et régulateur. De fait, ces deux aspects peuvent être dérégulés dans de nombreuses maladies. Toutefois, dans les pathologies inflammatoires chroniques, le TLR9 est le plus souvent délétère. Dans le cadre de la sclérose en plaques par exemple, les pDC TLR9+ sont présentes au niveau des leptoméniges et produisent de l'IFN $\alpha$  en réponse à une stimulation CpG. Le traitement aux IFN $\beta$  est cependant capable de diminuer le niveau de TLR9 à la surface de ces cellules ce qui contribue à diminuer la voie de production des cytokines pro-inflammatoires (Balashov et al., 2010; Liu, 2005). De la même façon, la stimulation du TLR9 avec du CpG des lymphocytes B des patients redirige leur production de l'IL-10 vers les cytokines pro-inflammatoires, y compris dans les cellules B mémoires (Hirotsu et al., 2010). L'administration de CpG exacerbe la GVHD et accélère le rejet des HSC de façon dépendante des APC (Taylor et al., 2008). Par ailleurs, l'induction de la GVHD chez des animaux déficients en TLR9 se traduit par une survie et un score clinique améliorés (Calcaterra et al., 2008). L'utilisation d'animaux donneurs déficients donne le même type de résultats (Elmaagacli et al., 2009).

### c) Hématopoïèse de stress et hématopoïèse inflammatoire

En 2006, il est démontré que les cellules souches hématopoïétiques ainsi que d'autres cellules immatures (MPP, CLP/CMP) présentent à leur surface plusieurs types de TLR (Figure 7) (Nagai et al., 2006). Cette équipe démontre qu'un signal TLR faible sur les cellules immatures n'induit pas d'aplasie mais une augmentation du nombre de cellules de types myéloïdes produites par la moelle osseuse. *In vitro*, la stimulation TLR4 est capable d'induire, de façon dépendante de MyD88, un biais dans l'hématopoïèse en induisant spécifiquement la production de granulocytes et macrophages de manière désormais indépendante de leurs facteurs de croissances associés. Cette stimulation permet également la réorientation de la production lymphocytaire par les CLP au profit des cellules dendritiques. De façon extrêmement importante, ils démontrent que cette polarisation est identique *in vivo* chez la souris. Depuis ces travaux, les TLR7 et 9 ont été retrouvés portés par les HSC murines (Tomchuck et al., 2008) mais également par de nombreuses cellules immatures (Figure 7).



**Figure 7 :** Récepteurs de cytokines et TLR portés par les cellules immatures lors de l'hématopoïèse. Ce Schéma résume l'ensemble des récepteurs extra et intracellulaires des cellules immatures à l'état basal chez la souris adulte. L'ensemble de ces récepteurs détermine le réseau moléculaire et cellulaire qui peut influencer l'hématopoïèse en condition pathologique. Cela permettra la redirection de la production cellulaire vers les types de cellules circulantes permettant le retour à l'état d'équilibre. Daprès Takizawa et al, 2012.

L'ensemble de ces mécanismes permet de remplacer les cellules immunitaires détruites et de maintenir le compartiment hématopoïétique fonctionnel en cas d'inflammation/infection non contrôlée. Ce

rôle peut également être assuré par les HSC circulantes ou qui résident dans les tissus (Tamplin et al., 2015). Toutefois, les DAMP et les PAMP ne sont pas les seuls signaux capables de moduler l'hématopoïèse : les cytokines pro-inflammatoires et les cellules immunitaires activées en sont également des régulateurs efficaces. Les cytokines sont connues pour leur rôle modulateur depuis assez longtemps comme pour le GM-CSF qui est à la fois une cytokine pro-inflammatoire mais également un facteur essentiel à la différenciation de la lignée myéloïde. C'est donc assez naturellement que cette cytokine est capable de rediriger l'hématopoïèse vers la voie myéloïde, en particulier vers les monocytes et neutrophiles circulants comme c'est le cas dans l'arthrite rhumatoïde par exemple (Cook et al., 2018). Des effets similaires ont été décrits avec le G-CSF, le Flt3L ou encore l'IL-3 dont les concentrations sériques peuvent augmenter jusqu'à plusieurs centaines de fois chez l'Homme et chez la souris (Chitu and Stanley, 2006; Resnick et al., 1990; Zhan et al., 1993). Toutefois d'autres cytokines typiquement inflammatoires sont également capables de réorienter l'hématopoïèse. C'est par exemple le cas de l'IFN $\gamma$ . Les T effecteurs sont capables d'entrer dans la moelle osseuse et d'y inhiber la différenciation des éosinophiles au niveau des précurseurs (de Bruin et al., 2010; Slifka et al., 1997). La même équipe démontrera deux ans plus tard que l'IFN $\gamma$  est également capable de biaiser le CMP pour la production de monocytes tout en inhibant la production de neutrophiles dans un modèle murin d'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire. Cela passe en particulier par une surexpression d'IRF8 et de PU.1 et la répression de la phosphorylation de Stat3 chez le CMP ce qui promeut l'orientation pleinement myéloïde du précurseur (Bruin et al., 2012). La production de cette cytokine au niveau des organes lymphoïdes primaires n'affecte pas seulement la lignée innée mais est capable de promouvoir largement l'induction de T effecteurs tout en inhibant le lignage B au niveau des précurseurs lymphoïdes (Young et al., 1997). Dans des inflammations plus sévères, la concentration sérique élevée d'IFN $\gamma$  et sa persistance s'avèrent problématiques car elles induisent à terme une anémie sévère assez caractéristique des maladies inflammatoires chroniques (Weiss and Goodnough, 2005). Des modèles murins ont permis de montrer que cette anémie s'explique à la fois par la réduction de la durée de vie des érythrocytes mais également par un défaut d'érythropoïèse au niveau de la moelle osseuse. Ce défaut est dû cette fois à une augmentation du couple PU.1/IRF1 dans les CMP ce qui est incompatible avec leur différenciation en précurseurs érythroïdes et inhibe donc cette voie. Cet effet est vérifiable chez la souris mais également chez l'Homme et la seule diminution de PU.1 ou d'IRF1 dans les CMP suffit à permettre à l'érythropoïèse de se dérouler correctement à nouveau (Libregts et al., 2011). Fort heureusement, l'érythropoïèse splénique n'est pas sensible à l'IFN $\gamma$  et l'augmentation de l'érythropoïétine circulante permet l'entretien d'une production basale même en conditions inflammatoires chroniques (Millot et al., 2010).

De la même manière, l'IL-1 est capable, en synergie avec le G-CSF d'induire une augmentation des granulocytes circulants et d'induire la formation de foyers d'hématopoïèse dans la rate d'un hôte murin.

Une fois ces foyers isolés et réimplantés dans un hôte non traité, le même biais vers la production de granulocytes est reproduit démontrant qu'il s'agit bien d'un effet sur les cellules immatures plus qu'une expansion en périphérie de cellules déjà engagées (Gallicchio et al., 1989). L'IL-1 est capable d'induire la prolifération des HSC, des MPP et des GMP *in vitro* et *in vivo* non pas directement par l'implication du système immunitaire, mais par la production d'IL-1 par des cellules non hématopoïétiques (Ueda et al., 2009).

Si jusqu'à présent les cytokines décrites avaient un rôle positif sur l'hématopoïèse, le TNF $\alpha$  est connu pour « mettre en pause » l'hématopoïèse en régulant négativement les HSC *in vitro* et *in vivo*. L'ajout de TNF dans une culture réduit l'auto-renouvellement des HSC et diminue leur capacité à reconstituer un hôte par l'induction de l'expression de Fas. L'engagement de Fas par un agoniste n'entraîne pas la mort des HSC mais inhibe complètement leur entrée en cycle (Bryder et al., 2001). *In vivo*, l'injection de TNF $\alpha$  abaisse drastiquement la cellularité de la moelle osseuse en lien avec un nombre d'HSC en cycle diminué (Pronk et al., 2011). Les auteurs démontrent que les deux récepteurs au TNF $\alpha$ , TNFR-I et TNFR-II sont portés par les cellules immatures à différentes étapes de leur différenciation et l'ajout de TNF $\alpha$  arrête les cycles à la fois des HSC mais également du GMP. L'engagement de ces deux récepteurs est responsable de l'arrêt rapide de toute la cascade de différenciation.

Certaines molécules de co-stimulation sont exprimées sur des cellules très immatures de la moelle osseuse et sont capables d'induire des modifications de l'hématopoïèse. Par exemple CD40 est exprimé par les cellules souches hématopoïétiques et la liaison de CD40 avec CD40L (CD154) augmente la prolifération des HSC et biaise leur différenciation vers la production de DC (Flores-Romo et al., 1997). Il s'est avéré que CD40 est également porté par les cellules stromales médullaires et la liaison CD40/CD40L sur ces cellules induit la production de Flt3L et TPO ce qui favorise indirectement la myélopoïèse (Solanilla et al., 2000). Il a par ailleurs été démontré qu'un microenvironnement inflammatoire est capable d'augmenter le niveau de CD40 sur les précurseurs des granulocytes et permet par la liaison de CD154 d'inhiber leur développement en induisant leur apoptose (Mavroudi and Papadaki, 2011). De la même manière 4-1BB est exprimé par les HSC, les CMP et les GMP et 4-1BBL est retrouvé sur les précurseurs myéloïdes activés (Lee et al., 2008a). La liaison de ces molécules sur les cellules immatures a pour effet direct de diminuer la proportion de DC tout en promouvant la différenciation des macrophages (Jiang et al., 2008). L'induction de cette myélopoïèse s'est révélée critique pour la résolution de nombreuses infections par le virus de la grippe, Bordetella pertussis, le Mycobacterium bovis, le bacille de Calmette-Guérin ou Escherichia coli (Tang et al., 2013).

Par ailleurs l'hématopoïèse en condition inflammatoire est également capable d'induire des types cellulaires qui ne sont habituellement pas présents. Par exemple, des niveaux élevés d'IFN $\gamma$  liés à une infection par le parasite responsable du paludisme, sont capables d'induire une population caractérisée comme Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>hi</sup>IL7-R $\alpha$ <sup>+</sup>. Ces cellules, distinctes des ILC, n'existent pas à l'état basal et ont des propriétés

semblables aux MPP à ceci près qu'elles présentent un biais myéloïde prédominant (Belyaev et al., 2010). Suivant cette même logique, un cancer ou une infection permet l'émergence de cellules Gr-1+CD11b+ produisant de faibles quantités de M-CSF qui favorise la différenciation de granulocytes (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). À l'heure actuelle, on ne sait pas avec certitude s'il s'agit de l'induction d'une population réellement nouvelle ou s'il s'agit plutôt de modifications phénotypiques permettant l'acquisition de nouveaux marqueurs sur une population connue sur d'autres critères. Seules des études précises des fonctions et du programme transcriptionnel de ces cellules permettraient de trancher cette question. Malheureusement, les études concernant ces types cellulaires n'ont pas été poursuivies.

Dans l'ensemble, la plasticité de l'hématopoïèse permet dans des conditions d'inflammation dite faible de satisfaire les besoins de l'organisme en promouvant des types cellulaires nécessaires pour la résolution rapide des troubles de l'homéostasie au détriment de cellules moins nécessaires sur l'instant. Ce mécanisme est toutefois délétère à long terme et l'anémie plus ou moins sévère qui accompagne les inflammations chroniques en est la principale complication. De façon audacieuse, Libregts et Nolte proposent en 2014 que le contrôle de la plasticité de l'hématopoïèse soit dépendante de 3 signaux d'activation, de co-stimulation et de cytokines pro-inflammatoires par analogie avec les signaux d'activation des lymphocytes T (Libregts and Nolte, 2014). Le premier signal est donné par les PAMP/DAMP et active la prolifération des HSC, la liaison de molécules de co-stimulation et les cytokines permettent la modulation de l'orientation des précurseurs ainsi activés.

## **2) Fonction régulatrice et cellules immatures**

### *i) La tolérance immunitaire*

Les cellules immunitaires ont le potentiel de faire d'énormes dégâts si elles ne sont pas régulées correctement. Il existe donc un contrôle sur le type d'antigènes que peut reconnaître le système immunitaire suivant qu'il s'agit du soi (appartenant à l'organisme dont il est issu) et du non soi (étranger à l'organisme ou appartenant à l'organisme mais endommagé par exemple par un cancer ou la mort cellulaire). La reconnaissance des antigènes par l'immunité innée est souvent restreinte aux PRR et ces cellules ne peuvent pas ou très rarement reconnaître le soi en condition homéostatique. En revanche les cellules de l'immunité acquise développent des récepteurs ayant une spécificité propre à chaque cellule produite par la moelle osseuse. Cette spécificité étant plus ou moins aléatoire, il est nécessaire d'exercer un contrôle sur le type de reconnaissance permis par les récepteurs ainsi générés afin de départager les cellules utiles des cellules potentiellement dangereuses. Pour cela l'organisme dispose de deux moyens de contrôle particulièrement efficaces : le contrôle central de la spécificité des cellules par la suppression des cellules auto-réactives. La tolérance périphérique fait référence à l'ensemble des mécanismes activement mis en place pour le

maintien de la tolérance dans les organes par l'adoption d'un phénotype tolérogène par des cellules matures activées.

### **a) La tolérance centrale**

La tolérance centrale est l'ensemble des mécanismes qui contrôle la spécificité antigénique des lymphocytes T et B produits par l'organisme. Comme les B dépendent des T pour leur activation, le contrôle le plus strict concerne donc ces derniers. Pour les lymphocytes T, la tolérance centrale est assurée par le thymus dans lequel ils mûrissent et sa mise en œuvre compte deux étapes.

Les pré-T CCR9+ (ou ETP, early thymic precursor) arrivent à la jonction cortico-médullaire du thymus par la circulation sanguine. L'entrée dans l'organe permet aux pré-T d'acquiescer l'expression de gènes spécifiques à la lignée T comme CD25 et deviennent alors des thymocytes triple négatifs (CD3<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>). La migration dans la partie corticale leur permet de rencontrer le signal des ligands de Notch exprimé par les cellules épithéliales du thymus ce qui va induire une forte expansion des cellules après quoi elles vont réarranger leurs gènes du récepteur T (TCR). Cette recombinaison requiert l'expression des endonucléases Rag1 et Rag2 qui vont recombiner aléatoirement des segments D et J de la chaîne  $\beta$  du TCR (Godfrey et al., 1994). Dans la grande majorité des cas, les cellules vont recombiner les loci  $\beta$  puis  $\alpha$  et donc donner naissance à des cellules T $\alpha\beta$ . Dans 5% des cas, la cellule échoue à réarranger ces loci et réarrange les loci  $\gamma$  et  $\delta$ , donnant ainsi des cellules T $\gamma\delta$  non conventionnelles qui ressemblent davantage aux cellules innées dans leur mode d'action et ne seront pas considérées ici. Les cellules T ayant réussi leur réarrangement DJ excluent la possibilité d'autres réarrangements de ces segments par exclusion allélique. Elles procèdent ensuite à la recombinaison du segment V, dit hypervariable, qui définira la spécificité antigénique du TCR ainsi construit. Une fois la recombinaison VDJ de la chaîne  $\beta$  terminée, les cellules prolifèrent activement avant de procéder au réarrangement de la chaîne  $\alpha$ , ce qui permet l'expression à leur surface membranaire d'un TCR d'une spécificité donnée. En parallèle, les cellules acquiescent les corécepteurs CD4 et CD8 (Wilson et al., 1994). C'est à ce moment qu'a lieu la première étape de tri des cellules T : la sélection positive qui permet de ne conserver que les cellules capables de reconnaître le CMH-I ou le CMH-II présenté par les cellules épithéliales corticales thymiques (cTEC). Suivant l'affinité de la cellule pour le CMH-I ou le CMH-II, elle conservera le corécepteur CD8 ou CD4 respectivement (Sim et al., 1998). Les cellules passant avec succès la sélection positive se mettront à produire des cytokines telles que l'IL-2 et l'IL-15 qui leur donneront le signal autocrine nécessaire à leur survie. Les autres cellules (90%) mourront par manque de ces facteurs. Du fait de la grande variété de molécules possibles ( $10^{18}$ ), certaines cellules ont la capacité de reconnaître plus ou moins fortement des peptides du soi. Les cellules sauvées doivent alors passer par une seconde sélection, négative cette fois, au regard de leur capacité à s'activer face à un antigène du soi. Un complexe CMH-peptide est présenté par les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) qui sont les seules à



exprimer, au niveau du thymus, le régulateur de l'auto-immunité (AIRE), un gène dont l'épissage alternatif leur permet de présenter une grande variété des antigènes du soi (Björse et al., 1998). La présentation des antigènes du soi peut également être médiée par des cDC et des pDC migrantes qui apportent des antigènes de la périphérie mais également par une sous-population de DC résidant au niveau du thymus capable de cross présenter des produits issus d'AIRE (Hadeiba and Butcher, 2013). La reconnaissance du ou des antigènes dont un CD4 ou un CD8 est spécifique et requiert l'immobilisation du dit lymphocyte afin d'établir des interactions de longue durée avec l'APC qui le lui présente. Cette immobilisation est le résultat de la mise en place de la synapse immunologique nécessaire à son activation (Kao et al., 2008; Kupfer et al., 1987). La liaison forte des CD4 ou CD8 au CMH présentant des produits de l'épissage alternatif d'AIRE permet donc de détecter les cellules spécifiques des antigènes du soi, dites auto-réactives. Si la cellule T ne réagit pas à la présentation d'auto-antigènes par les mTEC, elle passe avec succès la sélection négative et rejoint la circulation sanguine. Dans le cas contraire, deux destins sont possibles : soit la cellule est fortement affine pour l'antigène et la force du signal qui en résultera conduira la cellule à l'apoptose, soit la cellule a une affinité modérée pour l'autoantigène et elle pourra se convertir en Treg dit thymiques (tTreg). Le phénotype régulateur des tTregs est signé par l'acquisition du facteur de transcription forkhead box P3 (Foxp3) et dépend de la présence dans le proche environnement thymique d'IL-2 et de TGF $\beta$  (Hori et al., 2003; Lee and Hsieh, 2009). Ces cellules régulatrices ainsi produites sont elles-mêmes capables de produire des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'IL-35 et le TGF $\beta$ . Ces molécules sont capables d'arrêter ou de limiter l'activation de cellules effectrices lors de la phase de résolution d'une réponse immunitaire mais également d'empêcher l'activation de cellules légèrement auto-immunes qui ont tout de même passé la double sélection thymique. Cela passe en particulier par l'abrogation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules activées. Par ailleurs, les Tregs sont également capables d'induire l'apoptose de cellules activées par la présentation de molécules telles que TRAIL, Fas-L ou la galectine-9, qui engagent le programme de mort de la cellule recevant ces signaux. De façon plus détournée, les Tregs sont également capables de dépriver le milieu extra-cellulaire en ATP par le truchement de CD39, ce qui induit la mort des T activés (Deaglio et al., 2007). Les deux mécanismes de suppression des T auto-réactifs et l'induction de Tregs spécifiques du soi convergent pour le maintien de la tolérance au soi. Subséquemment, des dommages au thymus induits par une irradiation ou une inflammation chronique rompent cette sélection des cellules profitables à l'organisme. Il s'en suit un syndrome auto-immun généralisé le plus souvent mortel.

Si les lymphocytes B requièrent l'aide des lymphocytes T pour s'activer, il pourrait être tentant de considérer que la seule sélection de la spécificité antigénique des T suffit à empêcher l'activation des B auto-immuns. Ce n'est pas le cas et dans la mesure où ces cellules peuvent également s'activer sans l'aide des T, il est nécessaire de supprimer la partie auto-réactive du répertoire des lymphocytes B. Dans ce cas, la garantie de la tolérance centrale est assurée au niveau de la moelle osseuse. De façon intéressante, la

différenciation B et la sélection T sont assez proches dans leurs mécanismes. Ainsi, les lymphocytes B expriment à leur surface un BCR qui est constitué d'une immunoglobuline membranaire de type IgM et dont la spécificité est dictée par des réarrangements VDJ grâce à Rag1 et Rag2 (Tonegawa, 1983). En premier lieu, le pro-B de la moelle va réarranger les portions DJ de la chaîne lourde (H) de l'immunoglobuline puis, si c'est un succès, réarranger la partie V hypervariable. La chaîne lourde ainsi construite, l'exclusion allélique empêche davantage la recombinaison d'avoir lieu pendant que les pre-B prolifèrent massivement. La chaîne légère (L) est ensuite elle-même réarrangée et peut donner deux types de molécules : soit  $\kappa$ , soit  $\lambda$ . Si au cours de leur différenciation, certaines cellules échouent à produire un réarrangement productif soit de la chaîne lourde soit de la chaîne légère, elles mourront par apoptose. Comme elles sont dans la moelle osseuse, les cellules B immatures ainsi produites ne vont rencontrer quasiment que des antigènes du soi. La sélection positive des cellules B ainsi produites repose sur la faculté du BCR à produire un signal tonique de phosphorylation de CD19 s'il est vide, ce qui se traduit au niveau intracellulaire par un signal PI3K élevé, qui permet la survie de la cellule (Fujimoto et al., 2000). Si un antigène du soi se lie au BCR, le signal PI3K va brutalement s'élever puis s'effondrer avec l'internalisation du BCR fautif ce qui permet à la cellule de détecter que le réarrangement est auto-réactif. À la très grande différence des lymphocytes T, l'auto-réactivité n'induit pas une apoptose immédiate. À la place, le B détruit le BCR généré (destructive editing), réactive l'expression de Rag1/2 et procède à de nouveaux réarrangements de la chaîne L (Tiegs et al., 1993). Cette étape est connue sous le nom de receptor editing et si, à terme, le nouveau BCR produit est toujours d'une spécificité inadéquate ou si aucun réarrangement ne peut être produit, la cellule mourra par apoptose. Les autres B reçoivent le signal de survie PI3K et peuvent alors maturer en cellules B transitionnelles. Ces cellules sont incapables de réarranger leur BCR et sont toujours prédisposées à l'apoptose. Si la concentration de BCR à la surface de la cellule est insuffisante, le maintien du signal PI3K est déficient, et conduira toutes les cellules trop peu efficaces à l'apoptose. Les survivantes pourront alors rejoindre les organes lymphoïdes secondaires. Bien que légèrement plus souple que pour les lymphocytes T, la mise en place de la tolérance centrale des B est un processus fin qui empêche relativement efficacement la production de cellules auto-immunes.

## **b) L'ignorance, la délétion clonale et l'anergie**

Les mécanismes tolérogènes décrits jusqu'à présent sont rassemblés sous le nom de la tolérance dominante. Elle est caractérisée par le fait qu'elle requiert la participation de cellules au phénotype activement régulateur. Toutefois, il existe également de nombreux mécanismes indépendants de ces cellules, constituant la tolérance dite passive.

## L'ignorance immunitaire

Du système immunitaire, seules les cellules de la lignée innée infiltreront abondamment les tissus. Les cellules de la lignée adaptative résident en temps normal au niveau des organes lymphoïdes secondaires compte tenu de leur expression de molécules d'adhésion CCR7, CXCR5 ou CD62L (Ebert et al., 2005; López-Giral et al., 2004). Du fait de leur localisation, les cellules T et B ne rencontreront probablement pas de très nombreux antigènes du soi bien qu'elles aient le répertoire pour y répondre (Tlaskalová-Hogenová et al., 1992). Chez des souris DBA/2 portant un peptide issu du virus de la chorioméningite lymphocytaire murine (LCMV) au niveau des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans et des CD8 portant un TCR transgénique spécifique du peptide, on n'observe pas de diabète de type I (Ohashi et al., 1991). Toutefois, il est possible d'abroger cette ignorance en immunisant les animaux avec le LCMV. Les animaux déclenchent une réponse immunitaire contre le virus et de ce fait, si le peptide du LCMV est exprimé au niveau du pancréas, il est reconnu comme étranger et les cellules sont attaquées par les CD8. Ceci se traduit à terme par le déclenchement du diabète de type I. De façon complémentaire, une autre équipe a démontré en utilisant le même modèle que l'expression d'IL-2 au niveau du proche environnement des cellules  $\beta$  permet également le déclenchement du diabète (Heath et al., 1992). Ces résultats démontrent que les T ne sont pas anergiques et qu'une stimulation immunitaire appropriée permet une réponse immunitaire normale. Depuis, ces mécanismes ont également été identifiés chez l'Homme (Lohmann et al., 1996; Markovic-Plese et al., 1995; Ota et al., 1990).

## La délétion clonale

À la même époque, il est apparu comme évident qu'en plus de l'ignorance qui empêche l'activation du répertoire auto-immun, d'autres mécanismes en limitaient également la taille. Toujours en utilisant le modèle du diabète de type I du fait de sa praticité, certaines équipes ont non pas fait exprimer un peptide étranger dans le pancréas des animaux, mais cette fois un CMH-I allogénique. Le croisement de ces animaux avec ceux possédant les CD8 spécifiques de ce CMH permet d'obtenir un nombre normal de CD4 et de CD8 au thymus, mais en périphérie, le nombre de CD4-CD8<sup>+</sup> est drastiquement diminué par rapport aux animaux contrôles (Schönrich et al., 1991). Ce résultat est alors explicable par deux mécanismes différents : soit les cellules internalisent leur TCR et le CD8 associé du fait d'une stimulation trop efficace, soit elles sont purement détruites. Un an plus tard, la même équipe parvient à démontrer qu'une fois isolée et mise en culture, une partie des cellules est capable de réexprimer le TCR/CD8 à leur surface mais dans des quantités qui restent éminemment plus faibles que chez des animaux normaux, ce qui suggère que les deux mécanismes ont lieu en parallèle (Schönrich et al., 1992). En 1995, l'équipe de Thomas Brunner démontre que la délétion clonale est liée au fait que les lymphocytes T très régulièrement activés, meurent par apoptose induite par l'activation (AICD) directement liée au couple Fas/Fas-L (Brunner et al., 1995). Quelques années plus tard, les travaux sont poursuivis chez des animaux qui ne sont cette fois-ci pas enclins à l'auto-

immunité. Il est alors démontré que lorsque l'animal ne présente pas de prédisposition à l'auto-immunité, le mécanisme majoritaire est la délétion des clones trop activés (Kurts et al., 1997). Les résultats sont reproduits dans de nombreux organes et ce, y compris si les cellules qui expriment l'allo-antigène sont les cellules CD11c+ alors même que le répertoire CD4+ associé existe (Steptoe et al., 2007). Par ailleurs, l'équipe de William Heath est parvenue à démontrer que le revirement entre l'ignorance et la délétion clonale est directement lié à la dose de l'antigène et donc à la puissance de la stimulation qui s'ensuit (Kurts et al., 1999).

Ces résultats suggèrent que l'auto-antigène est bien reconnu par une partie des cellules en périphérie mais que cela conduit à la perte par délétion clonale des cellules trop fortement activées. Si les mécanismes par lesquels les animaux favorisent l'internalisation du TCR par rapport à la délétion clonale ne sont pas encore compris, cela permet de donner un indice sur la prédisposition de certaines personnes aux maladies auto-immunes.

### L'anergie

Malgré l'importance de la délétion clonale, un autre mécanisme d'induction de tolérance périphérique est déjà connu et étudié depuis le début des années 80, l'anergie. Il s'agit d'un état dans lequel les lymphocytes T deviennent incapables de répondre à un stimulus antigénique. De fait, les T concernés cessent de se diviser et de produire des facteurs solubles (comme l'IL-2) durant cette période (Nossal and Pike, 1980). La première induction d'anergie expérimentale est obtenue par culture de T humains en présence d'antigènes issus du virus de la grippe, mais en l'absence d'APC (Lamb et al., 1983). Les travaux des années suivantes parviendront à mettre en évidence que l'anergie est induite par l'engagement du TCR en l'absence de molécules de co-stimulation sur les APC, en particulier CD80 (Jenkins and Schwartz, 1987). Cet effet est dépendant de la présence de CTLA-4 à la surface des lymphocytes : le blocage de cette molécule par un anticorps empêche l'induction de l'anergie *in vitro* (Perez et al., 1997). Ces résultats sont confirmés *in vivo* en 1999 par la démonstration que l'engagement de CTLA-4 au moment d'une allogreffe cardiaque retarde considérablement le rejet par l'induction d'une population de cellules non répondeuses (Judge et al., 1999). Enfin, le récepteur de mort programmée (PD-1) contribue également au maintien des cellules dans leur état anergique et contribue à protéger des souris contre l'auto-immunité (Khoury and Sayegh, 2004). L'altération de la voie PD-1 par l'inhibition soit du récepteur soit de ses ligands PD-L1 et PD-L2 se traduit par un syndrome auto-immun généralisé et la mort rapide des animaux (Keir et al., 2006). En plus de la stimulation incomplète par les APC, il a été démontré que l'engagement du TCR en présence de doses massives d'IL-2 est également capable d'induire l'anergie des cellules, ce qui est réversible par l'ajout d'un anticorps contre le récepteur de l'IL-2 ou la suppression de la cytokine (Beverly et al., 1992). L'IL-10 présente une activité similaire mais cette fois même à faible dose (Groux et al., 1996). Cette état anergique est profond et ne peut pas être levé par l'ajout d'IL-2. Il apparaît donc qu'il existe plusieurs types d'anergie qui définissent s'il est possible ou pas de faire retourner la cellule vers un phénotype activé (Arnold et al., 1993). Cela est

directement lié à la possibilité pour les cellules de retourner en cycle par l'ajout d'IL-2. Si l'anergie est levée en présence de cytokines anti-inflammatoires, il est possible de faire émerger des Tregs des populations rendues anergiques (Kalekar et al., 2016). De façon intéressante, les CD4 naïfs ne sont pas sensibles à l'anergie (Davis and Lipsky, 1993). Par ailleurs, si l'anergie persiste trop longtemps, la cellule finit par mourir par apoptose, ce qui à terme rejoint le mécanisme de la délétion clonale.

### **c) La tolérance périphérique**

La tolérance centrale bien qu'extrêmement efficace, reste faillible. Des cellules auto-réactives sont régulièrement produites et constituent un répertoire auto-immun qui existe à l'état basal chez tous les individus sains, Homme ou souris (Imberti et al., 1993; Tlaskalová-Hogenová et al., 1992). Cela est en partie dû au fait que tous les antigènes du soi ne peuvent pas être présentés à toutes les cellules au moment de leur développement. Par ailleurs, certaines réponses immunes normales requièrent le développement d'une régulation contre des antigènes étrangers au soi, comme dans le cas des bactéries commensales, de la tolérance materno-fœtale ou des antigènes environnementaux. Il existe donc un répertoire tolérogène, tant T que B, qui émerge cette fois *in situ*.

Les Tregs différenciés en périphérie sont appelés Tregs périphériques (pTregs, également dénommés Tregs induits). Majoritairement les Tregs ainsi produits expriment le facteur de transcription *foxp3* et sont particulièrement abondants dans le tube digestif et le placenta. Ils sont issus de la différenciation de lymphocytes T CD4+ naïfs en présence d'IL-2 et de cytokines anti-inflammatoires comme le TGF $\beta$ . Il a été démontré que les souris ne possédant pas le gène du TGF $\beta$ 1 présentent un compartiment tTreg normal mais pTregs largement diminué, ce qui souligne l'importance cruciale de cette cytokine dans leur développement (Chen et al., 2003; Marie et al., 2005). Ces cytokines anti-inflammatoires sont produites par le partenaire cellulaire nécessaire à l'induction des pTregs : la cellule présentatrice d'antigène tolérogène (APCtol). Le plus souvent il s'agit d'une cDC et plus rarement d'une pDC ou d'un B. La particularité commune à toutes les APCtol est le niveau suboptimal de molécules de co-stimulation à leur surface et/ou la faible capacité de présentation des antigènes. Il a par ailleurs été démontré que la présentation d'antigènes par des DC à l'état basal est fortement tolérogène (Probst et al., 2003). Cette induction de tolérance est dépendante des interactions entre les DC à l'état basal et les Tregs, la perte du CMH-II entraînant une activation auto-immune des CD8 mortelle (Muth et al., 2012). En plus de ces caractéristiques, les APCtol produisent des facteurs solubles tels que l'acide rétinoïque qui facilite et maintient l'acquisition du phénotype régulateur en particulier dans l'intestin (Coombes et al., 2007). L'induction de pTregs par le TGF $\beta$  passe par la dimérisation de Smad2 ou Smad3 avec Smad4 (Takimoto et al., 2010). Trois régions non codantes conservées (RNC1, 2 et 3) permettent la liaison de ces dimères sur le promoteur de *foxp3* et induisent son expression. Il a été démontré que si RNC2 et 3 sont nécessaires aux deux types de Tregs, RNC1 est dispensable pour les tTregs

mais nécessaire à la génération de pTregs ce qui suggère des mécanismes d'induction différents, bien que tous deux dépendants du TGF $\beta$  (Zheng et al., 2010). Les mêmes auteurs démontrent que RNC2 est nécessaire au maintien de l'identité régulatrice aux cellules filles d'une Treg et que cette « mémoire régulatrice » est potentialisée par la présence d'ADN CpG, ce qui suggère que le maintien de la tolérance centrale est assuré en périphérie. S'il est clair que le TGF $\beta$  est la cytokine essentielle au développement des pTregs, il a été démontré que l'IL-10 a un rôle de facilitateur pour la conversion de CD4 naïfs en Tregs et favorise leur expansion (Hsu et al., 2015). Alors que l'IL-10 n'est pas indispensable à leur émergence, elle est en revanche indispensable (avec le TGF $\beta$ ) pour la fonction régulatrice des pTregs (Verhagen et al., 2014). En effet, le mode d'action des tTregs et pTregs est assez similaire mais il présente un certain nombre de différences. La plus flagrante étant le répertoire de ces deux compartiments l'un spécifique du soi, l'autre davantage biaisé vers les antigènes du non-soi (Haribhai et al., 2011). Par ailleurs, à spécificité égale, il a été démontré que les pTregs sont des cellules régulatrices beaucoup plus efficaces que leurs équivalents naturels (Huang et al., 2013). Plusieurs molécules ont été proposées pour départager efficacement les Tregs centraux des Tregs périphériques tels que le facteur de transcription Helios (IKZF2 chez l'Homme (Thornton et al., 2016)) ou la neuropilline-1 (nrp1 (Yadav et al., 2012)). Cependant, si ces deux molécules sont encore très utilisées aujourd'hui, leur spécificité pour l'un ou l'autre des sous types de Tregs est de plus en plus remise en cause.

La différenciation de la partie régulatrice de la population des lymphocytes B n'a pas lieu dans un organe central dédié comme le thymus mais est principalement acquise en périphérie. Ces cellules présentant des propriétés anti-inflammatoires, sont dénommées Breg et sont caractérisées par la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, l'IL-35 ou le TGF- $\beta$ . Plusieurs sous-groupes de B phénotypiquement distincts sont capables de régulation, mais le plus représenté et classiquement associé aux Breg est CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> CD1d<sup>hi</sup> IL-10<sup>+</sup> TGF- $\beta$ <sup>+</sup>. Toutefois, seule leur fonction permet de définir une B comme régulatrice dans la mesure où il n'existe pas de facteur de transcription qui signerait leur destin, à la manière de foxp3 pour les Tregs. Les Bregs sont induites à partir de B immatures dans un environnement cytokinique adéquat. Si les Bregs sont présentes à l'état basal chez la souris et chez l'Homme, leur nombre est considérablement augmenté en condition inflammatoire (Mizoguchi et al., 2002), plaçant l'inflammation comme un contexte nécessaire à leur émergence. Les cytokines inflammatoires IL-1 et IL-6 seraient nécessaires et suffisantes pour l'augmentation des B régulatrices *in vivo* (Rosser et al., 2014a). Les mêmes auteurs mettent en avant le rôle prééminent du microbiote, en particulier digestif, pour la génération de Bregs. D'autres cytokines pro-inflammatoires sont également capables de concourir à cet effet, comme l'IL-21 ou encore le GM-CSF (Rafei et al., 2009a; Tedder and Leonard, 2014). De plus, l'IL-35 est également capable d'induire ces cellules, or il est connu que cette cytokine anti-inflammatoire n'est produite exclusivement qu'en conditions inflammatoires (Li et al., 2012b; Wang et al., 2014). Toutefois, on ne sait toujours pas dans quelle mesure ces cytokines participent à l'expansion d'une population de Bregs discrète

déjà différenciée ou plutôt à l'induction de Bregs *de novo*. La spécificité du BCR de ces cellules est également activement impliquée dans l'induction et l'efficacité de leur fonction régulatrice. Ainsi, des souris transgéniques ne présentant qu'un BCR non spécifique ont un nombre de Breg diminué de presque 90% et ces cellules sont incapables de contenir correctement une inflammation (Fillatreau et al., 2002). Une étude plus récente a démontré que les Bregs émergent d'une population ayant déjà expérimenté l'engagement de leur BCR par un antigène, et qui est caractérisée par son expression de CD40 (Kleffel et al., 2015). De fait, il n'est pas surprenant que les animaux déficients en CD19, qui participe à la signalisation du récepteur B, aient un phénotype semblable aux souris avec un BCR non pertinent (Yanaba et al., 2008). De façon intéressante, ces auteurs démontreront un an plus tard que l'émergence des Bregs est indépendante de la présence des lymphocytes T (Yanaba et al., 2009). En effet, des cellules CD1d<sup>+</sup>CD5<sup>hi</sup>IL-10<sup>+</sup> sont présentes chez des souris « nudes » en quantité même plus importante que chez les souris WT et de façon indépendante de la présence des CMH-I, -II ou CD1d. Les récepteurs innés de la famille des TLR sont également des partenaires importants pour les Bregs, et le protocole assez standard pour leur induction passe par la stimulation avec du LPS. Toutefois, il a été démontré que le nombre de Bregs chez des animaux stériles (condition germ-free) est parfaitement comparable à celui des animaux élevés dans des conditions standards (Yanaba et al., 2009). Cela est également vérifiable chez des animaux MyD88<sup>-/-</sup> (DiLillo et al. 2010).

Le peu de recouvrement des répertoires régulateurs inné et acquis, à la fois pour les T et les B, tend à montrer que l'existence de ces deux systèmes tolérogènes va bien au-delà de la simple répartition des tâches et que le maintien de l'homéostasie immune dépend de la bonne coopération entre la tolérance centrale et la tolérance périphérique. La grande différence entre ces deux systèmes réside dans le fait que, si la tolérance centrale est strictement irréversible, la tolérance périphérique repose sur la flexibilité du phénotype de certaines cellules matures.

#### **d) Les sites immuno-privilegiés**

Trivialement, la réponse immunitaire se caractérise par la rougeur, le gonflement, la chaleur et la douleur au niveau de la zone inflammée. Cela est directement en lien avec la vasodilatation et l'épanchement variable de sérum qui accompagne l'entrée des cellules immunitaires dans le tissu. De fait, les tissus souffrent en fonction de l'importance de l'œdème qu'ils subissent. Dans l'écrasante majorité des tissus, cela ne pose pas de problème majeur et les dommages tissulaires seront réparés à la fois par le système immunitaire à la fin de la réponse immune mais également par les cellules souches en charge du maintien de l'intégrité de l'organe. Toutefois, pour un certain nombre d'entre eux, ni l'œdème ni les dommages tissulaires ne sont permis, car l'organe est retenu dans un espace inextensible (le cerveau, la moelle épinière ou encore les yeux) ou parce que le risque de conséquence à long terme est trop important (les testicules, les ovaires, l'utérus ou l'interface materno-fœtale). Ces tissus partagent de plus la

caractéristique d'avoir des capacités mitotiques assez faibles ce qui est incompatible avec une réponse immunitaire normale. Anciennement nommés sanctuaires immunitaires, il a longtemps été pensé que le système immunitaire était tout simplement exclu de ces organes, ce qui se traduisait par une tolérance passive. L'idée de sanctuaire immunitaire a plus d'un siècle et restera du domaine de la curiosité jusqu'au début des années 50 avec les travaux de Peter Medawar (Medawar, 1948).

L'hypothèse que le statut immuno-privilegié soit assuré par la présence de barrière entre la circulation et le site immuno-privilegié est ancienne. Dès le début du siècle dernier, l'utilisation de colorants permet ainsi d'identifier la barrière hémato-testiculaire, -rétinienne, -folliculaire (ovarienne) et -utérine. L'étude plus poussée de ces différentes singularités les révèle fonctionnellement, cellulièrement et moléculairement assez semblables et il est alors proposé de les nommer barrières hémato-tissulaires (Takata et al., 1990). Bien qu'il existe des barrières de type endothélial et épithélial, elles sont toutes caractérisées par la présence de jonctions serrées et d'une polarisation baso-apicale marquée par des transporteurs actifs spécifiques. De fait, seules certaines molécules peuvent entrer dans l'organe (comme c'est le cas pour le glucose par Glut1). La présence de cet obstacle empêche donc la libre circulation des cellules échantillonnant régulièrement le milieu par pinocytose or c'est majoritairement par ces mécanismes que les APC capturent et présentent aux CD4 et CD8 les antigènes libres du milieu (Platt et al., 2010). De fait, les barrières permettent une certaine séquestration de l'antigène dans le tissu, ce qui contribue à l'isoler du système immunitaire classique (Franke-Fayard et al., 2010; Streilein, 1993; Taglauer et al., 2010). Par ailleurs, les sites immuno-privilegiés possèdent des mécanismes permettant de les défendre contre l'entrée éventuelle des cellules immunitaires activées. En effet, Fas-L est constitutivement exprimé par les cellules stromales de la rétine, les cellules de Sertoli dans les testicules et au niveau des astrocytes de la barrière hémato-encéphalique (Bechmann et al., 1999; Lee et al., 1999; Matsumoto et al., 2015). Cette expression conduit à la mort systématique de toutes les cellules Fas+ qui pourraient entrer, soit la majorité des cellules immunitaires activées. De plus, le transfert de Fas-L dans certains organes suffit à leur conférer le statut de site immuno-privilegié (Li et al., 1998; Schmid et al., 2000), prouvant que Fas-L est activement impliqué dans le maintien du statut de site immuno-privilegié. D'autres molécules comme TRAIL ou CD200 sont constitutivement exprimées dans certains sites immuno-privilegiés pour remplir ce même rôle (Copland et al., 2007; Wosik et al., 2007).

Si les sites immuno-privilegiés sont relativement inaccessibles au système immunitaire dit classique, ils ne sont pas pour autant dépourvus d'immunité. Ils possèdent en effet une immunité humorale connue depuis assez longtemps par le biais de peptides antimicrobiens (Fleming and Allison, 1922). Les recherches de cellules capables d'immunité sont restées longtemps infructueuses. Les premières à être décrites sont des macrophages périvasculaires (PVM) qui siègent à la lisière des pieds des astrocytes (Harrison, 1978). Depuis le début des années 90, ils sont d'ailleurs compris dans la barrière hémato-tissulaire du système



nerveux central. Des macrophages périvasculaires semblables seront également retrouvés au niveau de d'autres sites immuno-privilegiés dans les années qui suivront. Ces cellules expriment constitutivement le CMH-II et cette expression peut être augmentée après exposition à l'IFN $\gamma$  ou au TNF $\alpha$  (Lassmann et al., 1991), à l'EAE, à des dommages neuronaux ou à des niveaux cliniques et sub-cliniques de la maladie du greffon contre l'hôte (Hickey and Kimura, 1987). La particularité de ces cellules est que le CMH exprimé est de la famille des HLA-G, qui sont une classe tolérogène (Wiendl et al., 2005). La microglie retiendra davantage l'attention pour son rôle d'APC. Son rôle immunitaire est en partie commun avec celui des macrophages avec lesquels la microglie partage un ancêtre embryonnaire commun (Kreutzberg, 1996) et sont caractérisées par F4/80, CD11b+, CD45+ et CD86+. À l'état basal, la microglie est capable de phagocytose mais ne présente que peu de récepteurs à l'exception de PRR et produit des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, le TGF $\beta$ 1 et l'IL-1R $\alpha$  (Kiefer et al., 1998). L'activation par des pathogènes ou des cellules mortes induit l'expression de CD40L et du CMH-II HLA-G ce qui fait d'elles des cellules présentatrices d'antigènes tolérogènes résidentes du système nerveux central (Gerritse et al., 1996; Wiendl et al., 2005). Toutefois, si les conditions inflammatoires sont fortes, comme dans le cas de l'encéphalite expérimentale auto-immune ou de la sclérose en plaques, la microglie peut devenir un stimulateur efficace de l'immunité de type Th1 en produisant de l'IL-12 (Aloisi et al., 1997). De façon intéressante, des connexions avec le système lymphatique ont été trouvées dans de nombreux sites immuno-privilegiés comme les testicules ou le cerveau ce qui pourrait mener à la révision ou à la découverte de nouveaux processus qui concourent au statut assez spécial de ces organes (Louveau et al., 2015; Orlandini et al., 1979).

Le corollaire de ce privilège consiste en un certain nombre de dangers. L'accumulation d'antigènes du soi et du non soi dans ces organes sont autant de risques latents, qui peuvent être libérés si le statut est perdu par exemple si les barrières hémato-tissulaires sont compromises. Contrairement aux organes non privilégiés qui sont protégés par la mise en place et l'entretien de la tolérance à leur égard, aucune tolérance centrale ne concerne les antigènes des sites immuno-privilegiés. Par conséquent, si ces antigènes sont exposés, ils sont considérés comme des éléments du non-soi. Il s'ensuit une réponse immunitaire violente comme par exemple dans la sclérose en plaques. Le but du traitement de ces maladies est alors d'arrêter la réponse immunitaire au niveau de l'organe et de rétablir son statut immuno-privilegié.

## *ii) Régulation par des cellules immatures*

L'idée de la régulation immunitaire par des cellules immatures est récente mais pas nouvelle et repose sur de solides bases théoriques et expérimentales. À l'heure actuelle, plusieurs thérapies sont déjà bien décrites chez l'animal et les essais cliniques chez l'Homme sont déjà en cours pour certaines

populations. Notre laboratoire a par ailleurs décrit plusieurs populations efficacement régulatrices *in vivo* dans plusieurs modèles pathologiques murins.

### a) Les MDSC

Les MDSC sont les cellules immatures régulatrices les plus anciennement utilisées en thérapie immunitaire. Il s'agit d'une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures issues de la moelle osseuse et incapables de terminer leur différenciation en cellules myéloïdes matures. Leur différenciation dépend de différents facteurs tels que l'IL-6, le M-CSF, le GM-CSF, l'IFN $\gamma$  et le TGF $\beta$  (Serafini et al., 2004b; Sinha et al., 2007). Elles se caractérisent par le phénotype CD11b<sup>+</sup> CMH-II<sup>-/lo</sup> et se divisent en deux grands groupes suivant qu'elles sont Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> (granulocytaire) ou Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup> (monocytaires). Ces deux sous-types montrent des capacités de migration et de protection propres et sont induites de manière différentielle suivant l'altération immunologique considérée. Les MDSC circulent à bas bruit à l'état basal chez la souris et l'Homme et se multiplient intensément en cas d'inflammation ou de cancer. Du fait de leur fort potentiel immunosuppresseur *in vivo* dans le cancer, l'idée de fonder une thérapie cellulaire sur les MDSC pour réguler l'auto-immunité ou l'inflammation chronique a été envisagée dès le début des années 2000. Les MDSC se sont avérées être des régulatrices efficaces chez la souris dans de nombreuses pathologies auto-immunes telles que le diabète de type I (Chou et al., 2012), l'encéphalite auto-immune expérimentale (Ioannou et al., 2012), l'arthrite rhumatoïde (Fujii et al., 2013) le lupus érythémateux (Iwata et al., 2010) ou encore les inflammations chroniques de l'intestin (Zhang et al., 2011). Les MDSC sont capables de réguler l'activité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> *in situ* par différents moyens. Ils peuvent soit diminuer leur activation par la réorientation de la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de Th17 vers Th1 ou Th2 soit ralentir leur prolifération (Fujii et al., 2013). Les MDSC ont un rôle complémentaire de régulation plus directe qui comprend l'induction de Tregs en particulier à l'aide de l'arginase I et la production de facteurs solubles comme l'IL-10, le TGF $\beta$  ou encore l'oxyde nitrique (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Leurs mécanismes d'action sont toutefois dépendants de chaque pathologie considérée qui induit l'émergence préférentielle d'une sous-population de MDSC spécifique, la production de ROS étant par exemple spécifique de la population monocytaire (Youn et al., 2008).

Toutefois, la littérature est très conflictuelle à leur sujet et des équipes ont pu obtenir des résultats variables pour chacune des pathologies où les MDSC avaient été trouvées protectrices démontrant cette fois une absence d'effet voire un rôle aggravant de ces cellules notamment par l'induction de Th17 *in vivo* par exemple dans l'arthrite rhumatoïde (Guo et al., 2015) ou encore l'encéphalite auto-immune expérimentale (King et al., 2009; Mildner et al., 2009). De façon intéressante, il semble que les MDSC se différenciant *in vivo* en réponse à la maladie sont peu ou pas profitables aux animaux malades là où les cellules induites *ex vivo* à partir de la moelle osseuse s'avèreraient de meilleures régulatrices bien que cela reste controversé. Cela

souligne la compréhension imparfaite de ces cellules et le fait que certains facteurs encore inconnus sont susceptibles de compromettre le rôle régulateur des MDSC. Des essais cliniques de suppression des MDSC dans le cancer sont en cours et semblent plutôt prometteurs (Naiditch et al., 2011; Tobin et al., 2017) en revanche l'essai de transfert adoptif pour la régulation la sclérose en plaques s'est révélé n'avoir aucun effet bénéfique pour les patients et était régulièrement associé à une toxicité rénale non négligeable (Nash et al., 2015). D'autres essais sont actuellement en cours.

## **b) Les MSC**

Les cellules souche mésenchymateuses (MSC) sont des cellules très immatures de type mésodermale issues de la moelle osseuse caractérisées par le phénotype  $CD45^-CD105^+CD73^+CD90^+$  (Dominici et al., 2006) et qui sont capables de se différencier en adipocytes, en chondrocytes ou en ostéoclastes. Elles sont également dénommées cellules stromales mésenchymateuses dans la mesure où certaines équipes trouvent leur potentiel « souche » trop limité pour mériter cette appellation. Les MSC ont pu être utilisées dans une grande variété de modèles pathologiques comprenant des modèles génétiques de défaut de la moelle osseuse, des dégâts de la moelle épinière ou même des infarctus du myocarde et se sont révélées très compétentes pour améliorer toutes ces pathologies. Il est apparu évident que les effets bénéfiques à long terme ne pouvaient pas être seulement attribués à leur capacité de réparation dans la mesure où les cellules greffées ne survivaient pas très longtemps chez l'hôte (Hofstetter et al., 2002; Horwitz, 2001; Iso et al., 2007). Plus étonnant encore, les MSC ont été décrites comme capables de se différencier en cellules non issues du mésoderme telles que des cellules épithéliales ou des cellules nerveuses (Herzog et al., 2003). Plus tard, cette plasticité sera en partie expliquée par des contraintes issues du milieu et des événements de fusion cellulaire permettant aux MSC d'obtenir un potentiel donné (Gruh and Martin, 2009; Prockop and Oh, 2012). La source d'une telle plasticité est encore peu comprise et sujette à de vifs débats parmi les chercheurs. Toutefois, une partie de l'effet pléiotrope des MSC vient certainement du fait qu'elles sont capables de soutenir et de favoriser la différenciation des cellules hématopoïétiques, proposant donc qu'au moins un de leurs mécanismes d'action se fasse par le biais de la modulation du système immunitaire (Dexter et al., 1977). Cette hypothèse est corroborée par l'étude de réactions mixtes lymphocytaires (MLR) dans lesquelles les MSC empêche la prolifération des T sans apoptose démontrant un potentiel immunosuppresseur fort (Le Blanc et al., 2003). Des études de blocage des facteurs cellulaires par des anticorps sont parvenues à mettre en avant le rôle du  $TGF\beta$ , du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) mais également de la prostaglandine E2 (PGE2) (Aggarwal and Pittenger, 2005; Di Nicola et al., 2002). Les études *in vivo* dans un modèle de maladie du greffon contre l'hôte sont parvenues à démontrer que la modulation des lymphocytes T est également observable chez l'animal et que cette fonction passe par l'induction de la sécrétion d'IL-10 et d'IL-4 par les APC mais également la diminution de leur production de  $TNF\alpha$ , d'IFN $\gamma$  et d'IL-12. De fait cela

s'accompagne de la réorientation de la réponse immunitaire de type Th1 vers Th2. Par ailleurs, cela s'accompagne de la différenciation de Tregs à partir de cellules T naïves capables de changer de manière significative l'équilibre Th/Treg. Par ailleurs, contrairement aux observations réalisées dans le cadre de la MLR, l'équipe d'Akiyama démontre que les MSC induisent l'apoptose des T effecteurs activés par le biais de la liaison Fas/Fas-L, ce qui augmente la production de TGF $\beta$  par les macrophages et donc la polarisation Treg (Akiyama et al., 2012). Dans une étude plus récente, il a été démontré que l'induction de Treg est renforcée par la capacité des MSC à produireIDO et qu'une partie de la protection conférée par ces cellules est substantiellement abrogée par l'ajout d'un inhibiteur d'IDO (Waterman et al., 2010). De façon intéressante cette équipe démontre qu'une brève stimulation TLR3 est nécessaire à la mise en place de ce mécanisme. Par ailleurs, les MSC, après avoir été stimulées avec du TNF $\alpha$ , sont également capables de limiter la production de cytokines inflammatoires par les macrophages par l'abrogation du signal NF- $\kappa$ B dans ces cellules (Choi et al., 2011). Enfin, les MSC sont également capables de limiter la production d'IgM, IgA et IgG par les plasmocytes tout en les empêchant d'être recrutés aux ganglions en diminuant leur expression de CCR7, CXCR4 et CXCR5 sans pour autant induire leur apoptose (Corcione et al., 2006). Du fait de l'ensemble impressionnant de modalités immunitaires que les MSC peuvent réguler, elles ont été testées avec succès dans un grand nombre de pathologies inflammatoires chez la souris (colite, septicémie, encéphalite auto-immune expérimentale, maladie du greffon contre l'hôte, arthrite rhumatoïde entre autres) et un certain nombre d'entre elles sont également à l'essai chez l'Homme. À l'heure actuelle, l'étude de sécurité et d'efficacité des MSC pour le traitement de la sclérose en plaque (NCT02239393) est en phase II et un essai de phase I est actuellement en cours de recrutement pour le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (NCT01764100).

### **c) Les MPP**

L'utilisation de cellules hématopoïétiques très immatures pour le traitement de différentes pathologies a souvent pour but de « réinitialiser » le système immunitaire, comme c'est le cas avec le transfert adoptif d'HSC qui sera approfondi dans la présentation de chacun des modèles pathologiques présentés. Toutefois, il est démontré en 2006 qu'il est possible d'induire la prolifération de Tregs par le transfert de cellules souches hématopoïétiques autologues à des patients jeunes atteints d'arthrite idiopathique. Par ailleurs, les mêmes auteurs observe la déviation immunitaire des cellules pro-inflammatoires (IFN $\gamma$ +) vers un phénotype régulateur (IL-10+) conduisant à une amélioration sensible de la maladie (Kleer et al., 2006). La même année, le laboratoire de Flora Zavala démontre que des précurseurs hématopoïétiques Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup> (LSK) mobilisés par un cocktail de G-CSF et de Flt3L de la moelle osseuse à la rate sont capables d'induire la prolifération des Tregs *in vivo* dans un modèle de diabète de type I, ce qui protège de manière significative les souris diabétiques non obèses (NOD) de la survenue de la maladie (Kared

et al., 2006). La mise en place de cette protection est directement dépendante de la mobilisation de ces MPP, leur équivalent médullaire non mobilisé n'en étant pas capable. Cet effet est en grande partie dû à des contacts cellulaires dépendant de l'expression de Jagged2 sur les cellules mobilisées qui interagit avec Notch3 sur les Treg périphériques. Les expériences de transwell ne permettront pas l'abolition de la prolifération des Tregs ce qui suggère l'implication d'un ou plusieurs facteurs solubles, distinct de TGFβ1. Deux ans plus tard, l'équipe démontre le rôle essentiel du GM-CSF comme facteur soluble participant à l'induction de la prolifération des Tregs. En effet, les Tregs sont sensibles au GM-CSF par la chaîne α de son récepteur (CD116) ce qui induit leur expansion de façon indépendante de la présence d'IL-2 (Kared et al., 2008). Les Tregs ainsi obtenus sont plus efficaces que leur équivalent n'ayant pas reçu un signal GM-CSF pour induire la régulation du diabète chez la souris NOD. Plus récemment, l'équipe de David Artis a mis en évidence l'induction d'une population de cellules de type MPP (Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>int</sup>Sca-1<sup>+</sup>) suite à une inflammation par un helminthe gastro-intestinal et à la production d'IL-25 qui l'accompagne (Saenz et al., 2010). Ces cellules sont capables d'induire la production de cytokines de type Th2 (à la fois l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13) au niveau des tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT), ce qui les conduit à dénommer ces cellules des MPP<sup>type2</sup>. Le transfert de ces cellules et la production de cytokines de type Th2 qu'elles induisent sont suffisants pour protéger des animaux sensibles (IL-17e<sup>-/-</sup>) de l'infection par l'helminthe. Par ailleurs ces cellules sont préférentiellement capables de se différencier en monocytes/ macrophages et granulocytes *in vivo* et *in vitro*. Ce biais peut suggérer que ces MPP<sup>type2</sup> sont distincts des ILC et seraient des MPP2.

#### **d) Les CpG-ProB**

S'il est assez bien connu que la stimulation des lymphocytes B matures est susceptible de faire émerger des Bregs, l'équivalent a pu être démontré avec des B immatures par notre laboratoire. Après une stimulation CpG, une population de type proB dénommée CpG-proB caractérisée par le phénotype c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> IgM<sup>-</sup> émerge dans la moelle osseuse à la fois *in vivo* et *in vitro*. Une fois injectées à des souris NOD, ces cellules sont capables de protéger environ 60% des animaux de l'apparition des signes cliniques du diabète de type I jusqu'à 50 jours post greffe (Montandon et al., 2013). Ces cellules migrent en premier lieu au pancréas puis secondairement à la rate mais peu aux ganglions. Après un signal inflammatoire produit par les lymphocytes T diabétogènes, les CpG-proB régulent la progression de l'inflammation par deux mécanismes complémentaires. Tout d'abord, après réception du signal IFNγ produit par les lymphocytes T activés, les CpG-proB augmentent l'expression à leur surface de Fas-L qui va induire la mort par apoptose des cellules T activées. La descendance des CpG-proB sont des cellules B matures exprimant également fortement Fas-L, ce qui entretient la perte des T à long terme. Par ailleurs, la production d'IFNγ directement par les CpG-proB est capable de rediriger la production cytokinique des cellules T survivantes en réorientant leur production d'IL-21, cytokine pathogène centrale du diabète auto-immun, vers la production d'IFNγ. La

production initiale d'IFN $\gamma$  par les CpG-proB est essentielle à leurs capacités protectrices, leurs équivalents IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> étant incapables de protéger les animaux de la survenue du diabète.

Les CpG-proB sont également capables de limiter les symptômes de l'encéphalite auto-immune expérimentale alors même qu'elles sont injectées au début des signes cliniques (Korniotis et al., 2016). De façon très intéressante, bien que la population initiale soit identique, son mode d'action est très différent dans cette pathologie et dans le diabète de type I. Dans ce modèle, les CpG-proB migrent à la moelle épinière et aux ganglions drainants. Au sein de ces derniers, les progéniteurs produisent CCL19, le ligand de CCR7 porté par les lymphocytes T activés. Les T pathogènes sont retenus en périphérie, ne peuvent plus migrer au système nerveux central et, de fait, ne sont plus capables de causer la maladie. L'utilisation de progéniteurs issus de souris CCL19<sup>-/-</sup> démontre que cette chimiokine est en effet requise pour la rétention des T pathogènes et la protection qui s'ensuit. Par ailleurs, une fois parvenue à la moelle épinière inflammée, la descendance des CpG-proB devient capable de produire de l'IL-10 qui contribue à diminuer l'état inflammatoire de l'animal notamment en diminuant fortement la production de GM-CSF, d'IL-17 et d'IFN $\gamma$  par les T CD4<sup>+</sup> infiltrant la moelle épinière. De façon complémentaire, la production d'IL-10 à la fois au site inflammatoire et au ganglion lymphatique drainant est augmentée dans les CD4 mais également dans la population B220<sup>+</sup> du receveur. Les CpG-proB sont par ailleurs capables d'augmenter le ratio Treg/Teff à la fois dans la moelle épinière et dans les ganglions et ces Tregs présentent des niveaux légèrement plus élevés de foxp3, ce qui est associé à une fonction régulatrice accrue. À nouveau, les progéniteurs sont capables de se différencier en B matures et l'utilisation de précurseurs issus de souris Rag<sup>-/-</sup> démontre que tant la cellule immature que sa descendance sont nécessaires respectivement pour la mise en place et l'entretien de la protection à long terme contre la maladie. Enfin, du fait du rôle prépondérant de l'IFN $\gamma$  pour la capacité préventive des CpG-proB dans le modèle du diabète de type I, l'investigation du rôle de cette cytokine dans la protection face à l'encéphalite auto-immune expérimentale apparaît essentielle. À nouveau, l'utilisation de progéniteurs issus de souris IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> abolit les capacités protectrices des progéniteurs qui ne sont plus capables de diminuer les signes cliniques de la pathologie ni par la séquestration des T en périphérie, ni par la diminution des cytokines encéphalitogènes au site inflammatoire. De la même façon, l'utilisation de souris donneuses IL-10<sup>-/-</sup> démontre que la production de cette cytokine par les progéniteurs et leur descendance est indispensable pour les capacités anti-inflammatoires des CpG-proB.

#### **e) Les cellules dendritiques conventionnelles immatures**

Les cellules dendritiques sont, du fait de leur position de pivot dans l'immunité adaptative, des cellules régulatrices extrêmement puissantes. Comme déjà discuté précédemment, les cellules dendritiques qui ne sont pas capables de fournir en quantités suffisantes les trois signaux requis pour l'activation des T induisent leur anergie et, si le microenvironnement s'y prête, les convertissent en Tregs. C'est l'apanage des

cellules dendritiques immatures d'induire ce type de régulations. Dans certains cas, ces cellules sont incapables de pleinement se différencier et conservent ce phénotype immature y compris dans des conditions inflammatoires. Ces cellules sont alors dénommées DC tolérogènes (tolDC) et sont les piliers de nombreuses régulations immunitaires. Outre leur faible capacité de présentation de l'antigène et une absence quasiment complète de molécules de co-stimulation, les tolDC sont capables de produire un large spectre de cytokines anti-inflammatoires dont l'IL-10 et le TGF $\beta$  sont les figures de proue. Leur fonction sera revue en détail dans chacun des modèles pathologiques présentés. Dès 2001, un essai clinique mené sur des sujets sains démontre la faisabilité et la sûreté des tolDC chez l'Homme (Dhodapkar et al., 2001). Bien que ces cellules soient encore de découverte récente, plusieurs essais cliniques utilisant des DC tolérogènes sont en cours dans de nombreuses pathologies humaines, en particulier auto-immunes. Deux essais cliniques utilisant ces cellules respectivement pour le traitement du diabète de type I (Giannoukakis et al., 2011) et le traitement de la maladie de Crohn (Jauregui-Amezaga et al., 2015) ont passé avec succès la phase I et sont actuellement en phase II. D'autres essais contre une large variété de maladies sont actuellement en cours de recrutement et devraient permettre de fournir à terme un panorama du paysage régulateur permis par les tolDC. Une approche différente dite vaccinale (tolDC spécifiques d'un antigène) est à l'étude chez les primates non-humains pour induire une régulation forte et de longue durée dans le cas de la greffe d'organe solide. Ce protocole pourrait être une excellente alternative à l'immunosuppression générale pas toujours parfaitement efficace qui est actuellement disponible pour les patients.

#### **f) Utilisation de pDC immatures**

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes matures sont connues pour être dans de nombreux cas d'assez bonnes cellules régulatrices. Leur équivalent immature est encore relativement peu étudié. Il est connu depuis les années 2000 que les pDC migrent depuis les organes lymphoïdes secondaires vers les tumeurs primaires où elles produisent de l'IFN $\beta$  mais très peu d'IFN $\alpha$ . Certaines équipes ont pu définir ces cellules nouvellement décrites comme immatures sur le seul critère de leur fonction incomplète et de leur morphologie ronde, ce qui ne semble plus correct dans l'état actuel des connaissances (Fiore et al., 2008; Vermi et al., 2003). Encore aujourd'hui il existe une imprécision dans la définition de l'immaturité des pDC et deux critères coexistent : les cellules immatures d'un point de vue fonctionnel et celles qui le sont au regard de leur développement. Les pDC sont des présentatrices d'antigènes médiocres qui présentent à l'état basal des niveaux extrêmement faibles de molécules de co-stimulation ainsi qu'un niveau modeste de CMH-II. Après stimulation, seule une sous-population est capable d'augmenter son expression membranaire de molécules de co-stimulation et de CMH-II (Zhang et al., 2017). Cette population est fonctionnellement et transcriptionnellement distincte des cellules dendritiques plasmacytoïdes classiques en ce qu'elle ne produit pas d'IFN de type I, présente un équilibre IRF7/IRF5 inversé et est une présentatrice d'antigènes efficace

capable d'induire la prolifération et l'activation des lymphocytes T CD4+ *in vitro*. À ce titre, ces cellules se rapprochent davantage des précurseurs de cDC et sont certainement à distinguer des pDC *bona fide*. Par ailleurs, il est connu que les pDC peuvent présenter un épuisement fonctionnel après, par exemple, une stimulation TLR9 trop intense (Gray et al., 2007). La définition de leur immaturité par leur fonction est donc délicate et ne peut souvent pas être corrélée à une immaturité développementale, comme cela peut être le cas pour les DC conventionnelles. Dans la littérature étudiant les pDC immatures, cette caractérisation repose majoritairement sur leur fonction ou leurs molécules de co-stimulation et peu d'équipes se sont intéressées aux pDC immatures d'un point de vue de leur développement. Par exemple, l'équipe d'Eugene Butcher démontre en 2008 que l'injection de 200 000 pDC CCR9+ ganglionnaires définies comme immatures au regard de leurs molécules de co-stimulation sont capables d'empêcher la survenue de la maladie du greffon contre l'hôte dans un modèle murin d'allo-réactivité complète (Balb greffé dans B6). Ces cellules sont capables de migrer en réponse au CCL25, de produire de l'IFN $\alpha$  et du TNF $\alpha$  en réponse à une activation CpG et de limiter la production d'IL-17 par les lymphocytes T. Ces pDC CCR9+ sont également capables d'induire des Tregs *in vivo* et ces derniers permettent la suppression de la prolifération T dans une MLR. Une autre étude menée par l'équipe de Hill propose une approche différente et démontre que la suppression des pDC de la moelle osseuse, contenant les pDC immatures, accélère la maladie du greffon contre l'hôte, alors que l'élimination des pDC matures ne change pas le cours de la pathologie (Banovic et al., 2009). Ils démontrent assez élégamment que ces cellules CD11<sup>low</sup>Bst2<sup>+</sup> sont restreintes au lignage pDC *in vivo* chez un hôte malade, mais peuvent en revanche donner des pDC et des cDC matures *in vivo* chez un hôte sain et *in vitro*. De façon étonnante, ces cellules présentent des niveaux assez forts de molécules de CD80/86 et de CMH-II mais sont capables d'inhiber la prolifération des CD4+ et des CD8+ par contact cellulaire. Enfin, la déplétion de ces cellules par l'injection d'un anticorps neutralisant contre Bst2 aggrave la maladie du greffon contre l'hôte chez les animaux. La protection contre la maladie par transfert adoptif de ces cellules n'a cependant pas été démontrée et de nombreux points mécanistiques restent à éclaircir. Malgré l'intérêt de ces travaux, ils ne connaîtront malheureusement pas de suite et à l'heure actuelle aucun essai clinique utilisant des cellules plasmacytoïdes immatures n'est ouvert.



## II/ Présentation des pathologies étudiées

Afin d'envisager les capacités régulatrices de la population de précurseurs de cellules dendritiques plasmacytoïdes étudiée dans ce travail, nous avons choisi de travailler dans deux contextes immunitaires distincts. Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à la régulation en fonction du type de pathologie immunitaire étudiée : auto-immune et allo-réactives. De nombreux modèles pour ces deux types de pathologies sont disponibles. Dans la mesure où nous voulons apprécier les limites de la protection mise en place par ces cellules, nous avons choisi de travailler avec un modèle assez localisé et un autre plus systémique, tous deux bien établis dans la littérature. Tout d'abord, l'Encéphalite Auto-immune Expérimentale, un modèle murin de sclérose en plaques, qui est assez proche de la maladie humaine sur de nombreux points, en particulier cellulaires. Ce modèle est par ailleurs spatialement assez restreint, la majorité de la pathologie se déroulant au niveau d'un site inflammatoire unique qu'est la moelle épinière. Afin de tester les limites des capacités régulatrices mais également les variations qui pourraient exister dans le fonctionnement de la protection par les cellules d'intérêt, nous avons choisi d'étudier un autre modèle très différent du premier. Pour cela, nous avons sélectionné la maladie du greffon contre l'hôte dans un modèle parent dans descendant. Cette pathologie est à la fois allogénique et systémique, caractérisée par une inflammation très violente. Par ailleurs, le modèle parent dans descendant se rapproche assez des protocoles mis en place chez l'Homme actuellement. De plus, ces deux modèles sont représentatifs de maladies relativement fréquentes chez l'Homme dans lesquelles l'utilisation à des fins thérapeutiques de l'équivalent humain des cellules d'intérêt est donc envisageable.

### **1) Un modèle de sclérose en plaques : l'Encéphalite Auto-immune Expérimentale (EAE)**

#### *i) Épidémiologie et étiologie de la sclérose en plaques*

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique du système nerveux central (SNC) et est la première cause d'invalidité non traumatique du jeune adulte (moins de 40 ans). Elle se caractérise par une démyélinisation multifocale « en plaques » par poussées inflammatoires successives tant de la matière blanche que de la matière grise du patient. D'un point de vue cellulaire, la SEP entraîne la perte progressive de la gaine de myéline qui induit à terme la perte des neurones des zones touchées. À l'heure actuelle la SEP reste le plus souvent caractérisée comme une maladie auto-immune liée à l'activation du répertoire auto-immun contre certains composants de la gaine de myéline. En France, plus de 100 000 personnes sont touchées par la SEP, avec une pénétrance dans la population de 1/1000. 400 000 personnes sont atteintes en Europe et 2.3 millions dans le monde (chiffres ARSEP 2017). Par ailleurs, la SEP est une maladie à prévalence féminine (sexe ratio 3/1) bien que les formes masculines soient plus agressives.

Il existe principalement deux formes distinctes de la SEP :

**La forme en poussée-rémission (RR-MS):** Il s'agit de la forme la plus commune (2/3 des cas).

La maladie évolue par crises successives avec une rémission presque totale des symptômes entre deux poussées.

**La forme progressive (P-MS):** Le patient n'a que peu ou pas de crise et son état physique se dégrade progressivement sans rémission. Cette forme de sclérose en plaques est assez difficile à soigner avec les traitements actuellement disponibles.

Dans 50-60% des cas, une SEP initialement en poussée-rémission devient progressive après plusieurs épisodes de crise. On parlera alors d'une forme secondairement progressive (**SP-MS**) qui survient lorsque le SNC n'est plus capable de compenser les pertes progressives de neurones. D'autres formes hybrides des deux premières sont plus rares mais possibles telle que la forme progressive avec présence d'épisodes critiques.

Les causes de la sclérose en plaques sont toujours débattues, en particulier la nature de l'élément déclencheur de la maladie qui semble être éminemment plurifactoriel. La cause génétique est évoquée dès les années 1970 du fait de la prévalence de la SEP dans certaines familles. Plusieurs gènes « à risque » sont mis en avant, bien que la prédisposition à la SEP soit supposée polygénique. De nouvelles approches génétiques globales ont pu démontrer l'implication possible de plusieurs gènes (CMH, TCR, Ig...) bien qu'aucune relation causale n'ait pu être trouvée. Toutefois, bien que favorable au déclenchement de la SEP, la seule cause génétique ne représente qu'entre 15% à 30% du risque de déclenchement de la maladie. En effet, une étude chez les jumeaux monozygotes et dizygotes a pu mettre en évidence que lorsqu'un des jumeaux monozygotes est atteint de SEP, l'autre jumeau a un risque modéré de développer lui-même la maladie (Tableau 1 et (Westerlind et al., 2014)). D'autres facteurs entrent en jeu, par exemple, il existe un gradient nord-sud dans le risque de SEP au sein de la population, révélateur de plusieurs facteurs environnementaux influençant l'apparition des symptômes, tels l'exposition aux maladies infectieuses à un jeune âge ou encore une carence en vitamine D. Il faut remarquer que les parasitoses chez un sujet jeune (moins de 15 ans) induisent une relative résistance vis-à-vis de la SEP du fait de l'induction de phénomènes régulateurs par la voie de l'acide rétinoïque entraînant la réorientation de la production cytokinique pro-inflammatoire (IL-6, IL-12, IL-23 et TNF- $\alpha$ ) vers la production d'IL-10 (Correale and Farez, 2013). À contrario, la cigarette, un régime riche en sel, le surpoids, ou encore la sédentarité sont des facteurs favorisant la survenue de la maladie du fait de l'induction de molécules pro-inflammatoires telles que la leptine. Toutefois, les facteurs environnementaux ne semblent pas être déterministes à toutes les périodes de la vie d'un individu : les études sur les populations de migrants quittant une zone de faible risque de SEP pour une

zone de fort risque et inversement ont pu mettre en évidence que l'environnement ne semble avoir de l'influence sur la susceptibilité individuelle que jusqu'à l'âge de 15 ans (Barnett et al., 2016).

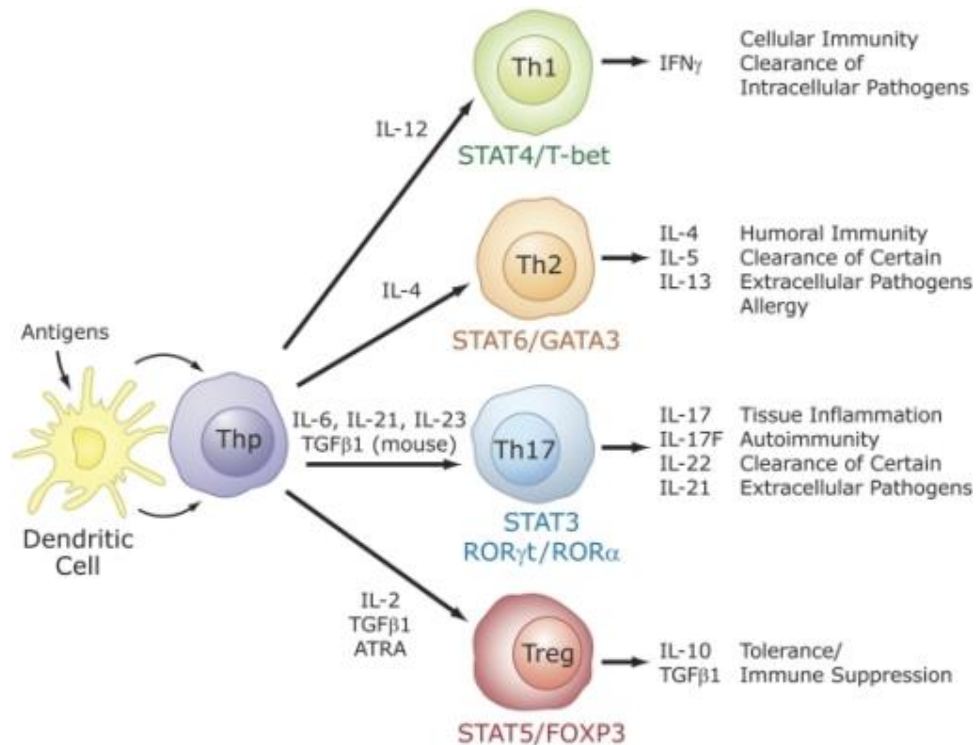
Proband Relative	Female			Male			Total		
	n (affected)	Crude risk (%)	Age-adjusted risk (%) (95% CI)	n (affected)	Crude risk (%)	Age-adjusted risk (%) (95% CI)	n (affected)	Crude risk (%)	Age-adjusted risk (%) (95% CI)
Monozygotic							78 (12)	15.38	17.26 (8.38–26.14)
Dizygotic							237 (4)	1.69	1.92 (0.00–0.38)
Child							43 078 (526)	1.22	2.03 (1.86–2.20)
Daughter	14 206 (251)	1.77	2.96 (2.60–3.32)	6 737 (107)	1.59	2.57 (2.09–3.05)	20 943 (358)	1.71	2.83 (2.54–3.12)
Son	15 003 (99)	0.66	1.12 (0.90–1.34)	7 132 (69)	0.97	1.55 (1.12–1.91)	22 135 (168)	0.76	1.26 (1.07–1.45)
Sibling							28 531 (652)	2.29	2.55 (2.09–3.01)
Sister	9 537 (288)	3.02	3.36 (2.98–3.74)	4 379 (136)	3.11	3.43 (2.86–4.00)	13 916 (424)	3.05	3.38 (3.16–3.60)
Brother	10 038 (136)	1.35	1.52 (1.13–1.78)	4 577 (92)	2.01	2.23 (1.77–2.69)	14 615 (228)	1.56	1.74 (1.51–1.97)
Maternal half-sibling							43 59 (62)	1.42	1.68 (1.26–2.10)
Sister	1 382 (29)	2.10	2.40 (1.26–2.94)	681 (13)	1.91	2.14 (0.96–3.32)	2 063 (42)	2.04	2.46 (1.72–3.20)
Brother	1 569 (12)	0.76	0.95 (0.52–1.49)	727 (8)	1.10	1.31 (0.41–2.21)	2 296 (20)	0.87	1.51 (0.96–2.06)
Paternal half-sibling							41 17 (44)	1.07	1.40 (0.99–1.81)
Sister	1 400 (16)	1.14	1.54 (0.79–2.29)	647 (10)	1.55	2.01 (0.78–3.24)	2 047 (26)	1.27	1.69 (0.99–1.81)
Brother	1 468 (10)	0.68	0.92 (0.35–1.49)	662 (8)	1.21	1.55 (0.05–2.62)	2 130 (18)	0.85	1.12 (0.60–1.64)
Adopted child							497 (2)	0.4	0.67 (0.00–1.58)
Adopted sibling							65 (1)	1.54	1.76 (0.00–5.18)
Adoption							562 (3)	0.53	0.84 (0.00–1.79)

**Tableau 1:** risques d'incidence de la SEP suivant le degré de parenté des personnes considérées. L'âge moyen de déclenchement de la sclérose en plaques est de 33.7 ans. Seuls les jumeaux monozygotes présentent une réelle augmentation du risque de développement de la sclérose en plaques si le premier est atteint. Données interprétées à partir du registre national suédois de la sclérose en plaques. Westerlind et al, Brain 2014.

Par ailleurs, certains virus sont également supposés être des facteurs de risques de la SEP. La maladie pourrait être une résultante, dans le cadre d'un terrain génétique favorable, de l'interaction du système immunitaire du patient avec certaines souches virales. Ainsi les herpès viridæ, en particulier le virus Epstein-Barr (EBV) ou le virus humain de l'herpès (HHV-6) sont, du fait de leur cycle en poussée-rémission des candidats idéaux. Ils sont, avec d'autres, associés à la maladie bien qu'il ne soit pas possible actuellement de déterminer avec certitude s'ils sont causes ou conséquences d'un dérèglement immunitaire. Il a ainsi été démontré que le liquide céphalorachidien (LCR) des patients atteints de SEP contient des anticorps anti-EBV (Castellazzi et al., 2010) et plus récemment qu'il est également possible d'y détecter l'ADN d'EBV (Cocuzza et al., 2014) bien que d'autres maladies neurodégénératives soient également associées à la détection de cet ADN viral. Par ailleurs, on a longtemps pensé que le virus de la rougeole et la SEP étaient étroitement liés, mais l'introduction du vaccin contre la rougeole n'a pas eu d'impact sur le nombre de cas de SEP dans les populations traitées (Ahlgren et al., 2009).

## ii) Développement de la maladie

La SEP est généralement considérée comme une maladie auto-immune induite par les lymphocytes T CD4+ (T CD4). Le développement de la maladie requiert plusieurs éléments essentiels : l'atteinte de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BBB) ainsi que l'activation du répertoire auto-immun du patient. Ces T CD4 résident en périphérie dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate ou les ganglions lymphatiques (LN) où ils sont activés par des cellules présentatrices d'antigène spécialisées (APC). L'activation complète du lymphocyte T auto-immun requiert la présence de l'antigène du système nerveux (un des composants de la gaine de myéline) présenté sur le CMH-II, des facteurs de co-stimulation (CD80/CD86, CD40) et des cytokines pro-inflammatoires. Ces lymphocytes activés vont se différencier en plusieurs sous classes effectrices (Teff) suivant les cytokines présentes lors de leur différenciation et migrer au SNC notamment grâce au récepteur de chimiokine CCR7 ainsi que grâce à différentes molécules d'adhésion (N-CAM, V-CAM,  $\alpha$ 1intégrine...). Chacune des sous-classes de Teff présente une signature transcriptionnelle et cytokinique propre qui définit leur activité biologique et donc leur rôle dans l'évolution de la maladie. Dénommés Lymphocytes T helper (Th), il en existe plusieurs sous-classes principales bien caractérisées, bien que de nouvelles classes continuent d'être découvertes à l'heure actuelle. Les principales sont résumées dans la Figure 8.



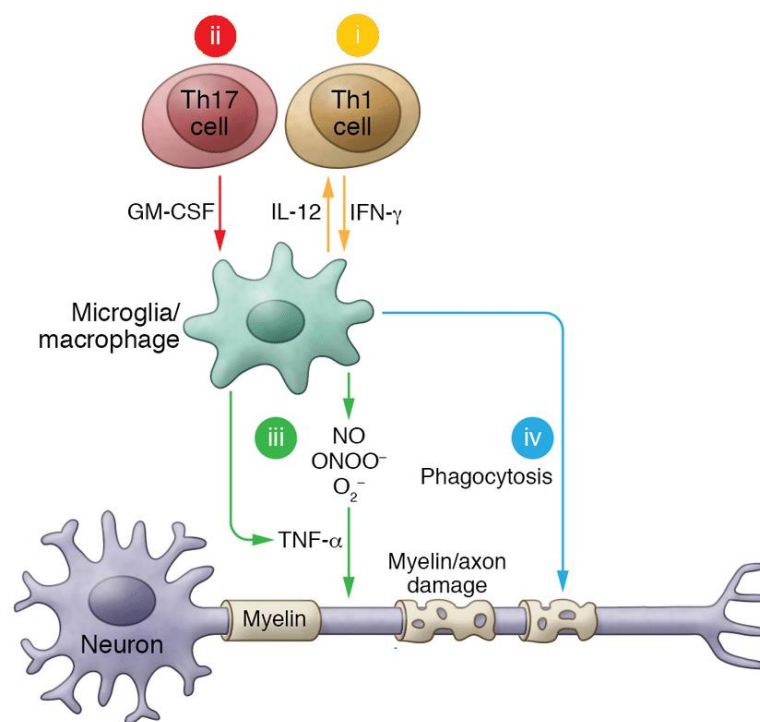
**Figure 8 :** La différenciation des CD4+ en différents lignages de Th1, Th2, Th17 et Treg est initiée par l'interaction entre les cellules dendritiques et un lymphocyte helper naïf (Thp). Les cellules effectrices sont caractérisées par leur synthèse cytokinique spécifique et leur fonction immuno-modulatrice comme indiqué à droite de la figure. Les cytokines avec des flèches pleines sont celles qui sont majoritairement associées au développement d'un lignage particulier. Les cytokines listées à droite des cellules sont les effecteurs principaux produits par chaque sous-type cellulaire une fois différencié. Thp : précurseur de T helper. (adaptée de Jetten et al, 2009).

## a) Le paradigme Th1/Th17

Il était initialement pensé que la SEP était une maladie liée aux Th1 dans la mesure où les souris IL-12p40<sup>-/-</sup> sont naturellement résistantes à l'induction de l'EAE, et que l'INF- $\gamma$  est retrouvé de manière systématique dans les lésions du SNC des patients. De plus, le traitement des patients atteints de SEP avec de l'INF- $\gamma$  induit une aggravation des symptômes (Panitch et al., 1987). Toutefois, en 2000 l'équipe d'Oppman démontre que si l'IL-12 est un hétérodimère composé des sous-unités p40 et p35, la sous-unité p40 peut s'assembler avec une autre sous-unité, p19, conduisant à la découverte d'une nouvelle cytokine : l'IL-23 (Oppmann et al., 2000). Les études déjà effectuées sur l'IL-12 sont alors remises en question, et l'équipe de Randolph Noelle démontre rapidement que si les souris p40<sup>-/-</sup> sont résistantes à l'EAE, les souris p35<sup>-/-</sup>  $\gamma$  sont sensibles à un degré encore plus important que les souris WT. De fait l'IL-12 est vue comme dispensable pour la mise en place de l'EAE tandis que l'IL-23 et les cellules répondeuses à l'IL-23 seraient essentielles à la pathologie (Becher et al., 2002; Cua et al., 2003). Deux ans plus tard, les Th17 sont découverts concomitamment par deux équipes (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005) et le paradigme des Th1 s'efface au profit de celui des Th17. Les souris IL-17<sup>-/-</sup> sont générées, il est prouvé que ces animaux sont plus résistants à l'EAE que les animaux WT et que le seul transfert des Th17 induit l'EAE (Komiyama et al., 2006; Touil et al., 2006).

Bien que ce travail ait permis la mise en lumière et l'investigation des Th17 conduisant à la découverte de plusieurs traitements efficaces de la sclérose en plaques par le blocage des Th17 (Guo et al., 2015; Saitoh et al., 2016; Yan et al., 2012; Yang et al., 2018a), l'équipe de Stephen Anderton postule rapidement que les Th17 ne peuvent être les seuls responsables de la pathogénèse. En effet, jusqu'à présent les études se sont concentrées sur le modèle d'induction active de l'EAE par l'injection de Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG)<sub>35-55</sub> dans de l'adjuvant complet de Freund qui induit un biais pathologique en ce qu'il crée lui-même des lésions du SNC. Ils proposent donc d'utiliser un modèle de transfert passif afin de simuler des conditions plus proches des conditions physiopathologiques réelles. Ils démontrent alors que le transfert de Th1 activés contre MOG suffit à transférer la maladie. Ils mettent également en évidence que les Th1 établissent les lésions au niveau du SNC ce qui permet l'entrée des Th17 donnant un rôle séquentiel et complémentaire aux deux types cellulaires (O'Connor et al., 2008). Une fois sur place les Th17 vont alors produire de l'IL-17A qui induit la production de chimiokines (IL-8, RANTES, MCP-1) qui vont attirer d'autres types cellulaires comme les macrophages, les cellules dendritiques, d'autres T et des cellules myéloïdes productrices d'IL-23, d'IL-6 et d'IL-12 contribuant à l'entretien de la boucle inflammatoire (Albanesi et al., 1999; Broxmeyer, 1996).

Les nouveaux T infiltrants sont hétérogènes et capables de produire un large spectre de molécules dont de grandes quantités de granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). Cette cytokines apparaît comme particulièrement importante et non redondante ; les Th GM-CSF<sup>-/-</sup> sont incapables d'induire l'EAE. De plus le gain de l'expression du GM-CSF chez les Th suffit à les rendre encéphalitogènes (Codarri et al., 2011). Il est intéressant de noter que l'IL-12, l'IFN $\gamma$  et l'IL-27 (mais pas l'IL-35) peuvent inhiber cette production de GM-CSF (Casella et al., 2017). Le GM-CSF est ensuite capable d'induire la maturation des DC et de promouvoir le recrutement, la survie, l'activation et la division des macrophages infiltrants, des monocytes mais également de la microglie (Fleetwood et al., 2005). Le GM-CSF produit par les Th a un rôle particulièrement important dans l'acquisition d'une signature inflammatoire au niveau des monocytes CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> et des moDC qui en dériveront, rendant ces cellules fortement pathogènes (Croxford et al., 2015a). L'activation qui en résulte est en partie responsable des dommages tissulaires induit par les cellules myéloïdes (Croxford et al., 2015b) Par ailleurs, la microglie activée va produire en particulier de grandes quantités de CCL2, une chimiokine capable de recruter des monocytes CCR2<sup>+</sup> de la périphérie, qui une fois sur place vont se différencier en phagocytes. Ces derniers vont produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS), dégradant fortement la myéline (Choi et al., 2015; Ruuls et al., 1995) (Figure 9).



**Figure 9 :** Attaque des gaines de myéline et des neurones. Pendant la SEP et l'EAE, les dommages faits aux axones et la démyélinisation sont initiés par la réponse inflammatoire dans le SNC. i : Les Th1 envahissent le SNC et produisent de l'IFN $\gamma$  ce qui active les macrophages et la microglie. Ces cellules produisent par la suite de l'IL-12 ce qui promeut la différenciation Th1. ii : Les CD4+Th17+ produisent du GM-CSF qui active les macrophages et la microglie. iii : Les macrophages et la microglie produisent de l'oxyde nitrique (NO), du peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) et du superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) qui vont peroxyder la gaine de myéline. (Modifié d'après Chitnis et al, 2017)

La dégradation de la myéline a pour effet de relâcher dans le proche environnement des portions plus ou moins grandes de la molécule qui seront phagocytées par les DC activées présentes sur place. Ces DC vont ensuite migrer aux organes lymphoïdes secondaires où ils entraînent la différenciation et l'activation du répertoire auto-immun en périphérie, biaisé Th17, qui constituera la « seconde vague » d'infiltration du SNC (Bailey et al., 2007). En parallèle de cette seconde vague, des cellules Th mémoire émergent, caractérisées par leur forte expression de CD44 et leur dépendance à l'IL-15 pour leur survie (Purton et al., 2007). Ces cellules ont un renouvellement très faible et une longue durée de vie. La fonction de ces cellules reste encore à déterminer mais on peut postuler qu'elles entretiennent une réserve de cellules fortement auto-réactives en périphérie, capables de se réactiver à distance d'une poussée inflammatoire. Leur rôle dans le cycle de poussée/rémission est à l'étude.

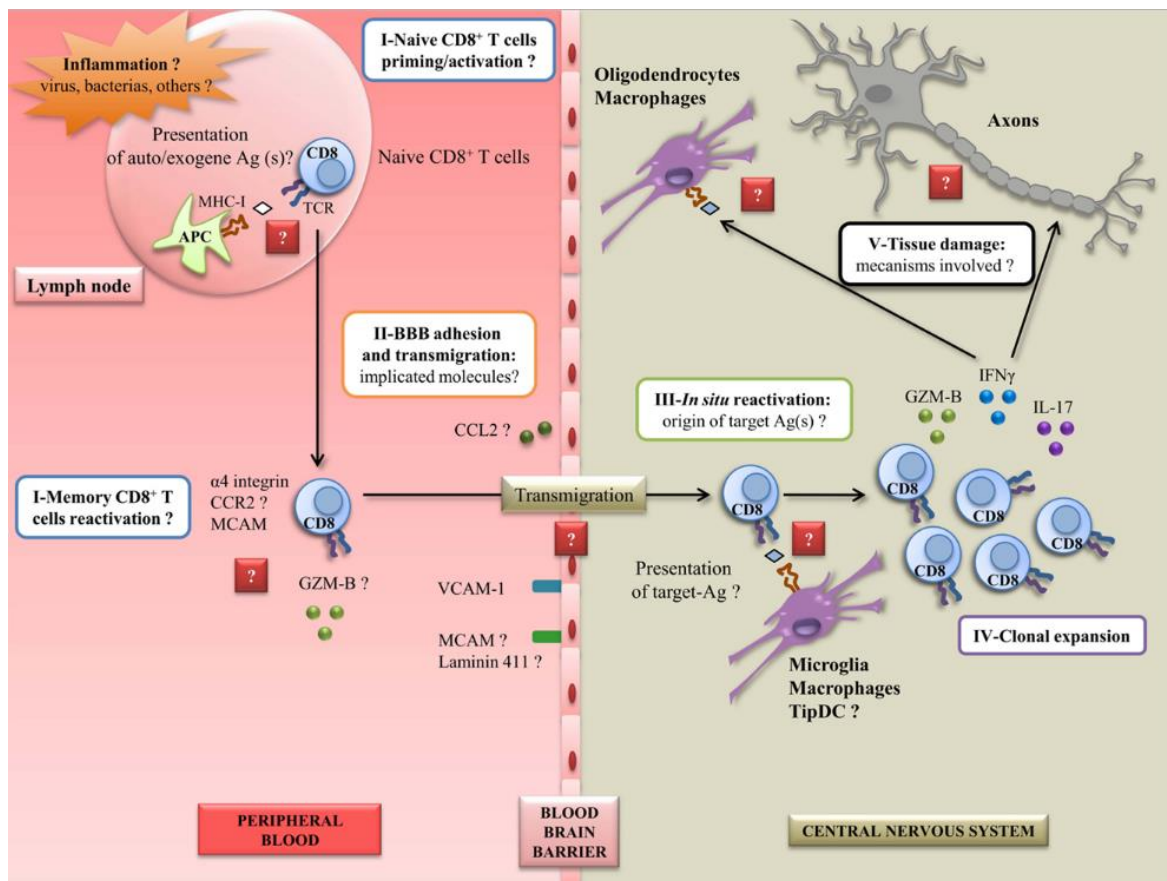
## **b) Les lymphocytes T CD8**

Les CD8 sont retrouvés en quantités non négligeables aux abords des plaques de démyélinisation actives et chroniques des patients SEP et des souris EAE. Ces cellules sont également plus abondantes dans le LCR des patients SEP par comparaison avec des donneurs sains (Jacobsen et al., 2002). Il a été montré que ces CD8 peuvent interagir avec des cellules présentatrices d'antigènes en marge des lésions de la SEP (Serafini et al., 2006). Par ailleurs, les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones des lésions expriment de manière inductible de forts niveaux de CMH-I (Traugott et al., 1983; Wong et al., 1984), ce qui pourrait suggérer une activation directe des CD8 présents. De plus, les CD8 infiltrants de type cytotoxiques (CTL) à proximité directe ou au contact des axones démyélinisés sont capables de produire du granzyme B et pourraient participer à l'entretien des lésions (Neumann et al., 2002). Toutefois, si les CTL sont bien présents dans le cadre de l'EAE, ils le sont également dans un grand nombre d'autres maladies neurodégénératives, posant la question de leur participation active à la pathogénèse ou plutôt d'une composante systématique du microenvironnement inflammatoire du SNC. Toujours au niveau des lésions, des CD8 mémoire producteurs d'IL-17, capables de recruter des macrophages corrélaient avec des lésions actives (Bettelli et al., 2007; Bitsch et al., 2000). Une étude plus poussée des CTL a permis de définir que la population présente dans le SNC est issue de l'expansion de moins de 10 clones (Babbe et al., 2000) dont la spécificité antigénique est liée aux protéines du CNS telle que la myelin-associated glycoprotein (MAG), la Myelin Basic Protein (MBP) ou encore la Proteolipid Protein (PLP). Une fois isolées, ces cellules sont capables d'induire la démyélinisation d'astrocytes *in vitro* (Tsuchida et al., 1994). Il est également possible de trouver dans le sang des patients SEP des CD8 spécifiques d'antigènes du SNC capables de produire de l'IFN- $\gamma$  et du TNF $\alpha$  après stimulation. L'induction de l'EAE chez des souris CD8<sup>-/-</sup> est plus faible, soulignant une participation active mais non suffisante des CD8 à la pathogénèse *in vivo* (Abdul-Majid et al., 2003).

Cependant, si leur rôle semble être important, leur contribution n'est toujours pas complètement comprise à l'heure actuelle. L'équipe de Sun a démontré de manière convaincante que le transfert de CD8 MBP- ou MOG-spécifiques est capable d'induire une démyélinisation qui touche à la fois le cerveau et la moelle épinière. Ces lésions s'accompagnent de la présence de zones ischémiques et nécrotiques en périphérie des plaques de démyélinisation, ce qui est assez proche de la pathologie humaine. Une nette amélioration clinique des animaux est par ailleurs observée après injection d'anticorps neutralisants de l'IFN- $\gamma$  (Sun et al., 2001). Il est cependant difficile de conclure sur le rôle de l'IFN- $\gamma$  car les cellules cérébrales en état de stress sont capables de produire cette cytokine. Il est désormais connu que le blocage de l'IFN- $\gamma$  seul suffit à réduire les dommages cérébraux et l'infarctissement des zones ischémisées (Lambertsen et al., 2004). Il est donc probable que la réduction des signes cliniques reflète plus directement la limitation de l'extension des zones de nécrose que l'impact sur l'activation des CD8. Par ailleurs, l'IFN $\gamma$  est également produit par d'autres cellules comme les Th1 dont le rôle dans l'EAE a déjà été discuté. Si d'autres équipes se sont intéressées à la mise en place de modèles d'EAE par le transfert de CD8 (Huseby et al., 2001; Na et al., 2008; Saxena et al., 2008) démontrant une participation indéniable des CD8 à la pathogénèse de l'EAE, il s'agit dans la grande majorité de CD8 à TCR transgéniques biaisant l'adressage ou l'activation effective de ces cellules. L'étude des CD8 *in situ* dans un modèle d'induction active est assez difficile : si l'inhibition de la migration des CD8+ au CNS s'est avérée efficace pour la prévention de l'EAE, les molécules bloquées sont assez peu spécifiques des CD8 et inhibent avec eux la migration des T CD4 helpers ( $\alpha 4$  (Ifergan et al., 2011)), des monocytes/macrophages (CCL2 (Kooij et al., 2014)) ou encore des neutrophiles (MCAM/laminine 411 (Larochelle et al., 2015)). Par ailleurs, il a été montré en 2013 que les CD8+ ne sont pas capables de migrer au SNC en l'absence de Th17 (Huber et al., 2013), et ne sont pas non plus capables de s'activer en l'absence des CD4 n'induisant de fait pas d'EAE (Leuenberger et al., 2013).

Si les CD8 participent à la pathogénèse de l'EAE, ils sont tributaires des CD4 et ont certainement un rôle plus tardif, notamment dans le maintien de l'ouverture de la BBB par la production de perforine comme le suggèrent Johnson et son équipe (Johnson et al., 2014). Le dialogue CD4/CD8 dans l'EAE commence tout juste à être compris et nécessite de plus amples investigations en particulier des démonstrations *in vivo* de leur capacité cytotoxique.





**Figure 10 :** Mécanisme de l'autoréactivité des CD8 dans la SEP. Une inflammation périphérique (comme EBV) pourrait avoir lieu dans le cas d'une infection mal contrôlée et pourrait conduire à l'activation des CD8, l'expression de diverses molécules impliquées dans l'adhésion, la migration et la cytotoxicité. Dans cet état inflammatoire, la BBB surexprime des chimioattractants et des molécules d'adhésion, induisant l'entrée des CD8 dans le SNC. *In situ*, les CD8 peuvent se réactiver grâce aux APC résidentes du SNC, ce qui reste encore mal élucidé aujourd'hui. Ceci conduirait à l'expression de cytokines pro-inflammatoires et à l'expansion clonale. Enfin, à cette étape, les CD8 pourraient être capables d'induire des dommages aux cellules résidentes et aux axones par la reconnaissance de peptides du soi dérivés du SNC. Ag: antigène; GZM-B: granzyme-B; BBB: barrière hémato-encéphalique; CNS: système nerveux central; MS: sclérose en plaque; EBV: Epstein-Barr virus; APC: cellule présentatrice d'antigène; TCR: T-cell receptor; MCAM: melanoma cell adhesion molecule; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1; DC: cellule dendritique; MHC-I: complexe majeur d'histocompatibilité I; CCR2: C-C chemokine receptor type 2; CCL2: C-C chemokine ligand 2; IFN $\gamma$ : interféron  $\gamma$ ; IL-17: interleukin-17. (D'après Salou et al, 2015)

### c) Les Lymphocytes B

Les cellules B sont connues pour être des partenaires importants dans de nombreuses maladies auto-immunes par la production d'anticorps, la production de cytokines ou la présentation d'antigènes. L'ensemble des travaux réalisés chez l'animal et chez l'humain appuie le rôle des B dans l'EAE et la SEP. Chez l'Homme, les lymphocytes B auto-réactifs sont détectés chez les patients avant le début des signes cliniques et sont présents au niveau des plaques de démyélinisation (Zhang et al., 2005). On retrouve des anticorps oligoclonaux dirigés contre différents composants de la myéline dans le LCR de plus de 95% des patients SEP (McDonald et al., 2001) et le recouvrement des transcriptomes des cellules B du SNC avec ces anticorps oligoclonaux suggère fortement qu'ils sont produits *in situ* par une population B intrathéchale (Obermeier et al., 2008). Des follicules au niveau méningé présentant une organisation similaire à des centres germinatifs ont été retrouvés chez des patients avec une forme secondairement progressive de la maladie (Serafini et

al., 2004a). La présence de ces immunoglobulines (Ig) dans le sang est fortement corrélée avec le passage du syndrome clinique isolé (CIS) à la sclérose en plaques (Masjuan et al., 2006).

Le rôle des lymphocytes B dans l'EAE et la SEP est complexe et fait appel à toutes les fonctions des B. Tout d'abord, la conversion en plasmocytes sécréteurs d'auto-anticorps est un point majeur de la maladie. Dès 1979, l'importance des B producteurs d'anticorps est démontrée en prouvant que l'induction de l'EAE avec le peptide MBP seul n'est pas possible chez des rats ne possédant pas de lymphocytes B (Willenborg, 1979). En revanche, le transfert adoptif de Th pathogènes dans les souris chez lesquelles les B ont été neutralisés induit bien l'EAE (Willenborg et al., 1986). Les Ig produites sont capables d'induire la démyélinisation de l'animal par deux mécanismes : le complément (qui entraîne à terme l'éclatement de la cellule) et l'engagement des récepteurs Fc (nécessitant des cellules effectrices de type CTL). Ces auto-anticorps sont rarement dirigés contre des antigènes de surface de la myéline. Les anticorps anti-MOG par exemple, ne sont présents presque qu'exclusivement dans les formes pédiatriques de la SEP et de manière transitoire chez les patients adultes jeunes (McLaughlin et al., 2009). La spécificité de ces anticorps est encore à l'étude mais plusieurs antigènes tel que le couple contactin-2/TAG-1 ou encore la neurofascine sont pointés du doigt (Derfuss et al., 2009, 2010; Mathey et al., 2007). Ces molécules sont exprimées à la fois par les oligodendrocytes et les neurones et sont localisées autour des nœuds de Ranvier. L'injection de ces anticorps dans des modèles animaux suffit à induire des dommages axonaux ou la démyélinisation, faisant d'eux des cibles thérapeutiques potentielles. Actuellement, les anticorps auto-immuns dans la sclérose en plaques sont considérés comme des contributeurs tardifs de la maladie. Cela est notamment dû au fait que la production d'IL-17 par les Th-17 est capable, seule ou en combinaison avec le facteur d'activation des lymphocytes B (BAFF), d'induire l'activation et la prolifération des lymphocytes B ainsi que leur différenciation en plasmocytes sécrétant des auto-anticorps responsables de la phase chronique de la maladie. L'analyse des auto-anticorps retrouvés dans le LCR des patients montre l'hypermutation à la fois des chaînes lourdes et légères dans les régions variables (Qin et al., 1998). Le répertoire de ces mutations est restreint et est imputable à l'expansion de seulement quelques clones, indiquant un début de la production alors que la maladie est déjà engagée (Owens et al., 2003).

Les Lymphocytes B sont également capables de produire un vaste spectre de cytokines à la fois pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ , la lymphotoxine- $\alpha$  (LT $\alpha$ ) ou l'IFN- $\gamma$ ) et anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- $\beta$ ) et sont à ce titre capables d'influencer le microenvironnement définissant la SEP (Rosser et al., 2014b). De la même manière que les lymphocytes T, les B des patients SEP démontrent une activité cytokinique pro-inflammatoire aberrante et la surexpression des cytokines inflammatoires susnommées induisant notamment un biais de polarisation Th17 (Bar-Or et al., 2010). Il a plus tard été démontré que la perte des B productrices d'IL-6 en particulier, améliore cliniquement la SEP par la diminution des réponses Th1 et Th17 (Barr et al., 2012). Ce même article démontre par ailleurs que cet effet bénéfique est perdu après traitement

avec la LT $\alpha$  et le TNF- $\alpha$  suggérant un rôle séquentiel de ces facteurs solubles. Dans une étude récente comparant les profils B des patients SEP à des donneurs sains, il a été montré que le nombre de B producteurs de cytokines pro-inflammatoires est plus élevé chez les patients au stade RR-MS ou SP-MS que chez les donneurs sains, alors que le nombre de B anti-inflammatoires (IL-13+) était diminué (Piancone et al., 2016). De façon importante, les B producteurs de GM-CSF sont également augmentés et se réactivent rapidement chez les patients (Li et al., 2015). La production anormale de cytokines pro-inflammatoires de ces lymphocytes B induit un effet d'activation « bystander » des Th pro-inflammatoires et contribue de fait à l'auto-immunité.

*In situ*, les lymphocytes B ont également un rôle d'APC en présentant les auto-antigènes sur leur CMH-II aux Th présents. Ces interactions induisent la différenciation de T effecteurs pathogènes à partir de Th0 infiltrants et la réactivation de T encéphalitogènes déjà présents sur place (Pierson et al., 2014). En 2010, Harp et son équipe parviennent à isoler des lymphocytes B spécifiques de différents antigènes de la myéline dans le sang des patients atteints de SEP (Harp et al., 2010). Il a été trouvé que les molécules de co-stimulation CD80 et CD86, essentielles à l'activation des Th encéphalitogènes, étaient augmentées à la surface des B des patients (Aung and Balashov, 2015; Niino et al., 2009). Chez près d'un tiers des patients, les lymphocytes B sont capables d'induire la prolifération de T spécifiques de protéines de la myéline ce qui suggère qu'au moins chez une partie des patients, les B peuvent contribuer à la pathologie par stimulation directe des Th (Ireland et al., 2012). Cela est corroboré par l'amélioration clinique de la SEP chez certains patients traités par le Rituximab, un anticorps détruisant les cellules CD20+ (Salzer et al., 2016).

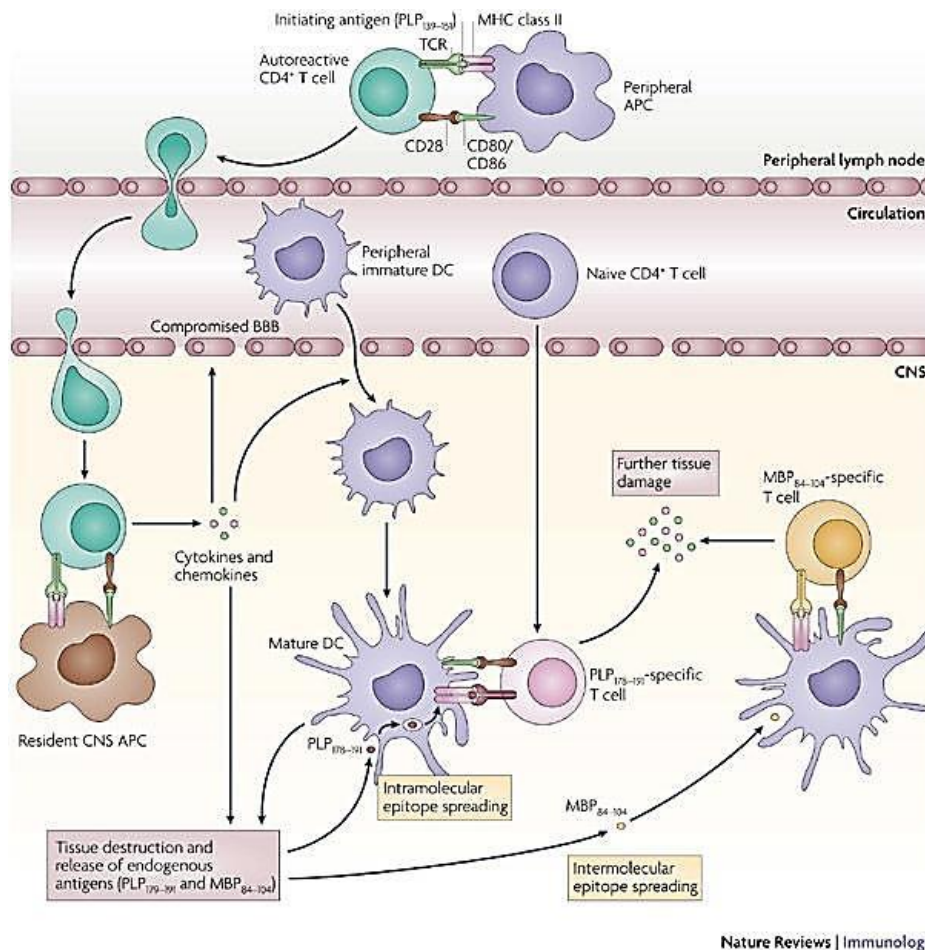
#### **d) Les DC pathogènes**

Les cellules dendritiques (DC) constituent la charnière essentielle entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif. Dans le cadre de l'EAE et de la SEP où les deux types de cellules sont nécessaires à la mise en place de la pathologie, les cellules dendritiques jouent naturellement un rôle central.

Les DC assurent la veille immunitaire de la grande majorité des organes et sont nécessaires aux réponses immunitaires y compris auto-immunes. La question de l'existence de DC au niveau du SNC est restée longtemps un problème épineux. Du fait de son statut de site immunoprivilégié, très peu de cellules immunitaires y résident à l'état basal. En 2001, Reichman et Fischer parviennent à démontrer qu'une population de précurseurs présents dans la fraction comprenant la microglie (CD11b<sup>+</sup>) est capable de se différencier en DC (Fischer and Reichmann, 2001). Isolées à partir de cerveaux adultes, ces cellules sont capables de maturer en DC immatures par le biais d'une stimulation GM-CSF et deviennent pleinement matures après liaison CD40/CD40L. Les deux chercheurs mettent cela en relation avec les DC qui sont

observées juste au moment de l'initiation de l'EAE. Ils postulent donc l'existence d'une population de DC résidentes du SNC, les « brain DC » (bDC), qui serait à l'origine de l'EAE et de la SEP. Les années suivantes, plusieurs équipes échouent à mettre en évidence ces cellules si bien qu'ils suggéreront qu'elles n'émergent qu'en condition inflammatoire, comme la sénescence cérébrale (Stichel and Luebbert, 2007). Cette population restera introuvable jusqu'en 2010 lorsque l'équipe de Karen Bulloch propose d'utiliser un nouvel anticorps anti-CD11c-YFP, capable de fonctionner y compris lorsque CD11c est en hétérocomplexe avec CD18. L'équipe met alors en évidence l'existence d'une population rare, distincte des monocytes et de la microglie dans leur fonction et leur transcriptome, et capable de se multiplier rapidement lorsque le SNC est agressé. Ces cellules sécrètent des niveaux élevés d'IL-12 (DC1) et sont plus capables que la microglie d'induire la maturation des Th. L'année qui suit, les DC sont détectées dans le parenchyme juxta-ventriculaire, les espaces péri-vasculaires, les plexus choroïdes et les méninges (Proding et al., 2011).

Les phases précoces de la SEP s'éclairent : après la liaison des antigènes issus de la myéline sur leur PRR, les bDC quittent le SNC en direction des LN périphériques (essentiellement les ganglions cervicaux) grâce à leur expression de CCR7. Elles rejoignent leur destination soit par le biais de la circulation sanguine soit par le réseau lymphatique intracrânien récemment décrit (Louveau et al., 2015). En chemin, elles ont internalisé l'antigène et l'ont dégradé pour le présenter sur leur CMH-II qui est maintenant fortement exprimé à leur surface. En parallèle, les DC augmentent leur niveau de molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40. Une fois sur place, elles sont capables d'activer des T naïfs et de les faire maturer en T effecteurs. Du fait de la très grande diversité de cytokines que les DC peuvent produire, les T effecteurs qui résulteront de cette maturation peuvent être de type Th1, Th2, Th17 ou encore Treg (Zhu and Paul, 2010). Les T ainsi activés rejoignent le SNC, en passant la BBB, et sur place sont restimulés par des APC résidentes (Tompkins et al., 2002). L'origine initiale des antigènes de myéline n'est pas certaine et est probablement variable d'un cas à l'autre. Néanmoins la piste virale est sérieusement envisagée. Au fur et à mesure de la progression de la maladie, les dégâts de la myéline exposent de nouveaux antigènes qui sont présentés par les APC induisant une diversification du répertoire des T auto-réactifs infiltrant le SNC. Ce phénomène est appelé « épitope spreading » (Figure 11) et compartimente les différentes phases de la maladie (McRae et al., 1995).



Nature Reviews | Immunology

**Figure 11:** Les modèles animaux nous ont permis de comprendre comment l'épitope spreading se déroule. Dans l'EAE, l'activation des T auto-réactifs est spécifique de l'antigène initiant la réponse et a lieu dans les ganglions. Suivant cette activation les T entrent dans la circulation puis s'extravasent dans le parenchyme nerveux en traversant la BBB. Une fois au SNC, les T auto-réactifs initient la destruction de la myéline grâce à la réactivation in situ par les cellules présentatrices d'antigènes résidentes. Les T vont alors produire des cytokines et des chimiokines qui vont recruter d'autres cellules immunitaires au SNC et aident à l'agression du SNC. En parallèle, de nouveaux antigènes de la myéline (MOG, MBP, PLP) sont relâchés dans le milieu, phagocytés, digérés et présentés par des DC venues de la périphérie à des T naïves. Durant les phases de rechute, ces cellules porteuses d'une nouvelle spécificité antigénique, vont s'activer et induire des dommages plus larges. TCR, T-cell receptor. (Modifié d'après Miller et al, 2007)

Il est à noter que l'induction de l'EAE chez les souris fait intervenir l'injection de peptide MOG dans de l'adjuvant complet de Freund par voie sous-cutanée, ce qui mobilise une population de DC périphérique et non les bDC. Suivant les sites d'injection choisis, ces DC activées migrent au niveau de ganglions lymphatiques drainant la peau où elles présentent le neuroantigènes aux lymphocytes T. Suivant le site d'injection choisi, en particulier au niveau du cou, il est cependant possible d'induire cette présentation du peptide MOG dans des ganglions lymphatiques drainant également le système nerveux central, en particulier lorsque l'injection a lieu au niveau du cou de l'animal. Cette différence qui existe entre l'initiation de la SEP et de l'EAE est cependant un élément discordant entre la pathologie humaine et son modèle murin qui ne permet pas de rendre compte des conditions d'initiation de la maladie.

L'origine des DC qui s'accumulent dans le SNC dans le cadre de l'EAE (Serafini et al., 2000) pose question: sont-elles préférentiellement issues des cellules résidentes ou viennent-elles de la périphérie ? Plusieurs équipes s'attèlent à la question et parviennent à démontrer que, si initialement les bDC induisent le premier signal inflammatoire, les cellules sont majoritairement issues de la moelle osseuse (Bailey et al.,

2007; Deshpande et al., 2007). Les DC s'accumulent dans le SNC des souris EAE sont donc des infiltrantes et ne sont pas issues de la prolifération des bDC.

Si l'étude de la transmigration des DC dans les organes périphériques est bien étudiée, le passage de la BBB par les DC est encore en grande partie à l'étude. Les cultures *in vitro* de cellules endothéliales microvasculaires ont montré que la transmigration des DC pouvait être augmentée par l'ajout de la chimiokine CCL3 induisant chez les DC l'expression de la métalloprotéase matricielle 9 (MMP9) (Zozulya et al., 2007). Cependant, ce mécanisme n'a pas été vérifié *in vivo*. Plus récemment, l'équipe de Pooja Jain est parvenue à mettre en évidence que l'infiltrat des DC au niveau du SNC des souris EAE corrèle avec les niveaux de la chimiokine CCL2 produite par la BBB. Les DC attirées par le signal CCL2 sont capables de trans migrer au travers de la BBB grâce à la phosphorylation d'ERK1/2 (Sagar et al., 2012). Une fois au SNC, les DC s'accumulent au niveau des lésions, riches en CCL2 et IL-8. Des études chez l'Homme et chez la souris ont mis en évidence que les DC s'agglutinent dans certaines régions du SNC suivant leur phénotype. Ainsi, les DC myéloïdes (CD8 $\alpha$ -) sont retrouvées préférentiellement en groupe avec des T CD4+ dans les foyers inflammatoires périvasculaires au niveau du cervelet et de la moelle épinière, alors que les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) s'accumulent davantage au niveau de la surface méningée cérébelleuse (Bailey et al., 2007). Les DC ont également été trouvées en groupe avec des T CD8+ à condition que leur CMH soit chargé avec un auto-antigène.

Chez l'Homme, les DC sont également présentes au niveau des plaques de démyélinisation et de la matière grise non lésionnelle des patients atteints des formes primaires progressives et secondairement progressive de la SEP (Cudrici et al., 2007). Ces DC sont à la fois matures (DC-SIGN+) et immatures (DC-SIGN-). Il est possible que les DC soient également présentes au stade poussée-rémission mais celui-ci n'étant pas mortel, l'accès aux tissus est rare. Il est donc nécessaire d'étudier des cellules du LCR. Dans le fluide cérébro-spinal des patients SEP, les DC sont de deux types : myéloïdes et plasmacytoïdes. Si les mDC expriment des niveaux plus élevés de molécules de co-stimulation (CD80, CD86 et CD40) que leur équivalent en circulation dans le sang, les pDC n'ont pas de changement de phénotype et sont simplement très représentées (Pashenkov et al., 2001). Par ailleurs, les DC issues du LCR des patients SEP produisent plus d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 que les DC issues du LCR de donneurs sains.

Les cellules dendritiques sont nécessaires à différentes étapes de la pathogénèse de l'EAE en permettant l'invasion du SNC par d'autres types cellulaires. Les souris chez lesquelles H2-Ab1 (CMH-II) est sous le contrôle de CD11c (seules les CD11c+ peuvent exprimer les CMH-II) sont plus sujettes à l'EAE par transfert adoptif de cellules encéphalitogènes, démontrant que les cellules CD11c+ sont les seules APC nécessaires au développement de la maladie (Greter et al., 2005). Par ailleurs, le nombre de DC corrèle assez étroitement avec la sévérité de l'EAE et le nombre de plaques de la SEP. Le Flt3L est une molécule nécessaire à la différenciation, à l'expansion et à la survie de toutes les cellules dendritiques. Le Flt3L induit *in vivo*

l'augmentation du nombre de DC en augmentant la prolifération de leurs précurseurs. L'induction de l'EAE chez les animaux traités au Flt3L est significativement plus grave que chez les animaux contrôles. À l'inverse, inhiber le signal Flt3 par un inhibiteur des tyrosines kinases réduit le nombre de DC et améliore subséquemment l'EAE (Whartenby et al., 2005). Une autre équipe a par ailleurs démontré que l'injection intra cérébrale de DC issues de la moelle osseuse et chargées avec le peptide MOG exacerbe l'EAE par le recrutement de CD4<sup>+</sup> et de CD8<sup>+</sup> au SNC et modifie la balance Th/Treg en faveur des premiers (Zozulya et al., 2009). Il a par ailleurs été démontré que les DC myéloïdes et lymphoïdes résidentes du SNC sont biaisées pour induire préférentiellement des Th-17 à partir de Th0 à répertoire auto-réactif (Bailey et al., 2007). Cela passe notamment par la production de cytokines comme le TGF- $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-23. Le dialogue entre les DC résidentes du SNC et les DC périphériques est continu et permet le maintien et le renouvellement des Th au SNC. Les DC pathogènes issues de la périphérie résident entre autre au niveau des ganglions cervicaux. Une étude chez l'Homme et chez le singe est parvenue à mettre en évidence la présence de DC présentant des dérivés de myéline dans les ganglions cervicaux à la fois des patients et des singes (van Zwam et al., 2009). Il a été remarqué que des APC présentant un certain nombre d'autres neuro-antigènes ont été retrouvées à la fois chez les patients et chez les donneurs sains, suggérant que le déclenchement de la SEP et de l'EAE pourrait utiliser les voies naturelles de drainage des neuro-antigènes pour l'initiation de la pathologie.

### *iii) Régulation de la maladie*

Le système immunitaire effecteur est, du fait de sa fonction de destruction du non-soi, l'ensemble de cellules le plus dangereux de notre organisme. Pour chaque activation des cellules effectrices, s'active un autre pendant du même système, à même de garder le contrôle de la réponse immunitaire : les cellules régulatrices. En condition homéostatique, les cellules régulatrices limitent l'activation (et donc les dégâts) du système immunitaire et permettent la résolution de la réponse immune lorsque la source de l'activation a été éliminée. Dans le cadre de la pathologie, l'aspect régulateur du système immunitaire est bien présent bien que parfois dépassé par l'ampleur ou la nature de l'activation du système immunitaire. L'EAE et la SEP ne font pas exception à cette règle et une régulation active est mise en place par plusieurs types cellulaires.

#### **a) Les lymphocytes T CD4 régulateurs**

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont (re)découverts en 1995 par Simon Sakaguchi (Sakaguchi et al., 1995) et initialement décrits comme CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>, avant que le phénotype ne soit complété en 2001 par l'ajout du facteur de transcription nécessaire et suffisant à la fonction des lymphocytes régulateurs :

Forkhead box 3 (Foxp3, (Brunkow et al., 2001)). Au niveau du SNC, en cas d'inflammation, les Tregs sont responsables du contrôle de la prolifération et de l'entrée des Teff dans le SNC (Koutrolos et al., 2014).

Du fait de leur rôle dans le maintien de la tolérance au soi, de nombreuses études ont mis en évidence que les Treg des patients SEP et des animaux EAE sont déficients. Ce déficit repose sur une capacité régulatrice moindre que chez les donneurs sains (Balandina et al., 2005; Noori-Zadeh et al., 2016) et une fréquence de Tregs moindre (Venken et al., 2008). Contrairement à l'Homme, les Tregs spécifiques des antigènes de la myéline s'accumulent chez les souris présentant une EAE (Korn et al, 2007). Si ces Tregs sont également incapables de contrôler la maladie *in vivo*, ils démontrent cependant d'excellentes propriétés régulatrices *in vitro* contre des T naïfs spécifiques de MOG mais s'avèrent inefficaces envers des T encéphalitogènes (IL-6<sup>+</sup> TNF<sup>+</sup>) issus du SNC des animaux malades. L'ajout d'IL-6 et de TNF dans la culture de Tregs face à des Tnaïfs spécifiques de MOG conduit au même phénotype déficient et empêche la suppression efficace par les Tregs dans ce contexte. Les auteurs proposent ainsi que l'état inflammatoire global du tissu est responsable de l'inefficacité des Tregs et qu'il serait probable de pouvoir restaurer l'efficacité des cellules régulatrices en diminuant spécifiquement certaines cytokines pro-inflammatoires. Il est cependant intéressant de noter que le pic d'accumulation de Tregs ainsi que le pic de production d'IL-10 *in vivo* chez les animaux malades a lieu au moment de la rémission de l'EAE. Il est donc probable que la perte de régulation de l'inflammation au niveau du SNC des animaux EAE fasse intervenir à la fois la perte de fonction des Tregs et un nombre légèrement insuffisant de cellules. Il resterait à éclaircir qui, de la perte de fonction des Tregs ou de l'initiation de neuroinflammation, est l'élément déclencheur de la SEP chez l'Homme.

Par ailleurs, la relative inefficacité des Tregs des patients SEP passe par une production d'IL-10 plus faible (Astier and Hafler, 2007). L'IL-10 est une cytokine commune aux principales fonctions régulatrices des tTregs et des pTregs et inhibe l'activation T en empêchant le signal par CD28, un des facteurs de co-stimulation essentiel à l'activation de la cellule. Une dérégulation de la production de CTLA-4 à la surface des Tregs a également été mise en évidence (Link, 1994). CTLA-4 et CD28 sont deux molécules de co-stimulation se liant à CD80 et CD86 à la surface des APC et si CD28 donne un signal activateur, CTLA-4 correspond à un signal inhibiteur. De même, en 2013, une étude par séquençage de plus de 14 000 patients SEP a pu mettre en évidence que CD25 était retrouvé régulièrement muté à la surface des Tregs des patients SEP (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) et al., 2013). L'appauvrissement du milieu en IL-2 étant moins efficace, cela aurait une double conséquence. D'une part, l'augmentation de la biodisponibilité de l'IL-2 favoriserait l'expansion et la survie de Teff de type Th1 et Th17 et, d'autre part, inhiberait la bonne capacité des Tregs à se multiplier. Ce changement d'équilibre est la signature immunologique principale de l'EAE et de la SEP (Haider et al., 2016). L'ensemble de ces déficits des Tregs pourrait être expliqué par un niveau anormalement faible de Foxp3 dans les Tregs des animaux malades (Astier and Hafler, 2007). En plus de leur fonction sécrétrice, il apparaît que les Tregs des patients atteints



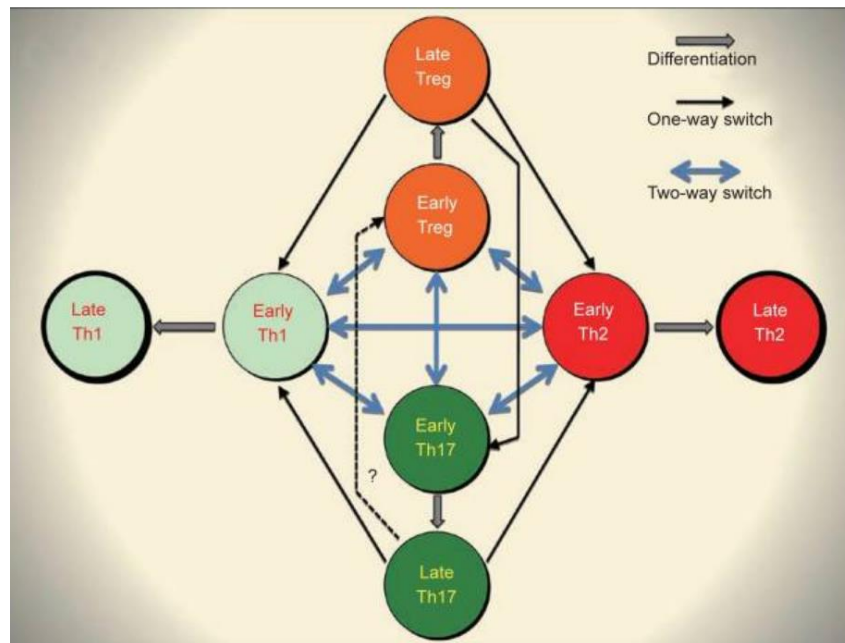
de SEP sont déficients dans leurs récepteurs aux chimiokines (Galimberti et al., 2008) et présentent donc un défaut migratoire. Chez l'Homme, une étude post-mortem des SNC des patients SEP a démontré que dans 30% des cas, les Tregs n'étaient pas détectables au niveau des lésions (Fritzsching et al., 2011).

Le TGF- $\beta$  est une molécule possédant trois isoformes (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3) qui est non seulement produite par les Tregs mais contribue également à leur différenciation à partir de Th0. Sa signalisation passe par la liaison sur son récepteur dimérique TGF $\beta$ RI/TGF $\beta$ RII qui induit la diphosphorylation de SMAD2 (ou SMAD3) qui s'associe à pSMAD4 afin d'aller transcrire les gènes de réponse au noyau. Dès la fin des années 1980, le potentiel immunorégulateur du TGF- $\beta$  est prouvé via l'inhibition de la prolifération et de la production d'IL-2 par les T (Kehrl et al., 1986). Bien que le TGF- $\beta$  soit associé à la différenciation de cellules pathogènes telles que les Th17, c'est une cytokine majoritairement reconnue comme anti-inflammatoire dans l'EAE. Après leur transfert adoptif, les Th0 spécifiques de la myéline cultivés en présence de TGF- $\beta$ 1 ne se différencient pas en T effecteurs et ne déclenchent pas d'EAE. Par ailleurs, le transfert adoptif de Th1 encéphalitogènes cultivés en présence de TGF- $\beta$ 1 induit une EAE faible, du fait de l'induction d'IL-10 via Smad4 dans ces cellules (Huss et al., 2010). Suivant cette même logique, le transfert adoptif de Th17 spécifiques de la myéline en présence de TGF- $\beta$ 1 les empêche complètement d'induire une EAE chez les souris receveuses contrairement aux Th17 cultivés en l'absence de la cytokine. Ce défaut d'induction passe par la régulation négative à la fois de la production de GM-CSF, de l'IL-23 et de T-bet (Yang et al., 2009). Il est possible de restaurer la pathogénicité de ces Th17 en les cultivant avec de l'IL23. Dans la SEP, 19 miRNAs pouvant cibler des composants de la réponse au TGF- $\beta$ , tels que les récepteurs TGF $\beta$ RI et TGF $\beta$ RII, SMAD2, SMAD4 et SMAD7, sont exprimés de manière différentielle entre des sujets sains et les patients (Severin et al., 2016). Une équipe a par ailleurs démontré que la reproduction de ce profil transcriptionnel des Treg de patient chez des Treg de donneur sain à l'aide de miRNAs aboutit à un phénotype régulateur déficient similaire à celui des patients (Meira et al., 2014). De manière intéressante, les isoformes TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3, étant exprimées dans les cellules gliales et les neurones, il est possible que la régulation des Th se fasse en partie par des cytokines produites par des cellules non-immunitaires.

Les Th3 sont décrites dans un contexte de tolérance orale avant même la découverte des Tr1, et sont distinguées des Th1 et Th2 par leur sécrétion de TGF- $\beta$  (Miller et al., 1992) malgré l'absence d'expression de foxp3 (Gandhi et al., 2010). Un des attributs des Th3 est l'expression du latency associated peptide (LAP), bien que celle-ci ne soit pas restreinte aux Th3 : certaines sous-classes de Tr1 sont également LAP+. LAP est une molécule exprimée à la surface des cellules et stabilise les trois isoformes du TGF- $\beta$  par leur queue N terminale avant le clivage de celle-ci et la sécrétion de la cytokine par la cellule. La forme associée de LAP et du TGF- $\beta$  est appelée le complexe latent et est capable d'induire un signal TGF- $\beta$  par contact cellulaire. L'importance du complexe LAP/TGF- $\beta$  pour la régulation de la réponse T a déjà été démontrée dans plusieurs études, y compris dans l'EAE (Andersson et al., 2008; Rezende et al., 2013). Des lymphocytes T CD4+

exprimant LAP ont été mis en évidence dans le sang de donneurs humains et chez les souris. La production de TGF- $\beta$  est capable d'induire la production de LAP et du complexe latent par des CD4 murines de façon indépendante de Foxp3 (Oida and Weiner, 2010). Ce complexe latent est capable d'induire des pTregs qui peuvent conditionner les DC à produire de l'IL-27 qui induirait secondairement des Tr1 (Awasthi et al., 2007). Les Th3 sont, encore aujourd'hui, une population assez mal connue et méritent que plus d'attention leur soit accordée afin d'envisager la biologie et les implications cliniques de ces cellules.

Au-delà de l'aspect tTreg et pTreg, les T régulateurs sont une population très hétérogène et, en plus de foxp3, présentent souvent les facteurs de transcription ROR $\gamma$ T ou T-bet reflétant la plasticité entre Th et Treg. Cette hétérogénéité définit des sous-populations de pTreg, particulièrement efficaces pour supprimer leur équivalent Th, qui présentent des profils de sécrétion cytokiniques hybrides. Le nombre de ces cellules est variable et la proportion de Tregs Foxp3<sup>+</sup> ROR $\gamma$ T<sup>+</sup>(IL-10<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) est plus importante que les Tregs Foxp3<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup>(IL-10<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) suggérant une plasticité plus importante entre les Th17 et Treg qu'entre Treg et Th1 (Trinchieri, 2007). Cela serait lié au fait que les Th1 possèdent T-bet, un facteur de transcription exclusif des autres facteurs de transcription, rendant la conversion de Th1 vers Tr1 impossible là où ROR $\gamma$ T est permissif, ce qui permet aux Th17 d'acquérir l'IL-10 et également aux Treg d'exprimer l'IL-17. Cela est possible car la copie du gène *tbx21* dans les cellules non Th1 est triméthylée sur K4 et K27 des histones 3 (Wei et al., 2009) ce qui permet la coexpression d'IFN- $\gamma$  dans les Tregs mais pas l'inverse. De fait les Th17 gardent leur capacité à produire de l'IL-4 et de l'IFN- $\gamma$  longtemps après leur différenciation (Lee et al., 2009). Cette plasticité de Treg vers Th17 passe par un environnement cytokinique particulier nécessitant la présence d'IL-6 et l'absence de TGF- $\beta$  afin que les Tregs se mettent à produire de l'IL-17 (Xu et al., 2007; Yang et al., 2008). De leur côté, si les Th2 sont peu capables de se différencier en cellules Foxp3<sup>+</sup>, la relative plasticité entre Th1 et Th2 permet tout de même aux Th2 de participer au compartiment Treg. Par ailleurs, il a été démontré en 2017 par l'équipe de David Wraith que la production d'IL-4 est nécessaire à la production d'IL-10 par les Tr1 (Mitchell et al., 2017) impliquant donc indirectement les Th2 dans l'induction du phénotype régulateur des Th1. L'ensemble de ces phénomènes de plasticité semble être un point clef dans l'alternance entre les phases de poussée et de rémission de la SEP. En effet, la plasticité des IL-17 vers Treg pourrait induire le basculement vers la rémission, là où la plasticité Treg vers Th17 induirait les poussées, bien que l'origine de ce switch d'environnement cytokinique soit encore relativement mal élucidée. (Figure 12).



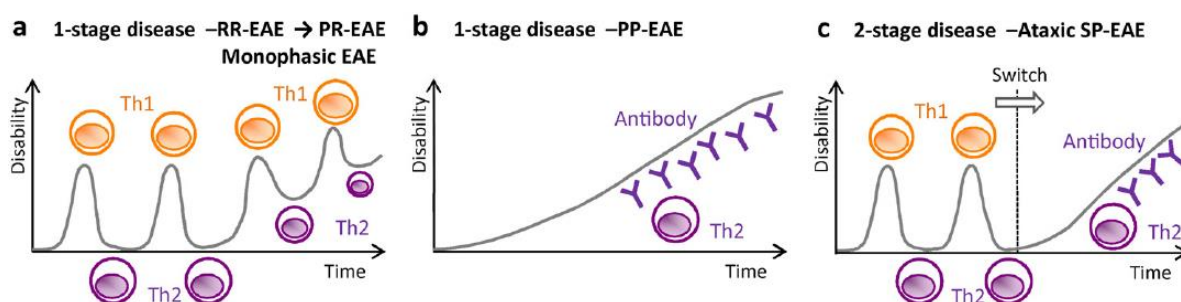
**Figure 12 :** Plasticité des T helper. La plasticité des CD4 helper dépend du stade de différenciation et du type cellulaire. A des stades précoces de la différenciation Th, chaque lignage peut se convertir relativement aisément en un autre. Toutefois, la plupart des Th1 et Th2 pleinement différenciés ne peuvent plus switcher alors que la majorité des Tregs et des Th17 restent plastiques durant tout leur processus de différenciation. (D'après Paul et Zhu, 2012)

La question qui reste d'actualité est de savoir si le défaut des Tregs est la cause du déséquilibre immunitaire et induit la sclérose en plaques, ou si le terrain pro-inflammatoire du sujet induit un épuisement progressif des Tregs. Comme représenté sur la Figure 12, les Tregs peuvent être catégorisés en Tregs dits précoces (très plastiques, KLRG1<sup>-</sup>) et en Tregs pleinement différenciés (moins plastiques, KLRG1<sup>+</sup>). À ce titre, KLRG1 est souvent considéré comme un marqueur de sénescence des Tregs et doit être associé à des marqueurs d'activation tels que CD103, LAG3 ou PD-1 afin de différencier les cellules vieillissantes des cellules pleinement différenciées. Dans le cadre de l'EAE, le nombre de Tregs KLRG1<sup>+</sup> est augmenté plus de 4 fois dans les souris récemment immunisées avec MOG versus animaux sains. Ces cellules sont foxp3<sup>hi</sup>CD25<sup>hi</sup> et prolifèrent. Toutefois, du fait de leur état sénéscent les Treg KLRG1<sup>+</sup> présentent un phénotype pro-apoptotique (Annexin V<sup>+</sup>) (Tauro et al., 2013). Ces résultats tendent à montrer que, dans le cas des modèles murins induits par immunisation, le déclenchement de la pathologie serait d'avantage lié à un épuisement des Tregs. Toutefois, dans le cadre de maladies spontanées (murines et humaines), la question est encore posée.

Enfin, les T régulateurs sont en charge de la réparation des tissus après la réaction immunitaire. Si, au cours de l'EAE et de la SEP, les Treg échouent à contrôler complètement la réaction inflammatoire, il a été prouvé qu'ils sont essentiels à la remyélinisation des axones lors des phases de rémission (Dombrowski et al., 2017). En outre, des souris déficientes en Tregs montrent un défaut de remyélinisation qui peut être corrigé par le transfert adoptif de Tregs, recrutés *in situ* par l'IL-33 produite par les cellules gliales (Gadani et al., 2015). Les Tregs peuvent également promouvoir la division des progéniteurs des *oligodendrocytes in vitro* et *ex-vivo*.

## b) L'équilibre Th1/Th2 et les cytokines Th2

Les données sur le rôle des Th2 dans l'EAE sont conflictuelles. Si dès 1993, l'équipe de Roel démontre que, contrairement aux Th1, le transfert de Th2 spécifiques d'antigènes du SNC n'induit pas d'EAE (van der Veen and Stohman, 1993), l'équipe de Tonegawa démontre le contraire en 1997 (Lafaille et al., 1997). Toutefois, si les cellules semblent avoir un rôle mitigé, probablement dicté par leur environnement direct, les cytokines de type Th2 et en particulier l'IL-4 ont démontré leurs capacités protectrices dans le cadre de l'EAE. Ainsi, les phases de rémission des animaux corrèlent avec l'augmentation de la concentration d'IL-4 dans le parenchyme cérébral des animaux analysés (Khoury et al., 1992). Chez des souris IL-4<sup>-/-</sup>, l'induction de l'EAE s'est avérée être non seulement plus précoce, plus sévère mais surtout sans phase d'amélioration clinique (Liblau et al., 1997) indiquant son rôle pour l'alternance poussée/rémission. Plus récemment, une équipe est parvenue à induire une tolérance face à l'EAE par gavage des animaux avec le peptide SIRS<sub>1-21</sub> qui a pour effet direct d'augmenter les cytokines Th2 (Brod and Hood, 2007). Par ailleurs, les Th2 ne sont pas les seules cellules capables de produire de l'IL-4. Les natural killer à TCR invariant (NKT) en sont également capables lorsqu'ils sont stimulés adéquatement. Plusieurs études ont démontré l'effet bénéfique des NKT dans la sclérose en plaque (Feng et al., 2004; O'Keefe et al., 2008; Sakuishi et al., 2010) et la stimulation de ces cellules avec de l' $\alpha$ -galactosylcéramide, qui mime la présentation de glycolipides sur CD1d, induit la production de cytokines Th2 (IL-4 et IL-10) et la suppression spécifique de la voie Th1 (Singh et al., 2001). L'ensemble de ces résultats suggèrent que le basculement entre poussée et rémission s'effectue en partie par le biais de modifications de la balance Th1/Th2 bien que la cause du changement de cet équilibre reste encore à déterminer. L'équipe de Minegar a également proposé un modèle expliquant les différentes formes de SEP sur ce principe, les susceptibilités individuelles et les variations des répertoires Th1 et Th2 étant à la base de cette diversité de pathologies (Figure 13).



**Figure 13:** Équilibre Th1/Th2 et cycle poussées/rémissions. Les poussées du modèle EAE classique en poussées/rémissions sont liées à l'équilibre entre les Th1/Th17 inflammatoires et les phases de rémission sont liées aux Th2 (cytokines Th2)/NKT et Tregs. Dans ce schéma, les maladies secondairement progressives sont liées à un biais pro-inflammatoire de la réponse immunitaire. La phase d'EAE secondairement progressive avec persistance de poussées (EAE secondaire ataxique) serait liée à l'épuisement de la réponse Th2 au fur et à mesure de la maladie. EAE: encéphalomyélite auto-immune expérimentale; PP: primaire progressive; RR: poussée-rémission; SP: secondairement progressive. Modifié d'après (Martinez et al., 2013)

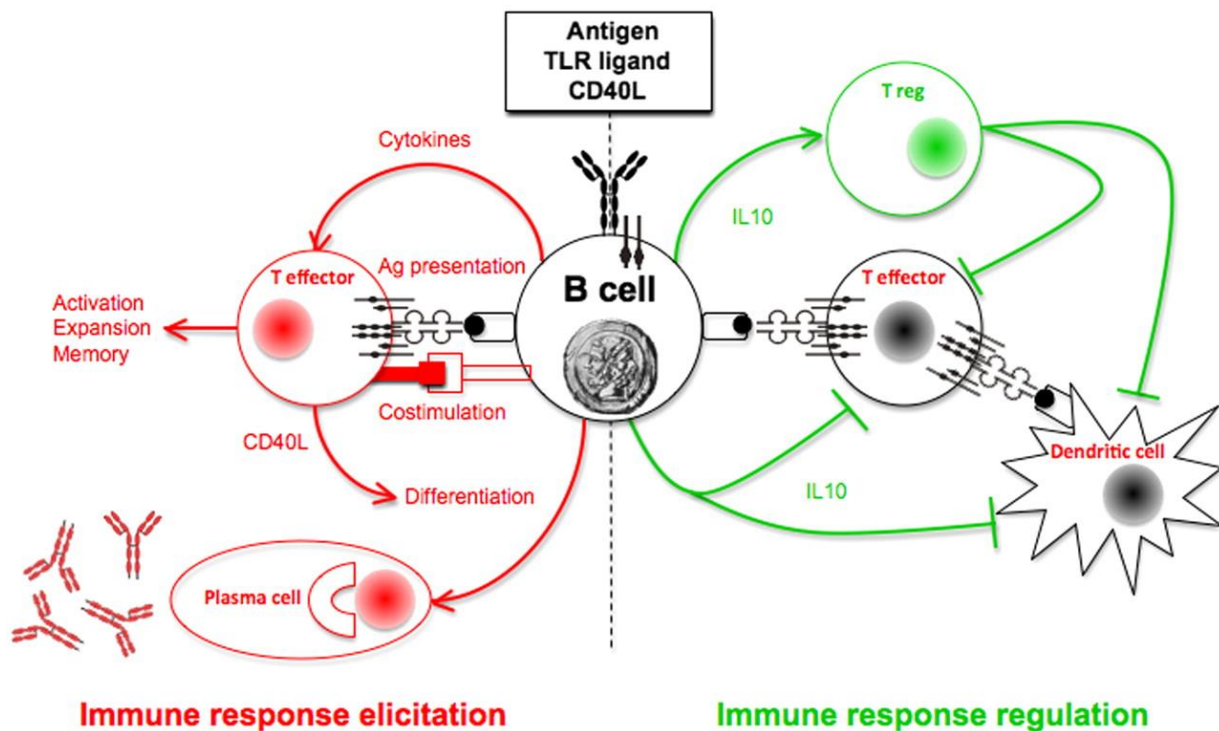
### c) Les lymphocytes T CD8 régulateurs

Si le rôle des T CD8<sup>+</sup> dans la pathogénèse de l'EAE et de la SEP est à la fois controversé et peu étudié, leur capacité d'inhibition de la maladie est relativement claire. Le fonctionnement de ces cellules n'est pas encore complètement compris mais il apparaît que leur émergence suit le même type de cheminement que les CD4 régulateurs. Les CD8 régulateurs sont des cellules de type mémoire, de faible affinité auto-réactive et dont le développement dépend des CD4 (Shameli et al., 2011). Dès 2003, le rôle régulateur des CD8 est rapporté : la soustraction des CD8 dans une souris avant l'immunisation conduit à une EAE exacerbée (Najafian et al., 2003). Un constat similaire est rapporté avec des animaux  $\beta$ -2 microglobuline<sup>-/-</sup> (CMH-I<sup>-/-</sup>) bien que l'implication des NK/ NKT puisse être discutée (Linker et al., 2005). Chez l'Homme, les CD8 régulateurs ont également été retrouvés au niveau du SNC et du sang des patients en phase de poussée (Baughman et al., 2011) et les traitements par l'acétate de glatiramère (copaxone) se sont révélés efficaces pour induire des CD8reg *in vivo* (Karandikar et al., 2002) bien que l'effet thérapeutique reste faible. Contrairement aux CD4 régulateurs, les CD8 régulateurs ne présentent que deux phénotypes : CD8<sup>+</sup>foxp3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> ou CD8<sup>+</sup>foxp3<sup>+</sup>CD22<sup>+</sup> (Lee et al., 2008b; Vuddamalay and van Meerwijk, 2017) et produiraient du TGF- $\beta$ 1, de la perforine et de l'IFN- $\gamma$  (Jiang et al., 2009). La perte de l'une de ces molécules sécrétées rend les CD8 régulateurs inefficaces *in vitro* (Tyler et al., 2013). Bien que ces deux types de cellules aient été démontrés inhibiteurs dans l'EAE, l'implication respective de chacun n'est pas encore élucidée (Najafian et al., 2003). À l'heure actuelle on pense que la spécificité de l'antigène ou la restriction du CMH, paramètres dépendants du modèle pathologique, sont responsables de l'implication préférentielle de l'un ou l'autre des types de CD8 régulateurs (Sinha et al., 2015). Chez la souris les CD8 spécifiques des neuro-antigènes restreints au CMH I non conventionnel Q1-a se sont montrés particulièrement efficaces pour limiter l'activation des T CD4<sup>+</sup> MBP spécifiques (Tyler et al., 2013) y compris au stade de la maladie établie (York et al., 2010). Il a été noté que les CD8 régulateurs sont diminués chez les Hommes et les souris présentant la pathologie (Cunnusamy et al., 2014) et présentent des capacités inhibitrices diminuées (Balashov et al., 1995). Par ailleurs, les mêmes auteurs ont montré l'existence d'une balance de ces CD8 régulateurs entre les phases de poussée et de rémission. Plus récemment, une étude a démontré une corrélation directe entre le nombre de CD8 régulateurs en périphérie et la gravité de la maladie (Sinha et al., 2014). Le rôle de ces CD8 régulateurs dans la sclérose en plaque peut potentiellement être essentiel dans la régulation de la pathologie. Davantage de travaux pour comprendre la biologie de ces cellules restent nécessaires.

## d) Les lymphocytes B régulateurs

En parallèle de leur activité pathogène, les lymphocytes B activés sont également capables de supprimer une réaction inflammatoire. En 2002, l'équipe de Stephen Anderton démontre que ces cellules B productrices d'IL-10 sont nécessaires aux phases de rémission et leur perte entraîne une maladie chronique sans perspective d'amélioration (Fillatreau et al., 2002). Cet effet passe par la différenciation et la survie de Tregs tout en diminuant la différenciation Th1 et Th17 *in vivo* (Flores-Borja et al., 2013). Encore une fois, l'IL-10 est la cytokine centrale du mécanisme : l'inactivation de l'IL-10 spécifiquement dans les B empêche l'accumulation de Tregs et restaure le biais Th1/Th17 (Carter et al., 2011). Le TGF- $\beta$  et l'IL-35 contribuent également à la régulation par les cellules B et à la résolution de l'inflammation à la fois par les Bregs et les Th. Le TGF- $\beta$  est capable de rediriger la production d'anticorps vers des sous-classes non inflammatoires telles que les IgG4 et les IgA (Taylor et al., 2006) et le TGF- $\beta$  produit directement par les Bregs est capable d'induire l'apoptose des T-CD4+ et leur conversion en Tregs mais également l'anergie des T-CD8+ (Parekh et al., 2003; Tian et al., 2001). D'un autre côté, les souris chez lesquelles les lymphocytes B sont incapables de produire de l'IL-35 (soit  $p35^{-/-}$  soit  $ebi3^{-/-}$ ) perdent également les phases de rémissions de l'EAE ce qui est en lien avec une activation des macrophages et des T inflammatoires élevée ainsi que l'augmentation de la capacité de présentation des auto-antigènes par les B (Shen et al., 2014). La raison en est que l'IL-35 serait, avec l'IL-21, l'un des régulateurs de l'IL-10 (Tedder and Leonard, 2014). Par ailleurs, dans un travail récent, une nouvelle population de Tregs, directement inductibles par les Bregs, a été décrite (Chien and Chiang, 2017). Dénommées « Treg-of-B cells » par les deux chercheurs, ces cellules sont des T naïves CD4+CD25- induites en cellules régulatrices CD25+Foxp3- et sont d'avantage caractérisées par leur expression de LAG3, ICOS, GITR, OX40, PD1 et CTLA4. Elles sécrètent de l'IL-10, mais sont également capables d'induire une suppression par contact cellulaire indépendant de l'IL-10. Notre laboratoire a par ailleurs démontré que l'utilisation de pro-B traités au CpG capables de se convertir en Bregs est capable de réguler efficacement plusieurs pathologies auto-immunes par différents mécanismes qui ont été détaillés dans la partie consacrée aux CpG-proB.

Il est intéressant de noter que tous les Bregs sont également capables de produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 : leur fonction dépend du contexte cellulaire et cytokinique associé à l'inflammation considérée (Figure 14). Ces cellules sont complexes et du fait de leur vaste spectre d'activités, leur manipulation est ardue. Preuve s'il en est, les résultats assez variables qu'ont pu donner différents essais cliniques visant à moduler l'activité des B (Coles et al., 1999; Compston and Coles, 2002; Giovannoni et al., 2017).



**Figure 14** : Les deux visages des lymphocytes B. Les lymphocytes B sont capables d'induire ou d'arrêter une réponse immunitaire. Gauche : les B présentent l'antigène avec des molécules de co-stimulation conduisant à l'activation et à la prolifération des T effecteurs. En regard, les T actives vont présenter CD40L qui va induire la différenciation des B en plasmocytes producteurs d'auto-anticorps. Les cytokines produites par ces cellules participent à la polarisation Th1/Th17 caractéristique de l'EAE et de la SEP. Enfin, les B participent au développement de T mémoire. Droite : Les B régulent la réponse auto-immune en produisant de l'IL-10 qui supprime l'expansion et l'activation des Th1 et Th17 pour induire une réorientation vers Treg et en parallèle participer à la suppression des APC présentant l'autoantigène. D'après Arellano et al, 2015.

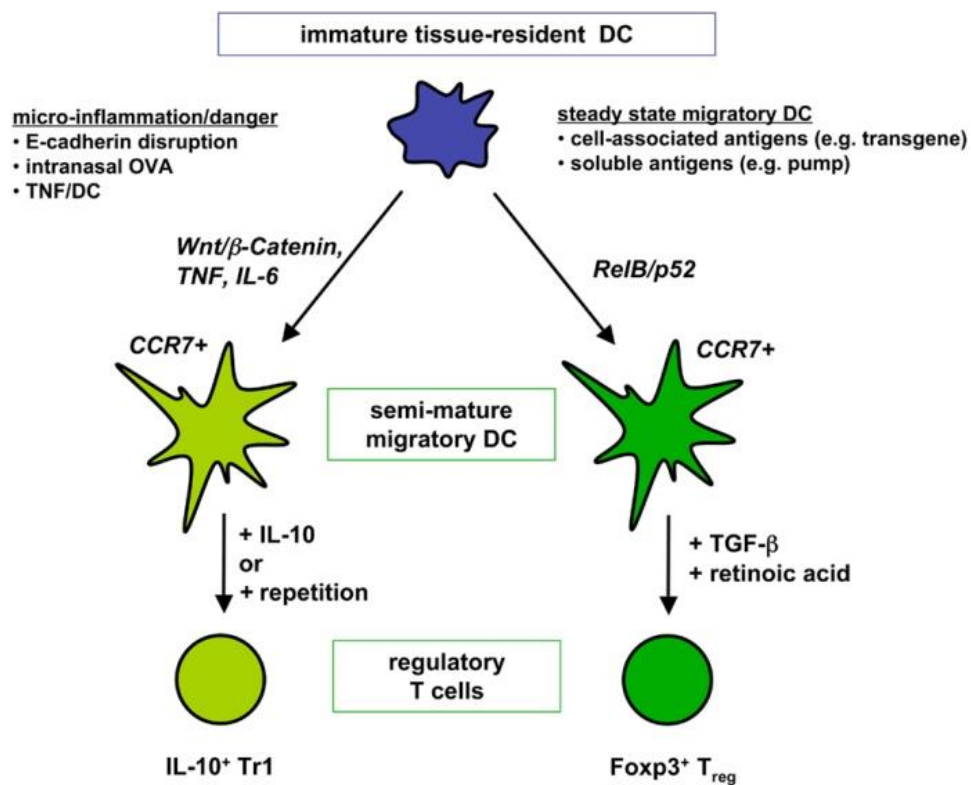
### e) Les DC tolérogènes

S'il est clair que les DC ont dans l'ensemble un rôle plutôt pathogène dans l'EAE et la SEP, certains sous-groupes de DC sont pourtant bénéfiques. Les DC immatures (iDC), déjà évoquées, ont plusieurs destins : soit devenir des DC matures, soit rester immatures, soit devenir des DC « semi matures ». Ces dernières présentent un phénotype intermédiaire entre les cellules matures et immatures : elles expriment fortement le CMH-II et les molécules de co-stimulation mais ne sont pas ou très peu capables de produire des cytokines, troisième signal essentiel à l'activation des T. L'identification des cellules immatures dans l'EAE est au crédit de l'équipe d'Adriano Fontana qui, en 2003, présente des résultats conflictuels avec le reste de la littérature, indiquant que les DC résidentes du SNC seraient de mauvaises présentatrices d'antigènes et supprimeraient la fonction des Th. Ces DC ont une expression faible du CMH-II et des molécules de co-stimulation de la famille B7, en particulier CD80 (B7-1). Elles émergent lorsque le précurseur de DC est dans un environnement cytokinique « conflictuel », présentant à la fois des cytokines pro-inflammatoires (GM-CSF) et anti-inflammatoires (IL-4) (Gregori et al., 2010). *In vitro*, ces cellules empêchent la prolifération des T auto-réactifs et ce, par le biais du TGF- $\beta$ , de l'IL-10 et de la forme soluble du récepteur 2 à TRAIL (sTRAIL-R2) (Suter et al., 2003). Même si ces cellules immatures puissent être dérivées des bDC, le recrutement d'iDC de la périphérie

est privilégié. Dans une étude de 2010, l'équipe de Britta Engelhardt met en évidence, par l'utilisation de la vidéomicroscopie intravitale à fluorescence que les iDC, et dans une moindre mesure les DC matures au LPS, issues de la moelle osseuse des souris immunisées entrent au SNC inflammé des animaux en passant la BBB. De manière très élégante, ils démontrent que cette entrée est liée à l'intégrine  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) et non  $\alpha_4\beta_7$  permettant le passage de l'endothélium microvasculaire, donc de façon relativement spécifique des iDC (Jain et al., 2010). Sur place, les iDC vont induire soit une tolérance des T CD4+ soit l'induction de l'anergie des CD4+ par manque de signaux de stimulation forts. Le mécanisme *in vivo* dans l'EAE n'est pas parfaitement clair, mais plusieurs études *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de diabète auto-immun donnent à penser que l'induction de Tregs est liée à la présentation répétée de faibles doses d'antigène. Cela induit la conversion de T pathogènes en cellules de type Tr1 spécifiques d'antigènes producteurs de grandes quantités d'IL-10 (Jonuleit et al., 2000; Turner et al., 2009). D'un point de vue fonctionnel, les capacités régulatrices des iDC passeraient par un niveau faible de NF- $\kappa$ B ; manipuler le niveau de ce facteur de transcription dans les cellules immatures pourrait potentialiser leurs capacités régulatrices (Iruetagoiena et al., 2006). De façon très intéressante, la régulation par les iDC ne s'effectue pas exclusivement au site inflammatoire mais également en périphérie, dans les LN cervicaux, où elles induiraient les Tregs. Dans ce sens, il a été prouvé que les iDC sont capables de capturer des corps apoptotiques, très abondants dans le cadre de la neuro-inflammation, par le biais d' $\alpha_v\beta_5$  et CD36, les digèrent, les présentent sur le CMH-II et les cross-présentent sur le CMH-I de façon dépendante du TNF- $\alpha$  (Albert et al., 1998). Les iDC migrent ensuite aux LN tout en mûrissant. Là elles induisent non seulement des Tregs mais également des CD8 régulateurs (Kushwah et al., 2010). Ceci pose la question suivante : les iDC ont-elles un rôle par elles-mêmes, ou la relative maturation vers le stade DC semi-matures est-elle nécessaire aux fonctions régulatrices des iDC ? En effet, l'équipe de Lutz, plutôt que d'injecter des iDC, choisit d'injecter de manière répétée des DC semi-matures directement activées par le TNF- $\alpha$ . Ce faisant, il parvient aux mêmes résultats *in vivo* dans l'EAE qu'avec l'injection d'iDC: réduction de l'EAE, induction d'IL-10 et conversion des Th vers des cellules de type Tr1 et ce, de façon spécifique de l'antigène (Menges et al., 2002). De façon très intéressante, ils démontrent aussi que l'IL-10 n'est pas un facteur essentiel à la protection par ces cellules de type Tr1, mais dépend également du contact cellulaire. En 2009, l'équipe de Fabry reproduit ces expériences et démontre que les DC semi-matures induites au TNF- $\alpha$  sont capables de moduler l'EAE là où leur équivalent stimulé avec du LPS a l'effet inverse bien que les deux types de cellules soient capables d'induire des Tregs *in vivo*. Il est possible de restaurer l'effet protecteur des DC semi-matures traitées au LPS si elles sont au préalable traitées à la dexaméthasone (qui inhibe la maturation) et sont même des régulatrices plus puissantes que les DC semi-matures induites au TNF- $\alpha$  (Emmer et al., 2006). Ces résultats indiquent qu'un premier signal anti-inflammatoire est probablement nécessaire à l'induction de ces cellules tolérogènes et qu'un second signal inflammatoire potentialise leur capacité régulatrice. Plus récemment, les DC semi-immatures ont été divisées en deux groupes distincts CCR7<sup>+</sup> et CCR7<sup>lo</sup>. L'induction différentielle de CCR7 chez les DC est directement liée à leur environnement :



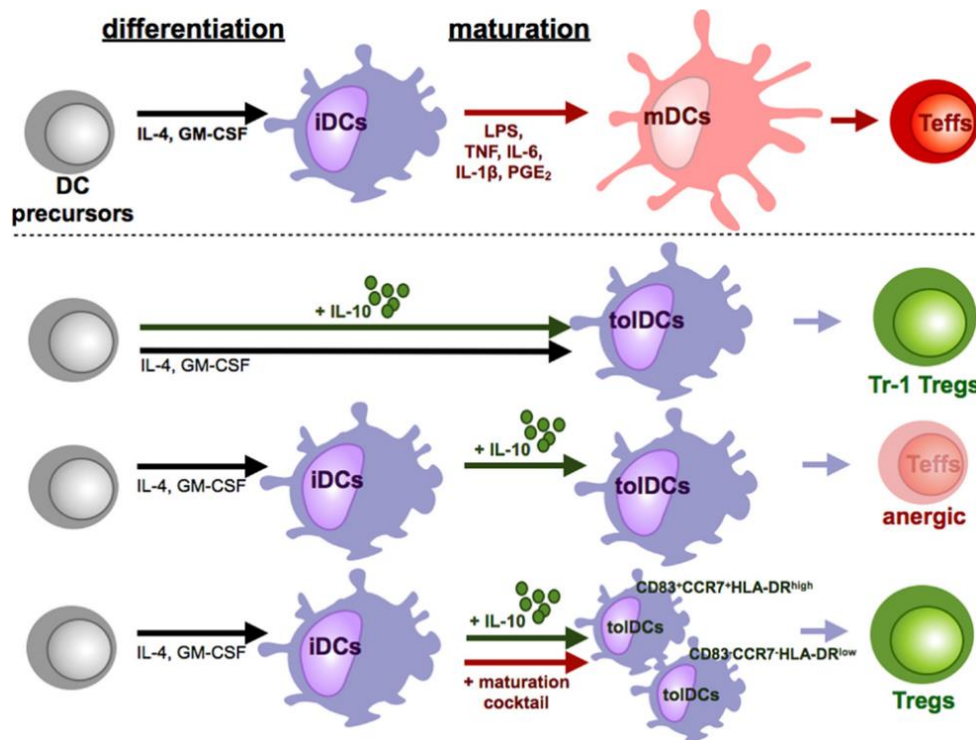
l'IL-10 ou la dexaméthasone sont capables d'induire la population CCR7<sup>lo</sup> alors qu'à l'inverse le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 induisent d'avantage la population CCR7<sup>+</sup> (Boks et al., 2012; Sordi et al., 2006). Ces deux populations sont fonctionnellement distinctes au-delà de leur capacité à migrer ou non aux organes lymphoïdes secondaires et ont des fonctions d'induction différentes : la population CCR7<sup>+</sup> induit des cellules de type Tr1 là où les populations CCR7<sup>lo</sup> induisent davantage les Tregs (Figure 15). L'ensemble de ces résultats fait directement écho aux rôles déjà décrits des iDC. Les iDC et les DC semi-matures diffèrent essentiellement au regard de leur niveau d'expression du CMH-II et des molécules de co-stimulation. Si une étude utilisant des iDC CMH-II<sup>-/-</sup> ne paraît pas envisageable car l'induction de la protection passe probablement par le niveau faible de CMH-II, l'utilisation de CD80<sup>-/-</sup> ou CD86<sup>-/-</sup> pourrait permettre de départager le rôle spécifique des iDC et des DC semi-matures. Par ailleurs, les iDC et les DC semi-matures ne semblent pas capables d'induire de Th2 *in vivo* bien que leur rôle protecteur dans l'EAE soit central. Cela est lié au fait que les Th2 requièrent de forts niveaux d'activation pour se différencier.



**Figure 15 :** Les deux voies distinctes de semi-maturation induisent différents types de T régulateurs. Les DC immatures résidentes des tissus ou les DC générées *in vitro* par des voies faisant intervenir Wnt ou la  $\beta$ -caténine ou des cytokines pro-inflammatoires deviennent semi matures faiblement capables de migrer. Par la production d'IL-10 ou le contact répété, ces cellules favorisent la différenciation Tr1. De l'autre côté, des DC semi-matures fortement mobiles émergent, bien que leur processus de maturation soit partiellement incompris. Ces cellules expriment RelB/p52+ ainsi que des facteurs de homing dans les zones T des LN périphériques. Ces cellules produisent de l'acide rétinoïque et du TGF- $\beta$  qui induisent *de novo* des Tregs spécifiques de l'antigène porté par les DC. (D'après Lutz, 2012)

L'existence de DC régulatrices (tolDC) matures reste à démontrer clairement. Dans la littérature, les DC tolérogènes, régulatrices et semi-matures sont souvent traitées comme une seule population. De fait, le phénotype des tolDC est le sujet de débats. En 1999, Onji et son équipe induisent *ex-vivo* des DC tolérogènes

par le traitement de DC matures spléniques avec de l'IFN $\gamma$ . Ces cellules, une fois transférées à des souris NOD, se révèlent protectrices contre le diabète de type I et sont donc immunomodulatrices (Shinomiya et al., 1999). Plus récemment, une équipe a montré que des DC matures cultivées avec du TGF- $\beta$  et l'auto-antigène sont capables d'induire l'amélioration clinique de l'uvéite en induisant des CD8 régulateurs spécifiques de l'antigène (Hsu et al., 2014). Il est donc possible d'obtenir des tolDC à partir de DC matures. Davantage que par un phénotype de surface, les tolDC sont à définir par leur fonction du fait de la diversité des cellules régulatrices considérées. *In vitro*, il semble que l'IL-10 soit la cytokine régulatrice majeure de l'induction des tolDC et différents protocoles s'en servent pour faire émerger ces cellules. Le mode d'action des tolDC dépend du moment où l'IL-10 a été ajouté à la culture (Figure 16). Ainsi, des monocytes cultivés avec de l'IL-4, du GM-CSF et de l'IL-10 donnent des DC matures capables d'induire la différenciation de Tr1 (Allavena et al., 1998). Ces tolDC sont dites myéloïdes en raison de leur expression de marqueurs membranaires classiquement associés aux macrophages tels que CD14 et CD16. Ces cellules ont pour phénotype CD14+CD16+CD83+CD86+HLA-DR+ et expriment, en plus de grandes quantités d'IL-10, de nombreuses molécules associées à l'induction de tolérance telles que HLA-G, ILT2 (CD85j), ILT3 (CD85k) et ILT4(CD85j) ce qui induit entre autres des Tregs. Si l'IL-10 est ajouté non pas à une culture de monocytes mais à des iDC, les DC régulatrices qui en résultent ne sont plus capables d'induire des T régulateurs mais induisent l'anergie des T en culture (Zheng et al., 2004), ce qui pourrait contribuer à réduire l'état inflammatoire du SNC. Si des signaux inflammatoires tels que l'IL-6 ou l'IL-1 $\beta$  sont ajoutés au protocole de culture précédent, deux types de tolDC émergent, distingués par leur expression de CCR7. Si la population CCR7- est considérée immature, la population CCR7+ est dite mature (Steinbrink et al., 2002). Bien que caractérisées par l'équipe d'Enk, ces cellules ressemblent à celles présentées comme immatures dans la partie précédente qui avaient été caractérisées par l'équipe de Piemonti et Brinke, mettant l'accent sur la difficulté à distinguer les DC matures des DC semi-matures.



**Figure 16 :** Les voies de tolérisation des DC. Sous l'influence de cytokines pro-inflammatoires et d'autres médiateurs solubles et l'engagement des PRR, les iDC maturent en mDC. À l'inverse des DC matures, l'IL-10 induit de nombreuses populations de DC tolérogènes (toIDC). L'état de différenciation des cellules au moment de l'exposition à l'IL-10 est crucial pour l'induction de toIDC. Une exposition longue depuis le stade de précurseur conduira à l'induction de cellules de type Tr1. Si les DC sont déjà au stade immature au moment de leur exposition avec l'IL-10 les toIDC conduiront davantage à l'anergie des T ou à leur apoptose (D'après Raker et al, 2015)

Plusieurs équipes se sont intéressées aux mécanismes d'induction des Tregs par les toIDC *in vivo*. Si un certain nombre d'entre eux sont communs aux iDC et aux DC semi-matures, un certain nombre sont spécifiques des DC matures. L'un des premiers mécanismes associé aux toIDC est l'Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), une enzyme qui dégrade le tryptophane en kinurénine (Taylor and Feng, 1991). Cette enzyme est capable d'appauvrir le milieu en tryptophane et d'induire la conversion métabolique des T qui s'accompagne de l'expression stable d'un phénotype régulateur (Mellor and Munn, 1999). Cette enzyme est induite *in vivo* à la surface des DC par plusieurs signaux tels que l'IFN $\gamma$ , CTLA-4 ou la liaison de CD80/CD86 (Grohmann et al., 2002). IDO peut également être induite par la vitamine D3 (Farias et al., 2013). Il a été prouvé que, dans l'EAE, IDO est essentielle à la régulation de la maladie chez les animaux. L'injection de 1-méthyl-DL-tryptophane, un ligand compétitif non dégradé d'IDO induit un déclenchement précoce de la maladie et un score clinique plus grave chez les souris immunisées pour l'EAE ou ayant reçu un transfert adoptif de T spécifiques de MBP (Sakurai et al., 2002). Il est important de noter que les DC CD8 $\alpha^+$  sont les plus capables de cataboliser le tryptophane et donc d'induire des Tregs que les CD8 $\alpha^-$ , bien que leur niveau de protéine IDO détectée par westernblot soit identique. Ceci évoque des mécanismes de régulation de l'adressage membranaire d'IDO malgré une expression constitutive chez les DC (Fallarino et al., 2002). L'oxyde nitrique en particulier, est connu pour inactiver IDO en déstabilisant l'hème dans le site actif et d'induire de fait son adressage au protéasome (Aitken et al., 2004). Ce mécanisme peut probablement en partie expliquer le défaut d'induction efficace de Tregs au niveau du SNC au cours de l'EAE du fait de la

concentration importante d'oxyde nitrique que l'on peut y trouver. Du point de vue des DC cette fois, l'équipe de Tony Eissa propose que les DC régulatrices soient caractérisées par un phénotype métabolique propre. Ils démontrent que les DC régulatrices présentent un défaut d'autophagie et que l'induction de la perte de l'autophagie par la mutation du gène Atg7 dans les DC améliore l'EAE (Bhattacharya et al., 2014).

Les ligands de Notch sont également impliqués dans le rôle régulateur des DC. S'ils sont surtout étudiés pour leur rôle dans le développement T, les ligands de Notch sont aussi capables d'induire, par le biais des DC, une régulation du système immunitaire. Déjà décrite en 2003 dans la maladie du greffon contre l'hôte, la surexpression de Jagged-1 sur les DC permet l'induction de Tregs spécifiques de l'antigène considéré (Yvon et al., 2003). Les ligands de Notch sur les DC sont étudiés dans l'EAE dès 2007. Jagged-1 est surexprimé exclusivement sur les DC dans le cadre de l'EAE et induit l'augmentation de la production de TGF- $\beta$  par les Tregs et la production d'IL-10 de manière spécifique de l'antigène. Cette production de cytokine n'a pas eu d'effet sur le nombre de Foxp3+ ou de Th17 chez l'animal. Le traitement avec un anticorps anti-Jagged-1 induit une aggravation de l'état clinique de l'EAE (Elyaman et al., 2007). Cette molécule est induite par le TGF- $\beta$ , alors que l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$  et l'IL-17 diminuent son expression, ce qui concorde avec son rôle anti-inflammatoire. De plus, Delta-1 qui peut également être exprimé sur les DC induit l'augmentation du nombre de Th1 et l'aggravation de la maladie.

TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) est une molécule de la famille du TNF et est davantage connue pour son rôle dans l'induction de l'apoptose que pour ses propriétés régulatrices. Toutefois, il a été montré que les DC matures chargées avec MOG et qui co-expriment TRAIL sont capables de diminuer la sévérité de l'EAE chez les souris traitées. Cela se traduit par l'accumulation de CD4+Foxp3+ au niveau de la moelle épinière, le site inflammatoire de ce modèle (Hirata et al., 2007). Ces cellules seraient issues de la conversion des T effecteurs infiltrants en Tregs plutôt que de l'induction de la différenciation de Tregs à partir de Th0 venus de la périphérie. Dans le même esprit, la molécule programmed cell death 1 (PD-1) est, comme son nom l'indique, impliquée dans l'induction de l'apoptose chez les cellules qui reçoivent le signal issu de la liaison de PD-1 avec son ligant PD-L1. L'induction de la tolérance par la voie PD-L1+/PD-L2+ est liée au fait que les CD4 ayant reçu le signal co-activateur CD28 surexpriment PD-1 (Walunas et al., 1994). Ceci induit chez le lymphocyte une diminution de la production cytokinique (en particulier l'IFN $\gamma$ ), et une diminution de la prolifération et augmente l'apoptose. La présence de PD-L1 et PD-L2 est décrite sur les DC en 2012 par l'équipe d'Ari Waismann ; la perte de ces DC aggrave l'EAE (Yogev et al., 2012). Ils démontrent également qu'à l'état basal la liaison de PD-1 avec ses ligands induit la conversion des T naïves en Tregs productrices de TGF- $\beta$  spécifiques de l'antigène en périphérie. Ces DC sont très peu présentes dans le cadre de l'EAE et pourraient contribuer à un terrain sensibilisé bien qu'il soit à nouveau difficile de déterminer si la perte de ces cellules est cause ou conséquence de l'EAE.

L'induction de l'EAE est souvent réalisée par immunisation des souris avec un neuro-peptide dans de l'adjuvant complet de Freund qui contient comme agent immunogène le *Mycobacterium tuberculosis*. De fait, les TLR sont nécessaires à la mise en place de l'EAE. Bien que les TLR soient dans l'ensemble associés à l'activation de DC, et en particulier participent aux toutes premières étapes de la prise en charge de l'antigène, certains TLR ont été associés aux fonctions régulatrices des DC. Ainsi, dans un modèle de peste, l'engagement du TLR6 s'est démontré capable d'induire la production d'IL-10 dans des cellules dendritiques induisant par la suite la différenciation de Tr1 (Depaolo et al., 2008). Bien que l'étude n'ait pas été menée dans l'EAE, il a été démontré que l'Apolipoprotéine E (ApoE) joue un rôle de neuroantigène circulant (Shi et al., 2011). Cette lipoprotéine possède un rôle dans la pathogénèse de la maladie : les souris ApoE<sup>-/-</sup> sont moins susceptibles à l'EAE que les souris WT (Shin et al., 2014). Le TLR6 pourrait donc être une des voies d'induction des tolDC dans l'EAE. Dans une autre étude comparant trois sous-classes de tolDC humaines, il a été déterminé que si les tolDC possèdent la même panoplie de TLR que les DC immunogènes (tous les TLR connus chez l'Homme), leur capacité à répondre à l'engagement de certains de ces récepteurs est différente. C'est le cas du TLR1/2 (Pam3CSK4), du TLR3 (poly I:C), du TLR4 (LPS) et du TLR5 (flagelline) (Chamorro et al., 2009). Outre le fait que les cellules ne produisent pas d'IL-12, mais de grandes quantités d'IL-10 en réponse à l'engagement de leur TLR, elles sont les seules cellules à augmenter leur expression de TLR2 à leur surface. Cela se traduit par une potentialisation de la production d'IL-10 par ces mêmes tolDC, en particulier après un premier signal LPS. Par ailleurs, là où chez les DC conventionnelles l'engagement de ces TLR se traduit par la maturation/activation, les tolDC gardent un phénotype régulateur stable. Contrairement aux iDC qui présentaient un phénotype régulateur « par défaut » du fait de leur incapacité à s'activer en relation avec un niveau de NF-κB constitutivement bas, les tolDC matures présentent un niveau de NF-κB haut (Funderburg et al., 2011). Ce phénotype activement régulateur est d'ailleurs probablement la clef de la stabilité de leur fonction. Si l'injection de tolDC préalablement traitées n'a pas été testée en EAE, l'injection répétée d'agonistes du TLR2 a été démontrée capable d'induire une régulation de l'EAE. Ceci est dû à la réduction du nombre de Th17 et de macrophages, en parallèle d'une relative augmentation du nombre de Tregs (Anstadt et al., 2016). Ces résultats sont toutefois à prendre avec beaucoup de précaution : l'exposition prolongée aux agonistes des TLR endommage les HSC et les mobilise à la périphérie ce qui les rend incapables d'assurer une hématopoïèse suffisante (en particulier des macrophages) et induit à terme un syndrome d'insuffisance médullaire et donc une aplasie pouvant être mortelle (Espinoza et al., 2017; Esplin et al., 2011).

D'autres types cellulaires que les Tregs pourraient également entrer en jeu dans les phénomènes de régulation de l'EAE par les tolDC, comme les lymphocytes B. Peu d'études se sont intéressées à l'induction de Breg par les tolDC. Toutefois, chez l'Homme dans un essai clinique de traitement du diabète de type I par des tolDC, les chercheurs ont pu remarquer l'augmentation de lymphocytes « CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> » (Giannoukakis

et al., 2011). Ils mettent en évidence trois ans plus tard dans un modèle de souris NOD que les cellules augmentées par le traitement avec les tolDC sont des Breg producteurs d'IL-10 ; et postulent, avec toutes les précautions nécessaires, qu'il en est probablement de même chez l'Homme (Di Caro et al., 2014). L'équipe de Di Caro s'est intéressée aux mécanismes de l'induction de ces Bregs par les tolDC et propose que certaines Bregs (CD19<sup>hi</sup>FcγIIb<sup>hi</sup>) puissent être induites par le signal de l'IFN-β et de CD40L. Toutefois, le sujet de l'induction des Bregs par des tolDC est encore assez obscur et aucune étude n'a été réalisée dans l'EAE.

#### **f) Le rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes**

Plus rares que les cDC, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont caractérisées par le phénotype CD11c<sup>lo</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup>E2.2<sup>+</sup> ainsi que par la production de grandes quantités d'interféron de type I et plus modérément, de l'IL-6 et du TNF-α. À la différence des cDC, les pDC ont une morphologie assez ronde, ressemblant à celle des plasmocytes. À l'état basal, les pDC patrouillent dans le sang et résident dans les organes lymphoïdes secondaires. Ce sont des cellules relativement rares (0.3% à 0.4% des PBMC contre 0.8% à 1% des PBMC pour les cDC) mais leur proportion et leur activité peuvent drastiquement varier en cas de réponse immunitaire, en particulier à un virus. En effet, les pDC expriment à la fois le TLR7 et le TLR9 dans leurs endosomes, chacun respectivement capable de détecter l'ARN simple brin et l'ADN simple brin (ou le CpG), deux acides nucléiques dérivés des virus, des bactéries ou des cellules mortes. L'engagement de ces deux TLR induit une cascade de signalisation dépendante de Myd88, IRAK 1,2 et 4 et finalement IRF7. La translocation de ce facteur de transcription phosphorylé au noyau induit la transcription d'INF de type I, principalement α et β (Fonteneau et al., 2004). Dans les DC, les IFN de type I sont également chaperons de leur propre production. Ils sont capables d'aller se fixer sur leur récepteur commun IFNAR, dont la liaison active une voie moléculaire différente de celle des TLR, dépendante d'IRF8 qui va également transcrire les gènes des IFN de type I (Tailor et al., 2007). En parallèle de leur production d'IFN de type I, et de manière similaire aux cDC, les pDC vont augmenter leur niveau d'expression des CMH et des molécules de co-stimulation leur permettant de présenter des antigènes aux T (Di Pucchio et al., 2008). Les auteurs montrent également que les antigènes sont préférentiellement cross-présentés par les pDC sur le CMH-I ce qui les rend efficaces pour induire une bonne réponse CD8+. En revanche, les pDC produisent MARCH-1, une ubiquitine ligase qui ajoute au CMH-II des groupements ubiquitine ce qui a pour effet d'adresser très rapidement la protéine au protéasome. Du fait de ce turn-over très rapide, les pDC ne sont pas capables de maintenir un antigène très longtemps à leur surface ce qui explique leur capacité médiocre à activer les CD4+ (Young et al., 2008).

Il est connu depuis le début des années 2000 que les pDC adéquatement stimulées peuvent être des inductrices d'une réponse effectrice efficace. Dans un modèle de réponse au virus de la grippe par exemple, les pDC induisent une importante réponse Th1 par le biais de CD40L (Cella et al., 2000). Dans le cadre de

l'EAE, plusieurs études ont montré que les pDC pouvaient participer à la pathogénèse de l'EAE par différents mécanismes. En 2007, il est prouvé que les pDC présentes dans le SNC, bien que moins efficaces que les mDC, sont capables de présenter l'auto-antigène et d'induire une réponse des CD4+. Les cellules qui résultent de cette activation sont orientées préférentiellement vers Th17, dans une moindre mesure Th1, et sont pathogènes (Bailey et al., 2007). Deux ans plus tard, l'équipe d'Anna Lobell réalise la déplétion des pDC avec un anticorps anti PDCA-1 et démontre que la perte des pDC avant l'induction de l'EAE est cliniquement bénéfique aux animaux traités. Cela passe notamment par une baisse significative de la concentration sérique d'IFN de type I et une fréquence de Th17 diminuée en périphérie. Toutefois, la neutralisation des IFN de type I chez des animaux immunisés pour l'EAE ne réplique que partiellement le phénotype. Ces résultats mettent donc en évidence que les pDC sont nécessaires à la phase d'initiation de l'EAE par des mécanismes qui peuvent faire intervenir la production d'IFN de type I et la présentation de l'antigène sur le CMH-II (Isaksson et al., 2009). Le même groupe démontre également que la perte des pDC une semaine après l'immunisation des animaux aboutit en revanche à une aggravation des signes cliniques. Au cours de l'EAE, les pDC sont recrutées aux LN où elles sont capables de présenter, faiblement, des neuro-antigènes restreints au CMH-II et d'induire des Tregs spécifiques de la myéline (Irla et al., 2010). L'ablation spécifique du CMH-II sur les pDC aggrave le cours de l'EAE en favorisant la présentation de l'antigène par d'autres APC pro-inflammatoires en périphérie, ce qui compromet l'expansion de tTregs spécifiques de la myéline. L'équilibre entre Tregs et Th penche en faveur des Th qui infiltrent plus massivement le SNC. Les interactions entre les pDC et les Tregs sont capables d'induire l'expression d'IDO par les pDC de manière dépendante de l'antigène et contribuent aux capacités suppressives des pDC dans l'EAE (Lippens et al., 2016).

Chez l'Homme, dans le cadre de la SEP, les pDC s'accumulent dans le SNC et le LCR des patients (Pashenkov et al., 2001). Si dans le sang, leur nombre ne change pas, les pDC d'un patient SEP non traité présentent un phénotype dysfonctionnel vis-à-vis de ceux d'un donneur sain. En particulier, ces pDC présentent des niveaux particulièrement faibles de molécules de co-stimulation comme CD40 et CD86 reflétant une incapacité à s'activer. Après activation *in vitro* avec IL-3 et CD40L, les cellules conservent leur niveau faible de CD86 et réduisent même leurs niveaux de CD40 et CD83 ce qui traduit une incapacité à maturer (Stasiolek et al., 2006). Par ailleurs, la stimulation de ces pDC *in vitro* par de l'ODN CpG (TLR9) n'est pas capable d'induire la production d'IFN $\alpha$ . De la même manière, dans un système de co-culture avec des PBMC, la production d'IFN $\gamma$  est largement diminuée et la prolifération de PBMC est faible. Les pDC ainsi obtenues à partir du sang de patients traités à l'acétate de glatiramère restaurent en partie leur phénotype (niveau augmenté de CD86) et leur fonction (prolifération des PBMC). La restauration de la fonction des pDC corrèle avec l'amélioration clinique des patients ce qui étaye la possible fonction des pDC comme cellules régulatrices chez l'Homme. Il semble donc probable que la pathologie épuise ces cellules (phénotype « exhausted ») et qu'elles deviennent ainsi incapables de la réguler. Les pDC issues des patients présentent

en effet toutes les caractéristiques de cet état d'épuisement: une faible expression de molécules de co-stimulation, une faible production de cytokines et une faible capacité à faire proliférer les PBMC. Les pDC sont davantage des cellules régulatrices dont l'épuisement permet l'entretien de l'inflammation. Il serait intéressant d'étudier le phénotype de ces mêmes pDC du LCR au moment de la rémission d'une poussée afin de savoir s'il s'agit des mêmes pDC ayant récupéré leur fonction régulatrice ou s'il s'agit de nouvelles pDC fonctionnelles issues de la périphérie qui les remplacent au cours du processus normal de renouvellement cellulaire.

Il a été montré que dans le sang des patients non traités, les pDC présentent un biais pDC1/pDC2 en faveur des pDC2. Lorsque ces cellules sont isolées et mises en culture avec des T naïfs, l'induction d'IL-17 plutôt que d'IL-10 est observée (Schwab et al., 2010). En revanche, les pDC isolées de patients répondant bien au traitement par les IFN $\beta$  et en état clinique stable (voir section IV, a) présentent une balance en faveur des pDC1. Les IFN de type I étant chaperons sur leur fonction, leur rôle protecteur passe probablement également par la réorientation de l'hématopoïèse des pDC.

La famille des interférons de type I comprend l'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$  (qui peut également être produit par les cDC) qui sont les types les plus courants et l'IFN $\kappa$ , l'IFN $\epsilon$ , l'IFN $\omega$  et l'IFN $\nu$  plus rares. Chez l'Homme, la forme IFN $\epsilon$  n'existe pas et du fait de leur forte ressemblance l'IFN $\epsilon$  et l'IFN $\kappa$  pourraient être deux isoformes de la même molécule dont seul l'IFN $\kappa$  aurait persisté chez les primates. Cette famille de molécules est une réponse particulièrement efficace en cas de réponse virale. Chez l'Homme et chez la souris, l'expression d'IFNAR, le récepteur unique à tous les IFN de type I, est ubiquitaire sur toutes les cellules nucléées. L'activation d'IFNAR a des effets variés suivant les cellules considérées. Dans toutes les cellules, les IFN de type I sont capables d'interférer directement avec la réplication virale par l'inhibition de la production d'ADN viral (via la phosphorylation d'EIF2 $\alpha$ ), la dégradation des ARN viraux (augmentation des RNAses) et la relative inhibition de la synthèse protéique. En parallèle, la cellule diminue fortement l'expression membranaire d'un ensemble de ses récepteurs membranaires glycoprotéiques et empêche l'arrimage et l'infection *de novo* (Meredith et al., 2014). Sur les cellules du système immunitaire inné en particulier, les IFN de type I sont capables d'induire la maturation des DC et l'augmentation de leurs molécules de co-stimulation ce qui promeut l'induction de Th1 et de CTL (Cella et al., 2000). Les NK, de leur côté vont s'activer fortement en augmentant le niveau de STAT1 qui favorise leur action cytotoxique et vont augmenter leur expression membranaire de Ly49A facilitant la reconnaissance et la lyse des cellules infectées (Paolini et al., 2015). Au niveau des lymphocytes B, les IFN de type I induisent la conversion isotypique vers IgA (Tezuka et al., 2011) dont ils augmentent la synthèse (Le Bon et al., 2001). Dans la mesure où les IFN de type I sont des molécules puissantes, pléiotropes et donc potentiellement dangereuses, leur production est finement régulée. Chez l'Homme, BDCA-2 et ILT7 régulent négativement la production d'IFN de type I là où ce rôle est tenu par NKp44 et Siglec-H chez la souris (Blasius et al., 2006). Chez la souris, l'engagement de Siglec-H empêche la



production d'IFN $\alpha$  en réponse à un signal TLR9 par l'ODN CpG (Blasius et al., 2004, 2006). À l'heure actuelle le ligand de Siglec-H n'est toujours pas connu.

Les IFN de type I sont un des éléments centraux de la régulation de la SEP par les pDC mais il convient de départager le rôle spécifique de l'IFN $\alpha$  et de l'IFN $\beta$ . Si l'IFN $\alpha$  peut avoir, à forte dose des effets neurotoxiques graves (Fritz-French and Tyor, 2012), dans le cas précis de l'EAE, l'IFN $\alpha$  est davantage protecteur. Le traitement oral de souris avec des pirimines est connu pour induire une nette amélioration clinique dans l'EAE sévère ce qui corrèle avec l'augmentation significative des concentrations sériques d'IFN $\alpha$ . L'administration par voie intraveineuse du composé s'est révélée davantage capable d'induire l'augmentation d'IFN $\alpha$  dans le sérum des animaux et coïncide avec une efficacité de régulation de l'EAE accrue (Vroegop et al., 1999). Le rôle protecteur de l'IFN $\alpha$  n'a pas été directement mis en évidence par son injection. Le risque de toxicité étant très important, les stratégies visant plutôt les pDC ou l'IFN $\beta$  sont privilégiées. Contrairement à l'IFN $\alpha$ , le rôle protecteur de l'IFN $\beta$  dans l'EAE est bien étudié. Dès 2003, il est montré que l'induction de l'EAE chez des souris IFN $\beta^{-/-}$  se traduit par une maladie plus sévère et des symptômes neurologiques chroniques expliqués par une inflammation et une démyélinisation du SNC plus importantes (Teige et al., 2003). Chez l'Homme, l'injection intramusculaire d'IFN $\beta$  est un des traitements les plus utilisés pour combattre les formes en poussée-rémission de la sclérose en plaques mais reste malheureusement inefficace contre les formes progressives. Il se traduit à la fois par une diminution du nombre de plaques de démyélinisation mais également par un espacement conséquent entre les poussées voire, dans les meilleurs cas, leur arrêt (Simon et al., 1998). La suppression de l'inflammation cérébrale est liée à l'induction de l'apoptose des cellules pro-encéphalitogènes. Bien que les cellules retrouvées au niveau du SNC aient un niveau augmenté de molécules pro-apoptotiques (Kaser et al., 1999), l'induction directe de l'apoptose des cellules pro-inflammatoires n'est pas observée (Zipp et al., 2000). En revanche, une forte apoptose des cellules pro-inflammatoires est retrouvée en périphérie, au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Gniadek et al., 2003). Le mécanisme d'induction de l'apoptose par l'IFN $\beta$  repose sur la participation de l'acide rétinoïque afin d'induire l'expression de GRIM-19 dans les cellules ce qui entraîne une mort cellulaire médiée par la caspase 9 (Angell et al., 2000). De façon complémentaire, l'IFN $\beta$  peut également empêcher la différenciation des Th1 et des Th17 par l'inhibition de la production des cytokines nécessaires à leur développement et participe ainsi à la perte de ces types cellulaires en périphérie (Durelli et al., 2009; Guo et al., 2008; McRae et al., 1998). Des approches complémentaires d'induction d'IFN $\beta$  par différentes molécules plutôt que son injection ont été envisagées et se sont révélées relativement efficaces pour réduire l'EAE (Dann et al., 2011; Khoroshi et al., 2015) et seront peut-être appliquées à l'Homme dans le futur.

L'IL-27 s'est révélé être un partenaire essentiel à l'induction de la protection par l'IFN $\beta$ . L'IL-27 est une cytokine anti-inflammatoire sécrétée par tous les types de DC et elle peut réduire l'inflammation par

différents mécanismes. Il a été montré en 2011 que l'IL-27 est l'intermédiaire nécessaire au traitement de la SEP par l'IFN $\beta$  et que cela passe par l'inhibition de la différenciation Th17 chez les patients. (Sweeney et al., 2011). Cette propriété de l'IL-27 n'est expliquée qu'en 2009 lorsque l'équipe de Kastelein parvient à mettre en évidence dans l'EAE que l'IL-27 bloque spécifiquement ROR $\gamma$  ce qui empêche la différenciation des Th0 vers Th17. Ils démontrent également que cela s'accompagne d'une augmentation d'IL-10 dans le SNC qui ne peut pas être retrouvée chez les animaux IL-27p28<sup>-/-</sup> (Diveu et al., 2009). Une autre équipe démontre que l'IL-27 est une cytokine capable d'induire une conversion robuste des Th17 vers Th1 en vertu de la plasticité des Th17 (Wanke et al., 2014). Chez l'Homme, un mécanisme similaire d'inhibition des Th17 mais également des Th1 est décrit, ce qui fait directement écho aux effets décrits avec l'IFN $\beta$  (Chong et al., 2014). Par ailleurs, l'étude des T ayant reçu le signal IL-27 montre la présence à leur surface de CD39, molécule associée à l'immuno-modulation (Mascanfroni et al., 2013). Il est également démontré que l'IL-27 mais pas l'IL-35 (une autre cytokine de la même famille qui partage la sous unité Ebi3), est capable de diminuer la production du GM-CSF *in vivo* et de réduire la neuro-inflammation dans l'EAE (Casella et al., 2017). Si l'IL-27 est une cytokine capable d'inhiber l'induction de Th17, son rôle ne se limite pas à la phase d'initiation de l'EAE et l'injection d'IL-27 au moment du déclenchement des signes cliniques de l'EAE supprime efficacement la pathologie (Fitzgerald et al., 2007). Par ailleurs, l'IL-27 peut être induit directement par l'engagement du TLR et ne requiert pas la présence de l'IFN $\beta$  pour être immuno modulateur mais dépend dans ce cas de la voie IRF3 (Molle et al., 2007).

Il est intéressant de noter que 30% à 50% des patients ne sont pas de bons répondeurs au traitement par l'IFN $\beta$  ; chez certains cela induit même une aggravation des symptômes, en particulier de la névrite optique (Warabi et al., 2007). Cela serait lié au fait qu'il coexiste deux types de SEP (et d'EAE) différentes. En effet, l'équipe de Mari Shinohara démontre que l'engagement du signal IFNAR sur les macrophages inhibe la production de ROS par le biais du cytokine signaling 1 (SOCS1). L'inhibition des ROS supprime l'activité de l'inflammasome NLRP3 ce qui diminue l'EAE (Inoue et al., 2012). Ils démontrent alors que deux types d'EAE peuvent être définis sur la base de leur dépendance à NLRP3. Suivant ce raisonnement, ils proposent que la résistance à l'IFN $\beta$  soit conférée par l'indépendance vis-à-vis de NLRP3, ce qu'ils démontrent en 2016 dans l'EAE (Inoue et al., 2016) et est démontré chez l'Homme en 2015 (Malhotra et al., 2015).

Si l'activation du TLR9 induit la production d'IFN de type I la plupart du temps, cela n'est pas le cas avec de fortes concentrations d'ODN CpG. Plusieurs équipes ont démontré que la courbe dose-réponse IFN $\alpha/\beta$  est biphasique. Ainsi à de fortes concentrations (plus de 0.1  $\mu$ M) l'ODN CpG a un effet inhibiteur sur la production d'IFN de type I par toutes les cellules dépendantes de Flt3, toutes les DC en particulier (Gray et al., 2007; Hemmi et al., 2003). Cette dose-réponse biphasique ne concerne que la production d'IFN de type I et n'impacte absolument pas la production d'autres cytokines. De façon intéressante, l'inhibition de

la production d'IFN de type I par l'ODN CpG concerne à la fois les voies de production d'IFN de type I dépendantes et indépendantes du signal par les TLR (Liu et al., 2010).

#### *iv) Modèle murin*

Si la pathogénèse de la SEP commence à être aussi bien comprise, c'est en grande partie grâce aux modèles animaux de cette maladie, en particulier chez les rongeurs. Toutefois, la complexité des mécanismes immunologiques, neurologiques, génétiques et possiblement viraux qui entrent en jeu rend très difficile la création d'un modèle fidèle à toutes les caractéristiques de la maladie humaine. Il existe de nombreux modèles de SEP, chacun proposant de mettre l'accent sur un aspect de la pathologie : l'inflammation, la démyélinisation, la remyélinisation ou encore la neurodégénération. L'utilisation combinée de ces modèles pourrait à terme permettre de comprendre la mosaïque immunologique de la SEP. Il existe à l'heure actuelle majoritairement trois types de modèles de la SEP : les modèles par sensibilisation active des animaux, par transfert passif de cellules encéphalitogènes et par injection d'un virus.

Les modèles par sensibilisation active sont les plus courants. Ils consistent à injecter aux animaux des dérivés de myéline dans un adjuvant (le plus souvent l'adjuvant complet de Freund contenant du *Mycobacterium tuberculosis* inactivé par la chaleur) en périphérie afin d'induire l'activation du répertoire auto-immun. Le passage de la barrière hémato-encéphalique est assuré par l'utilisation de la toxine pertussique (PTX) qui compromet son étanchéité (Bergman et al., 1978). Cependant, le rôle de la PTX ne se limite pas à l'ouverture de la BBB et est capable de se fixer sur les TLR2 et TLR4, ce qui induit la maturation des macrophages et des cellules dendritiques myéloïdes. L'activation de ces mDC induit l'augmentation de leurs niveaux membranaires de CD80/CD86 ainsi que leur production d'IL-6, d'IL-12 et de TNF $\alpha$ , ce qui a pour effet direct d'induire la différenciation de Th1/Th17, contribuant donc directement à la pathologie (Fan et al., 2004; Nasso et al., 2009).

Plusieurs modèles sont très utilisés et présentent des caractéristiques pathologiques intéressantes :

\* Le modèle le plus utilisé est l'immunisation de souris femelles C57BL/6 (B6) avec le peptide MOG<sub>35-55</sub> dans du CFA. Ce modèle est facile à mettre en place et se traduit cliniquement par trois phases :

-La phase asymptomatique qui suit l'injection et persiste pendant 11-13 jours. Bien qu'aucun signe clinique ne soit observable à cette étape, de nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires se mettent en place, en particulier le recrutement et l'expansion du répertoire auto-immun.

-Le déclenchement et la progression de la maladie qui surviennent entre le J12 et le J18. Une paralysie progressive de l'animal débute par une absence de maintien de la queue et se caractérise par une paralysie flasque ascendante des membres de l'animal.

-Le pic de la maladie et la phase chronique qui se poursuit après le J18. Bien qu'une légère rémission de la pathologie soit possible chez certaines souris, ce modèle est chronique chez la plupart des animaux et se caractérise par une seule « poussée », ce qui ressemble donc plutôt à une forme primaire progressive, assez rare chez l'Homme.

L'EAE induite par MOG<sub>35-55</sub> est rarement mortelle et présente le gros avantage d'être très reproductible d'une expérience à l'autre. D'un point de vue histologique, les dommages induits présentent les caractéristiques d'une démyélinisation multifocale conduisant à terme à une perte de la masse neuronale. Ces dommages sont circonscrits à la moelle épinière (SpC), en particulier au niveau thoracique. Ce modèle présente l'énorme avantage d'être induit chez les souris B6, ce fond génétique étant celui qui présente la plus grande variété de KO et de KI disponibles permettant une analyse cellulaire et moléculaire approfondie du mécanisme. Par ailleurs, l'inflammation chronique de l'animal permet une étude facilitée de la régulation par un traitement cellulaire ou moléculaire à différent temps précis de la pathologie. Ce modèle présente toutefois plusieurs limites. La circonscription de l'inflammation au niveau de la SpC et peu voire pas au niveau cérébral et cérébelleux est assez peu représentative de la maladie humaine. Par ailleurs, la démyélinisation dans ce modèle est imputable à la participation presque exclusive des CD4+, ce qui rend difficile l'étude d'autres cellules, en particulier les lymphocytes B qui sont totalement dispensables dans ce modèle (Soulika et al., 2009). Afin de rétablir la participation des lymphocytes B dans la pathogénèse, le modèle avec la protéine totale MOG<sub>1-125</sub> peut être utilisé. Ce modèle se caractérise en particulier par la production d'auto-anticorps détectables au niveau des plaques de démyélinisation à la SpC.

Dans ce travail nous avons choisi de travailler avec ce modèle. Malgré ces différences par rapport à la maladie humaine, il en reste néanmoins assez proche sur de nombreux aspects. Par ailleurs, il est le modèle le plus adéquat pour l'étude de régulation par thérapie cellulaire, et la compréhension des voies moléculaires impliquées par l'utilisation de KO pour les différents candidats moléculaires de notre étude. Il est donc naturellement indiqué pour l'objectif de notre étude. Toutefois, de nombreux autres modèles faisant intervenir des rongeurs existent.

\* L'étude de la forme en poussée rémission requiert l'utilisation d'un autre fond génétique : la souris SJL. De nombreux homogénats de protéines et de peptides dérivés du SNC peuvent être utilisés pour induire l'EAE chez la souris SJL (PLP, MOG, MBP...) mais le protocole offrant la forme en poussée-rémission la plus robuste est induit avec le peptide PLP<sub>139-151</sub>. Ce modèle permet l'étude mécanistique des régulations spontanées de la pathologie et, de manière plus générale, de la pathologie de la forme la plus commune de

SEP. La principale difficulté de ce modèle est que seulement 50% des animaux font une deuxième poussée. Dans le cas de deuxième poussée, les animaux concernés sont assez peu synchrones, ce qui rend difficile les études nécessitant de grands groupes expérimentaux. Outre ces limitations, le modèle SJL/PLP présente les mêmes limites que le modèle B6/MOG, à savoir une atteinte presque exclusive de la SpC et un modèle centré sur les T CD4+. Récemment, un modèle d'immunisation de souris NOD avec le peptide MOG<sub>35-55</sub> permet la mise en place d'une pathologie de type poussée rémission suivie d'une phase progressive chronique et se caractérise par des dommages cérébraux (Levy et al., 2010). Bien que ce modèle soit extrêmement intéressant d'un point de vue clinique, il est encore assez peu caractérisé.

\* Malgré le manque de corrélation entre le déclenchement de la SEP et la présence de virus comme EBV, un modèle d'induction de l'EAE par l'utilisation de virus a été développé. Il s'apparente à une induction active de l'EAE et consiste à injecter le virus de Theiler directement dans l'espace intracrânien. Seule la souris SJL permet d'obtenir une EAE par ce procédé. L'impossibilité de se débarrasser efficacement du virus induit une inflammation persistante qui conduit à des dommages de la myéline au niveau de la SpC et à l'induction de la maladie. D'autres virus sont également capables d'induire une EAE, c'est le cas par exemple du virus de l'hépatite murine (HMV) ou, plus récemment, de plusieurs cardiovirus de la même famille que le virus de Theiler (Chiu et al., 2008). Cliniquement, ce modèle se développe comme une SEP primaire progressive et est très utilisé pour caractériser les mécanismes de prise en charge des épitopes viraux, d'épitope spreading et le rôle des CD8+. La plus grande limitation de l'EAE à virus de Theiler réside dans le fait que sa pathogénèse est complexe et induit de très nombreux partenaires immunitaires ce qui rend l'étude et la compréhension de l'implication de chacune des populations cellulaires difficiles dans ce modèle.

\* Les modèles d'EAE par transfert de cellules encéphalitogènes se composent de deux étapes. Un premier groupe d'animaux est injecté avec des peptides issus du SNC sans co-injection de PTX ce qui entraîne l'activation et la rétention en périphérie des cellules auto-réactives. Ces cellules sont ensuite triées puis réinjectées chez un animal naïf n'ayant reçu que la PTX. Les modèles d'EAE par transfert passif sont particulièrement utiles pour étudier les mécanismes de veille immunitaire, les voies d'entrée des T au SNC et l'impact du répertoire auto-immun sur la pathologie résultante. L'un des principaux avantages de ce modèle réside dans la possibilité de sélection des cellules réinjectées, y compris des cellules induites *in vitro*. De fait, le transfert de cellules encéphalitogènes est l'un des modèles qui permet d'obtenir une démyélinisation du cerveau plutôt que de la SpC par la manipulation du ratio Th1/Th17 : un ratio en faveur des Th17 induit une démyélinisation préférentiellement de la SpC là où un ratio en faveur des Th1 induit des dommages davantage cérébraux (Stromnes et al., 2008). Par ailleurs, au-delà de la seule injection de cellules, le co-transfert de cellules encéphalitogènes avec les auto-anticorps d'affinité correspondante permet l'étude du pouvoir de démyélinisation de certains anticorps. Les lésions qui résultent de ce type de co-transfert ont

de grandes ressemblances avec celles observables dans la SEP par la présence de complexes immuns qui déterminent ou non l'activité d'une plaque.

\* L'EAE n'est pas une maladie spontanée chez les rongeurs. Pour permettre l'étude des mécanismes d'initiation de la maladie, des modèles nécessitant un TCR transgénique ont été conçus pour être spécifiques d'antigènes du SNC, comme MOG par exemple (Bettelli et al., 2003). Les animaux naissent donc exempts de maladie et ne développent l'EAE que plusieurs mois après leur naissance. La pathologie induite dans ces conditions est faible, les plaques de démyélinisation sont clairsemées et ne présentent pas d'activation du complément, ce qui est un élément important dans la pathologie humaine. Malgré cela, l'EAE spontanée reste un modèle qui est actuellement utilisé pour décrire le nouveau concept de l'axe microbiote digestif/cerveau (Berer et al., 2011).

\* Les études translationnelles sont ardues dans le cas de la sclérose en plaques et très peu de modèles d'EAE xénogéniques existent. Cela est lié en particulier aux différences dans la structure et la fonction des complexes de présentation des antigènes qui sont les molécules les plus polymorphes des vertébrés. En 2013, l'équipe de Florian Kurschus parvient à mettre en place un modèle de transfert de PBMC de donneur sain dans des souris NSG, virtuellement sans système immunitaire. Ces souris sont ensuite immunisées avec un peptide MOG humain. Aucune maladie ne résulte de cette procédure mais les cellules humaines injectées s'activent spécifiquement contre le MOG humain. Au niveau du SNC des animaux, un infiltrat T CD4+ et CD8+ et la production de cytokines pro-encéphalitogènes sont caractérisés (Zayoud et al., 2013). Ce modèle « sub-clinique » ne permet pas les travaux sur la régulation de la pathologie mais pourrait se révéler intéressant pour l'étude du mode de fonctionnement de certains traitements potentiels de la SEP avant les essais cliniques de niveau I.

Au-delà des considérations spécifiques à chaque modèle, les modèles murins dans leur ensemble présentent plusieurs limites précisément liées à la souris. En particulier les études de sureté des thérapies à long terme qui ne sont pas compatibles avec l'espérance de vie des rongeurs de laboratoire. Ceci est particulièrement important pour les thérapies cellulaires, dans la mesure où les cellules injectées peuvent devenir pathogènes voire cancéreuses sur le long terme. Par ailleurs, du fait d'une plus grande pénétrance de la maladie et une meilleure stabilité des symptômes de l'EAE chez les femelles, les modèles animaux sont presque exclusivement réalisés chez des femelles. Bien que la SEP soit plus courante chez les femmes, certains modèles présentent un biais qui va au-delà de la statistique. Par exemple, le modèle de poussée-rémission chez la souris NOD décrit plus haut, ne peut être mis en place que chez les femelles ; les mâles sont entièrement résistants à l'induction de cette EAE suggérant un biais qu'il faudrait considérer. Certains modèles proposent de pallier dans une certaine mesure cela en utilisant une EAE induite chez des primates non humains (A'T'Hart et al., 2015). Ces modèles sont cependant coûteux et logistiquement difficiles à mettre en place.

## *v) Traitements possibles de la sclérose en plaques*

Malgré les progrès considérables de la recherche pour comprendre le fonctionnement de la sclérose en plaques ces dernières années, il n'existe à l'heure actuelle qu'un seul traitement curatif de la sclérose en plaques : le transfert de cellules souches hématopoïétiques. Du fait de ses implications thérapeutiques très lourdes et de sa potentielle dangerosité, il n'est appliqué qu'aux cas de SEP réfractaires à toutes les autres stratégies de traitement. Dans l'écrasante majorité des cas, la SEP est prise en charge par les traitements conventionnels, mieux maîtrisés.

### **a) Les traitements conventionnels**

Les traitements conventionnels de la sclérose en plaques ciblent différents aspects de la maladie : soit les poussées au moment où elles surviennent soit la progression de la maladie et les handicaps qui l'accompagnent. Il convient donc de les envisager séparément suivant qu'ils sont des traitements de la crise ou de fond. Nous ne traiterons pas ici la prise en charge des symptômes associés à la SEP (douleurs, troubles neuronaux et musculaires) car ils sont associés au pendant neurologique et non immunologique de la pathologie.

#### Le traitement de la crise:

L'utilisation de doses massives de glucocorticoïdes (methylprednisolone, MP) par voie intraveineuse durant 3 à 5 jours est le traitement classique des poussées de sclérose en plaques. Il s'agit d'un traitement très efficace capable de diminuer à la fois l'intensité et la durée de la réaction inflammatoire, mais n'a toutefois pas d'influence sur le degré de récupération du patient. Si la poussée est suffisamment peu symptomatique et/ou rapidement régressive, elle ne sera toutefois pas traitée de cette manière car l'utilisation de doses aussi importantes de corticoïdes est associée à des effets secondaires néfastes. D'un point de vue immunitaire, les glucocorticoïdes sont capables de modifier de nombreuses voies concourant à l'immunosuppression. L'effet le plus précoce des glucocorticoïdes est de réduire à la fois la perméabilité des vaisseaux et le flux sanguin ce qui entrave directement l'extravasation des lymphocytes encephalitogènes (Perretti and Ahluwalia, 2000). D'autres groupes ont démontré que l'administration de glucocorticoïdes induit une profonde lymphopénie T et B au niveau du sang des animaux et humains traités mais également une perte conséquente des monocytes et éosinophiles circulants (Fauci and Dale, 1975a, 1975b). Par ailleurs, les productions d'IL-1 $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , de TNF $\alpha$ , d'IL-6, d'IL-8, d'IL-12, d'IFN $\gamma$  et du GM-CSF sont largement diminuées après traitement avec la MP (Brattsand and Linden, 1996).

La résistance à la MP est un problème de taille pour le traitement de la SEP et les mécanismes qui l'induisent sont encore mal compris. Il a été démontré que la résistance aux MP *in vitro* des T issus des patients corrèle non seulement avec le degré de résistance clinique de la poussée aux glucocorticoïdes mais également avec une mauvaise évolution à venir de la maladie. Ainsi, on pense que la résistance aux stéroïdes endogènes peut être un des mécanismes à la base du déséquilibre immunitaire qui induit secondairement des formes plus agressives de la SEP (DeRijk et al., 2004; van Winsen et al., 2010). Aucune association n'a pu être prouvée entre des mutants du récepteur aux glucocorticoïdes et une résistance au traitement par cette même famille de molécules, ce qui indique que la résistance aux glucocorticoïdes est acquise (van Winsen et al., 2005). Si la résistance aux MP est un trait acquis et non une caractéristique innée des cellules, de bons espoirs sont permis. Dans quelques rares cas, des formes de SEP sont naturellement résistantes aux glucocorticoïdes et bien que l'expression de molécules comme la heat shock protein 90 ait été trouvée augmentée dans ces cellules (Matysiak et al., 2008), aucune explication n'est avancée à l'heure actuelle.

### Les traitements de fond:

Les traitements de fond sont donnés aux patients dès la pose du diagnostic de la sclérose en plaques et sont administrés régulièrement afin de moduler l'activité auto-immune du système immunitaire. De très nombreuses molécules existent actuellement, le choix entre ces différents traitements dépend de l'état du patient et de la manière dont il a réagi aux éventuels traitements précédents. Par ailleurs, certaines molécules sont données au début de la maladie, d'autres ne sont réservées qu'aux formes agressives de la SEP en raison de la lourdeur de leur effets secondaires. Deux exemples de traitement de première intention parmi les plus communs ont été choisis (IFN $\beta$  et acétate de glatiramère) et un exemple de traitement des SEP multirésistantes (le fingolimod)

**\*Les interférons  $\beta$ .** Ils représentent le traitement de fond le plus utilisé dans la sclérose en plaques. Injecté en intramusculaire, sa tolérance est bonne et permet l'espacement des poussées de 30%, la réduction de l'activité des plaques à l'IRM et un ralentissement du handicap. Par ailleurs, les IFN $\beta$  permettent de réduire de 50% le risque de conversion d'un syndrome de démyélinisation isolé vers une SEP. Leur fonctionnement a déjà été discuté.

**\*L'acétate de glatiramère (GA).** Aussi étonnant que cela puisse paraître, l'acétate de glatiramère ne fait pas réellement référence à une molécule mais à un ensemble de polypeptides dont la séquence n'est pas clairement établie. Plusieurs études ont tenté de déterminer un peptide « clef » qui résumerait l'activité du GA, mais les résultats de ces études sont conflictuels et parfois contradictoires. On pense plutôt que c'est l'association des différents peptides qui permet l'activité efficace et multiple du GA. Cet ensemble polypeptidique est capable de se fixer sur les CMH (majoritairement le CMH-II) du patient et d'induire la modulation de plusieurs types des cellules immunitaires. En particulier, les DC traitées au GA perdent leur



capacité à produire de l'IL-12p70, de l'IL-6 et du TNF $\alpha$  en réponse à une stimulation par du LPS. Elles sont en revanche capables de produire de l'IL-10 et de l'IL-4 qui favorise les Th2, ce qui dénote une conversion vers un phénotype de tolDC (Vieira et al., 2003). Le mécanisme responsable de ce changement d'orientation n'est pas complètement compris à l'heure actuelle. L'un des grands avantages sur les IFN de type I, est que le GA est capable d'induire une remyélinisation des individus traités. Il a ainsi été démontré que les cellules T murines traitées au GA sont capables de produire des facteurs neurotrophiques, en particulier, les neurotrophines 3 et 4 et les insulin growth factor 1 et 2 (Aharoni et al., 2005; Skihar et al., 2009; Zhang et al., 2010).

\* **Le fingolimod.** Le fingolimod est réservé aux formes agressives de la SEP et n'est donné que si les molécules citées au-dessus ont échoué à limiter la maladie. Il s'agit d'un analogue synthétique de la sphingosine qui inhibe les récepteurs aux sphingosines S1P<sub>1, 3, 4</sub> et 5. S1P<sub>1</sub> en particulier, est exprimé par les lymphocytes T, les DC et les monocytes. L'engagement du récepteur S1P<sub>1</sub> induit la sortie des lymphocytes T et des DC des ganglions périphériques. Par conséquent, le fingolimod désensibilise les T et les DC au signal induit par les sphingosines et induit une rétention des cellules concernées en périphérie (Di Dario et al., 2015; Mehling et al., 2011). Par ailleurs, le fingolimod a également un effet neuroprotecteur direct sur les cellules du SNC. Cela passe par l'extinction de l'activation chronique des astrocytes, comme démontré par l'arrêt de leur programme transcriptionnel associé (Rothhammer et al., 2017). Bien que particulièrement efficace, le fingolimod est peu utilisé du fait de ses effets secondaires toxiques, en particulier au niveau cardiaque. Par ailleurs, l'arrêt du fingolimod est associé à un rebond fréquent de la SEP chez les patients. Ceci est lié à la surexpression du récepteur à la sphingosine à la surface des T et des DC (Giordana et al., 2018).

Il existe un certain nombre de voies de recherches actuelles sur les traitements futurs de la sclérose en plaques. Si les traitements qui modulent le système immunitaire sont les plus courants, ils ne sont pas curatifs. De plus, il n'est pas rare qu'un traitement perde en efficacité au cours de la maladie et que le changement de stratégie thérapeutique doive être envisagé. Par ailleurs, le risque de conversion de la forme en poussée-rémission vers des formes progressives reste réel avec ce type de traitements. Des approches innovantes par thérapie cellulaire sont en cours d'investigation et pourraient permettre d'envisager des effets à long termes, voire curatifs, à la fois contre des formes en poussée-rémission mais également contre des formes progressives.

## **b) La greffe de cellules souches hématopoïétiques**

En 1991, l'équipe de Dirk Van Dekkum démontre que le transfert des cellules souches hématopoïétiques autologues (aHSCT) après irradiation totale est capable d'induire la rémission complète

de rat arthritiques sans les effets secondaires indésirables des cellules allogéniques (Knaan-Shanzer et al., 1991). Rapidement, l'idée de traiter des maladies auto-immunes par aHSCT se répand et ne manque pas de démontrer que le transfert autologue (ou syngénique) de moelle osseuse permet de prévenir efficacement l'EAE à la fois chez le rat de Lewis et chez la souris SJL (Burt et al., 1995; van Gelder et al., 1993). De plus, l'analyse par PCR des animaux entre 1 et 3 mois après la résolution de l'EAE par le transfert d'HSC ne permet pas de mettre en évidence la persistance des réarrangements VDJ impliqués dans la pathogénèse, contrairement aux animaux contrôles ayant également cliniquement régressé. Cependant les limites de l'application du transfert d'HSC seront mises en avant quelques années plus tard. Il est démontré que s'il est possible de traiter efficacement l'EAE induite par MOG peu de temps après son induction, le protocole n'est d'aucune aide s'il est appliqué en phase chronique (Burt et al., 1998). Par ailleurs, le traitement par aHSCT n'est bénéfique que dans les EAE purement auto-immunes. Dans le cas de la demyélinisation induite par le virus de Theiler, la maladie s'aggrave très rapidement et devient mortelle à presque 50% à la suite du conditionnement myéloablatif (Burt et al., 1999). Cela est directement lié à l'augmentation très importante de la charge virale au SNC des animaux concernés, sans composante immunitaire pour la juguler. Bien que le mécanisme d'action du traitement par aHSCT soit loin d'être compris, les essais cliniques débutent en 1995. Il est décidé, que du fait des risques éventuels, l'aHSCT ne se limitera qu'au traitement des SEP secondairement progressives pour lesquelles il n'existe à l'époque aucun traitement efficace. Le protocole expérimental est assez simple et se subdivise en quatre étapes :

-Les patients sont « mobilisés » par injection de G/GM-CSF, ce qui a pour effet de faire sortir les cellules hématopoïétiques très immatures de la moelle osseuse et de les mettre en circulation. Ces cellules immatures sont par la suite isolées à partir de sang circulant par leucophérèse.

-Le conditionnement myéloablatif est ensuite nécessaire afin de détruire à la fois la moelle osseuse contenant des cellules pathogènes mémoires mais également, dans une certaine mesure, les cellules pathogènes périphériques. Cette étape peut être réalisée à l'aide d'une irradiation totale du corps (TBI) ou à l'aide de chimiodéplétants à haute dose comme le cyclophosphamide. L'irradiation est très rare de nos jours pour le traitement de la SEP.

-La réinjection de la suspension de cellules souches par voie intra veineuse permet la reconstitution du patient. En général, un délai de plusieurs jours est observé avant la reconstitution, afin que la niche homéostatique se libère et que l'auto-greffe puisse se développer pour remplacer la précédente moelle osseuse.

-Le traitement des patients greffés avec un cocktail de globuline antithymocyte qui permet d'éliminer les T à la fois du greffon mais également ceux qui auraient survécu au traitement ablatif.

Le résultat n'est pas parfait, il est néanmoins très encourageant (Fassas et al., 1997). Sur les 15 patients, 14 présentent une amélioration neurologique notable et une régression du handicap. Deux patients rechuteront par la suite, mais dans l'ensemble les effets sont bénéfiques et durables. Il est à noter que l'état clinique du dernier des quinze patients s'est détérioré à la suite de l'aHSCT, ce qui pourrait étayer la thèse selon laquelle certaines SEP ont une composante virale. Toutefois, comme pour toute thérapie cellulaire, un suivi à long terme est nécessaire afin d'envisager les effets réels du traitement. Plus de six ans plus tard, le constat sur le traitement de la SEP secondairement progressive par aHSCT est posé : c'est un échec (Burt et al., 2003). Après une période d'amélioration clinique de durée variable, la SEP reprend et, avec elle, la progression des lésions et du handicap. En 2009, deux équipes indépendantes démontrent que l'aHSCT est capable de stopper complètement la SEP chez plus de 75% des patients atteints cette fois de la forme en poussée-rémission (Burt et al., 2009; Fagius et al., 2009). Depuis, de nombreux essais cliniques ont été lancés dans différents pays afin de documenter la sécurité et l'efficacité du protocole (Burt et al., 2015; Nash et al., 2015; Shevchenko et al., 2015).

Malgré toutes les subtilités qui sous-tendent l'efficacité du traitement par aHSCT, le mécanisme global commence à être assez bien compris grâce au suivi immunologique des patients impliqués dans ces essais. Ainsi, il a été montré que le compartiment T des patients jusqu'à 6 mois après greffe est presque exclusivement constitué de T mémoires centraux (T<sub>mc</sub>, CD45RO<sup>+</sup>), celui-ci diminue rapidement passée cette échéance du fait de la production massive de Th0 qui prend presque un an pour se stabiliser (Calvet et al., 2013). Deux ans post greffe, le nombre de T<sub>mc</sub> est en dessous des valeurs précédant la greffe, alors que le nombre de Th0 a doublé. L'analyse du répertoire de ces T montre une reconstitution d'un répertoire large et non biaisé par une prévalence clonale (Muraro et al., 2005). Par ailleurs, la diversité du répertoire du TCR est directement corrélée avec le succès du traitement : les patients pour lesquels l'aHSCT améliore la SEP à deux ans (83%) ayant le répertoire le plus divers à la fois dans les CD4<sup>+</sup> mais également dans les CD8<sup>+</sup> (Muraro et al., 2014). En terme de cytokines, le profil des patients un an après la greffe montre une orientation de type Th1/Th2 alors que la production de cytokines de type Th17 est considérablement réduite par rapport à l'état avant greffe. La fréquence des Th17 est également diminuée (Darlington et al., 2013). De façon intéressante, 6 mois post greffe, un pic important mais transitoire du nombre de Tregs et de NK CD56<sup>hi</sup> immunorégulateurs est observé. Ces cellules pourraient avoir un rôle dans le contrôle de l'activation des cellules effectrices nouvellement produites lors de leur exposition aux neuro-antigènes toujours en circulation. De façon intéressante, dès 6 mois post greffe, le nombre de CD8 CD161<sup>hi</sup> (CD8 invariants associés aux lésions de SEP) producteurs de cytokines pro-inflammatoires tel que l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$  ou encore l'IL-17 est considérablement diminué (-87%) (Abrahamsson et al., 2013). La régulation par le nouveau système immunitaire qui émerge post greffe est spécifique des neuro-antigènes : une fois isolés les T ne prolifèrent pas contre MBP, ils sont en revanche toujours capables de s'activer contre OVA dans un système de coculture

*in vitro* (Karussis et al., 1992). L'ensemble de ces résultats suggère un maintien actif de la tolérance face aux neuro-antigènes, ce qui est nécessaire en complément de la tolérance induite par aplasie.

À l'heure actuelle, l'aHSCT est le seul traitement curatif de la sclérose en plaques et n'est réservé qu'aux formes multi-résistantes des SEP en poussée-rémission. Le protocole commence à être envisagé comme une seconde ligne de traitement par certains pays comme la Suède, les États Unis d'Amérique ou le Mexique. En France, l'aHSCT est toujours considéré comme expérimental et ne fait toujours pas partie des procédures autorisées en routine hospitalière.

### **c) La faisabilité d'un traitement par thérapie cellulaire**

Si l'aHSCT est un traitement très efficace de la SEP, il possède un certain nombre d'effets secondaires directement liés au conditionnement nécessaire à la prise de greffe ou au temps nécessaire à l'inoculum pour reconstituer tout un système immunitaire fonctionnel. En particulier un risque accru de développer des maladies opportunistes qui induit entre 1 et 2% de mortalité dans cette procédure. D'autres approches de thérapie cellulaire moins lourdes se sont développées et tentent également de moduler le système immunitaire afin de limiter ou stopper durablement la SEP. Le principal avantage de la thérapie cellulaire réside dans l'utilisation de systèmes vivants, capables de s'auto-entretenir et dont l'activité est finement régulée par le système biologique auquel elle s'intègre. À l'heure actuelle de nombreuses thérapies cellulaires sont disponibles contre différentes maladies auto-immunes dont la SEP. On peut les différencier en deux catégories : celles visant à moduler le système immunitaire et celles cherchant à reconstruire le système nerveux endommagé. Nous ne parlerons ici que de celles concernant le système immunitaire.

**Les cellules souches mésenchymateuses (MSC).** Dès 2005, les MSC sont utilisées dans un modèle d'EAE et démontrent un potentiel immunorégulateur intéressant (Zappia et al., 2005). *In vitro*, les MSC inhibent l'expansion des T encéphalitogènes dépendante et indépendante du TCR mais sans induire d'apoptose. Cela s'accompagne d'une baisse d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$ . L'injection intraveineuse de  $1.10^6$  MSC avant l'immunisation, au moment du déclenchement ou du pic des signes cliniques est capable de réduire l'EAE. Cela corrèle avec un état histologique bien meilleur au niveau du SNC et la réduction de l'infiltrat immunitaire. Cependant, les MSC ne sont plus capables d'avoir un effet thérapeutique lors de la phase chronique de la maladie. *Ex vivo*, les T issus des animaux traités par les MSC ne sont plus capables de s'activer en présence de l'antigène MOG ce qui révèle un état d'anergie de ces cellules. Il est également démontré que le nombre de cellules spécifiques du neuro-antigène est significativement plus faible chez les animaux traités que chez les contrôles (Gerdoni et al.). Des lymphocytes T spécifiques de l'auto-antigène isolés à partir d'une souris traitée avec des MSC et transférés à un animal naïf induisent une EAE significativement plus faible que les T issus d'une souris contrôle indiquant un effet en profondeur directement sur les T et non sur

le micro-environnement. Il est plus tard démontré que les MSC sont capables, à l'aide de métalloprotéases de lyser CCL2 en un dérivé qui empêche son effet par inhibition compétitive de ses récepteurs (Rafei et al., 2009b). L'inhibition du signal CCL2, nécessaire aux Th17, induit la surexpression de PD-L1 par les CD4 des animaux ce qui, à terme, inhibe la production d'IL-17 et de TNF $\alpha$  par ces mêmes lymphocytes. Il est plus tard montré avec des cellules humaines en culture que la co-culture de MSC avec des lymphocytes T0 inhibe leur différenciation en Th17 et limite l'expression d'IL-17, IL-22, IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$  par les Th17 déjà différenciés (Ghannam et al., 2010). Les mêmes auteurs démontrent également que les MSC vont induire des changements épigénétiques des Th17 qui vont diminuer leur niveau d'expression de ROR $\gamma$ c et se mettre à exprimer Foxp3, ce qui coïncide avec l'initiation de la production d'IL-10 par ces mêmes cellules. En parallèle de leurs effets sur les Th17, les MSC vont également promouvoir la différenciation de Th2 producteurs d'IL-4 qui favorisent l'arrêt de l'EAE (Bai et al., 2009). Toutefois, si les MSC se révèlent très efficaces pour diminuer l'activité des CD4, l'équipe de Justin Glenn démontre qu'elles sont également capables d'induire la prolifération de CD8 producteurs d'IFN $\gamma$  et renforce leur production de cytokine pro-inflammatoire (Glenn et al., 2014). Ils démontrent également que l'injection de MSC dans une EAE induite par MOG<sub>37-50</sub>, connues pour être dépendante des CD8, aggrave la maladie. Dans la mesure où les SEP chez l'Homme sont d'origines cellulaires très variées, il propose des réserves sur l'utilisation des MSC en thérapie cellulaire. Différents essais cliniques ont cependant eu lieu avec les MSC et concluent que ces cellules, injectées par voie intraveineuse mais pas intrathécale, sont capables de réduire la SEP en inhibant les Th17 et leurs cytokines. Toutefois, l'induction de micro-embolies limite leur utilisation généralisée (Cohen et al., 2018; Lublin et al., 2014; Rice et al., 2010). La principale limite du protocole réside dans le fait que la dose efficace de MSC chez l'Homme est de 1 à 2.10<sup>6</sup> cellules/kg, ce qui requiert de passer par une phase d'expansion *in vitro* qui diminue leur activité suppressive au fur et à mesure des cycles.

**Les Tregs et les CARTregs.** Les Tregs sont des cellules centrales de la régulation du système immunitaire, mais sont étonnamment peu utilisées en thérapie cellulaire. Il y a deux raisons majeures à cela : un fois injectés, les Tregs peuvent devenir pathogènes en se différenciant en Th ou Tfh (Bailey-Bucktrout et al., 2013; Duarte et al., 2009; Tsuji et al., 2009, 2009) et par ailleurs l'augmentation *in vivo* du nombre de Tregs déjà présents par l'injection d'un complexe d'IL-2/anti-IL-2 ou de nanoparticules s'est révélée efficace pour abroger l'EAE (Ephrem et al., 2008; Maldonado et al., 2015; Webster et al., 2009). Différents essais cliniques d'injection de Tregs pour traiter différentes maladies auto-immunes ont déjà eu lieu et les résultats sont peu encourageants, en particulier dans le cadre du diabète de type I (Bluestone et al., 2015; Desreumaux et al., 2012; Marek-Trzonkowska et al., 2012). Un essai clinique par l'injection de Tregs issus de patients SEP et multipliés *ex vivo* a commencé en 2016 mais aucun essai clinique d'expansion de Tregs *in vivo* n'est prévu à ce jour. Une nouvelle voie de recherche dans le domaine des T ouvre de nouvelles perspectives dans les maladies auto-immunes : les cellules T à TCR chimériques spécifiques d'antigènes (CAR-

T). L'équipe de Loskog transfecte ainsi des cellules T murines avec un plasmide qui induit la production d'un TCR spécifique de MOG sous le contrôle de foxp3. Injectés aux souris au pic de la maladie par voie intranasale, seulement 100 000 CAR-Tregs sont capables d'arrêter l'EAE en environ 10 jours, ce qui va de pair avec une diminution de la production d'IL-12 et d'IFN $\gamma$  dans le SNC des animaux (Fransson et al., 2012). La réinjection du peptide MOG aux animaux ainsi traités n'est pas capable de ré-induire l'EAE montrant une bonne persistance de ces cellules à long terme. Bien que ces résultats soient très intéressants, les CAR-Tregs sont encore trop peu caractérisés dans l'EAE pour que des essais cliniques soient envisageables.

**Les cellules dendritiques tolérogènes.** Une thérapie à base de cellules dendritiques présenterait le plus fort potentiel que l'on pourrait fournir aux patients SEP du simple fait que les tolDC sont capables d'induire plusieurs centaines de T régulateurs au cours de leur vie. De fait, les DC doivent présenter plusieurs caractéristiques afin d'être de bonnes candidates pour une thérapie cellulaire : elles doivent être résistantes à une maturation plus avancée que leur stade actuel, avoir un phénotype régulateur spécifique d'un antigène et être fonctionnellement stables. La preuve de la faisabilité d'une thérapie cellulaire basée sur des DC a été fournie par l'équipe de Borràs lorsqu'ils parviennent à différencier des tolDC à partir de monocytes issus du sang de donneurs sains mais également de patients atteints de SEP en poussée-rémission (Raïch-Regué et al., 2014). Ces cellules sont semi-matures et présentent des niveaux faibles de CD40 et CD83 à leur surface, comparables aux niveaux d'une DC immature. Ces cellules sont fixées dans un phénotype régulateur et ne peuvent pas murer davantage en présence de LPS. Une fois chargées avec le peptide MOG, ces tolDC sont capables d'induire *in vitro* l'arrêt de la prolifération des T spécifiques de cet antigène isolés de patients SEP, mais également de convertir leur production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12p70, IL-6, TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$ ) vers anti-inflammatoires (IL-10) et ce, de façon spécifique de l'antigène. Chez la souris, plusieurs études ont démontré que le transfert adoptif de tolDC chargées de neuro-antigènes induites par différents protocoles est capable de conduire à une amélioration significative de l'état clinique de l'animal, de façon spécifique de l'antigène (Chen et al., 2018; Mansilla et al.; Papenfuss et al., 2011). *In vivo*, le comportement des cellules est semblable à celui décrit *in vitro*, à savoir une conversion cytokinique de pro- vers anti-inflammatoire et une réorientation de la différenciation T biaisée vers le phénotype Th2. L'ensemble de ces travaux tend à présenter les tolDC comme des candidates idéales pour une thérapie cellulaire. Actuellement, trois essais cliniques de phase I (NCT02283671 ; NCT02618902 ; NCT02903537) utilisant des tolDC issues des patients SEP et chargées au peptide MOG sont en cours de recrutement.

**Les cellules dendritiques plasmacytoïdes.** Malgré tout l'intérêt que représentent les cellules dendritiques plasmacytoïdes dans le traitement de la SEP de par leur production d'IFN de type I, une thérapie cellulaire reposant sur les pDC semble peu envisagée. Il a cependant été démontré que l'injection de pDC matures cultivées avec le peptide MOG<sub>35-55</sub> pendant la phase de progression de la maladie est capable de réduire drastiquement le score clinique des animaux traités (Duraes et al., 2016). L'amélioration clinique des

animaux est expliquée par une réduction de l'expression d'IFN $\gamma$  et d'IL-17 par les CD4 *in situ*, ce qui implique une inflammation générale plus faible du SNC. Cela passe notamment par le recrutement de pDC endogènes via la chémérine de manière spécifique du neuro-peptide. Une fois au niveau du SNC, les pDC endogènes présentent un phénotype régulateur (CD69<sup>dim</sup>) induit par les pDC-MOG injectées. Si elles peuvent être envisagées comme des cibles d'immunothérapie, aucune recherche chez l'Homme ne vise à établir une thérapie cellulaire basée sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes à l'heure actuelle.

Dans ce travail nous proposons d'examiner la possibilité de contrôler un dérèglement immunitaire à l'aide d'une thérapie cellulaire reposant sur des pDC immatures. Si l'étude des cellules d'intérêt dans l'EAE nous permet de mettre en avant un certain nombre de mécanismes, certaines questions nécessitent l'utilisation d'un autre modèle pathologique. En particulier savoir si la dispersion spatiale et temporelle ou si la nature (auto-immune ou allo-réactive) de la réponse immunitaire affecterait l'efficacité de la thérapie que nous proposons. Si tel s'avère être le cas, nous souhaitons caractériser dans quelle mesure les mécanismes sont différents afin d'envisager en partie dans quelle mesure le phénotype régulateur détenu par la population d'intérêt est intrinsèque ou dicté par l'environnement inflammatoire. Par ailleurs, les études translationnelles qui pourraient aboutir à proposer une thérapie pour l'Homme sont difficilement envisageables avec l'EAE du fait de la grande difficulté à travailler avec des animaux humanisés. Pour cet ensemble de raisons nous avons décidé de travailler avec une pathologie allo-réactive plus systémique qui est assez proche d'une pathologie humaine assez bien décrite : la maladie du greffon contre l'hôte.

## *2) La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)*

Avec les maladies cardiovasculaires, les cancers sont devenus la première cause de mortalité dans les pays développés. Depuis 30 ans, le nombre de cas ne cesse d'augmenter, ce qui est en partie dû à l'amélioration des méthodes de diagnostic, mais également au problème croissant de la pollution. En 2017, le nombre de nouveaux cas de cancer en France est estimé à 400 000, avec une légère prévalence chez les hommes (53,5%) par rapport aux femmes (46.5%) (Chiffres de l'Institut National du Cancer, INCa), ce qui se retrouve également dans le nombre de décès: environ 150 000 par an sont imputables aux cancers dont 56% pour les hommes et 44% pour les femmes. Ce déséquilibre est en partie expliqué par des habitudes de vie différentes, notamment le tabagisme et l'alcoolisme plus fréquents chez les hommes, mais le changement des mœurs tend à lisser ces différences. De façon assez encourageante, si le nombre de nouveaux cas progresse, la survie nette standardisée à 5 ans est en constante progression depuis 1989. Dans le monde, les cancers touche plus de 14 millions de nouveaux patients dans le monde par an et l'accès inégal aux soins de qualité se traduit par plus de 8 millions de décès par an, l'Afrique, l'Asie centrale et l'Amérique du sud étant les zones les plus à risque avec près de 70% de décès (Chiffre issus du rapport du Centre International de Recherche sur le Cancer, 2014).

Les cancers hématologiques dont les leucémies, les lymphomes et les myélomes sont les formes les plus communes et représentent à eux seuls plus de 33 000 cas en France, concernant principalement les personnes aux deux âges extrêmes de la vie. Ces trois types de cancer touchent tous les types de cellules sanguines mais plus fréquemment le système immunitaire.

**Les leucémies** sont une prolifération anormale de cellules hématopoïétiques au niveau du système sanguin et colonisent massivement la moelle osseuse ce qui entraîne une insuffisance médullaire grave. Elles sont à distinguer en deux catégories dites aiguë et chronique au regard de la rapidité de leur évolution. Ces cancers peuvent également être soit lymphoïdes (souvent B, plus rarement T) soit myéloïde (erythrocytes, mégacaryocytes et toute la lignée immunitaire myéloïde) et touchent des populations différentes selon leur âge. En effet, les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) et la forme myéloïde (LMC, assez rare) concernent essentiellement les adultes. Les LLC sont la forme la plus fréquente et les chances de guérison sont bonnes avec plus de 70% de survie. Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) touchent quant à elles préférentiellement les sujets jeunes et sont très agressives avec une survie globale faible. La forme aiguë myéloïde (LAM) concerne en revanche davantage les adultes et les chances de rémission complète sont proches de 70% (chiffre INCa 2011, Tableau 2).



**Les lymphomes** sont également une prolifération anarchique de lymphocytes (plus souvent B que T) au niveau des organes lymphoïdes secondaires mais également au niveau du foie et plus rarement dans d'autres organes. Les lymphomes sont le type de cancer hématologique le plus fréquent et représentent à eux seuls plus de 50% des cancers liquides. Parmi eux, 20% sont dits hodgkiniens (LH) et 80% non hodgkiniens (LNH). Le LH n'est pas très courant et se développe majoritairement soit entre 20 et 35 ans soit après 70 ans et est associé à un très bon pronostic. Les lymphomes non hodgkiniens regroupent une large famille de cancers et tous les âges sont concernés avec cependant un risque accru au-delà de 65 ans. Ce sont généralement des cancers à développement très lent, dit indolents, bien que les lymphomes de Burkitt, à grande cellules B, et des cellules du manteau soient plus agressifs. Le pronostic est variable selon le sous-type de lymphome, de son stade et de l'âge de la personne mais la survie globale nette à 5 ans est de 66%.

**Les myélomes** appartiennent à un type de cancer affectant spécifiquement les plasmocytes et se caractérisent par un pic monoclonal qui entraîne une insuffisance rénale chronique assez caractéristique. Bien souvent, les plasmocytes cancéreux nichent dans la moelle osseuse qu'ils colonisent au détriment du reste du système hématopoïétique. À nouveau il existe des formes aiguës et des formes indolentes. S'il est détecté à un stade précoce et que le patient ne présente pas de symptôme, un simple suivi peut être proposé. En revanche, si les patients sont anémiés ou présentent des douleurs osseuses persistantes, ils doivent être traités. Malheureusement, dans ce cas, la survie n'est comprise qu'entre 7 et 10 ans si le malade supporte bien le traitement et tombe en dessous de 5 ans pour les autres patients.

Hommes					Femmes				
Localisation	Incidence		Mortalité		Localisation	Incidence		Mortalité	
	Effectif	Part (%)	Effectif	Part (%)		Effectif	Part (%)	Effectif	Part (%)
Lymphome malin non hodgkinien	6400	3,1	1990	2,4	Lymphome malin non hodgkinien	5300	3,3	1680	2,7
myélome multiple et maladie immunoproliférative	3210	1,6	1590	1,9	myélome multiple et maladie immunoproliférative	2720	1,7	1460	2,3
Leucémie lymphoïde chronique	2140	1	610	0,7	Leucémie lymphoïde chronique	1650	1	450	0,7
Leucémie aiguë	1970	1	1740	1,74	Leucémie aiguë	1810	1,1	1480	2,3
Maladie de Hodgkin	920	0,4	170	0,17	Maladie de Hodgkin	920	0,6	120	0,2

**Tableau 2 :** Effectif des patients atteints de cancers hématologiques en France pour l'année 2011. Effectif : Effectif total arrondi. Part : proportion du type de cancer concerné par rapport au total des nouveaux cas de cancers. Source : Hospices civils de Lyon, InVs, INCa, Francim, Inserm. Simplifié d'après les chiffres INCa 2011.

Les mécanismes de la résistance de certains cancers hématologiques à un ou plusieurs traitements par radiothérapie et/ou chimiothérapie sont encore assez mal compris à l'heure actuelle. Quelques chemins moléculaires sont proposées tels que la régulation négative des gènes de ménage, la surexpression de Stat5 ou encore l'augmentation aberrante des signaux de survie (Bhadri et al., 2012; Yang et al., 2018b). Il est en

revanche assez bien établi que certains types de cancer sont plus à risque que d'autres : les leucémies aiguës lymphoblastiques et les myélomes multiples sont tous les deux associés à une proportion de cas multi-résistants plus importante que les autres types de cancers liquides. Dans le cas où le patient récidive immédiatement après le traitement (ce qui est une forme discrète de résistance associée aux cellules souches du cancer), le traitement par greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques (aHSCT) peut être proposé.

*i) la GVHD est une conséquence du transfert de cellules souches hématopoïétiques*

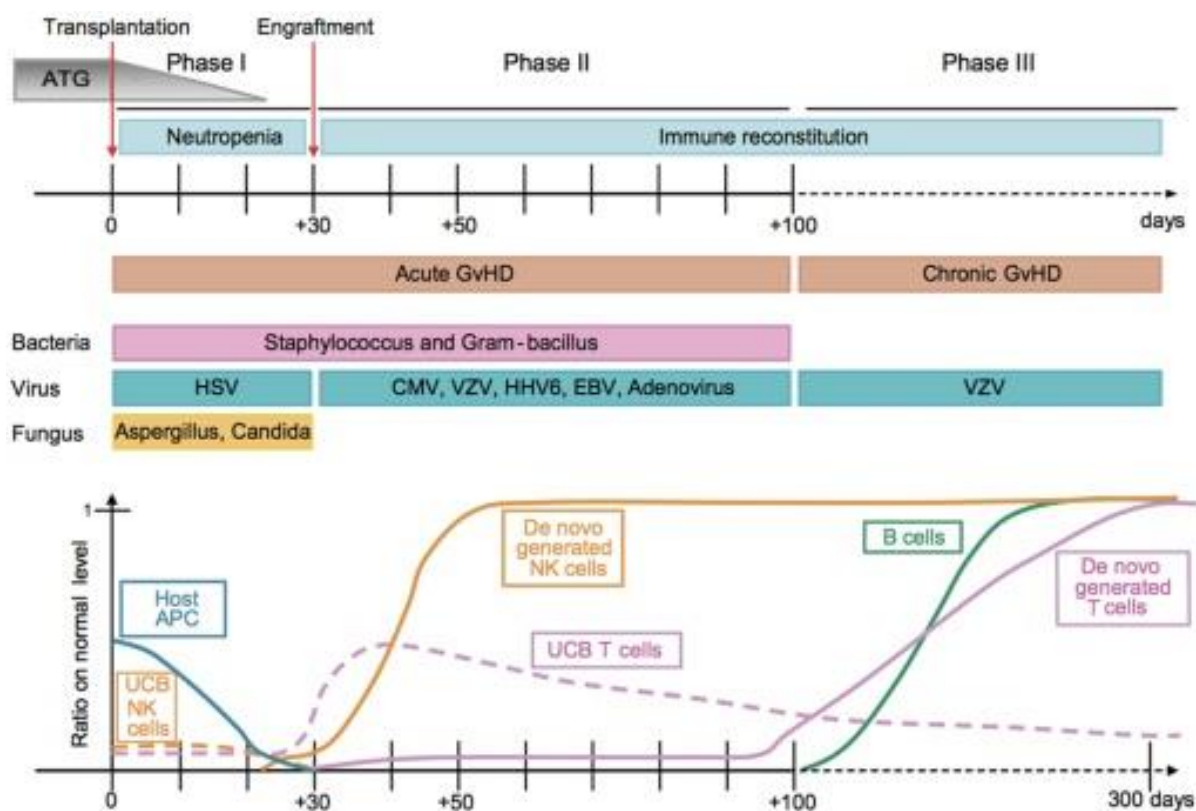
L'allogreffe est une procédure à haut risque et n'est réservée qu'aux cas extrêmes pour lesquels les autres lignes thérapeutiques se sont révélées être un échec. L'aHSCT est assez similaire à l'autogreffe dans sa procédure, à ceci près qu'elle fait intervenir un donneur et un receveur :

- Un donneur sain consentant est recruté. Le don requiert que le donneur et le receveur soient géno-identiques (de la même famille, 58% des greffes) ou phéno-identiques (donneur non apparenté, 42% des greffes) sur les 10 groupes HLA majeurs et mineurs. Dans l'impossibilité d'avoir une correspondance parfaite, des greffes compatibles à 9/10 sont possibles mais présentent des risques plus importants pour le receveur. Si plusieurs dons sont possibles, il sera envisageable de choisir un certain nombre d'autres critères favorisant le meilleur pronostic pour le receveur. L'âge du donneur (idéalement moins de 45 ans), la compatibilité du système ABO, le nombre le plus faible de grossesses et le sexe du donneur. L'inadéquation du sexe entraînant un risque accru de GVHD chronique en particulier pour les hommes (Flowers et al., 2011). Le statut sérologique du donneur vis-à-vis du cytomégalovirus est également important, en particulier si le receveur est négatif car les infections à CMV comportent un risque de morbi-mortalité élevé post greffe (Nichols et al., 2002). Le don de moelle osseuse est désormais moins fréquent et la mobilisation de cellules souches en périphérie par le G-CSF est préférée car la procédure est moins invasive et donc moins pénible pour le donneur. Par ailleurs, il est également possible de bénéficier d'une greffe de cellules issues d'un mélange de sangs de cordons, ce tissu étant à la fois très riche en cellules immatures et plutôt moins inflammatoire que l'équivalent adulte (Ballen et al., 2013). Une fois les cellules très immatures CD34+ isolées par leukophérèse, le greffon sera cryo-préservé en attendant que le receveur soit en état de recevoir la greffe.

- L'aHSCT permet et requiert de procéder à un conditionnement myéloablatif avant la greffe du patient. Celui-ci a deux objectifs : détruire au maximum les cellules cancéreuses mais également libérer la niche hématopoïétique afin que la prise de greffe puisse avoir lieu et éviter son rejet. Le conditionnement consiste en une chimiothérapie à haute dose (busulfan-cyclophosphamide) qui peut être associée à une irradiation totale du patient délivrée en plusieurs doses si des sites particulièrement réfractaires sont

touchés (moelle osseuse, méninges, gonades). Le conditionnement comprend également un traitement avec un sérum anti-lymphocytaire qui diminue la survenue de la GVHD aiguë et chronique et améliore la survie à long terme du receveur (Bacigalupo et al., 2006).

- Quelques jours après le conditionnement, le système immunitaire du receveur est virtuellement inexistant et le patient entre dans une phase d'aplasie médullaire qui serait mortelle sans greffe. Cette période dure entre quelques jours et quelques semaines et peut requérir des transfusions sanguines si un retard de prise de greffe est observé (ce qui est souvent le cas avec des cellules issues du sang de cordon). Cette période est critique du fait de la morbidité associée aux infections opportunistes. Le patient est surveillé de près. Lorsque les neutrophiles sont retrouvés dans le sang (environ 30-40 jours après greffe), il est raisonnable de penser que la greffe a pris et que les risques d'infections fongiques deviennent plus limités mais les risques bactériens et viraux restent non négligeables. L'immunité du receveur restera encore incomplète jusqu'à environ 100 jours après greffe, temps requis pour la génération *de novo* d'une immunité T compétente et éduquée (Figure 17).



**Figure 17:** Cinétique de reconstitution des cellules immunitaires après une greffe de cellules souches hématopoïétiques. La période post transplantation peut être divisée en trois phases. La période avant la prise de greffe (phase I, j0 à j30) est caractérisée par une immunosuppression généralisée (déplétion des lymphocytes par le sérum anti-lymphocytaire), neutropénie, faible compte de plaquettes et forte susceptibilité aux infections fongiques. Les APC de l'hôte, assez radiorésistantes, finiront par mourir à la fin de la phase I. Une prolifération massive de NK permet de revenir à un seuil normal environ un mois après greffe et représenteront environ 80% des PBMC durant presque toute la phase II (30-100j). Durant la phase II, les patients sont assez sensibles aux infections bactériennes et virales et voient se déclencher la maladie du greffon contre l'hôte. Pendant la phase II, les lymphocytes T présents dans la greffe vont se diviser homéostatiquement du fait de la place laissée libre par le conditionnement. La génération *de novo* de T par les mécanismes normaux de thymopoïèse reprend à partir de jour 100 et ferme la fenêtre à risque de la procédure. Si au-delà du j100 le patient ne montre plus de signes de GVHD, la procédure est un succès. Sinon, il entre en phase III, dite tardive, et caractérisée par la GVHD chronique. D'après Merindol et al. 2011.

Durant la période qui s'ouvre entre la génération des premiers neutrophiles et la reprise de la thymopoïèse, les lymphocytes T présents dans la greffe se multiplient de manière homéostatique profitant de la place libérée par le conditionnement. Bien que le receveur soit phénotypiquement très proche du donneur, il reste néanmoins différent. De fait, les T issus du greffon s'activent contre le receveur ce qui induit deux effets. La réaction du greffon contre la leucémie (GVL) est le résultat recherché lors de l'HSCT. Comme le donneur et le receveur sont légèrement différents, le nouveau système immunitaire greffé est compétent pour reconnaître et détruire assez efficacement les résidus du cancer qui n'ont pas pu être éliminés par le conditionnement. En revanche, ces mêmes lymphocytes T sont également capables de s'activer contre les tissus sains du patient, en particulier le tractus digestif, la peau et le foie. On parle alors de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) qui touche environ 70% des receveurs. La GVHD est une pathologie qui n'existe donc pas en dehors du contexte de l'aHSCT et en est une conséquence directe, responsable de 15 à 30% de la mortalité qui lui est associée.

### *ii) La GVHD aiguë*

La GVHD et l'EAE sont deux pathologies très différentes. Toutefois, elles partagent un certain nombre de mécanismes moléculaires et cellulaires communs. Aussi, ils seront cités mais ne seront pas réexpliqués dans le détail.

Cliniquement, la maladie du greffon contre l'hôte est divisée en différents stades allant du stade 0 (absence de symptôme) au stade 4 (symptomatologie très sévère). Du fait que tous les organes cibles ne vont pas subir la GVHD de la même manière, un stade est donné indépendamment au foie, à la peau et au tractus digestif. Le score général est ensuite exprimé en grades allant du grade 0/I au grade IV. Tous les centres de transplantation, et à fortiori toutes les équipes de recherches, n'appliquent pas le même système de score de la maladie, ce qui peut rendre la comparaison entre les études très difficile. De plus, certains critères comme la douleur et l'inconfort sont éminemment subjectifs et rendent les travaux encore plus ardu. Actuellement un colossal travail d'harmonisation de la méthode de gradation de la GVHD est en cours tant pour la souris que pour l'Homme afin de proposer une score mondial. Par ailleurs, la compréhension de la physiopathologie de la GVHD progressant d'année en année, la méthode de score doit évoluer de concert afin de refléter fidèlement l'état du patient et permettre de le traiter au mieux. Actuellement le score de base le plus utilisé est celui proposé par Harold Glucksberg en 1974 (Glucksberg et al., 1974) (Tableau 3). En raison de sa relative simplicité, il est souvent complété pour inclure des critères complémentaires ou même d'autres organes tels que les yeux, les poumons, le tractus génital ou les articulations.

GVHD Staging			
Stage	Skin	Liver (total bilirubin)	GI tract (diarrhea output/day)
0	No GVHD rash	<2 mg/dl	Adult: <500 ml/d *Child: <10 ml/kg/d
1	Maculopapular rash <25% body surface area	2-3 mg/dl	Adult: 500-999 ml/d Child: 10-19.9 ml/kg/d -or- persistent nausea, vomiting, or anorexia with a positive upper GI biopsy
2	Maculopapular rash 25-50% BSA	3.1-6 mg/d	Adult: 1000-1500ml/d Child: 20-30 ml/kg/d
3	Maculopapular rash >50% BSA	6.1-15 mg/dl	Adult: >1500ml/d Child: >30 ml/kg/d
4	Generalized erythroderma (>50% BSA) plus bullous formation or desquamation >5% BSA	>15 mg/dl	Severe abdominal pain with or without ileus, or grossly bloody diarrhea
*Use adult values for patients $\geq$ 50 kg			
Overall Clinical Grade: Grade 0: No GVHD of any organ Grade 1: Stage 1-2 skin and no liver OR GI tract involvement Grade 2: Stage 3 skin and/or stage 1 liver and/or stage 1 GI tract Grade 3: Stage 0-3 skin with stage 2-3 liver and/or stage 2-3 GI tract Grade 4: Stage 4 skin, liver, and/or GI tract			

**Tableau 3 :** Méthode de score pour la GVHD humaine de Glucksberg. Le critère de la peau définit la proportion de la surface totale du corps couverte par une éruption cutanée maculopapuleuse (lésions superficielles en forme de taches rondes). À des stades avancés le patient peut présenter une atteinte cutanée caractérisée par des phlyctènes semblables à des brûlures ou une desquamation importante. Les atteintes du foie sont reflétées par la concentration totale de bilirubine dans le sang et les urines. Les dommages au tube digestif sont quantifiés par la présence et l'abondance de la diarrhée, la présence de nausées et de sang dans les selles ainsi que la sévérité des douleurs digestives. BSA : surface cutanée totale, GI : tractus gastro-intestinal. Adapté de Glucksberg et al, 1974.

### a) La tempête cytokinique

L'environnement dans lequel la GVHD va s'initier conditionne son déroulement futur (Ferrara and Deeg, 1991). La première phase de la maladie est déclenchée par le conditionnement lui-même qui induit d'importants dommages aux tissus sains dont la barrière épithéliale et muqueuse de l'intestin, mais également le microbiote en particulier digestif. La quantité et la diversité de DAMP et de PAMP tel que le LPS ou le CpG libérés à cette étape sont les acteurs centraux de l'inflammation digestive qui constituera la première manifestation clinique de la GVHD. Cela conditionnera la gravité de la maladie à venir (Jenq et al., 2012). Ainsi, il a été démontré que l'utilisation de metronidazole et de ciprofloxacine avant et après le conditionnement des individus est capable de diminuer sensiblement la gravité de la GVHD digestive mais également cutanée. Cela est directement en lien avec l'allègement de la charge bactérienne et les ligands des PRR qui l'accompagnent (Beelen et al., 1999; Lampert et al., 1988). La restriction de la diversité du microbiote intestinal est normalement assurée par les peptides antimicrobiens produits par les cellules de Paneth. La disparition transitoire de ces cellules à la suite du conditionnement concourt à la dysbiose et à l'inflammation digestive (Eriguchi et al., 2012). Le LPS en particulier dirige la pathogénèse précoce de la

GVHD. L'utilisation d'inhibiteurs oraux des lipopolysaccharides dans un modèle murin induit une amélioration sensible de la GVHD tout en conservant une GVL efficace, ce qui est associé à une meilleure survie générale (Cooke et al., 2001). L'utilisation de traitements prophylactiques est depuis largement répandue et pratiquée par de nombreux centres de transplantation. Cependant, tous les microorganismes digestifs ne semblent pas néfastes pour le patient ; il semble que la famille des Lactobacilles soit protectrice dans la GVHD : son élimination spécifique avant l'HSCT aggrave la GVHD et sa réintroduction améliore la maladie (Jenq et al., 2012).

La libération massive de DAMP, de PAMP ainsi que le stress directement lié au conditionnement myéloablatif sont responsables de la sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires, classiquement d'abord le TNF $\alpha$  puis l'IL-1 et l'IL-6 (Hill et al., 1997a; Xun et al., 1994). Cette étape est surnommée la tempête cytokinique et ses effets s'expriment à la fois *in situ* et à distance en raison de la relative libre circulation des molécules en lien avec la perte du confinement digestif. In situ, la quantité de cytokines inflammatoires est telle qu'elle est capable d'induire à elle seule l'apoptose des cellules des cryptes digestives mais également des cellules souches cutanées (Stuber et al., 1999; Zhan et al., 2012). Si les cellules non hématopoïétiques sont capables de produire ces cytokines, deux types de cellules immunitaires sont également impliqués : les macrophages et les cellules dendritiques issus de l'hôte. Ces deux types cellulaires sont en effet relativement résistants aux traitements chimioablatifs et vont préparer l'activation T à venir. Tout d'abord les cellules présentatrices d'antigène de l'hôte vont être très fortement activées par la production de cytokines pro-inflammatoires par les tissus stressés (Hill and Ferrara, 2000). Cela va se traduire par l'activation de ces cellules, l'expression de molécules d'adhésion et la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et le TNF $\alpha$  (Hill et al., 1997b). De fait, dès l'arrivée des T du donneur, ceux-ci seront activés par les APC de l'hôte et la phase II de la GVHD pourra commencer. Par ailleurs les macrophages de l'hôte sont capables de répondre au LPS présent dans le milieu et vont également se mettre à produire du TNF $\alpha$  et de l'IL-1, ce qui participera à l'apoptose des cellules de l'hôte induite par les cytokines inflammatoires (Poher, 1987). Le TNF $\alpha$  en particulier joue un rôle central dans les phases très précoces de l'initiation de la GVHD et plusieurs études chez l'Homme ont pu démontrer une corrélation directe entre la quantité de TNF $\alpha$  sérique et la sévérité de la maladie (Holler et al., 1990; Kitko et al., 2008). Si la concentration de TNF $\alpha$  est élevée aux étapes précoces de la maladie, le niveau de l'un de ses récepteurs TNFR1, le récepteur impliqué dans l'apoptose induite par le TNF $\alpha$ , est augmenté 7 jours après transplantation (Choi et al., 2008). Cette équipe a montré dans une étude de plus de 400 patients que l'augmentation de TNFR1 de plus de 2,5 fois sa concentration basale est un assez bon indicateur précoce du développement d'une GVH de grade 2 à 4 mais également des risques de mortalité associés. Les patients dont le niveau de TNFR1 ne double pas, présentent un risque faible (grade 0 à 1). L'augmentation initiale du TNFR1 est directement liée aux dommages induits par le conditionnement et retourne à un niveau normal après quelques jours mais pour certains patients, cette augmentation sera

maintenue par la pathologie et initiera un cercle vicieux de dégâts tissulaires. De façon assez logique, un conditionnement réduit se traduit par une augmentation plus modeste de TNF $\alpha$  et de son récepteur ce qui se traduit par une GVHD plus douce et plus tardive mais n'améliore pas la survie des patients (Levine et al., 2003). De façon assez convaincante, ces études démontrent que l'augmentation de TNF $\alpha$  précède et augure de la GVH à venir, il pourrait être alors intéressant de supprimer cette cytokine. Toutefois le TNF $\alpha$  est également impliqué dans la réponse GVL et sa suppression n'est à priori pas envisageable chez les patients car elle compromettrait leur immunité anti tumorale (Tsukada et al., 1999).

Bien que plus tardif que le TNF $\alpha$ , l'IL-1 est également une cytokine importante dans les étapes précoces de la GVHD. Une équipe est parvenue à démontrer que la neutralisation de l'IL-1 par un anticorps neutralisant chez des souris diminue les niveaux sériques de LPS circulant ce qui diminue sensiblement la mortalité associée à la GVHD sans impacter la réponse GVL (Hill et al., 1999). En 2015, l'équipe de Cho démontre que cela est directement lié à la diminution de la différenciation et l'activité des Th17 et l'augmentation concomitante du nombre de Tregs chez ces animaux (Park et al., 2015). La séparation mécanistique entre la GVHD et la GVL du point de vue de l'IL-1 en fait un bon candidat pour l'immunomodulation précoce chez les patients.

Le rôle de l'IL-6 est en revanche plus nuancé. En effet, aux phases précoces, il apparaît que cette cytokine est délétère et que sa neutralisation améliore la GVHD en changeant le rapport Treg/Teff (Chen et al., 2009). Un essai clinique d'inhibition de l'IL-6 en complément des traitements prophylactiques conventionnels est d'ailleurs déjà en phase II et semble donner des résultats très convaincants (Kennedy et al., 2013). Toutefois, de récents travaux ont mis en évidence le rôle de cette cytokine dans le retour à l'homéostasie, la régénération tissulaire et le métabolisme (Scheller et al., 2014). Il existe en effet deux signalisations IL-6 : soit par trans-signalisation (complexe IL-6/IL-6R soluble puis liaison à gp130 à la surface de la cellule) ou par cis-signalisation (liaison de l'IL-6 soluble au complexe IL-6R/gp130 de la cellule). Des études dans d'autres pathologies ont pu mettre en évidence que la trans-signalisation est associée aux propriétés pro-inflammatoires de l'IL-6 là où la cis-signalisation est responsable de ses capacités anti-inflammatoires. Dans la GVHD, il serait donc important de clarifier s'il est également possible de distinguer ces deux effets, en ce cas, ne bloquer que l'effet transactivateur de l'IL-6.

Bien que beaucoup plus discret, l'IFN $\gamma$  joue également un rôle clef dans l'initiation de la GVHD. En effet, les dommages précoces aux organes sont dirigés par l'expression de chimiokines qui permettent le d'attirer des lymphocytes. L'intégrine  $\alpha_4\beta_7$  et la sélectine CD62L en particulier sont nécessaires à l'induction de dommages au tube digestif mais également à la peau (Dutt et al., 2005). Or l'IFN $\gamma$  fait partie des facteurs solubles qui stimulent la sécrétion des chimiokines et de leurs récepteurs, il a de fait été démontré que les niveaux d'IFN $\gamma$  permettent de déterminer la sévérité de la GVHD avant les signes cliniques (He et al., 2007).

La tempête cytokinique est un événement transitoire en amont de la déclaration de la GVHD clinique et ne dure en générale que 7 à 10 jours tant chez l'Homme que chez les souris. Toutefois, cet environnement pro-inflammatoire conditionne l'activité et l'orientation des populations de lymphocytes issues du donneur qui causeront les dommages aux tissus du receveur et déclencheront la phase clinique de la GVHD. Ainsi, agir très précocement sur la phase sub-clinique de la maladie peut avoir un impact fort par la suite.

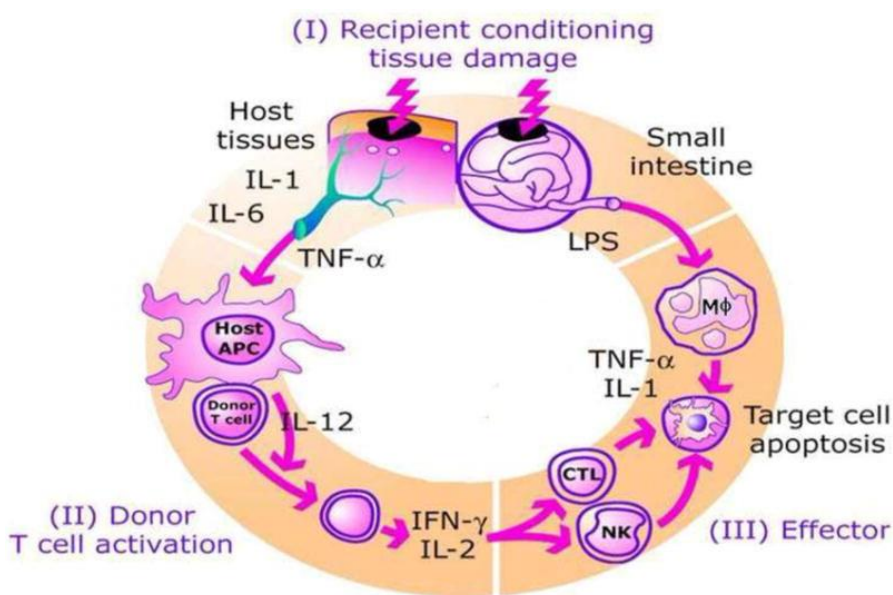
### **b) Les cellules présentatrices d'antigènes de l'hôte**

La tempête cytokinique et les DAMP/PAMP qui résultent des phases très précoces de la GVHD sont capables d'activer les APC de l'hôte qui sont relativement résistantes à la déplétion chimique et physique (Matzinger, 2002). Ces APC de l'hôte vont alors augmenter leur niveau d'expression des molécules de co-stimulation, du CMH mais également intensifier leur production de chimiokines ce qui en retour va attirer et activer les T du donneur (Figure 18) (Hill and Ferrara, 2000). Les dommages au niveau du tube digestif sont particulièrement importants pour cette étape car ils permettent la translocation massive de produits bactériens aux organes lymphoïdes secondaires (Paris et al., 2001). Par le biais de modèles murins, il a ainsi été démontré qu'il est possible de prévenir la GVHD en inactivant les APC de l'hôte (Shlomchik et al., 1999). Il a par ailleurs été mis en évidence que si toutes les APC étaient activées par la tempête, seules les APC de l'hôte et les quelques APC du donneur capables de présentation indirecte participent à la maladie (Markey et al., 2009). Leur contribution relative par rapport des APC du receveur est faible et ces cellules et sont dispensables pour la mise en place de la maladie (Matte et al., 2004). Il est alors proposé d'inactiver ou d'éliminer ces cellules pour prévenir la GVHD. Pour cela, il est suggéré d'utiliser des cellules issues d'un donneur discordant sur les récepteurs KIR, ce qui entraînerait une perte des APC de l'hôte par le biais des NK allo-réactifs. En effet, l'équipe de Ciccone a proposé d'identifier par MLR les clones NK allo-spécifiques (Moretta et al., 1990). Toutefois, étant donné que de nombreuses cellules de l'hôte expriment le CMH-I fortement après le conditionnement, il a été démontré que l'efficacité de l'utilisation de KIR allo-réactifs dépendait de l'intensité du conditionnement (Brunstein et al., 2009). Par ailleurs, certains haplotypes de KIR sont associés à une GVHD sévère (grade III à IV) sans amélioration de la survie des patients (Hosokai et al., 2017).

Parmi les cellules ayant des capacités à présenter l'antigène, les DC sont celles qui jouent le rôle le plus important dans l'induction de la GVHD (Banchereau and Steinman, 1998). Il est en particulier démontré que la reconstitution d'animaux CMH-II<sup>-/-</sup> avec une moelle osseuse WT ne permet pas l'induction de la GVHD, ce qui peut être rétabli avec l'injection de DC CMH-II<sup>+/+</sup> issues de l'hôte mais pas par de lymphocytes B CMH-II<sup>+/+</sup> (Duffner et al., 2004). Les mêmes auteurs démontrent des résultats similaires pour la dépendance vis-à-vis du CMH-I dans un modèle de GVHD dépendant des CD8<sup>+</sup> ce qui démontre que les DC sont bien la population cellulaire centrale de l'initiation de la GVHD. Quelques années plus tard, il sera mis en évidence



que RelB est un facteur de transcription essentiel à la mise en place de la pathologie en permettant l'induction de la différenciation et l'expansion des Th1 mais pas des Tregs issus du donneur (MacDonald et al., 2007). Chez l'Homme, si la majorité des DC sont issues du donneur après jour 30, environ 5% de cellules du receveur persistent après 60 jours et peuvent contribuer à l'entretien de la GVHD aiguë. De fait, la chimerisation rapide du compartiment DC est associée à une GVHD réduite (Auffermann-Gretzinger et al., 2002). Par ailleurs, une étude plus récente a permis de démontrer que le nombre d'APC requis pour le déclenchement de la GVHD est extrêmement faible. Ceci semble compromettre la possibilité d'abroger la maladie en clinique tant le traitement devrait être lourd et donc associé à des effets secondaires (Li et al., 2012a).



**Figure 18:** Physiopathologie de la GVHD. La GVHD comporte trois phases, la première étant la tempête cytokinique directement liée au conditionnement de l'individu et donc aux dommages aux tissus de l'hôte qui l'accompagnent. La deuxième phase clinique est caractérisée par l'activation des APC de l'hôte (et dans une moindre mesure du donneur) par les cytokines produites par les tissus inflammés. Ces APC vont alors activer les T présents dans le greffon. Ceci entraînera la phase III qui voit l'induction de l'apoptose des cellules de l'hôte par les T du donneur. Dans une certaine mesure, les DAMP/PAM et la tempête cytokinique peuvent induire directement cette apoptose. D'après Reddy et al, 2009.

Si les APC de l'hôte ne sont pas indispensables à l'établissement de la GVL, elles permettent néanmoins une réaction plus efficace qui permet la destruction du cancer. Les APC de l'hôte sont capables d'initier la réponse GVL, en particulier si la quantité d'antigènes associés à la tumeur est faible (Reddy et al., 2005). De façon assez paradoxale, la suppression des cellules myéloïdes CD11b+ améliore même la survie des animaux présentant une GVHD et portant une tumeur (Li and Waller, 2004). Par rapport à la souris, la nécessité des DC pour la GVL chez l'Homme semble être plus importante car la faible quantité de CD11c+ dans le sang au moment de la greffe est corrélée à un risque de repousse cancéreuse et de décès associé plus important (Reddy et al., 2004). Il semble dans ce cas, que le CMH-II soit nécessaire à un effet GVL optimal (Chakraverty et al., 2006).

Comme pour l'EAE, il existe des cellules dendritiques régulatrices dans la GVHD dont la manipulation peut avoir des effets significatifs sur le développement de la pathologie. Peu de données existent sur la perte des tolDC *in vivo* dans la mesure où la perte totale des DC est protectrice. Cependant certaines études proposant d'utiliser des modèles animaux déficients pour certaines voies essentielles à leur biologie s'approchent d'une certaine façon de la perte des tolDC. Assez logiquement,IDO joue un rôle essentiel dans la protection contre la GVHD permise par les tolDC. Les animaux IDO<sup>-/-</sup> présentent une pathologie accélérée mais également plus sévère en particulier au niveau digestif ce qui se traduit par une mortalité plus forte (Jasperson et al., 2008). Cela concorde avec des résultats plus anciens, qui démontraient que la sévérité de la GVHD chez les patients était en corrélation inverse avec l'expression d'IDO sur les monocytes en circulation (Steckel et al., 2003). De façon paradoxale, une expression d'IDO faible par les cellules endothéliales intestinales est associée à une GVHD plus faible et un risque de repousse tumorale plus faible (Park et al., 2014). Des études ont montré que l'induction de l'expression d'IDO sur les APC de l'hôte par l'injection de kynurénine ou de 3M-011 (un agoniste des TLR7/TLR8), supprime la GVHD (Jasperson et al., 2009). En revanche de nombreuses études se sont intéressées à la manipulation pharmacologique de ces cellules en cherchant l'induction et l'amplification de ces tolDC. Les DC traitées avec la rapamycine (RAPA-DC) sont déjà bien caractérisées pour leurs effets protecteurs dans la greffe d'organes solides (Turnquist et al., 2007). Leur transfert adoptif par voie i.v dans la GVHD est capable d'améliorer la survie et le stade clinique de la maladie des animaux ainsi traités (Reichardt et al., 2008). Les auteurs mettent en évidence que les RAPA-DC migrent spécifiquement aux organes lymphoïdes secondaires grâce à CCR5, CCR7 et CD62L et de là, elles sont capables d'inhiber l'activation et la prolifération des T. De façon intéressante, il a été démontré que les RAPA-DC dans le cadre de la GVHD ne présentent pas le phénotype classique des DC tolérogènes (IL-10+TGFβ+) mais expriment fortement l'IL-12p40 et sont capables d'induire, par le truchement de l'IFNγ, l'apoptose des lymphocytes T allogéniques activés par la voie de la caspase 8 (Stenger et al., 2014). L'effet protecteur des RAPA-DC est ainsi abrogé par la neutralisation de l'IFNγ chez les animaux traités. De façon assez similaire, des tolDC issues de l'hôte, générées par l'intermédiaire du peptide intestinal vasoactif, qui est un neuropeptide immunosuppresseur capable de faire émerger des tolDC *in vitro*, permettent de protéger l'animal de la GVHD en épargnant la GVL (Chorny et al., 2006). Cet effet est possible par le fait que les DC traitées au peptide intestinal vasoactif empêchent l'activation et la prolifération des CD4+ alloréactifs et induisent des CD4+ régulateurs mais laissent le compartiment CD8 intact. De façon intéressante, les auteurs ont démontré que l'administration de ces cellules tôt dans la pathologie (avant jour 5) se traduit par des effets plus efficaces, en particulier dans un modèle de discordance des antigènes majeurs du CMH. En revanche, dans un modèle de discordance des antigènes mineurs, le temps d'injection des cellules est moins important. Il est également possible d'induire des tolDC capables de réguler la GVHD par l'injection de corps apoptotiques précoces issus des cellules mononucléées du donneur la veille de la transplantation. Cette protection est très efficace et dépend de l'induction de tolDC mais le mécanisme n'est pas encore

parfaitement clair. Des essais de phases I et II sont cependant en cours et donnent d'excellents résultats (Mevorach et al., 2014). Si quelques études ont pu démontrer un rôle régulateur pour les mDC dans la GVHD (Paraiso et al., 2007), les capacités tolérogènes sont associées aux CD8 $\alpha$ +DC dans la grande majorité des cas (Toubai et al., 2013b). Toutefois, d'autres cellules qualifiées de DCreg présentant le phénotype CD200R3+CD49+ ont été générées *in vitro* par la culture de moelle osseuse en présence de GM-CSF, d'IL-10 et de TGF $\beta$  et présentent de meilleures capacités tolérogènes que les tolDC (Fujita et al., 2007). Ces cellules émergent également spontanément chez un animal naturellement résistant à une forme cutanée de GVHD et semblent équivalentes en termes de phénotype et de fonction (Sato et al., 2009). Ces cellules sont capables d'induire l'anergie des CD4+CD25-foxp3- et de générer des Tregs. Par ailleurs, ces cellules semblent capables dans une certaine mesure de réduire la gravité de la GVHD chronique.

Outre leurs effets propres les APC de l'hôte sont également la source des cytokines nécessaires à la différenciation des Th1, Th2, Th17 et Tregs à partir des T du donneur, le relais essentiel au déclenchement de la GVHD (Ho and Glimcher, 2002)

### **c) L'axe Th1/Th17**

Dans la mesure où les lymphocytes T allogéniques sont des cellules essentielles pour l'initiation et l'entretien de la GVHD, leur activation, leur différenciation et leur prolifération sont des facteurs clés pour le déroulement de la pathologie. Le répertoire alloréactif des lymphocytes T CD4+ est, pour sa partie naïve, lié à la génération de ces cellules par le thymus. Il peut également exister un répertoire mémoire alloréactif capable de se réactiver très rapidement. Ces cellules sont générées par cross-réactivité avec un certain nombre de virus comme Influenza ou EBV (Amir et al., 2010). Les auteurs ont ainsi démontré que dans le répertoire T spécifique des virus, 45% de ces cellules sont susceptibles d'être allo-réactives.

Comme pour l'EAE, jusqu'à la découverte des Th17, GVHD était vue comme une pathologie essentiellement provoquée par les Th1 en raison de la prédominance de l'implication de la réponse CTL et de l'induction excessive de cytokines de type Th1 dont l'IFN $\gamma$  (Antin and Ferrara, 1992; Blazar et al., 1997). Assez rapidement après la découverte des Th17 il a été démontré qu'ils jouaient également un rôle dans l'induction de la pathologie (Carlson et al., 2009). Les Th17 sont particulièrement nécessaires pour la pathologie cutanée et digestive mais moins pour la forme hépatique et les Th1 sont davantage capables d'induire les dommages cutanés et hépatiques. L'inhibition de chacune de ces voies de différenciation se traduit par l'amélioration clinique de la GVHD (Boieri et al., 2017; Cheng et al., 2012). Il est ainsi possible de prévenir la GVHD tout en conservant la GVL par l'utilisation d'animaux bi-déficients à la fois pour Tbet et ROR $\gamma$ t (Yu et al., 2011). Cependant, il apparut assez rapidement que ni les Th1, dont la production d'IFN $\gamma$  est

dispensable pour l'établissement de la maladie (Yang et al., 2002), ni les Th17 ne peuvent résumer la maladie et sont tous deux nécessaires mais non suffisants (Iclozan et al., 2010). Ces travaux mettent donc en avant une coopération fonctionnelle entre les Th1 et les Th17 qui doivent travailler de concert pour l'établissement de la pathologie.

Il est à noter que le rôle de l'IFN $\gamma$  décrit dans la littérature est conflictuel. En effet, il est connu que l'induction d'une GVHD chez un animal ayant reçu une moelle osseuse IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> est plus sévère que son équivalent WT (Yang et al., 1998). De façon intéressante, les auteurs démontrent également que l'IL-12 a un rôle protecteur dans la GVHD mais que cet effet dépend de la capacité des cellules à produire de l'IFN $\gamma$ . L'effet protecteur de l'IL-12 étant en effet perdu chez un animal ayant été reconstitué avec de la moelle osseuse issue d'un animal IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Cet effet bénéfique de l'IL-12 passe par la dissociation GVHD/GVL. L'injection de cette cytokine permet en effet de retarder le déclenchement de la GVHD et de diminuer la mortalité chez les animaux traités (Yang and Sykes, 1999). Dans ce modèle, les auteurs ont démontré que l'IL-12, en association avec l'IFN $\gamma$  est capable de limiter l'expansion et l'activation des T CD4<sup>+</sup> du donneur par l'induction d'une apoptose Fas-L dépendante. Cette apoptose épargne les CD8<sup>+</sup> ce qui permet de conserver une réponse GVL efficace. Quelques années plus tard, il est mis en évidence que si l'induction de la GVHD est effectivement plus forte chez des animaux IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>, la même maladie déclenchée chez des animaux Tbet<sup>-/-</sup> est significativement plus faible. Ces cellules Tbet<sup>-/-</sup> ne sont plus capables de migrer convenablement aux organes cibles mais surtout ne sont plus capables d'induire des molécules associées au phénotype Th1 comme le Granzyme B, CXCR3 ou PD1 et ce de façon indépendante de l'IFN $\gamma$  endogène (Fu et al., 2015). Par ailleurs, les auteurs mettent en évidence que la perte de Tbet se traduit par une orientation Th17 augmentée mais que ces cellules ont une capacité réduite à causer la maladie ce qui corrobore une coopération entre les Th1 et les Th17. Les animaux reconstitués avec une moelle Tbet<sup>-/-</sup> sont également déficients dans leur réponse GVL. Ce travail distingue donc des rôles différents pour les cytokines IL-12 et IFN $\gamma$  d'une part et les Th1 d'autre part.

Il existe au cours de la différenciation deux types fonctionnels de Th1 : les Th1 précoces (IFN $\gamma$ + GM-CSF-) et les Th1 dit tardifs (IFN $\gamma$ + GM-CSF+) (Herndler-Brandstetter and Flavell, 2014). Il pourrait donc être intéressant de se questionner sur la présence de deux types de Th1 qui pourraient avoir, dans le cadre de la GVHD des effets différents.

Il est à noter qu'une littérature opposée sur l'IL-12 existe, et démontre que l'utilisation d'un anticorps anti IL-12/IL-23p40 diminue la GVHD en supprimant les Th17 classiques mais également une population assez rare dans d'autres modèles mais abondante en GVHD : les Th1/Th17 (IL-17+IFN $\gamma$ +) (Okamoto et al., 2015). Le niveau d'IFN $\gamma$  et d'IL-17 est par ailleurs drastiquement diminué chez ces animaux. Ce travail rejoint tout de même le travail de Yang et Sykes en démontrant que le niveau d'expression de Tbet est réduit dans ces cellules et qu'il est associé à la production d'IL-22 par les cellules du donneur. Ce travail démontre donc

que les Th1 sont effectivement susceptibles d'induire les Th17, ce qui est en accord avec une étude cinétique de la production de l'IL-17 et de l'IFN $\gamma$  réalisée un an plus tôt. En effet, dans un modèle murin de réponse allogénique, Ju et son équipe parviennent à mettre en évidence que, comme pour le cas de l'EAE, les Th1 précèdent les Th17 puis ceux-ci recrutent les CD8<sup>+</sup> (Ju et al., 2014).

La littérature reste donc conflictuelle sur l'implication respective des Th1 et Th17 ce qui tend à montrer que la compréhension fine des modalités contrôlant les deux visages des Th1 et des Th17 est encore imparfaite et doit assurément considérer l'organe concerné, la quantité de cellules et les cytokines produites mais également le type cellulaire qui recevra le message cytokinique. Il est possible de résumer la contribution respective des Th1 et Th17 par l'existence d'un équilibre entre ces deux populations. Il est envisageable de proposer un équilibre Th1-Th17 « idéal » que l'on retrouverait chez des patients peu atteints de GVHD ayant une réponse GVL compétente. Ainsi, toute déviation de cette balance soit en favorisant l'axe Th1 (Yi et al., 2008) soit en favorisant l'axe Th17 (Reinhardt et al., 2014) conduit à une pathologie exacerbée ce qui est en accord avec la nature pathogène de ces deux cellules. La dose ferait la toxicité, ce qui n'est pas si étranger aux concepts biologiques. De cette façon on pourra également envisager chacun de ces types cellulaires comme étant apte à limiter la maladie, à condition que ce soit dans un retour vers l'homéostasie initiale de l'équilibre Th1-Th17. L'étude systématique de la proportion Th1-Th17 en parallèle du suivi clinique des animaux a ainsi pu mettre en évidence que l'augmentation de l'une ou l'autre de ces deux populations conduit à une GVHD plus sévère (Pan et al., 2012). Suivant cette logique, il est donc possible de réguler la GVHD par la perte simultanée de ces deux cellules de sorte que l'une ne compense pas la perte de l'autre comme c'est le cas avec le sérum anti lymphocytaire (Socié et al., 2011).

Les CD4 sont capables d'induire en partie l'effet GVL, notamment par la production de cytokines comme l'IL-12, l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  mais vont surtout recruter d'autres cellules capables de détruire les cellules tumorales comme les NK et les CD8 (Schmaltz et al., 2003).

#### **d) Les CD8**

La GVHD est un contexte allogénique qui passe donc par la présentation d'antigènes en particulier sur le CMH-I. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> y jouent naturellement un rôle important. Les CD8<sup>+</sup> sont très profitables pour leur capacité à induire la GVL. Cet effet est lié à plusieurs mécanismes fonctionnant de concert comme la mort médiée par les cytokines ou une activité cytotoxique directe qui fait intervenir les couples Fas/Fas-L et perforine/Granzyme (Hsieh and Korngold, 2000). En particulier la voie perforine est à la fois plus importante et plus précoce pour l'activité des CD8, là où la voie Fas-L semble plus importante pour la GVL induite par les CD4. Dans le cas où les CD8 initialement présents dans le greffon ne suffisent pas à

éradiquer efficacement le cancer, un transfert secondaire de CD8 spécifiques des antigènes tumoraux issus du même donneur est possible et donne de bons résultats (Ciceri et al., 2009; Muffly et al., 2018). Toutefois, en dehors du transfert de CD8 spécifiques des antigènes tumoraux, le répertoire issu de l'hôte permet également à un certain nombre d'entre eux de s'activer contre des antigènes des tissus sains. Les CD8+ sont capables de s'activer indépendamment des APC et des CD4 à la condition qu'une population de CD8 mémoires générée à l'occasion de réponses antivirales (CD44<sup>hi</sup>) soit présente (Farber and Ahmadzadeh, 2002). Il a ainsi été démontré que l'activation des CD8 et l'induction de la GVHD peuvent suivre deux modalités. Si le répertoire CD8 mémoire n'est pas suffisant pour l'induction de la GVHD, les CD8 naïfs seront activés par le répertoire CD4 alloréactif (Amir et al., 2010). Dans ce cas, le répertoire T CD8 sera largement polyclonal. Sinon, l'activation précoce du répertoire mémoire central des CD8 est capable d'induire une GVHD dans des modèles de discordance des antigènes majeurs mais également mineurs via la production d'IFN $\gamma$  (Zheng et al., 2009). De façon intéressante il a été démontré que la GVHD induite par les T CD8 mémoires est plus douce que celle induite par les T naïfs mais l'effet GVL est en revanche assez comparable. La coopération entre les CD4 et les CD8 va d'ailleurs au-delà de la simple activation en ce que l'affinité de la réponse allogénique et l'aide des T CD4 conditionnent la sévérité de la GVHD induite par les CD8, la présence des CD4 potentialisant les dégâts induits par les CTL (Yu et al., 2006). La GVHD induite par les CD8 touche essentiellement le foie, le tube digestif et la peau. L'étude du répertoire menée avec les CD8 issus de la peau d'animaux présentant une GVHD démontre que ces cellules sont très différentes de leurs équivalents induits dans les ganglions (Santos E Sousa et al., 2018). Il semble donc que le contexte pro-inflammatoire spécifique à chaque organe et en particulier l'identité spécifique des APC qui résident dans chaque tissu conduisent à une GVHD qui lui est spécifique. Les CD8 allogéniques activés sont recrutés au niveau des organes lymphoïdes secondaires et s'activent de façon spécifique à l'organe (Zhang et al., 2002; Zhou et al., 2008).

Il semble que les CD8 jouent également un rôle essentiel dans la prise de greffe lors de l'aHSCT et permettent un meilleur chimérisme. Il a ainsi été démontré que l'ajout massif de CD8 issus du donneur en parallèle d'un traitement avec un anticorps dirigé contre CD3 n'induit pas de GVHD mais favorise au contraire la mise en place de la tolérance face à la greffe (Liang et al., 2005). Cela corrèle avec un niveau faible de TNF $\alpha$  et une augmentation d'IL-4 et d'IL-10 en lien avec une expansion forte des CD8 au niveau des organes lymphoïdes et hématopoïétiques mais sans induction de Tregs.

### **e) Les lymphocytes B**

Le rôle des lymphocytes B dans la pathologie et la régulation de la GVHD aiguë est extrêmement limité. D'une part, les lymphocytes B de l'hôte sont relativement sensibles au conditionnement, ce qui détruit une très grande partie du compartiment B du receveur, ce qui est heureux dans le cas des myélomes. D'autre part, les lymphocytes B issus du donneur contenus dans le greffon présentent un phénotype

dysfonctionnel en raison de la forte production de Fas-L par les T (Baker et al., 1997). Il semble cependant que le nombre plus élevé de lymphocytes B présents dans le greffon corrèle avec une GVHD de grade élevé (III et IV), ce qui indique que les B pourraient potentiellement avoir un rôle dans le déclenchement de certaines formes de la GVHD (Kim et al., 2011). Par ailleurs, chez l'animal, l'administration de rituximab améliore la pathologie, ce qui renforce cette hypothèse, même si cela est encore très peu investigué (Schultz et al., 1995). Enfin, la production de novo des lymphocytes B circulants par le greffon n'est détectable qu'après la fin de la période correspondant à la GVHD aiguë. En effet, les dommages importants à la niche hématopoïétique inhibent la différenciation des lymphocytes B (Lindemans and Hanash, 2014). Il est démontré que la profondeur de la lymphopénie B est associée au degré de colonisation de la moelle osseuse par les T du donneur (Mensen et al., 2014). En revanche, on ne sait pas si la perte de la lymphopoïèse B permet l'infiltration des T ou si la présence de ces T empêche la production de B. On ne sait pas non plus clairement dans quelle mesure la déficience en B est directement liée au traitement de la GVHD. Cette question est d'autant plus pertinente qu'il a été démontré que le ruxolitinib, un inhibiteur de la voie Jak utilisé pour le traitement des GVHD réfractaires aux stéroïdes, est associé à la perte de l'expansion des B au niveau des centres germinatifs (Jackson et al., 2016). Dans un travail récent, une équipe s'est toutefois intéressée à la possibilité de réguler la GVHD par le biais des Bregs et il semble que dans ce contexte ces cellules sont douées de capacités régulatrices (diminution de la production d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$ ) qui n'empêchent pas la GVH (Hu et al., 2017). Toutefois, l'étude se limite à un suivi clinique des animaux de 30 jours au maximum ce qui peut poser la question de la stabilité à long terme du phénotype régulateur de ces cellules comme c'est le cas pour les Tregs. Par ailleurs, aucun mécanisme moléculaire n'est postulé. Aussi étonnant que cela puisse paraître, le travail est complété d'une étude clinique impliquant plus de 70 patients qui démontre une tendance à la protection par ces cellules chez l'Homme.

## **f) Les T régulateurs**

EN 2002, il est mis en évidence que la déplétion des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> tant du greffon que de l'animal une fois greffé se traduit par une GVHD aggravée (Taylor et al., 2002). La même équipe démontre que l'administration de ces cellules multipliées *ex-vivo* co-injectées en nombre équivalent aux CD25<sup>-</sup> améliore une GVHD autrement rapidement létale. Ces résultats seront confirmés à plusieurs reprises par des équipes différentes qui viendront compléter les modalités de cette protection. L'équipe d'Hoffman démontre que le rapport CD25<sup>-</sup>/CD25<sup>+</sup> présent dans le greffon avant la reconstitution est prédictif de l'amplitude clinique de la GVHD et que cette protection *in vivo* requiert la production d'IL-10 par les Tregs ainsi injectés (Hoffmann et al., 2002). Tant *in vitro* qu'*in vivo* seuls les Tregs issus du donneur sont à même de réguler la GVHD (Tawara et al., 2012). Par ailleurs, le transfert de Tregs n'est réellement efficace que lorsqu'il est réalisé dans une

fenêtre temporelle restreinte autour de la greffe (Edinger et al., 2003). Les mêmes auteurs démontrent qu'une quantité de Tregs capable d'arrêter la GVHD n'a en revanche pas d'impact sur la GVL qui se déroule normalement. Ces résultats seront en revanche remis en question quelques années plus tard. Des essais cliniques chez l'Homme démontrent que si effectivement les Tregs sont susceptibles de protéger de la GVHD, les patients ayant reçu les plus grandes doses de Tregs sont ceux qui connaissent le plus de reprises tumorales, ce qui peut suggérer un effet GVL affaibli (Hicheri et al., 2008).

Le suivi de la migration des tTregs issus du donneur démontrent qu'ils migrent spécifiquement aux organes lymphoïdes secondaires où ils se divisent et inhibent précocement les T alloréactifs (Nguyen et al., 2007). Par ailleurs, il a été prouvé que dans les deux populations CD62L<sup>+</sup> et CD62L<sup>lo</sup>, seule la population fortement positive est capable d'inhiber la prolifération des Teff *in vivo* (Ermann et al., 2005). Il semble cependant qu'une autre population de Tregs caractérisées par le phénotype CD4<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ne migre pas aux organes lymphoïdes secondaires mais plutôt directement aux poumons et au tube digestif, en raison d'une expression de CCR5 forte et de CD62L faible. Si les Tregs déficients en CCR5 sont parfaitement efficaces *in vitro*, ils induisent une protection moins efficace *in vivo* en raison de leur incapacité à migrer aux poumons et au foie (Wysocki et al., 2005). Des résultats semblables sont observés avec la perte d'autres molécules d'adressage à certains organes ce qui démontre bien que la seule capacité régulatrice n'est pas suffisante mais requiert une répartition efficace de ces cellules (Varona et al., 2006). Par ailleurs, si le TNFR1 a été démontré pathogène dans la GVHD, il est démontré en 2016 que le TNFR2 est indispensable à la protection par les tTregs (Leclerc et al., 2016).

De façon intéressante le rôle du TGF $\beta$  après aHSCT, est assez ambigu. La neutralisation du TGF $\beta$  après la greffe augmente significativement la GVHD aiguë en favorisant l'expansion des populations T (Banovic et al., 2005). À cette étape, la principale source de cette cytokine est les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du donneur qui s'avèrent capables de diminuer l'incidence clinique de la pathologie en supprimant l'expansion des CD8<sup>+</sup> et en induisant l'apoptose de façon dépendante du TGF $\beta$ , bien que l'effet soit amplifié en l'absence d'IL-10 (Gu et al., 2014). Paradoxalement, si la suppression du TGF $\beta$  favorise l'expansion des T, elle en altère la cytotoxicité et empêche de fait que la réponse GVL soit efficace. Par ailleurs, la production de TGF $\beta$  tardive favorise la survenue de la GVHD chronique et la suppression de cette cytokine à cette étape est clairement bénéfique.

De par leur répertoire spécifique et de l'activité suppressive très efficace des pTregs, ces cellules peuvent avoir un rôle central dans la régulation de la pathologie, sans risquer de mettre en péril la GVL. Elles sont pourtant beaucoup moins étudiées que les tTregs, en partie car que l'induction de pTregs est assez faible *in vivo* pendant la GVHD (Beres et al., 2011). L'étude de ces populations repose donc sur une différenciation et une expansion *ex vivo* avant leur co-transfert avec la moelle osseuse. Du fait de la grande instabilité de leur expression de foxp3, ces cellules ne parviennent pas à réguler efficacement la GVHD et



adoptent un phénotype effecteur (IL-21<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) sous la pression inflammatoire (Koenecke et al., 2009). Il est cependant possible de rétablir leurs capacités protectrices en les prétraitant à l'IL-2 en combinaison avec de la rapamycine, ce qui a pour effet de fixer leur expression de foxp3 et d'augmenter leur durée de vie dans l'hôte (Zhang et al., 2013). Ces cellules sont alors capables de protéger efficacement et relativement spécifiquement l'hôte de la GVHD. Les animaux ainsi traités présentent une GVHD atténuée et une survie améliorée.

Par comparaison avec les Tregs les Th2 sont des cellules aux propriétés régulatrices moins étudiées car leur rôle est ambivalent. Il a ainsi pu être démontré qu'il n'est pas possible d'induire la GVHD chez des souris receveuses avec des T auto-réactifs biaisés vers Th2 par leur pré-incubation avec de l'IL-4 du fait d'un défaut de production du TNF $\alpha$  (Krenger et al., 1995). Il sera également démontré que les Th2 sont capables, par leur production d'IL-4 et d'IL-10 de protéger les animaux en GVHD de la mortalité induite par l'injection de LPS (Fowler et al., 1994). Cela est directement lié au fait que l'enrichissement de la greffe en Th2 empêche une bonne prise de greffe des CD8, induit une perte de l'IFN $\gamma$  mais une augmentation de l'IL-4. Du fait de la perte des CD8, l'effet GVL est diminué ce qui contribue à augmenter la mortalité associée au cancer (Fowler et al., 1996; Jung et al., 2003). Comme la perte des CD8 est liée à un défaut d'expansion de la population après greffe, il pourrait être intéressant de réorienter les lymphocytes T après la prise complète de la greffe (7 à 10 jours). Il a toutefois été démontré que dans le cadre de la GVHD, la réorientation des Th1 vers Th2 *in vivo* est minimale, ce qui indique un rôle thérapeutique de l'IL-4 virtuellement nul chez l'animal (Huang and Paul, 1998). Il est alors proposé de séparer temporellement l'injection du greffon compétent et des Th2 de 14 jours. Par cette méthode, les Th2 sont capables d'améliorer la GVHD sans compromettre la GVL (Foley et al., 2008). Cette thérapie peut être annulée par l'injection d'IL-2 ou d'APC, ce qui suggère que l'effet protecteur des Th2 peut passer par la consommation des cytokines dans le milieu et la modulation des APC. Les Th2 peuvent cependant être pathogènes. Il a ainsi été démontré que les animaux *STAT4*<sup>-/-</sup> ont un compartiment Th1 limité et que ce sont les Th2 qui prennent alors la place laissée libre (Nikolic et al., 2000). Si pour les animaux ayant reçu des splénocytes issus de souris *STAT4*<sup>-/-</sup> le déclenchement et la mortalité associés à la GVHD sont plus tardifs, les animaux développent une GVHD cutanée, digestive et hépatique sévère, indiquant que les Th2 sont pathogènes. Il a également été démontré que les Th2 coopèrent avec les Th17 pour induire les dommages pulmonaires associés à la GVHD, les cytokines de type Th2 étant en particulier responsables de la fibrose pulmonaire (Gowdy et al., 2012).

Il existe par ailleurs une population de CD8 naturellement régulateurs, dont la survie et les capacités suppressives contre la GVHD sont dirigées par Bim (Agle et al., 2018). Ces cellules émergent spontanément dans la GVHD et sont capables de moduler la gravité de la pathologie (Beres et al., 2012). De façon intéressante, il semble que les CD8 tTregs du donneur sont également capables de protéger l'hôte murin de la GVHD. Cependant, à l'inverse de leur équivalent CD4, il semble que les CD8 tTregs n'affaiblissent pas la

réponse GVL (Zheng et al., 2013). Les meilleurs résultats de régulation de la GVHD tout en conservant une GVL très efficace sont obtenus par le transfert adoptif d'un mélange des CD4 iTregs et CD8 pTregs (Heinrichs et al., 2016). Chez l'Homme, les CD8 pTregs ne sont pas présents chez les patients car ces cellules sont détruites par la cyclosporine qui est l'un des traitements de première intention pour la prise en charge de la GVHD aiguë (Robb et al., 2012). La prudence dans l'utilisation de ces cellules est toutefois de mise, car l'expression de foxp3 par les CD8 pTregs est également instable et ces cellules finissent par devenir des CD8 pathogènes au bout de trois semaines et sont moins sensibles que les CD4 à la stabilisation de leur phénotype régulateur par le cocktail rapamycine/IL-2 (Zhang et al., 2013).

### **g) Les cellules dendritiques plasmacytoïdes**

L'implication des cellules dendritiques plasmacytoïdes matures dans le cadre de la GVHD est un sujet assez bien étudié dans. À nouveau, leur rôle dans ce contexte est ambivalent et plusieurs études ont pu ainsi démontrer que les pDC CMH-II<sup>+/+</sup> peuvent agir comme des cellules présentatrices d'antigènes capables d'induire une GVHD chez des animaux CMH-II<sup>-/-</sup>, naturellement résistants à la pathologie. Ces pDC sont capables d'orienter spécifiquement la réponse T CD4<sup>+</sup> dans la voie Th17 et d'activer les CD8 ce qui contribue à la pathologie (Koyama et al., 2009; Yu et al., 2010). Cela requiert la présentation de l'alloantigène par les pDC de façon dépendante ou non de l'activation par le TLR7. Cet effet est directement lié au conditionnement dans la mesure où l'irradiation seule augmente l'expression membranaire des CMH-II et est requise pour que les pDC acquièrent une fonction d'APC efficaces dans la GVHD. Chez les patients présentant un stade clinique de GVHD, il a été retrouvé dans la peau et le tractus digestif davantage de pDC et de Th17, ce qui est corrélé avec le stade clinique des patients. Ceci peut être en lien avec la capacité des pDC à induire une telle orientation T, mais n'est pas directement démontré (Bossard et al., 2012; Malard et al.). Il a cependant été démontré que les pDC sont capables de migrer à la lamina propria grâce à leur expression de CCR9 et, guidées par CCL25, sont capables d'atténuer la GVHD digestive (Hadeiba et al., 2008). Cette protection passe en particulier par l'induction de Tregs et la suppression directe des CD4 allogéniques.

Si les pDC du receveur sont virtuellement inexistantes après un traitement par irradiation, les pDC du donneur sont reconnues comme des cellules immunorégulatrices dans de nombreux modèles de GVHD. Il a ainsi été démontré qu'une quantité importante de pDC dans le greffon ainsi que dans le sang des patients greffés 3 mois après la transplantation corrèle avec un meilleur pronostic pour le patient (Mohty et al., 2005). Ceci est certainement à mettre en lien avec leur production d'IDO induite par l'IFN $\gamma$  des T activés capables par la suite de modifier l'équilibre Treg/Teff chez l'animal (Lu et al., 2012). De façon très importante, loin d'empêcher la réponse GVL, le transfert de pDC deux semaines après la greffe augmente la réponse GVL de manière significative. L'équipe de Waller a ainsi démontré qu'il est possible d'améliorer la réponse GVL chez des animaux recevant une moelle osseuse enrichie en pDC (Darlak et al., 2013). Cet effet, dépendant de l'IL-

12p40, passe par la division des CD8, sans pour autant augmenter la GVHD. Au-delà de la période proche de la greffe, les pDC se sont révélées compétentes pour moduler la survenue et la sévérité de la GVHD. Ainsi, l'utilisation du peptide intestinal vasoactif est capable de diminuer la GVHD du fait qu'il augmente l'activation des T dans la voie Th1 qui produisent de l'IFN $\gamma$  ce qui en retour induit la production d'IDO par les pDC (Li et al., 2016). Par ailleurs, une chimérisation précoce des pDC, rapidement remplacées par le compartiment des pDC du donneur est associée à une GVHD chronique plus faible (Clark et al., 2003). En effet, la circulation de pDC issues du donneur induit des Th2 plutôt associés à la régulation de la GVHD (Arpinati et al., 2000). Dans un travail assez récent, il a été démontré que les pDC CCR9+ de la moelle osseuse sont effectivement protectrices chez des animaux présentant une GVHD. En revanche, les pDC mobilisées par G-CSF ont davantage un comportement d'APC qui va augmenter la sévérité de la pathologie (Hassan et al., 2016). Ce travail est en accord avec le travail de Banovic, qui a démontré que la déplétion des pDCs issues d'un greffon de moelle osseuse aggrave la maladie, ce qui n'est pas le cas en supprimant les pDC d'un greffon d'origine splénique (Banovic et al., 2009). La protection offerte dans ce contexte par les cellules d'origine médullaire, probablement immatures, peut ainsi laisser supposer que cette propriété régulatrice peut être acquise dans le contexte inflammatoire qu'est la GVHD. Il paraît essentiel de tester si les mêmes cellules médullaires issues d'animaux parfaitement sains sont capables d'induire le même type de régulation. Ceci permettrait en particulier de savoir si les capacités protectrices des pDC médullaires dans ce modèle sont une propriété liée à leur stade de maturation ou si elle est acquise en contexte inflammatoire. La même équipe démontre également que la GVHD est elle-même capable d'empêcher la maturation des pDC ce qui entraîne une maladie plus agressive. De façon intéressante, il a été proposé d'induire l'augmentation du nombre de pDC du donneur par le traitement avec du Flt3L mais cela ne change pas la GVHD issue du transfert de cette moelle osseuse (Blazar et al., 2001). En revanche le traitement des receveurs après greffe avec cette cytokine accélère la mortalité liée à la GVHD, probablement par l'induction de cDC présentatrices d'allo-antigènes. Cependant, l'administration de Flt3-L au receveur avant la greffe atténue la GVHD en augmentant les CD8 de l'hôte et en diminuant en particulier l'expansion et l'activation des T du donneur rapidement après greffe (Teshima et al., 2002a). Les disparités entre les rôles des pDC pourraient ainsi être expliquées par leur origine, leur nombre mais également par le type et la sévérité du conditionnement qu'ont eu à subir ces cellules.

Par ailleurs, l'équipe d'Ildstad a décrit une population de cellules CD8<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>TCR<sup>-</sup>, dénommées les cellules facilitatrices (facilitating cells, FC), capables d'améliorer la prise de greffe dans un contexte de greffe allogénique des cellules hématopoïétiques mais qui limite la GVHD (Kaufman et al., 1994). Ces cellules seront plus tard retrouvées chez l'Homme (Huang et al., 2016). Cette population cellulaire est hétérogène, mais la composante principale des FC est une population de pDC (plus de 80%) qui est nécessaire mais non suffisante pour permettre la promotion de la prise de greffe (Fugier-Vivier et al., 2005). Il est intéressant de noter que

ces pDC sont capables de produire tout le spectre des cytokines caractéristiques des pDC après stimulation CpG, y compris de l'IL-6, de l'IFN $\alpha$  et du TNF $\alpha$ . Le mécanisme d'action des FC n'est pas parfaitement clair, mais il semble qu'il passe par l'augmentation de la survie des HSC et l'induction d'un solide réseau de Tregs (Colson et al., 2004). La portion des cellules CD8<sup>+</sup>TCR<sup>-</sup>B220<sup>+</sup> qui n'est pas des pDC comprend des lymphocytes B, des NK, des granulocytes et des monocytes. La manière dont les interactions de ces cellules avec les pDCs leur donne leur fonction facilitatrice n'est pas pleinement élucidée à l'heure actuelle.

### *iii) La GVH chronique*

Si la GVHD persiste au-delà de 100 jours, elle est alors probablement en phase chronique (cGVHD). La cGVHD est beaucoup plus mortelle que son équivalent aigu (plus de 70% de décès au bout d'un an). Le déclenchement de la cGVHD peut survenir avant 3 mois après greffe, de même une GVHD de type aigu peut se déclencher après ce délai, il est donc essentiel de caractériser la pathologie chronique par des critères cliniques et non temporels. La cGVHD se caractérise par une attaque d'un nombre important d'organes qui ne sont traditionnellement pas touchés par l'aGVHD, tels que les muscles, et la pathologie ressemble davantage à une maladie auto-immune (Graze and Gale, 1979). De plus, il est possible que la cGVHD et l'aGVHD coexistent créant un syndrome de recouvrement particulièrement mortel. La cGVHD est très difficile à traiter et de nombreuses thérapies efficaces contre l'aGVHD ne sont d'aucun secours contre la forme chronique. La cGVHD est cette fois due à une prolifération non sélective des T du donneur nouvellement produits. Cela est une conséquence directe de la GVHD aiguë qui a induit des dommages importants au thymus du receveur, qui n'est alors plus capable d'éduquer les nouveaux lymphocytes T permettant la persistance d'un vaste répertoire de TCR aberrants, auto-immuns et allo-immuns (Wu et al., 2013a). L'activation T liée à la forme chronique de la GVHD est telle que le risque de rechute cancéreuse est presque inexistant. La mortalité de la cGVHD est en revanche liée à une fibrose tissulaire massive qui entraîne à terme une perte de fonction de certains organes ce qui, comme pour les poumons, est mortel à très court terme. D'un point de vue immunitaire, la cGVHD se caractérise par une perte des Tregs et donc une incapacité à contrôler les Th1 et les Th17 mais également les lymphocytes B (Chen et al., 2007). La fibrose est perpétuée par la production de TGF $\beta$  qui induit la formation de tissu cicatriciel en parallèle des dommages perpétrés par les T (Blazar et al., 2012). Les deux types de GVHD sont liés à un déséquilibre entre la face effectrice et régulatrice du système immunitaire et la prévention de la phase chronique repose sur une prévention efficace de la phase aiguë sans persistance de dommages tissulaires subcliniques qui pourraient affecter entre autre le thymus.

### *iv) Différents modèles de GVHD*

L'étude de la GVHD chez l'Homme est ardue, en raison de la grande difficulté d'accéder aux organes cibles autres que la peau chez des patients qui sont par ailleurs très affaiblis. Aussi, il est absolument nécessaire de recourir à des modèles animaux. Comme cette pathologie est induite par l'Homme, les modalités de déclenchement de la maladie sont parfaitement connues et des nombreux modèles animaux relativement fidèles sont disponibles.

### **a) Modèle *in vitro* : la Mixed Lymphocyte reaction (MLR)**

La réaction lymphocytaire mixte est un modèle cellulaire de la réponse allogénique qui met en présence des lymphocytes d'un donneur avec des APC allogéniques. Ce modèle permet de travailler avec des cellules murines ou humaines primaires mais impose toutes les réserves des modèles *in vitro*. Il existe principalement deux types de MLR : à une voie ou à deux voies. Elles sont ainsi définies au regard des types de cellules pouvant proliférer une seule dans la MLR à une voie (T vs APC) ou les deux dans la MLR à deux voies (PBMC vs PBMC). La prolifération dure en général 5 à 6 jours et est évaluée à l'aide de traceur fluorescent (cell trace violet, CFSE) ou à l'aide d'un marqueur de la synthèse d'ADN (BrdU, thymidine tritiée).

Ce modèle est un test fonctionnel qui permet d'étudier avec beaucoup de précision l'augmentation ou l'inhibition de la prolifération de différentes populations de lymphocytes T. Il permet dans une certaine mesure de prédire de quelle manière un composé ou un type cellulaire va affecter la population testée. La MLR est en particulier très utilisée pour les tests pharmacologiques ou pour tester le matériel chirurgical par exemple et est un pré requis essentiel pour l'autorisation de mise sur le marché d'un certain nombre de médicaments. La possibilité d'utiliser des cellules humaines primaires issues d'un simple prélèvement sanguin permet les études prospectives chez l'Homme et le travail avec des populations cellulaires pathologiques issues de patients présentant des affections immunologiques pour lesquelles les modèles animaux sont encore très perfectibles comme le lupus.

S'il a le mérite de permettre l'étude de certains mécanismes, ce modèle n'est toutefois pas un candidat idéal pour l'étude de pathologies complexes comme la GVHD. En effet, dans le cas de cette pathologie, plusieurs étapes se succèdent et se chevauchent en faisant intervenir de nombreux acteurs cellulaires y compris non hématopoïétiques issus de plusieurs organes qui instaurent un dialogue immunitaire. Du fait du côté relativement systémique de la GVHD, la MLR est à considérer comme une représentation extrêmement simple (voire simpliste) de la réponse allogénique figée dans le temps et dans l'espace. Les capacités pathologiques ou protectrices de certaines cellules peuvent en particulier requérir l'environnement complet de la GVHD pour acquérir leur phénotype définitif et donc présenter des phénotypes divergents *in vitro* et *in vivo*. Par ailleurs, le rapport utile des cellules est souvent choisi pour

maximiser la réponse obtenue et ne reflète pas les conditions physiologiques. Chaque hypothèse posée par le biais d'une MLR requiert donc sa confirmation *in vivo* dans un modèle animal.

## **b) Modèle *in vivo* murin**

Les modèles murins de la GVHD sont variés de sorte de représenter la diversité des pathologies présentes chez l'Homme. Étant donné l'existence de deux stades bien définis de la maladie, il existe des modèles spécifiques pour la phase aiguë et pour la phase chronique. Les seconds ne seront pas discutés ici, le travail de thèse s'étant concentré sur le stade aigu de la GVHD.

Les modèles murins de la GVHD nécessitent, comme pour l'Homme, une irradiation létale (plus rarement un traitement myéloablatif chimique du fait de son coût élevé) et le transfert d'aHSC. Comme les animaux de laboratoire n'ont presque pas de passé immunitaire, en particulier viral, le répertoire alloréactif est plus faible que chez l'humain (environ le tiers), et le seul transfert de moelle osseuse ne suffit pas à déclencher une GVHD dans un modèle murin. Aussi, au moment de la greffe, il faut compenser cela et plusieurs choix sont possibles :

-Soit le transfert de la moelle osseuse sans son compartiment lymphocytaire qui est par la suite complété en T CD4+ et/ou CD8 issus de la rate. Ceci permet d'obtenir des conditions de GVHD parfaitement contrôlées et dont les proportions relatives peuvent être modifiées pour favoriser un aspect de la pathologie plutôt qu'un autre. Il est cependant assez peu physiologique et perd l'implication de certaines populations présentes dans la moelle osseuse.

-Soit le transfert de moelle osseuse totale en parallèle d'un transfert de T total ou de CD4+ issus de la rate. Ce type de transfert permet de se rapprocher au plus près des conditions physiologiques car il conserve à la fois les proportions et la diversité des lymphocytes injectés, y compris le compartiment mémoire. Il présente toutefois le désavantage d'être plus variant entre les animaux et requiert donc des groupes plus importants.

L'identité du donneur et du receveur jouent également un rôle prédominant. Ils sont catégorisés au regard du type d'alloantigènes différents (majeurs ou mineurs) et si cette différence est totale ou partielle. Ces modèles permettent une modulation relativement fine de la maladie qui en découle et le choix du modèle se fait suivant le type de mécanisme étudié.

- Les modèles dits en allo-réactivité complète (full mismatch) font référence à un contexte où le receveur et le donneur sont différents pour leurs allèles du CMH-I, du CMH-II, ou plus souvent les deux en même temps. Dans ce modèle, les antigènes mineurs sont souvent également différents mais la réaction immunitaire que cela va susciter sera éclipsée par celle contre les antigènes majeurs, beaucoup plus forte.

Le modèle le plus courant dans cette catégorie est le transfert de cellules de C57bl/6 (H2<sup>b</sup>) à des receveurs Balb/c (H2<sup>d</sup>) ou inversement. La GVHD qui résulte de ce transfert est dépendante des CD4<sup>+</sup> en premier lieu, les CD8 pouvant ajouter un niveau de pathologie supplémentaire. Du fait de la dépendance aux CD4<sup>+</sup>, ces systèmes sont caractérisés par une tempête cytokinique particulièrement violente qui induit des dommages tissulaires sans interaction spécifique avec le CMH au niveau des épithélia (Teshima et al., 2002b). Cela s'accompagne d'une mortalité très importante chez les animaux (espérance de vie des animaux ≈20 jours) qui peut toutefois être limitée par la réduction du nombre et le type de lymphocytes injectés. Ces modèles de GVHD aiguë en allo-réactivité complète sont particulièrement utiles pour étudier un traitement dont l'effet attendu, en particulier sur la survie, est radical (par exemple l'ajout de Tregs ou la suppression d'une population entière comme les DC) ou si le sujet d'étude est la tempête cytokinique et sa régulation.

-Les modèles d'allo-réactivité partielle font toujours référence à une discordance sur des antigènes majeurs mais seule une partie du receveur est différente du donneur. Ces modèles reposent le plus souvent sur des modèles de transfert de moelle dit de parent à descendant, comme c'est assez souvent le cas chez l'Homme, par exemple le modèle C57BL/6 (H2<sup>b</sup>) → B6C3F1 (H2<sup>b/k</sup>). Ce type de modèle est caractérisé par une tempête cytokinique plus douce et repose sur une participation plus équilibrée des CD4<sup>+</sup> et des CD8<sup>+</sup> ce qui se traduit par une pathologie moins fulgurante et relativement moins mortelle que pour l'allo-réactivité complète (espérance de vie des animaux ≈40-50 jours) (Puliaev et al., 2005). Par ailleurs, la présentation des antigènes par les APC de l'hôte et l'induction de CTL est impérative pour le déclenchement de cette GVHD qui est donc beaucoup plus proche du contexte physiopathologique humain. La maladie reste néanmoins mortelle pour 40 à 100% des animaux suivant les conditions d'induction. Ce type de modèle est utilisé pour l'étude de l'implication de populations ayant un rôle plus minoritaire que les T, comme les NK, ou encore la régulation de la GVHD dans un contexte physiopathologique proche de l'Homme. Du fait de sa ressemblance avec la pathologie humaine nous avons choisi de baser notre étude sur ce type de modèle.

-L'induction de GVHD par l'inadéquation d'antigènes mineurs (miHA) est induite chez des animaux identiques sur les critères du CMH-I et -II mais sont différents sur un ou plusieurs antigènes mineurs comme l'antigène H-Y codé par le chromosome Y des mâles. Dans ce modèle les APC de l'hôte et du donneur sont toutes les deux capables d'induire l'activation des T CD4<sup>+</sup> du donneur puis secondairement des CD8<sup>+</sup> et donc de déclencher la maladie (Anderson et al., 2005). Ce type de modèle est moins morbide que ceux dépendant des antigènes majeurs, il permet une longue espérance de vie pour les animaux en protocole et est le plus proche de l'Homme. Toutefois, le type et le nombre d'antigènes mineurs choisis influencent le type de pathologie et la dépendance aux T qui résultent de cette discordance. Ce modèle présente le désavantage d'être assez souvent subclinique pour certains types de manifestations de la maladie chez la souris bien que des mécanismes cellulaires allo-réactifs soient effectivement à l'œuvre, ce qui rend difficile les études de

régulation de la GVHD ou de survie. Toutefois, il permet une étude fine des mécanismes immunologiques moléculaires et cellulaires mis en œuvre dans la GVHD, toute proportion gardée avec la maladie humaine.

-Du fait de son caractère allogénique, la GVHD est une pathologie dont le pendant xénogénique (xGVHD) est non seulement bien caractérisé mais est également relativement « facile » à mettre en place. Dans ce type de modèle, la maladie est induite par des lymphocytes T humains tirés de donneurs sains ou de patients. Il requiert donc des animaux lourdement immunosupprimés afin d'éviter le rejet de greffe par l'animal, la réponse aux xénogreffes étant plus forte que pour les allogreffes. Le plus souvent, ce type de modèle passe par l'utilisation de souris NSG (NOD, Rag2<sup>-/-</sup>, IL-2R $\gamma$ c<sup>-/-</sup>). Il n'est pas possible d'induire une xGVHD par l'injection de T humains seuls et la présence d'APC humaines capables de présenter les antigènes murins est indispensable du fait que les CMH sont des molécules restreintes entre espèces. L'injection de PBMC humains aux NSG permet une bonne prise de greffe et un syndrome de type GVHD aiguë 20 à 50 jours plus tard. Celui-ci se manifeste par l'infiltration et l'activation des T humains au niveau des organes de la souris qui sont traditionnellement la cible des l'aGVHD (Howell et al., 1989). Ce type de modèles est une étape clef pour le passage des résultats murins aux études précliniques humaines et permet entre-autre de contrôler que les cellules humaines ont un comportement conforme à ce qui a été décrit chez l'animal.

Il est important de souligner que dans chacun des modèles décrits, il est possible de transférer une tumeur à l'animal en parallèle de sa GVHD afin de contrôler la présence et l'intégrité de la réponse GVL.

### *v) Traitement de la GVHD aiguë*

La GVHD est une complication dont la morbidité empêche d'utiliser la greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques pour le traitement de nombreuses pathologies telles que les thalassémies. À l'heure actuelle, le traitement de la GVHD doit permettre de concilier la suppression de l'activation immunitaire excessive, tout en conservant un effet GVL efficace, les deux extrêmes du spectre de l'immunosuppression étant mortels. La prise en charge de la GVHD repose sur le savoir-faire du clinicien plutôt que sur des critères systématiques solidement établis. En effet, les traitements de première intention vont être essayés et suivant la réponse du patient la dose sera ajustée ou la molécule changée jusqu'à trouver le type d'immunosuppression qui convient à un patient donné. Pendant la période d'ajustement thérapeutique le patient est donc à risque soit à cause du cancer et des infections opportunistes soit à cause d'une réponse inflammatoire délurée.

#### **a) Traitements conventionnels**

La première ligne de traitement de la GVHD aiguë est l'utilisation de fortes doses de glucocorticoïdes avec adjonction d'inhibiteurs de calcineurine (cyclosporine ou tacrolimus) au-delà du grade I. Les



glucocorticoïdes (methotrexate ou prednisone) à haute dose sont des immunosuppresseurs généraux dont le mode de fonctionnement a déjà été détaillé dans la partie consacrée au traitement de la SEP. Il semble que pour les patients qui répondent bien aux glucocorticoïdes, la moitié de la dose actuellement utilisée semble fournir des résultats tout aussi satisfaisants pour le traitement de la GVHD tout en limitant les risques d'effets secondaires comme les myopathies induites par les stéroïdes (Lee et al., 2006; Mielcarek et al., 2015). Les cyclosporines quant à elles sont des inhibiteurs de la voie IL-2 entre autres cytokines en bloquant de facteur de transcription NFAT. De fait, la survie et la prolifération des lymphocytes T sont largement limitées par l'ajout d'inhibiteurs de calcineurines au prix d'une toxicité rénale importante (Liu et al., 1991). Une étude rétrospective de près de 600 patients a démontré que les glucocorticoïdes ne sont profitables que pour environ 44% des patients avec une amélioration notable des pathologies digestives et/ou hématiques et/ou cutanées (Martin et al., 1990). Pour les autres patients, ils sont généralement considérés réfractaires aux stéroïdes si aucune amélioration ou si une aggravation de l'aGVHD est constatée pendant les 5 à 14 jours du début du traitement suivant la gravité de la GVHD. De nombreux agents thérapeutiques ont été testés afin de faire face à cette résistance mais, jusqu'à présent, peu présentent des résultats convaincants sur le long terme. Actuellement l'aGVHD réfractaire est toujours associée à une survie médiocre avec une morbidité et une mortalité approchant les 80% (Van Lint et al., 2006). L'utilité d'un sérum anti lymphocytaire est assez contesté et les résultats sont fortement fluctuants d'un centre à l'autre (MacMillan et al., 2002). Il n'existe pas réellement de seconde ligne de traitement systématique et elle dépend essentiellement du type de manifestation observée, de leur sévérité et de leur persistance dans le temps. Dans l'ensemble, peu d'études proposent un échantillon statistique et un recul suffisant pour permettre de privilégier un type de traitement plutôt qu'un autre (Martin et al., 2012). À nouveau, cela repose sur l'expertise du centre de transplantation. Certains traitements parmi les thérapies qui ont été proposées se sont même révélées délétères. C'est le cas de l'utilisation d'un anti IL-2 qui promeut la progression de la GVHD avec une mortalité largement augmentée à 100 jours post greffe (Lee et al., 2004; Przepiorka et al., 2000). De la même manière, l'essai clinique de phase III d'un anticorps neutralisant le TNF $\alpha$  a été un échec cuisant en induisant une forte mortalité liée aux infections fongiques opportunistes (Couriel et al., 2009). De nombreux autres essais avec un anticorps neutralisant  $\alpha$ CD52, la photophorèse extracorporelle, un inhibiteur de mTOR (sirolimus) ou encore un analogue des nucléotides (pentostatine), pour ne citer que ceux-ci, se sont révélés au mieux inefficaces et parfois toxiques.

## **b) Traitements par thérapie cellulaire**

Du fait du besoin de thérapies souples mais efficaces contre la GVHD tant sensible que réfractaire aux stéroïdes, les thérapies cellulaires sont une voie de recherche de choix. L'existence d'un donneur et d'un receveur rend légitime de questionner l'origine des cellules qui seront utilisées. Dans le cas de cellules

hématopoïétiques le choix se portera presque systématiquement sur le donneur et ce pour deux raisons principales : d'une part le compartiment hématopoïétique de l'hôte est vicié par la présence d'un cancer et le risque de réimplanter l'affection maligne est souvent trop grand pour être pris. D'autre part, si une deuxième dose de la thérapie cellulaire est nécessaire, il est délicat d'imaginer conserver des cellules du receveur pendant une période aussi longue que ce soit en culture ou par la congélation. Par ailleurs, le nouveau système immunitaire du patient étant celui du donneur, il est inutile de prendre le risque de voir la thérapie cellulaire rejetée par l'allo-réactivité. Dans le cas de cellules non immunitaires en revanche, il est possible d'utiliser des cellules issues du receveur du fait de leur relatif échappement à la réponse immunitaire. Comme dans le cas de l'EAE, seule les thérapies cellulaires ayant pour but de moduler l'activité du système immunitaire seront considérées, celles dont le but est la régénération d'organe ne seront pas abordées.

Dans l'ensemble, les thérapies cellulaires en phases d'essais cliniques dans le cadre de la GVHD sont utilisées soit en compléments de traitements déjà reconnus pour leur efficacité comme les glucocorticoïdes, soit seules dans le cadre de la GVHD réfractaire. Fortes de leur efficacité dans d'autres modèles, les MSC ont été l'une des premières thérapies cellulaires proposées pour faire face à la GVHD parfois avant même que les études précliniques ne soient finies. Les résultats des thérapies cellulaires à base de MSC sont contrastés et certains ont pu noter une amélioration notable de la pathologie et de la survie à la fois dans le cadre de la GVHD répondeuse (Le Blanc et al., 2004) mais également dans le cadre de la GVHD réfractaire y compris à des grades élevés (Ball et al., 2013; Ringdén et al., 2006). Par ailleurs, l'énorme avantage des thérapies à base de MSC est la faible toxicité associée à ces cellules du fait de la robustesse de leur phénotype régulateur et de leur capacité d'évasion de la reconnaissance par les T allogéniques (Le Blanc et al., 2003). Il semble que le mode d'action des MSC dans l'aGVHD repose sur une relative séquestration des lymphocytes T pathogènes au niveau des organes lymphoïdes secondaires qui le empêche d'induire des dommages aux organes cibles de façon dépendante de l'IL-10 et de l'IFN $\gamma$  (Min et al., 2007). Cependant, toutes les études ne sont pas aussi positives démontrant parfois que les MSC ne sont pas capables de prévenir ou de traiter l'aGVHD (Badillo et al., 2008; Zinöcker et al., 2012). Plusieurs facteurs pourraient expliquer ces différences, en particulier des méthodes d'isolement des MSC variables d'un groupe à un autre, ou encore l'origine des MSC (moelle osseuse ou tissus adipeux) ou encore le temps et la dose de MSC injectée. Par ailleurs, comme les MSC ne sont pas immunitaires, elles sont le plus souvent prélevées sur le patient directement et pourraient être rejetées par le système immunitaire du donneur. Actuellement, l'utilisation de MSC comme traitement prophylactique de la GVHD est à l'étude. De nouveaux essais cliniques standardisés de grande ampleur sont parvenus à démontrer l'efficacité (83% de réponse) et la sûreté du traitement des l'aGVHD réfractaire par les MSC chez les adultes et les enfants avec un risque de rechute lié au cancer de seulement 2% (Bader et

al., 2018). Il est donc possible de voir le traitement par MSC se généraliser pour le traitement de l'aGVHD réfractaire d'ici quelques années.

Les Tregs sont également une voie de thérapie cellulaire qui a été proposée assez tôt pour le traitement de la GVHD. Compte tenu de la difficulté à les identifier, les pTregs n'ont pas été utilisés dans le cadre d'essais pour le traitement de la GVHD et seuls les tTregs ont fait l'objet de tests. Les études précliniques ont ainsi mis en évidence que l'activité des Tregs sur la GVHD n'est réellement bénéfique qu'à de très fortes quantités (ratio 1 :1 avec les T helpers) et ces cellules requièrent donc d'être multipliées *ex vivo* (Hoffmann et al., 2002). L'isolement et la multiplication de Tregs humains fonctionnels à partir de sang périphérique et de sang de cordon furent démontrées dès 2011 (Hippen et al., 2011). Le premier essai clinique utilisant des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> issus de sang périphérique obtint des résultats mitigés bien qu'une phase transitoire de réduction des symptômes ait pu être observée chez les patients (Trzonkowski et al., 2009). Un autre essai fut démarré peu de temps après en utilisant cette fois différentes doses de Tregs isolés à partir de sang de cordon réputé plus fortement régulateur (Brunstein et al., 2011). Si sur les 23 patients, la réduction de la GVHD observée était modeste, aucun effet toxique n'a été relevé. La même année, un autre essai clinique propose cette fois d'injecter des Tregs syngéniques 4 jours avant la greffe sans immunosuppression autre (Di Ianni et al., 2011). Seulement 2 des 26 patients ont développé une GVHD, 13 décèderont dans les trois mois qui suivront l'injection de Tregs. Leur décès est imputable à d'autres causes incluant des infections opportunistes et la repousse tumorale. Si les tTregs totaux semblent donc peu indiqués pour le traitement de la GVHD, l'expansion de Tregs spécifiques d'allo-antigènes semble être une stratégie thérapeutique beaucoup plus prometteuse et pourrait limiter les risques d'immunosuppression généralisée. Certains essais cliniques de phase I et II ont débuté (NCT02474199 et NCT02188719).

La combinaison de Tregs avec les MSC pour le traitement de la GVHD aiguë s'avère efficace pour réguler la pathologie dans un modèle murin (Lim et al., 2014). Cette régulation passe par la suppression des Th1 et des Th2 mais également par une expansion plus rapide des Th2 et des Tregs. Une compréhension plus globale des mécanismes mis en œuvre dans cette régulation est nécessaire avant de pouvoir envisager un essai de ce type chez l'Homme.

Les MDSC ont également été utilisés comme population candidate pour la régulation de la GVHD car leur capacité à rendre tolérant un animal face à une greffe solide allogénique avait été déjà bien décrite (Garcia et al., 2010; Zhang et al., 2008). Dans des modèles murins, les MDSC sont capables de réguler la GVHD aiguë en réorientant la différenciation T vers un profil Th2 et leur suppression dégrade l'état clinique des animaux (Wang et al., 2013). Les MDSC dérivés de la moelle osseuse du donneur sont d'autant plus capables d'inhiber l'aGVHD qu'ils sont prétraités à l'IL-13 qui augmente leur expression de l'arginase I (Highfill et al., 2010). L'administration d'arginase I pégyulée seule reproduit ces résultats. Il est également possible d'augmenter les capacités de suppression de la GVHD par les MDSC en prétraitant le receveur avec

du CpG avant la greffe (Morecki et al., 2008). Chez ces animaux, les niveaux d'IL-10 et d'IFN $\gamma$  sériques sont augmentés et les T présentent des capacités mitotiques plus faibles. Cependant, d'autres équipes nuanceront ces résultats en démontrant qu'il faut en partie supprimer le compartiment T activé pour permettre une induction de tolérance face à la greffe par les MDSC (Morita et al., 2014). Une autre équipe démontrera que les MDSC n'ont même aucune activité suppressive *in vivo* dans un modèle murin en raison de l'effet de l'inflammasome associé à la GVHD (Koehn et al., 2015). Le transfert adoptif de ces cellules n'apporte pas non plus d'avantage pour la survie des animaux. Ce travail est publié par l'équipe de Bruce Blazar qui avait pourtant déjà démontré un effet inverse ; ce qui démontre donc des variations inhérentes aux cellules qui pourraient s'avérer problématiques pour un éventuel essai clinique chez l'Homme. Par ailleurs, les MDSC émergeant en condition cancéreuse, il serait probablement trop risqué d'utiliser ces cellules dans le cadre d'une GVHD humaine où l'effet GVL doit absolument être maintenu.

En parallèle des T, plusieurs essais cliniques se sont penchés sur la manipulation des DC *in vivo* à l'aide de composés pharmaceutiques ; aucun ne propose actuellement le transfert adoptif de tolDC ou de pDC pour limiter la GVHD. L'injection d'inhibiteur de NF- $\kappa$ B ou du protéasome par exemple vise l'induction de tolDC *in vivo* mais ne peut donc pas légitimement être rangée dans la catégorie des thérapies cellulaires. Les DC peuvent en revanche être utilisées comme une technique vaccinale pour la prévention de la repousse tumorale (Pyzer et al., 2014).

### III/Problématique et objectifs de l'étude

#### 1) Problématique

Le but de cette étude est de caractériser une population de précurseurs de cellules dendritiques plasmacytoïdes activées par un signal inné et leur rôle protecteur potentiel contre deux types de pathologies : la première auto-immune (l'EAE) et la seconde allogénique (l'aGVHD).

#### 2) Comparaison des deux modèles d'étude

Nous avons identifié une nouvelle population de cellules caractérisées par le phénotype  $c\text{-Kit}^+\text{Sca-1}^+\text{B220}^{\text{int}}\text{PDCA-1}^+\text{IgM}^-$  émergeant dans la moelle osseuse des souris C57BL/6 après activation par du CpG. Nous avons proposé d'étudier la possibilité de réguler l'EAE, un modèle murin de sclérose en plaques et de définir les modalités de cette protection (**article 1**).

Dans un second temps nous nous sommes demandés si les cellules  $c\text{-Kit}^+\text{Sca-1}^+\text{B220}^{\text{int}}\text{PDCA-1}^+\text{IgM}^-$  sont également douées de capacités régulatrices dans un modèle murin de GVHD aiguë. Nous nous sommes attachés à définir une fenêtre thérapeutique pour ces cellules. Après suivi de leur migration et la définition phénotypique et fonctionnelle de leur descendance, nous avons caractérisé les effets sur le receveur (**page 163 à 183**).

#### 3) Démarche expérimentale

Il sera tout d'abord nécessaire de caractériser finement la population définie par le phénotype  $c\text{-Kit}^+\text{Sca-1}^+\text{B220}^{\text{int}}\text{PDCA-1}^+\text{IgM}^-$ . Par la suite, pour l'une ou l'autre des pathologies, la démarche sera similaire :

- 1) Définir le ou les sites de migration de la population de précurseurs.
- 2) Définir le phénotype de la descendance des précurseurs injectés *in vivo*.
- 3) Étudier les effets sur la population pathogène *in situ* et proposer des candidats moléculaires requis pour la régulation.
- 4) Vérifier la nécessité et/ou l'implication des candidats.

#### Collaboration à d'autres articles scientifiques

Notre laboratoire a défini une population de progéniteurs de lymphocytes B activés par le CpG (CpG-proB) qui émergent en même temps que les CpG-pre-pDC et qui sont capables de protéger des animaux dans le cadre de l'EAE. Le transfert adoptif de 60 000 de ces cellules conduit à la rétention des T encéphalitogènes à la périphérie par le biais du couple CCR7/CCL19. Par ailleurs, l'infiltration des CpG-proB au niveau de la moelle épinière est capable, par le biais de sa production d'IL-10 de diminuer la production de cytokines pathogènes et d'induire des Tregs. Leur effet protecteur dépend à la fois de l'IL-10 et de l'IFN $\gamma$  (**article 2**, en annexe)

**Article n°1**

Innate activation primes bone marrow plasmacytoid dendritic cell precursors for tolerance

Hélène LETSCHER, Sarantis KORNIOTIS, Viviane AGBOGAN, Emmanuel TEJERINA, Christophe GRAS, Jérôme MEGRET, William R. ROBYSKI and Flora ZAVALA

## **Innate activation primes bone marrow plasmacytoid dendritic cell precursors for tolerance**

Hélène LETSCHER<sup>1,2</sup>, Sarantis KORNIOTIS<sup>1,2,†,\*</sup>, Viviane AGBOGAN<sup>1,2,\*</sup>, Emmanuel TEJERINA<sup>1,2</sup>, Christophe GRAS<sup>1,2</sup>, Jérôme MEGRET<sup>3</sup>, William R. ROBYSKI<sup>4</sup> and Flora ZAVALA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institut Necker Enfants Malades, INSERM U1151, CNRS UMR8253, 14 rue Maria-Helena Vieira da Silva, 75014 Paris, France

<sup>2</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine Site Necker, 14 rue Maria-Helena Vieira da Silva, 75014 Paris, France

<sup>3</sup> Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24, CNRS UMS 3633, 75014 Paris, France

<sup>4</sup> Medical College of Wisconsin Cancer Center, 8701 W Watertown Plank Rd, Milwaukee, WI 53226, USA

\*These authors contributed equally to this work, †present address: Institut Curie, INSERM U932, 75005 Paris, France

### **Abstract**

Innate signals sensed by hematopoietic progenitors in their early education within the bone marrow (BM) may prime them for either pro-inflammatory or immunoregulatory functions. We herein demonstrate that activation via Toll-like receptor-9, either in vivo or in vitro, confers to BM plasmacytoid dendritic cell (pDC) precursors (CpG-pre-pDCs), unlike non-activated pDC precursors, the capacity to protect stably against experimental autoimmune encephalomyelitis when adoptively transferred at all disease stages. CpG-pre-pDCs migrated to the inflamed spinal cord where they differentiated into more mature pDCs that produced the anti-inflammatory cytokines TGF- $\beta$  and IL-27 acting sequentially for protection against disease. These results reveal that early innate activation of pDC precursors within the BM confers therapeutic properties onto their mature pDC progeny that are based on their capacity to effectively control tissue-specific autoimmunity without reverting to a pro-inflammatory profile. They further open promising perspectives for cell therapy of autoimmune diseases with innate activated precursor cells.

**Key words:** Immune therapy/ Cell therapy/ peripheral tolerance/ plasmacytoid dendritic cells/ precursors

## Introduction

Emergency or adaptive hematopoiesis has been described as a key response to infections or injury.

Indeed, hematopoietic progenitors are not only confined to the bone marrow (BM) to replenish the immune system by differentiation but can sense pathogens and danger signals<sup>1</sup> and travel to injured or inflammatory tissues<sup>2</sup>. This enables them to interact with the ongoing immune response. Thus, we have shown that G-CSF, a response factor to infections, mobilizes multipotent progenitors from the bone marrow to the spleen, a process along which MPP2 progenitors acquire the capacity to enhance the expansion of functional Tregs and thereby, upon adoptive transfer, protect against type 1 diabetes onset in Non Obese Diabetic (NOD) mice<sup>3</sup>. Askenase et al. showed that gastrointestinal infection can prime monocyte precursors during development within the BM for regulatory function<sup>4</sup>. We further showed that activation with the TLR-9 agonist CpG of B-cell committed progenitors, at the pro-B cell stage (CpG-proBs), enabled them to control effector T cells and to provide protection even at late stages of spontaneous T1D in NOD mice<sup>5</sup> as well as against ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the murine model of multiple sclerosis (MS), at the onset of clinical signs<sup>6</sup>. CpG-proBs have the capacity to migrate to the immune reaction site and target tissues, where they differentiate into diverse mature Breg subsets that act locally at the immune response site<sup>6</sup>. Altogether, these observations suggested that early education of hematopoietic progenitors within the bone marrow may be essential to imprint regulatory functions that enable them to control immune responses in the periphery.

Optimal treatments for autoimmune conditions require efficacy when symptoms are detected, i.e. at the effector phase of disease. Cell therapy with Tregs is not efficient at the effector phase of EAE as Tregs tend to lose their immunosuppressive properties in an inflammatory environment<sup>7</sup>. Indeed, the timing and stimuli sensed by immune cells affect their capacity to restore tolerance or instead contribute to disease severity. Such versatility has been reported for plasmacytoid dendritic cells (pDCs). In MS patients, pDCs accumulate in the central nervous system (CNS) and the cerebrospinal fluid<sup>8</sup>. In the peripheral blood, although pDCs remain stable in numbers, they display a dysfunctional phenotype, with particularly low levels of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 relative to that expressed in pDCs from healthy donors. Even after activation with IL-3 and CD40L in vitro, pDCs from MS patients fail to mature further<sup>9</sup> and to produce IFN- $\alpha$  in response to stimulation by the TLR-9 ligand, the oligonucleotide CpG. Interestingly, the recovery of pDC functions correlates with clinical improvement in MS patients treated with glatiramer acetate, suggesting a regulatory role of pDCs in humans.

In mice, CNS pDCs, although far less efficient than mDCs, are able to present autoantigen and to induce a CD4<sup>+</sup> T-cell response, mostly Th1 and Th17-oriented and thereby exert pathogenic influence<sup>10</sup>. As a result, pDC depletion before EAE induction is clinically beneficial<sup>11</sup>. It induces a significant reduction of circulating IFN- $\alpha$  and a reduced frequency of peripheral Th17 cells, effects that are only partially reproduced by type I



IFN neutralization in pDC-replete animals<sup>12</sup>. These results suggested that pDCs are required for EAE initiation, via their IFN-I production. Conversely, pDC depletion one week after immunization results in aggravation of EAE, suggesting that pDCs adopt a regulatory function once disease has started. They inhibit CNS pro-inflammatory myeloid DCs and thereby reduce pathogenic CNS Th17 differentiation<sup>10</sup>. Moreover, after EAE induction, pDCs establish MHC-II dependent myelin-Ag specific contacts with CD4<sup>+</sup> T-cells in lymph nodes that promote selective expansion of myelin antigen specific regulatory T cells<sup>13</sup>. The remarkable capacity of pDCs to reduce EAE when adoptively transferred at the effector phase of the disease and establish an inhibitory feedback loop between regulatory pDCs and Tregs was shown to strictly depend on their pre-loading with myelin antigen<sup>14</sup>. Conversely, simple activation with CpG, although enhancing MHC-II expression, did not confer to pDCs a protective function against EAE<sup>14</sup>.

Cell-therapy with pDCs in order to foster tolerance in EAE and MS remains an attractive option that has prompted a variety of studies based on pDCs isolated either from the spleen at a mature stage or from the BM. Although the latter have been named precursors, they have been exposed for several days to growth and differentiation factors such as GM-CSF or Flt3-L for expansion and therefore differ from genuine early pDC precursors from the BM. So-called immature spleen and BM pDCs were so far defined on a functional basis, in relation with their low co-stimulatory and MHC II molecules expression. Therefore, whether immune regulatory function can be stably imprinted at the early BM precursor stage in the pDC lineage onwards remains unknown so far.

We herein investigated whether early education of pDCs with TLR agonists during development, at the stage of pDC precursors prior to bone marrow egress, may determine whether they will exert pro-inflammatory or immunoregulatory functions.

We show that activation with CpG, either in vivo or in vitro, confers to BM pDC precursors a highly stable capacity to protect against EAE when adoptively transferred at all disease stages, initiation, onset of clinical signs and peak of the disease whereas control non-activated pDC precursors were not protective. CpG-pre-pDCs migrate selectively to the inflamed spinal cord where they differentiate into more mature pDCs that produce the anti-inflammatory cytokines TGF- $\beta$  and IL-27, acting sequentially for protection against disease. They reduce the production of the main pro-encephalitogenic cytokines GM-CSF, IL-17 and IFN- $\gamma$  by spinal cord infiltrated CD4<sup>+</sup> T-cells and switch them in turn to the production of anti-inflammatory TGF- $\beta$  and IL-27. These results reveal that early innate activation of pDC precursors within the BM confers to this lineage the capacity to effectively control tissue-specific immunity. Whether equivalent therapeutic human pDC precursors can be produced and contribute to protect against MS, either on their own or in the context of autologous HSCT, might be worth investigating.

## RESULTS

**MyD88-dependent emergence of DC precursors in bone marrow after CpG activation: isolation, phenotypic and functional characterization.** Incubation of a BM cell suspension with CpG-B 10 µg/ml during 18h led to the accumulation of hematopoietic progenitors that were first enriched by c-kit positive magnetic selection. Further staining allowed the isolation by FACS-cell sorting of a fraction expressing the phenotype c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> PDCA-1<sup>+</sup> (Figure 1a), with a plasmacytoid morphology (Figure 1b). This PDCA-1<sup>+</sup> cell population was negative for B lineage markers such as CD19, IgM, CD127 (IL-7Rα) as well as for the myeloid lineage marker CD11b but stained CD11c<sup>low</sup>Siglec-H<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> (M-CSFR<sup>+</sup>) (Figure 1a), suggesting a plasmacytoid dendritic cell progenitor more probably derived from the M-CSFR<sup>+</sup> common dendritic precursor (CDP)<sup>15</sup> rather than from the M-CSFR<sup>-</sup>IL-7Rα<sup>-</sup> pDC oriented precursor or the recently described common lymphoid progenitor (CLP)-derived IL-7Rα<sup>+</sup> Ly6D<sup>+</sup> Siglec-H<sup>+</sup> pDC precursor subset<sup>16, 17</sup>. Engagement of the cell-sorted progenitor population into the pDC lineage was further confirmed by its high nuclear expression of the basic helix-loop-helix transcription factor E2-2 (also known as TCF4) which is essential for the development of pDCs<sup>18</sup> at level similar to that in mature splenic pDCs (Figure 1c). They also expressed high levels of the nuclear transcription factor PU.1, active in early lympho-myeloid development and reported to be expressed by pDC precursors<sup>19</sup> for which splenic mature pDCs were instead PU.1<sup>low/-</sup>, as reported<sup>20</sup>. Mature CD19<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> splenic B cells served as E2-2<sup>-</sup> PU.1<sup>+/low</sup> control population (Figure 1c). Activation with CpG for 18h in the BM only slightly enhanced the level of expression of both E2-2 and PU.1 in the sorted population. Upon differentiation in vitro with IL-3 and Flt3L during 9 days<sup>21</sup>, the cells from the selected fraction adopted a more mature pDC phenotype (Figure 1d), losing most of their c-kit expression but acquiring high expression of the co-stimulatory molecule CD86 and of MHC II. Their lack of expression of CX3CR1 discriminated them from myeloid-derived suppressor cells<sup>22</sup>. The functional properties of the CpG-activated cell-sorted precursors were examined by activation with PMA + ionomycin that induced their release essentially of IL-6, IFN-γ and TNF-α, a typical cytokine profile for pDCs (Figure 1e). However, compared to mature splenic pDCs, and as previously reported for human<sup>23</sup> and murine Sca-1<sup>+</sup> BM pDC progenitors<sup>24</sup>, they were deficient in their ability to produce IFN-α, in response to activation by TLR-9 agonists, either CpG-B or CpG-P, a form of the oligonucleotide specific for activating pDCs, as well as by the TLR-7 agonist R848 or the TLR-4 agonist LPS (Figure 1f). Altogether, these characteristics demonstrate that the c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> CD11c<sup>low</sup> Siglec-H<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> E2.2<sup>hi</sup> PU-1<sup>hi</sup> CD11b<sup>-</sup> progenitor population that was cell-sorted from CpG-incubated BM suspension is a pDC precursor that displays functional exhaustion for the production of IFN-α in response to further TLR activation. Finally, a survey of various TLR agonists demonstrated that only TLR-4, TLR-7 and TLR-9 agonists were able to induce this population at significant levels (Figure 1g), and its lack of emergence in the CpG-activated BM of MyD88-deficient mice showed that the MyD88 pathway was required for its accumulation in the BM (Figure 1h).

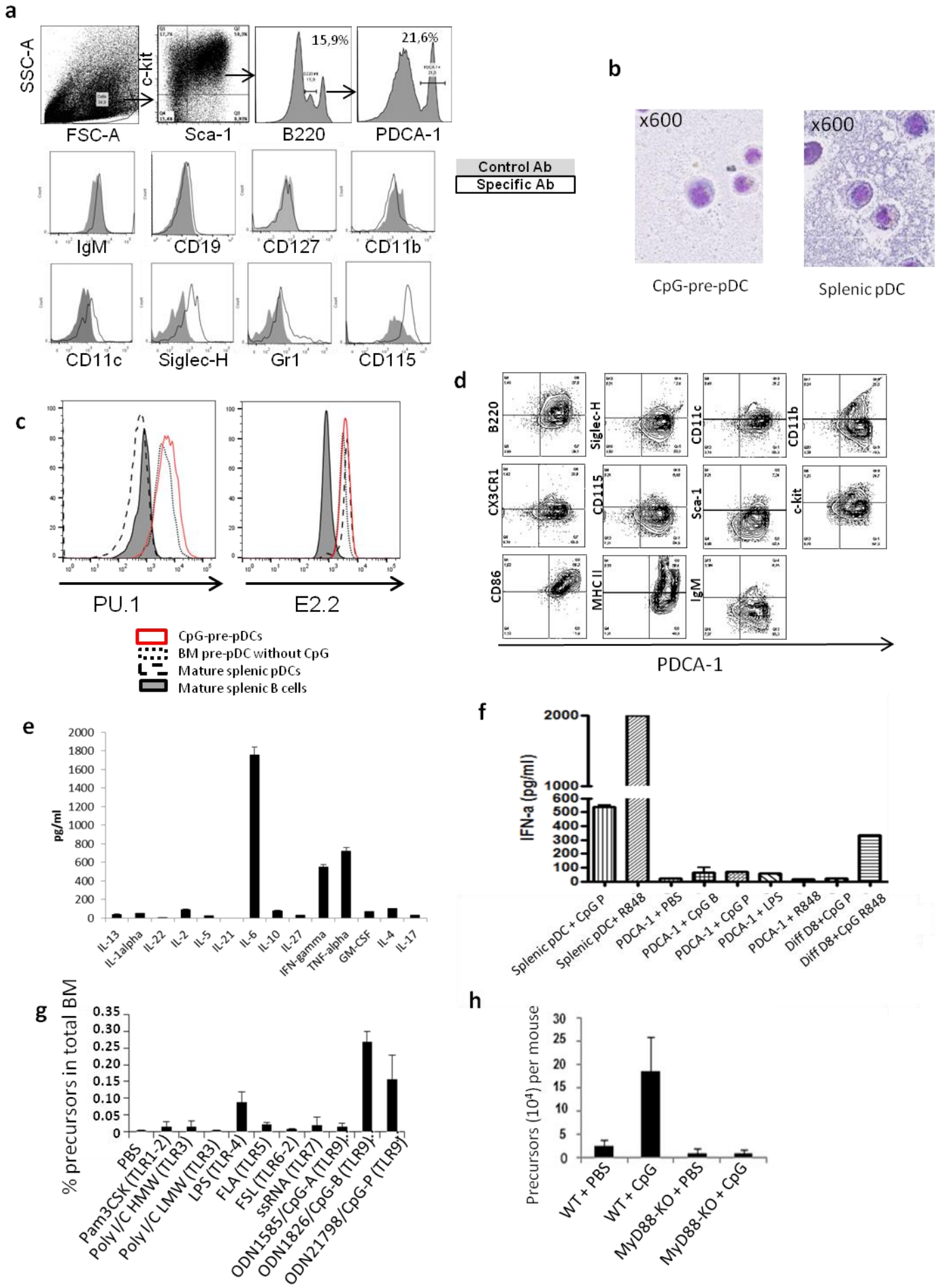
**CpG-pre-pDCs provide protection against EAE at all phases of disease.** To investigate their protective properties in an autoimmune disease, the CpG-pre-pDC progenitors were adoptively transferred in mice immunized for EAE. A single intravenous injection of only 80,000 CpG-pre-pDCs per recipient significantly protected against EAE disease (Figure 2a), either at immunization time on day 0, at the onset of clinical signs on day 12 or at the peak of the disease on day 18, demonstrating both preventive and therapeutic effects of this precursor population. CpG stimulation was absolutely required for the PDCA-1<sup>+</sup> precursor fraction to exert protective effects against EAE since the cell fraction with the same phenotype but recovered after incubation of BM cells with PBS instead of CpG, and representing only one third of the occurrence of the precursor population in CpG-incubated BM, conferred no protection against EAE (Figure 2b). Moreover, when the same PDCA-1<sup>+</sup> precursor fraction was cell-sorted from the BM of mice 18h after an i.p. injection of CpG-B (30 µg/recipient), it exerted a similar protective effect against EAE as in vitro activated CpG-pre-pDCs (Figure 2c), demonstrating the pathophysiological relevance of this precursor cell population.

**Migration, differentiation and functional properties of adoptively transferred CpG-pre-pDCs in EAE-developing recipients.** CpG-pre-pDCs prepared from congenic CD45.1<sup>+</sup> donor mice enabled us to track their migration and differentiation in CD45.2<sup>+</sup> C57Bl/6 recipients in which they were adoptively transferred at day 12 after immunization with the MOG peptide. Six days after their adoptive transfer in recipient mice, >80% CD45.1<sup>+</sup> cells were found in the spinal cord, representing 12% of total injected cells, and <20% in the spleen and the cervical lymph nodes of the recipient mice (Figure 3a). In the spinal cord, FACS analysis of gated CD45.1<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup> cells showed that they exhibited a c-kit<sup>low/neg</sup> Sca-1<sup>+</sup>B220<sup>low</sup> Siglec-H<sup>+</sup>CD11c<sup>low</sup> phenotype characteristic of pDCs (Figure 3b). Upon activation with PMA + ionomycin of the cells recovered from the spinal cord of the recipients, 70-80% of the CD45.1<sup>+</sup> progeny of the injected CpG-pre-pDCs showed intracytoplasmic expression of TGF-β and IL-27, 20% of cells expressed GM-CSF and IFN-γ whereas less than 10% expressed IL-10 at low levels (Figure 3C). IL-17 production was barely detected.

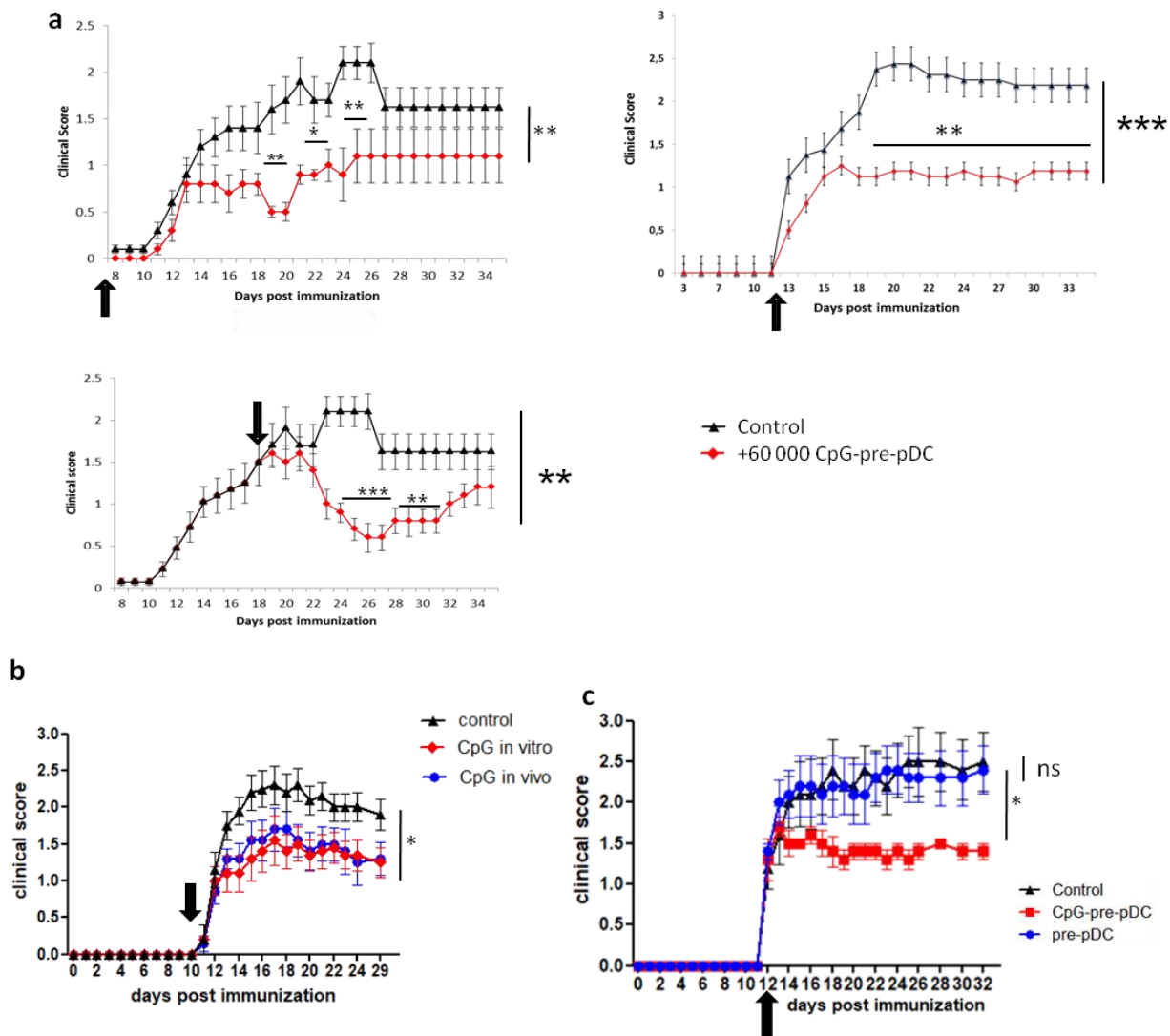
**CpG-pre-pDCs switch the T-cell response of the recipients to an anti-inflammatory profile.** The T-cell profile was analyzed in the spinal cord of the recipients. The CD45.2<sup>+</sup> host CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> T-cells were slightly but not significantly reduced in numbers with a subtle increase in CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-cells (Figure 4a). The CD4<sup>+</sup> cell production of the pathogenic cytokines IL-17, GM-CSF, IL-6, and IFN-γ were reduced while that of IL-21 was barely changed (Figure 4b). Moreover, the productions of TGF-β and LAP were massively enhanced, as well as that of IL-27p28 (but not IL-12p40) in CD4<sup>+</sup> T-cells from the spinal cord of CpG-pre-pDC recipients. Finally, no significant expression of IL-10 production was noted (Figure 4c). Therefore, CD4<sup>+</sup> T-cells were massively deviated towards an anti-inflammatory cytokine profile dominated by TGF-β and IL-27 in CpG-pre-pDC recipients.

**Role of TGF- $\beta$  and IL-27 production by the CpG-pre-pDC progeny in the protection against EAE.** To investigate the functional role of the anti-inflammatory cytokines produced in the spinal cord by the progeny of the CpG-pre-pDCs, and to discriminate from their production by the recipient's T-cells, we prepared CpG-pre-pDCs deficient for either TGF- $\beta$  or IL-27.

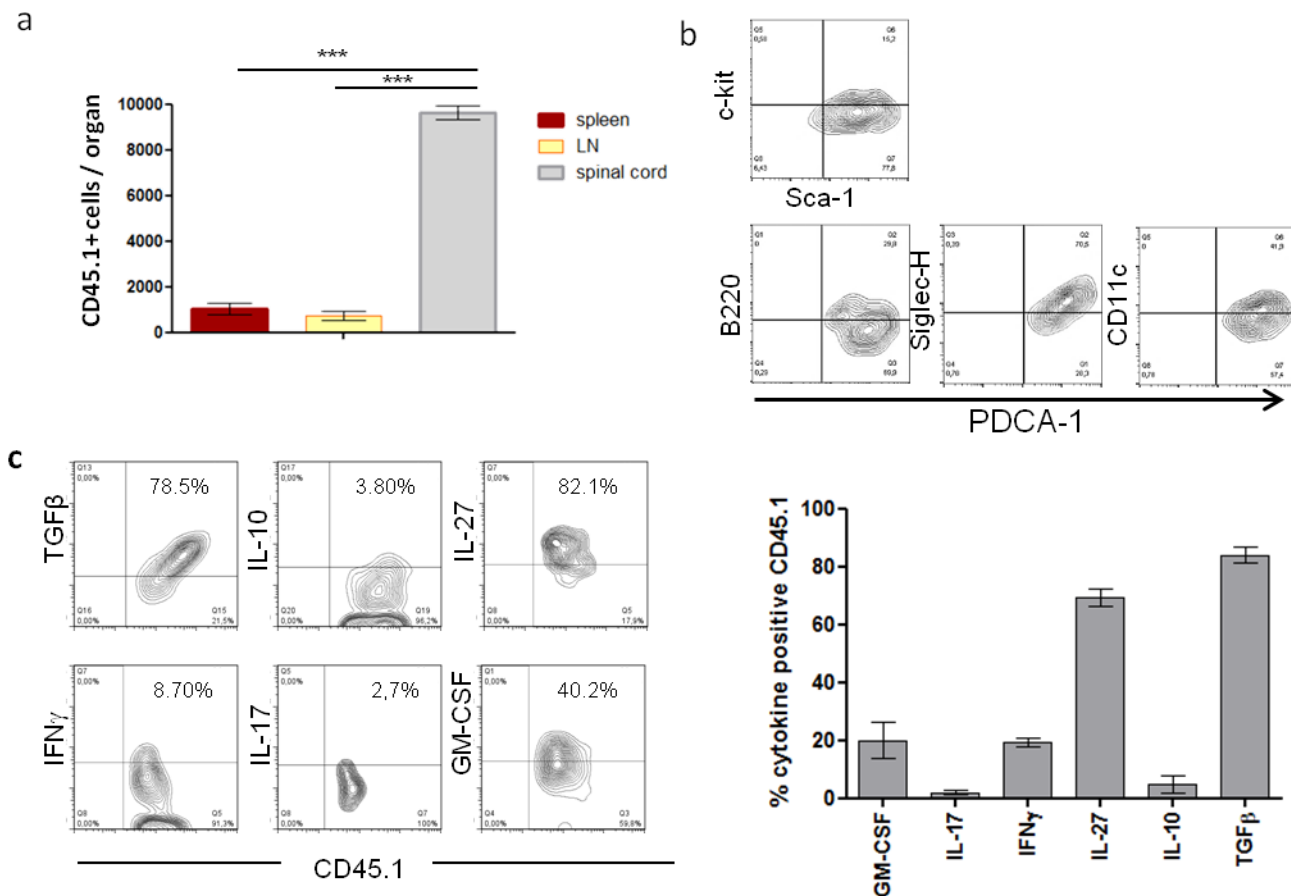
Since TGF- $\beta$  deficient mice are not viable, we neutralized TGF- $\beta$  within the pDC precursors by inserting a neutralizing antibody directed against the TGF- $\beta$ -associated LAP protein that confers its biological properties to membrane TGF- $\beta$ . To this aim, we used a protein transfection vector Chariot, as previously used for neutralizing a chemokine released by adoptively transferred DCs<sup>25</sup>. While CpG-pre-pDCs in which an isotype antibody had been inserted were still able to provide protection against EAE, CpG-pre-pDCs in which a LAP-neutralizing antibody had been inserted had lost their protective capacity against EAE (Figure 5a). Moreover, when CpG-pre-pDCs were prepared from IL-27p28 deficient donor mice, they remained protective until day 22, but lost their protective effect thereafter (Figure 5b). Therefore, TGF- $\beta$  and IL-27 appear to be sequentially playing a key role in the protection against EAE conferred by the progeny of CpG-pre-pDCs.



**Figure 1: Cell sorting strategy and phenotypic and functional analysis of CpG-induced c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>hi</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup> BM cells.** **(a)** Total BM cells incubated with CpG-B (1 $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) for 18h were magnetically enriched for c-kit<sup>+</sup> cells, further labelled for Sca-1, B220, PDCA-1 and electronically sorted into c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>hi</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup> cells. Further characterization of the population was performed using flow cytometry analysis of the expression of various B-cell, myeloid and dendritic cell markers. Specific antibody staining is depicted with open histograms and isotype controls with filled histograms. **(b)** Sorted CpG-activated BM c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>hi</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup> cells and magnetically sorted splenic pDCs were cytopspinned, stained with May-Grünwald Giemsa and scanned using Nanoscan 2.0 HT (x600). **(c)** FlowRNA analysis of lineage transcription factor expression: expression of the hematopoietic PU.1 and the plasmacytoid specific E2.2 transcription factors in CpG- versus PBS-stimulated c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>hi</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup> population versus in mature splenic pDCs and B cells. **(d)** CpG-induced c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>hi</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup> sorted cells were differentiated in vitro using 50ng/mL IL-3 and 300ng/mL Flt3L for 9 days. The progeny phenotype was assessed using flow cytometry analysis. **(e)** Cytokine production of CpG-induced c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>hi</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup> cells, measured in the supernatant after 4h of activation with PMA/ionomycin using multiplex ELISA. **(f)** IFN $\alpha$  production was measured after 18h incubation with TLR-7 (R848), TLR-9 (CpG-B and CpG-P) and TLR-4 (LPS) agonists of splenic pDCs, CpG-induced cell-sorted c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>hi</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup> (PDCA-1<sup>+</sup>) or their in vitro progeny (Diff d8) obtained as in (d). **(g)** Frequency of c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>hi</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup> cells emerging among BM cells after 18h of incubation with different TLR agonists. **(h)** BM cells of both WT and MyD88<sup>-/-</sup> C57BL/6J mice were incubated with CpG-B for 18h and frequency of the c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>hi</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup> precursor population quantified by flow cytometry analysis.

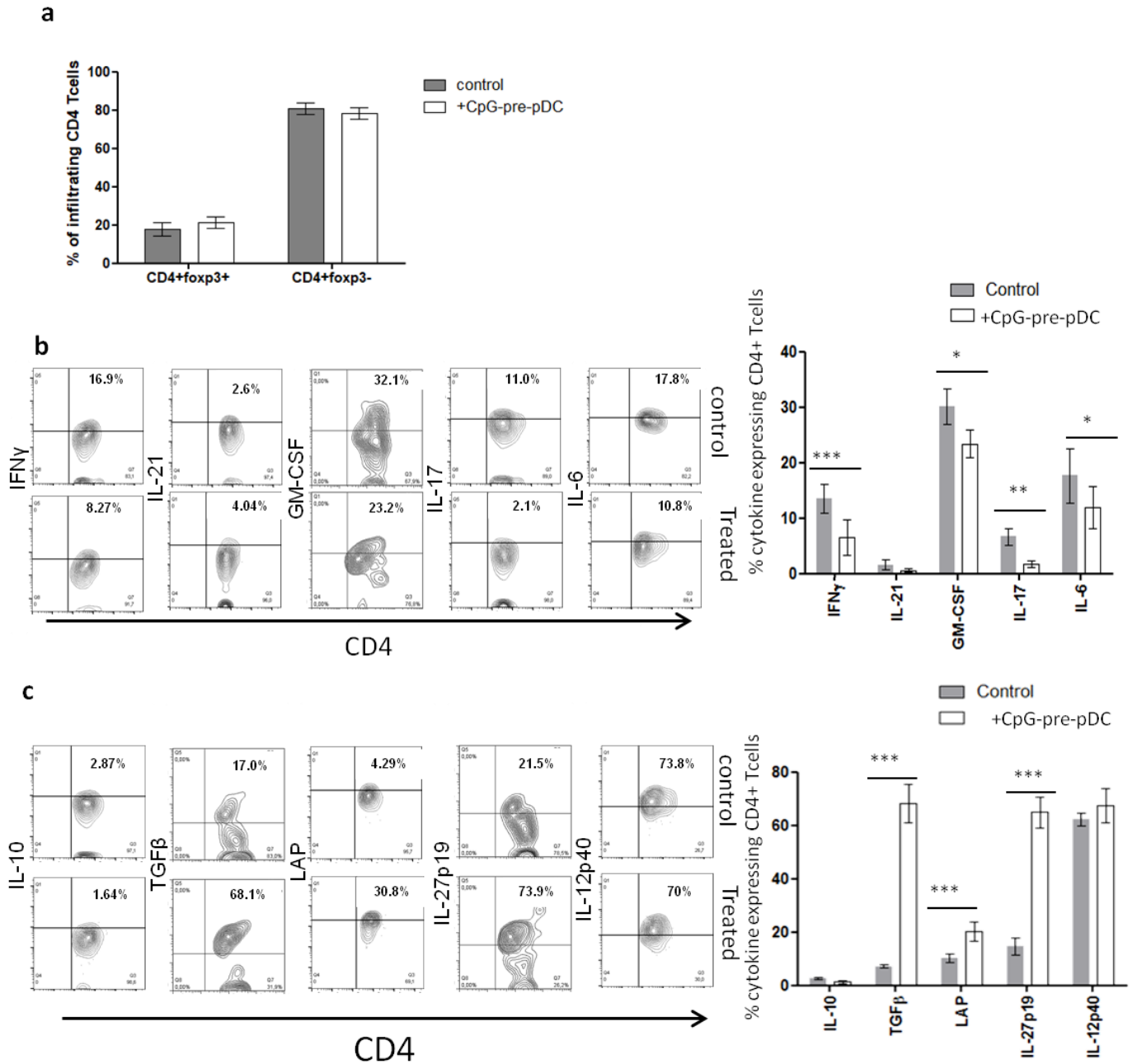


**Figure 2: Disease protection against EAE and therapeutic window of CpG-pre-pDCs. (a)** EAE clinical scores (mean  $\pm$  s.e.m.) over 35 days of the indicated groups of MOG<sub>35-55</sub> immunized C57Bl/6 mice in which 80,000 CpG-pre-pDCs or PBS (controls) were injected i.v at different disease stages, at immunization (d0), at the onset of clinical signs (d12) and at the peak of disease (d18). n=10-15 mice per group. **(b)** c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>hi</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup> cells were cell-sorted as in Figure 1a either from BM cells stimulated in vitro for 18h with CpG-B (1 $\mu$ g/ml<sup>-1</sup>) or from the BM of mice 18h after in vivo injection of CpG-B (30  $\mu$ g/mouse, i.p.) and injected into MOG<sub>35-55</sub>-immunized mice at the onset of EAE clinical signs (d12). Clinical score (mean + s.e.m.) was followed until d30, n=10 mice per group. **(c)** Total BM was cultured in complete medium with or without CpG. c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>hi</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup> cells were cell-sorted and 80,000 cells of each type were injected at d12 into MOG<sub>35-55</sub> EAE immunized mice. Clinical score (mean + s.e.m.) was followed until d32, n=5 mice per group. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA with Bonferroni post-test. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.005, \*\*\* $P$ <0.001.

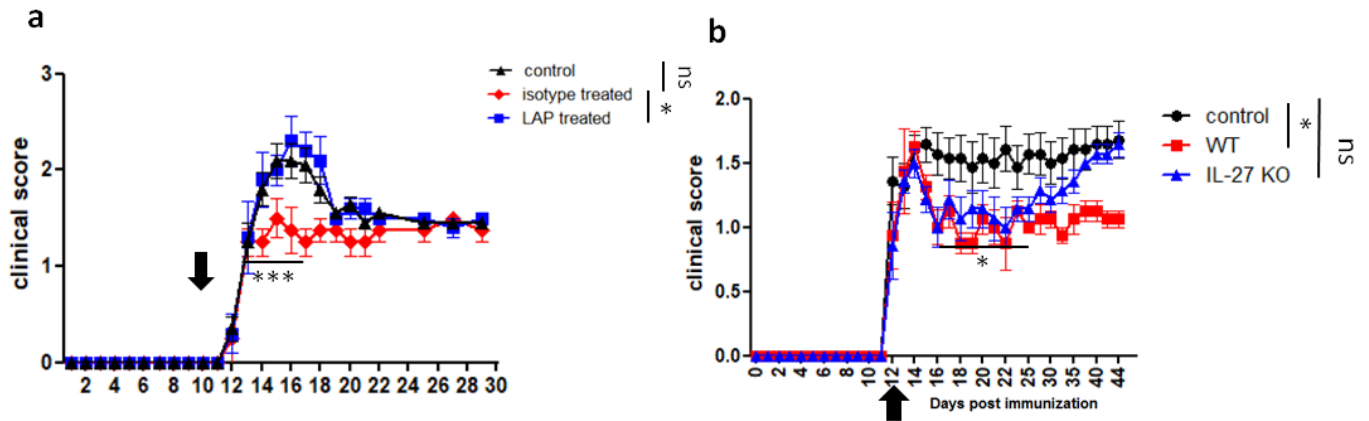


**Figure 3: Migration, differentiation and cytokine production of the CpG-pre-pDC progeny in EAE mice. (a)** CD45.1<sup>+</sup> CpG-pre-pDCs were injected at d12 into MOG<sub>35-55</sub> immunized CD45.2<sup>+</sup> mice. Absolute numbers of the CD45.1 progeny of CpG-pre-pDCs was analysed in the spleen, draining lymph nodes and spinal cord of the animals at d18. n=12 mice per group, statistical analysis performed using repeated measure one way ANOVA with Bonferroni multiple post-test \*\*\**P*<0.001. **(b)** Phenotype of the spinal cord CD45.1<sup>+</sup> progeny, assessed at d18 using flow cytometry analysis. **(c)** Cytokine production of the CD45.1<sup>+</sup> progeny from the spinal cord at d18 analysed by flow cytometry after 4h activation with PMA/ionomycin in presence of brefeldine A. Left: representative flow cytometry analysis. Right: histograms summarizing percent of CD45.1<sup>+</sup> cells expressing a given cytokine. n=3 mice per cytokine, mean  $\pm$  s.e.m.





**Figure 4: CpG-pre-pDC cell therapy shapes host infiltrating CD4<sup>+</sup> T cell response. (a)** Frequency of infiltrating total CD4<sup>+</sup> effector T cells and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the spinal cord of control (plain bar) and CpG-pre-pDCs-treated (open bar) mice. Statistical analysis was performed using two way ANOVA; n=5, \**P*<0.05. **(b, c)** Pro-inflammatory **(b)** and anti-inflammatory **(c)** cytokine expression by spinal cord infiltrating CD4<sup>+</sup> T cells. Staining was performed after 4h PMA/ionomycin stimulation in the presence of Brefeldin A. Left: representative panel of each cytokine production in control untreated mice (upper panel) mice and CpG-pre-pDC treated mice (lower panel). Right: Bar histogram represents data from two cumulated experiments. n=5-8 mice per group, statistical analysis was performed using two-way ANOVA \**P*<0.05, \*\**P*<0.005, \*\*\**P*<0.001.



**Figure 5: Cytokine dependency of CpG-pre-pDC mediated protection against EAE. (a)** CpG-pre-pDCs were transfected with neutralizing anti-LAP antibody or control isotype antibody using a protein transfection vector. 80,000 of resulting cells were injected i.v to MOG<sub>35-55</sub> immunized mice at d12 after immunization. Clinical score (mean + SEM) was assessed until d30, n=5 mice per group. **(b)** CpG-pre-pDCs were isolated from the BM culture of either WT or IL-27<sup>-/-</sup> mice in presence of 1 $\mu$ g/ml<sup>-1</sup> CpG-B. 80,000 of one or the other phenotype were injected i.v into EAE immunized mice at d12. Clinical score was assessed until d45. n=7 for the IL-27<sup>-/-</sup> CpG-pre-pDCs treated group, n=8 for the WT CpG-pre-pDCs treated group, n=14 for the control group. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA with Bonferroni post-test. \**P*<0.05, \*\*\**P*<0.001.

## DISCUSSION

CpG-activated pDC precursors represent a powerful regulatory cell population that provides protection against EAE disease at remarkably low cell counts, compared to most mature cell types so far tested against EAE. Contrary to Tregs that tend to lose their suppressive properties in an inflammatory environment<sup>7</sup>, CpG-pre-pDCs are equally protective at all disease stages, i.e. initiation, onset of clinical signs and at peak of disease, therefore displaying a promising therapeutic potential, highly desirable for a robust cell therapy.

The susceptibility of CpG-pre-pDCs to adopt regulatory functions selectively upon either in vivo or in vitro stimulation with CpG-B differs from the report that CpG-B was instead unable to confer protective properties against EAE onto mature pDCs<sup>14</sup> for which loading with antigen was instead required to acquire therapeutic properties. CpG-pre-pDCs have low MHCII and co-stimulatory molecules expression at the time of injection. Six days after injection, they have essentially migrated to the inflammatory spinal cord, but nearly not to any other tissue, a feature they share with reported myelin antigen-loaded pDCs<sup>14</sup>. In the spinal cord, they displayed a more mature phenotype, as they have differentiated into c-kit<sup>-</sup> pDCs with clearly enhanced levels of MHCII and CD86. Notably, the functionally immature state of pDCs does not per se lead to a pro-tolerance profile as the injection of such immature pDCs in vivo was reportedly unable to induce antigen-specific tolerance<sup>26</sup>. Therefore, both the precursor stage of CpG-pre-pDCs and their activation by CpG are crucial for developing into a tolerogenic cell population in vivo within the inflamed spinal cord.

T-cell infiltration in the spinal cord of CpG-pre-pDC recipients was only slightly modulated, with CNS infiltrated T cells reduced by 20% for CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> T-cells and the proportions of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs moderately enhanced (from 17.3% to 21.2%). Notably, all additional spinal cord Tregs that were found in the spinal cord of CpG-pre-pDC recipients expressed Nrp1 only at low level (not shown) and were therefore iTregs<sup>27</sup>. Instead, CpG-pre-pDC transfer induced drastic changes in the recipient's T-cell cytokine profile within the spinal cord, with a profound reduction of their production of a various neuroinflammatory cytokines and their switch to an anti-inflammatory profile characterized by the massive production of TGF- $\beta$  and IL-27. This suggests that CpG-pre-pDCs promote effector T-cell conversion into regulatory Th3 cells. Indeed, we can exclude that the CD4<sup>+</sup> T-cells producing TGF- $\beta$  are Foxp3<sup>+</sup> Tregs since the TGF- $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-cells represent 70% of spinal cord infiltrating CD4<sup>+</sup> T-cells among which only 2-3% express Foxp3. Such T-cell cytokine profile conversion results from the same dominant TGF- $\beta$  and IL-27 cytokine pattern that the CpG-pre-pDC progeny displays upon arrival into the inflamed spinal cord. This mechanism, including migration of precursors –that do not produce TGF- $\beta$  or IL-27 - to the spinal cord, differentiation into TGF- $\beta$  and IL-27 producing pDCs in the inflammatory environment of the spinal cord in mice with EAE and induction of the T-cell production of the same two major anti-inflammatory cytokines may account for the approximate lag time of 3 days after adoptive transfer of CpG-pre-pDCs required before protection from EAE is clinically observed in recipients. Each one of these regulatory cytokines plays a functional role, with TGF- $\beta$  being

required as soon as CpG-pre-pDCs are transferred whereas IL-27, a member of the IL-12 family<sup>28</sup>, appears to play a non-redundant key role in the late events taking place 10 days after the transfer. This sequential action of TGF- $\beta$  and IL-27 is in keeping with the capacity of TGF- $\beta$  to induce IL-27 in pDCs<sup>29</sup>. Highest expression of IL-27 and its receptor have been found at the effector phases of EAE, disease peak, and relapse<sup>30</sup> and Th17 effector cells are particularly sensitive to suppression by IL-27 that inhibits ROR $\gamma$ t expression<sup>31</sup>. Moreover, IL-27 reduces GM-CSF production in vivo<sup>32</sup> thereby limiting neuroinflammation.

Although TGF- $\beta$  was enhanced in both T-cells and the CpG-pre-pDC progeny in the spinal cord, which could result in enhanced Th17 differentiation, the concomitant reduction of IL-6 resulted instead in the significant reduction of Th17 differentiation. The tolerogenic role of TGF- $\beta$  producing pDCs has been reported in various immune settings, including autoimmune diseases as well as tumor defense. TGF- $\beta$  production, induced by GM-CSF and TNF- $\alpha$  released by tumors, is a recognized feature of intra-tumoral pDCs that promote tumor escape<sup>33</sup>. In T1D, viral infection triggered the production of TGF- $\beta$  by pancreatic pDCs via activation of NKT cells<sup>34</sup> involving both IL-10 and PDL-1, resulting in lower T1D incidence.

Although both TGF- $\beta$  and IL-27 have the capacity to act directly on effector T-cells, the possibility remains that the CpG-pre-pDC progeny may promote, or interact with, other cellular partners to enforce tolerance in the inflamed spinal cord. Notably, CpG-pre-pDCs, unlike mature pDCs<sup>14</sup>, did not recruit endogenous regulatory pDCs into the spinal cord. In view of our present data, the interesting possibility that the reported endogenous pDC recruitment observed by Duraes et al.<sup>14</sup>, that was essential in the protective effect of myelin-Ag exposed pDCs, reflected a wave of newly generated pDC precursors in the BM deserves to be considered. Additionally, whether in CpG-prep-DC recipients, CNS myeloid DCs may be impacted and no longer activate Teff remains to be investigated. Moreover, whether pDC-induced IL-10 producing Bregs<sup>35</sup> and Tr1<sup>36</sup> may contribute to the protection against EAE at a later time, will be worth investigating.

Altogether, data herein presented suggest that early CpG activation of pDC precursors within the BM generates uniquely powerful regulatory cells effective at all phases of EAE. They now extend to the pDC lineage previous demonstrations in the monocyte and the B-cell lineages<sup>4, 5, 6</sup> that innate stimuli prime BM hematopoietic progenitors into a tolerogenic profile that remains imprinted upon maturation into the corresponding lineage. Whether equivalent therapeutic human pDC precursors can be produced and contribute to protect against MS, either on their own or in the context of autologous HSCT, might be worth investigating.

## Material and Methods

**Mice.** WT CD45.2<sup>+</sup> C57Bl6J mice were obtained from Janvier Laboratories (Le Genest Saint Isle, France) and housed in our animal facility for at least 2 weeks before EAE induction. Congenic CD45.1<sup>+</sup>, MyD88<sup>-/-</sup> C57Bl6J, all backcrossed for at least ten generations, were bred in our accredited animal facility at Institut Necker Enfants Malades under pathogen-free conditions. IL-27-knock-out C57Bl6J mice were raised at the Medical College of Wisconsin Cancer Center facility. Female 10-week-old C57Bl/6J mice were used as a model for MOG<sub>35-55</sub>-induced EAE and received intravenous progenitor cell transfers at various times after immunization.

**EAE induction.** Active EAE was induced in 12-wk-old female mice by s.c. immunization at two sites, upper and lower back, with 200 µg MOG<sub>35-55</sub> peptide emulsified in CFA containing 400 µg heat-killed Mycobacteria tuberculosis H37Ra (Hooke Laboratories, Lawrence, MA) on day 0. In addition, mice received 200 ng pertussis toxin (Hooke Laboratories) i.p. in 0.1 ml per mouse on days 0 and 1. Clinical signs of EAE were assessed daily on a 0 to 5 scale defined as follows: 0, no obvious changes in motor function compared to non-immunized mice; 0.5, tip of tail is limp; 1, limp tail; 1.5, limp tail and unstable gait; 2, limp tail and hind leg inhibition; 2.5, limp tail and dragging of hind legs; 3, limp tail and complete paralysis of hind legs or paralysis of one front and one hind leg; 3.5, limp tail and complete paralysis of hind legs that are together on one side of body; 4, limp tail, complete hind leg and partial front leg paralysis; mouse is still minimally moving and appears feeding; 4.5, complete hind leg and partial front leg paralysis; no movement around the cage, mouse is not alert; 5, death or severe paralysis. Mice with score  $\geq 4$  for two consecutive days and mice with score 5 were euthanized.

**Sorting of TLR-activated bone marrow progenitors.** Bone marrow cells removed from tibiae, femurs and hips of 8- to 12-wk-old C57Bl/6J mice were incubated in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 10% (vol/vol) FCS and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) for 18 h with 1 µg/mL of the oligodeoxynucleotides CpG 1585 (CpG-A) (InvivoGen, Toulouse, France), CpG 1668 (CpG-B) (Eurogentec, Angers, France) or with the respective agonists of TLR1-9, supplied in a commercial kit (InvivoGen), including: Pam3CSK4 (0.5 µg/ml), FSLI (1 µg/ml), HKLM ( $2 \times 10^6$  cells/ml), Poly I:C (HMW) (5 µg/ml), Poly I:C (LMW) (5 µg/ml), LPS-EK standard (1 µg/ml), FLA-ST standard (1 µg/ml), and ssRNA40/LyoVec (2 µg/ml) as well as CpG 1826 (CpG-B) (1 µg/ml). c-kit<sup>+</sup> bone marrow cells were sorted by immuno-magnetic separation using a RoboSep automaton (StemCell Technologies, Grenoble, France). Sorted cells were further stained with appropriate fluorochrome-conjugated mAbs against Sca-1, B220 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), PDCA-1 (eBioscience, Paris, France) and electronically sorted as a c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup> cell subset using a FACS-Aria IIIu (BD Biosciences).

**Isolation of immune cells from the spinal cord.** Spinal cords isolated from control and CpG-pre-pDC-recipient mice were passed through a cell strainer, using the back side of a syringe plunger to smash the tissue. Cells were then resuspended in 3-5 ml of 30% Percoll underlaid with the same volume of 70% Percoll (in PBS) and centrifuged for 20 min at 1300g (2800 rpm) without brakes to form a smooth interface. Cells were collected with a Pasteur pipette and diluted 10 times with complete medium RPMI 10% SVF. After centrifugation cells were resuspended in 2-3 ml of complete medium and further stained with appropriately labeled mAbs.

**Staining of cells for flow cytometry analysis.** To block nonspecific Fc receptor binding, cells were pre-incubated for 10 min at room temperature with FcR blocker 2.4G2 mAb. Cells were then stained with appropriately labeled mAbs against CD4, B220, PDCA-1, CD8, CD86, CD115, CX3CR1, Siglec-H, MHC-II (eBioscience), CD19, CD127, IgM, CD11b, CD11c, c-Kit (CD117), Sca-1 (anti-Ly6A/E), Gr-1, CD45.1, CD45.2 (BD Biosciences). Nuclear Foxp3 expression was measured by FACS analysis as per the manufacturer's instructions (eBioscience). Nuclear factor expression of E2-2 and PU-1 were measured by Quantigene FlowRNA (Affymetrix, ThermoFisher Scientific, Montigny-le-Bretonneux, France) as per the manufacturer's instructions

**Cytokine assays.** Intra-cytoplasmic expression of cytokines by cells recovered from the spinal cord was assessed after a 4-h stimulation with PMA (10 ng/ml) plus ionomycin (500 ng/ml) in the presence of Brefeldin A (2 mg/ml), followed by fixation/permeabilization with PFA/saponin and subsequent staining with specific antibodies including PE-labeled anti-TGF- $\beta$ , PE-labeled anti-IL-27p28, PE-labeled GM-CSF, APC-labeled anti-IL12p40 (eBioscience), APC-labeled IL-21 (R&D, Abingdon, UK), APC-labeled anti-IL-10, PE-labeled anti-IFN- $\gamma$ , APC-labeled anti-IL-17 (BD bioscience), FITC-labeled IL-6 (Biolegend, London, UK) or isotype controls (from BD Biosciences and eBioscience). Membrane and intracellular antigen expression was analyzed in a FACS Canto II cytometer (BD Biosciences) using FlowJo software (Treestar, Ashland, OR).

Cytokine production by CpG-prepDCs was measured in supernatant after 4h-activation of the precursors with PMA + ionomycin by multiplex ELISA using Flow Cytomix analyte detection reagents from eBioscience.

**TGF- $\beta$  neutralization with Chariot vector.** 0.1mg Chariot (Active Motif, La Hupe, Belgium) was combined with 50  $\mu$ g of either LEAF purified anti-LAP neutralizing antibody or IgG1 isotype control (Biolegend) according to the manufacturer's instructions. Electronically sorted CpG-pre-pDCs were incubated with the Chariot construct for 20 minutes and thoroughly rinsed in PBS alone. Transfected cells were then injected intravenously in PBS, 2% SVF.

**Study approval.** All experiments were conducted under an animal study proposal approved by the Paris Descartes Ethical Committee for Animal Experimentation and the French Ministry of Research and Higher Education.

**Statistics.** Disease curves and cytokine production were analyzed using two-way ANOVA test, with Bonferroni post-test for clinical scores. Cell proportions were analyzed using one way ANOVA with Bonferroni multiple post-test.

**Data availability.** All relevant data are available from the authors.

## References

1. Nagai, Y. *et al.* Toll-like Receptors on Hematopoietic Progenitor Cells Stimulate Innate Immune System Replenishment. *Immunity* **24**, 801-812 (2006).
2. Massberg, S. *et al.* Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell* **131**, 994-1008 (2007).
3. Kared, H. *et al.* Jagged2-Expressing Hematopoietic Progenitors Promote Regulatory T Cell Expansion in the Periphery through Notch Signaling. *Immunity* **25**, 823-834 (2006).
4. Askenase, M.H. *et al.* Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity* **42**, 1130-1142 (2015).
5. Montandon, R. *et al.* Innate pro-B-cell progenitors protect against type 1 diabetes by regulating autoimmune effector T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E2199-2208 (2013).
6. Korniotis, S. *et al.* Treatment of ongoing autoimmune encephalomyelitis with activated B-cell progenitors maturing into regulatory B cells. *Nat Commun* **7**, 12134 (2016).
7. Bailey-Bucktrout, S.L. *et al.* Self-antigen-driven activation induces instability of regulatory T cells during an inflammatory autoimmune response. *Immunity* **39**, 949-962 (2013).
8. Pashenkov, M. *et al.* Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* **124**, 480-492 (2001).
9. Stasiolek, M. *et al.* Impaired maturation and altered regulatory function of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis. *Brain* **129**, 1293-1305 (2006).
10. Bailey-Bucktrout, S.L. *et al.* Cutting edge: central nervous system plasmacytoid dendritic cells regulate the severity of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **180**, 6457-6461 (2008).
11. Ioannou, M., Alissafi, T., Boon, L., Boumpas, D. & Verginis, P. In vivo ablation of plasmacytoid dendritic cells inhibits autoimmunity through expansion of myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol.* **190**, 2631-2640 (2013).
12. Isaksson, M. *et al.* Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2925-2935 (2009).

13. Irla, M. *et al.* MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. *J. Exp. Med.* **207**, 1891-1905 (2010).
14. Duraes, F.V. *et al.* pDC therapy induces recovery from EAE by recruiting endogenous pDC to sites of CNS inflammation. *J. Autoimmun.* **67**, 8-18 (2016).
15. Naik, S.H. *et al.* Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* **8**, 1217-1226 (2007).
16. Manz, M.G. Plasmacytoid dendritic cells: origin matters. *Nature Immunology* **19**, 652-654 (2018).
17. Rodrigues, P.F. *et al.* Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nature Immunology* **19**, 711-722 (2018).
18. Cisse, B. *et al.* Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* **135**, 37-48 (2008).
19. Schotte, R. *et al.* The transcription factor Spi-B is expressed in plasmacytoid DC precursors and inhibits T-, B-, and NK-cell development. *Blood* **101**, 1015-1023 (2003).
20. Back, J., Allman, D., Chan, S. & Kastner, P. Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp. Hematol.* **33**, 395-402 (2005).
21. Banovic, T. *et al.* Graft-versus-host disease prevents the maturation of plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* **182**, 912-920 (2009).
22. Peranzoni, E. *et al.* Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 238-244 (2010).
23. Martin-Martin, L. *et al.* Immunophenotypic, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow. *Transfusion (Paris)*. **49**, 1692-1708 (2009).
24. Niederquell, M. *et al.* Sca-1 expression defines developmental stages of mouse pDCs that show functional heterogeneity in the endosomal but not lysosomal TLR9 response. *Eur. J. Immunol.* **43**, 2993-3005 (2013).
25. Layseca-Espinosa, E. *et al.* CCL22-producing CD8 $\alpha$ - myeloid dendritic cells mediate regulatory T cell recruitment in response to G-CSF treatment. *J. Immunol.* **191**, 2266-2272 (2013).
26. Salio, M., Palmowski, M.J., Atzberger, A., Hermans, I.F. & Cerundolo, V. CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *J. Exp. Med.* **199**, 567-579 (2004).
27. Yadav, M. *et al.* Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* **209**, 1713-1722, S1711-1719 (2012).



28. Hunter, C.A. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 521-531 (2005).
29. Pallotta, M.T. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol* **12**, 870-878 (2011).
30. Fitzgerald, D.C. *et al.* Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **179**, 3268-3275 (2007).
31. Diveu, C. *et al.* IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J. Immunol.* **182**, 5748-5756 (2009).
32. Casella, G. *et al.* IL-27, but not IL-35, inhibits neuroinflammation through modulating GM-CSF expression. *Sci Rep* **7**, 16547 (2017).
33. Saas, P. & Perruche, S. Functions of TGF-beta-exposed plasmacytoid dendritic cells. *Crit. Rev. Immunol.* **32**, 529-553 (2012).
34. Diana, J. *et al.* Viral infection prevents diabetes by inducing regulatory T cells through NKT cell-plasmacytoid dendritic cell interplay. *J. Exp. Med.* **208**, 729-745 (2011).
35. Menon, M., Blair, P.A., Isenberg, D.A. & Mauri, C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity* **44**, 683-697 (2016).
36. Ito, T. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.* **204**, 105-115 (2007).

## Acknowledgements

This work was supported by a grant to FZ from Fondation pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques (ARSEP) and from The Secular Society (TSS). HL was supported by a PhD fellowship from Région Ile de France, Domaine d'Intérêt Majeur Ile de France Biothérapies, and by a subsequent fellowship from Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC). VA is supported by a doctoral fellowship from TSS.

## Author contributions

HL and FZ performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript. SK and VA performed experiments, analyzed results and discussed the manuscript. WRD provided IL-27 KO mice, discussed the results and provided critical review of the manuscript.

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES PARTIE 1

---

Dans ce travail nous avons mis en évidence la possibilité de faire émerger une population de cellules au sein de la moelle osseuse totale traitée avec des agonistes TLR et principalement TLR9, par le biais de la voie MyD88. Leur phénotype  $c\text{-Kit}^+\text{Sca-1}^+\text{B220}^{\text{int}}\text{PDCA-1}^+\text{IgM}^-\text{CD11c}^{\text{lo}}\text{Siglec-H}^+$ , leur morphologie et la double expression de PU.1 et E2.2 nous permet de postuler que les cellules d'intérêt sont dans la voie de différenciation des pDC. Par ailleurs, la possibilité de les différencier *in vitro* en cellules plus matures nous permet de les définir comme des précurseurs. Nous avons décidé de nommer ces cellules CpG-pre-pDC.

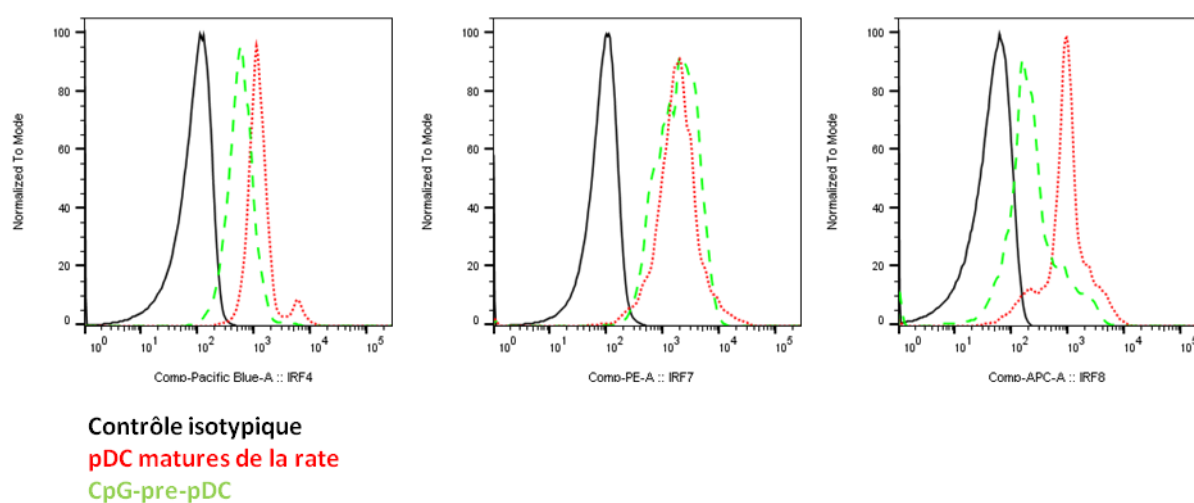
La confirmation définitive du lignage de ces cellules pourrait être obtenue en combinant plusieurs types d'étude des mRNA présents dans le précurseur. De nombreux profils de gènes ont déjà été publiés pour les cDC et les pDC matures y compris en comparant les deux types l'un à l'autre (Edwards et al., 2003; Shigematsu et al., 2004). Par ailleurs, des travaux récents ont également publié des profils de pDCs murines matures respectivement activées avec du CpG-P ou du pRNA mais également avec un agoniste du TLR7 ou TLR7/8 (Birmachu et al., 2007; Mathan et al., 2017). Du fait qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de profil transcriptionnel publié pour les pDC immatures, à fortiori activés avec un agoniste du TLR9, il sera nécessaire de les comparer à des pre-pDCs issues de la moelle osseuse sans activation CpG. Dans la mesure où les pDC peuvent émerger à la fois d'un précurseur lymphoïde et myéloïde, il sera nécessaire d'associer à la comparaison transcriptionnelle à la fois le profil du CDP (Miller et al., 2012) et du CLP (Ghaedi et al., 2016). Si lors de sa différenciation *in vitro* et *in vivo*, la population des CpG-pre-pDC est assez homogène, certains de leurs marqueurs présentent des niveaux d'expression variables. C'est le cas du CD11b *in vitro* et de B220 *in vivo* ce qui souligne la possibilité que la population soit légèrement hétérogène, ce qui a été néanmoins invalidé par l'étude Tsne de la population électriquement triée. Il est donc possible que les CpG-pre-pDC aient la possibilité de donner plusieurs descendance dont la composante largement majoritaire est de type pDC et dont une partie serait autre. Ceci pourra également être éclairci à l'aide du profil transcriptionnel de la population. Du fait de la quantité de cellules requises pour procéder à une analyse des mARN en bulk, il ne paraît pas possible d'utiliser cette technique, en particulier pour l'analyse de la descendance qui pourra être triée à partir de la moelle épinière. Nous devons donc avoir recours à l'analyse single cell des différentes populations, ce qui pourra donner un éclairage nouveau sur cette population, en particulier si l'incapacité de produire de l'IFN $\alpha$  est une « compétence » de la population ou s'il s'agit davantage d'une réelle sous-population de précurseurs de pDC distincte des précurseurs classiques. Enfin, l'utilisation d'un array relativement large pourrait permettre d'isoler une signature transcriptionnelle associée au phénotype tolérogène des cellules.

De façon intéressante, l'utilisation d'un éventail large d'agonistes TLR a démontré qu'il était possible de faire émerger la population des CpG-pre-pDCs par le biais du TLR4. À l'état basal les pDC naïves

n'expriment pas le TLR4 et ne peuvent le surexprimer que très modérément après une activation par le LPS (Zheng et al., 2012). Par ailleurs, les pDC expriment assez fortement le TLR7 qui semble ici assez peu capable de faire émerger la population (Bao and Liu, 2013). Il est donc possible que l'effet des agonistes des TLR ne soit pas direct sur les pDC mais requiert l'implication d'une cellule tierce présente dans la moelle osseuse. Une expérience de déplétion parallèle de chacune des populations présentes dans la moelle osseuse nous a permis de mettre en évidence que la perte de la population CD11b<sup>+</sup> limite très fortement l'émergence des CpG-pre-pDC. Dans la mesure où les CpG-pre-pDC ne sont pas CD11b<sup>+</sup>, il semblerait donc envisageable qu'une population de type myéloïde puisse être nécessaire à l'émergence de la population d'intérêt. Plusieurs candidats sont possibles à cette étape : les macrophages, les monocytes, certains NK, les neutrophiles ou encore une sous classe de cellules dendritiques présentes dans la moelle osseuse par ailleurs connue pour ses capacités tolérogènes (Li et al., 2008). Si l'émergence des CpG-pre-pDC est effectivement dépendante d'une autre population, il serait également intéressant de déterminer si cet effet dépend de contact cellulaire ou de facteurs solubles. Afin de répondre à cette question, deux types de démarche sont possibles : soit utiliser un système transwell, soit utiliser un milieu conditionné par une culture de moelle osseuse totale en présence de CpG sur les précurseurs des CpG-pre-pDC. Actuellement, nous ne savons pas si le précurseur direct des CpG-pre-pDC est lui-même engagé dans la voie pDC ou s'il s'agit d'un précurseur encore plus immature qui se voit orienté dans ce destin cellulaire par la présence de CpG. De façon intéressante, il reste possible que le précurseur en amont des CpG-pre-pDC soit par exemple de type myéloïde et exprime CD115 et CD11b. Sous l'action de l'agoniste du TLR9, ce précurseur se différencierait en CpG-pre-pDC d'intérêt. Ceci pourrait également expliquer que la suppression de la population CD11b<sup>+</sup> empêche l'émergence des CpG-pre-pDC. Il est en effet connu que les conditions inflammatoires sont capables de fortement diminuer l'expression de CD11b à la membrane des cellules (Fernández-Calotti et al.; Thylén et al., 2000). Une telle origine pourrait expliquer la présence de cette intégrine dans la descendance retrouvée au niveau du CNS des animaux. Néanmoins, l'expression de CD115 par les CpG-pre-pDC peut suggérer qu'elles dérivent du CDP, lui-même CD115<sup>+</sup>. Par ailleurs, dans la mesure où les pDC sont elles mêmes TLR9<sup>+</sup>, il est tout de même possible qu'au moins une partie de l'effet du CpG soit direct sur ces cellules et soit synchrone de l'effet sur une cellule tierce.

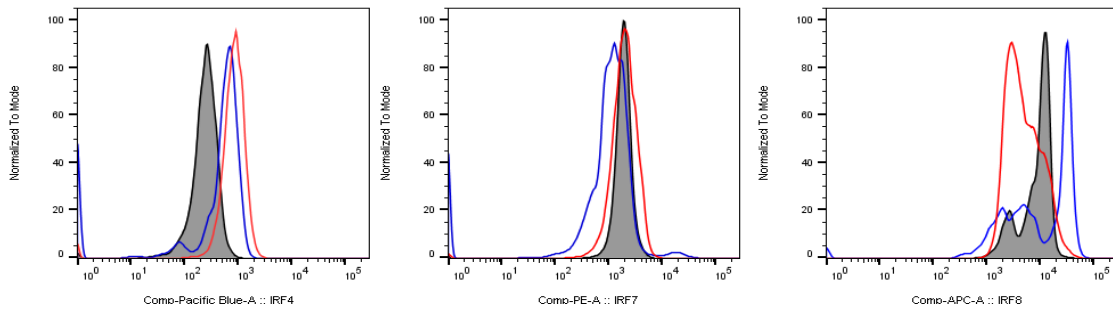
Si le profil sécrétoire global des CpG-pre-pDCs correspond bien à une identité pDC (IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL-6<sup>+</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup>), il est notable que les précurseurs d'intérêt ne produisent pas d'IFN $\alpha$ . Nous avons décrit dans l'introduction de cette thèse et dans l'article que les pDC peuvent ne pas produire d'IFN $\alpha$  pour plusieurs raisons : soit par épuisement en raison d'une stimulation TLR trop intense, soit simplement du fait que les CpG-pre-pDC sont encore immatures. Il est en effet connu que la population Sca-1<sup>+</sup> des précurseurs de pDC n'est pas en mesure de produire cette cytokine (Niederquell et al., 2013). Il est cependant intéressant de noter que la population différenciée in vitro perd l'expression de Sca-1 mais ne retrouve que très partiellement la capacité à produire

de l'IFN $\alpha$  (1/10<sup>o</sup> de la production des pDC spléniques), ce qui favorise donc plutôt la thèse de l'épuisement. Nous avons débuté l'investigation de l'origine de cette incapacité fonctionnelle des CpG-pre-pDC par le biais de l'étude des IRF. Plusieurs de ces facteurs de transcription contrôlent la production d'IFN de type I, en particulier IRF3, 7 et 8 qui sont associés à son expression, là où IRF4 est en revanche associé à la production d'IFN $\gamma$  I (Mahnke et al., 2016). Ces facteurs de transcription fonctionnent en opposition et la bonne expression des uns requiert l'extinction des autres (Piya et al., 2011). Nous avons donc testé l'expression de ces différents facteurs de transcription chez les précurseurs en comparaison avec les pDC de la rate. Il apparaît que, si le niveau d'IRF7 est comparable entre les CpG-pre-pDC et les pDC matures de la rate, les précurseurs d'intérêt ont un niveau d'IRF8 et d'IRF4 diminué par rapport à leur équivalent splénique (figure supplémentaire 1).



**Figure supplémentaire 1** : Niveaux d'IRF4, 7 et 8 des CpG-pre-pDC (vert) issus de 18h de culture avec du CpG comparés aux niveaux de la population des pDC matures de la rate (rouge). Le niveau négatif pour chacun des marquages est défini à l'aide d'un isotype (noir)

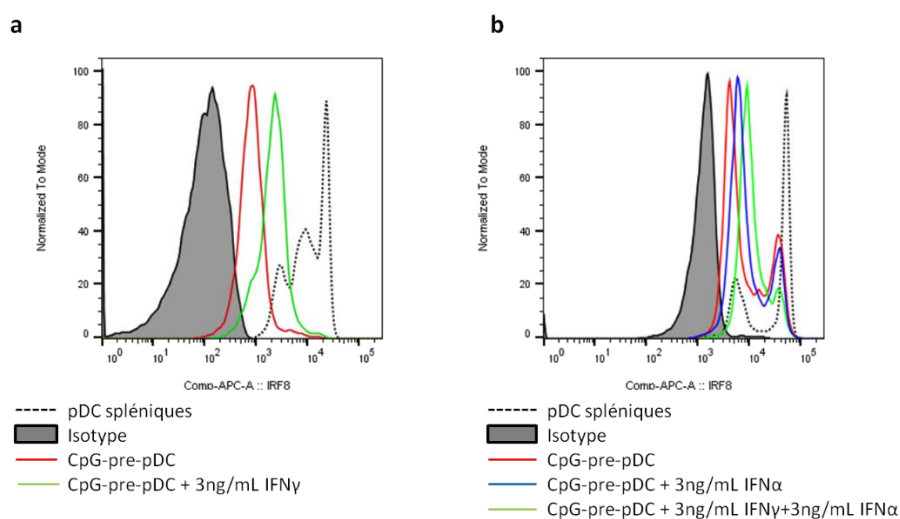
Ce niveau très faible d'IRF8 est atypique pour les pDC. Si ce facteur est associé à la différenciation des cellules dendritiques plasmacytoïdes, il n'est cependant requis que pour leur fonction de production d'IFN de type I (Sichien et al., 2016). À ce stade au moins deux explications sont possibles : soit cette diminution de l'expression des IRF est une propriété des cellules immatures de la moelle osseuse, soit c'est effectivement lié à la présence de CpG dans la culture de moelle osseuse totale. Afin de s'affranchir de « l'effet culture », un même échantillon de moelle osseuse a été divisé en deux et cultivé pendant 18h en présence ou en l'absence de CpG. Les niveaux des différents IRF des populations résultantes sont ensuite comparés aux pDC matures de la moelle osseuse (figure supplémentaire 2)



pDC matures spléniques  
 Culture sans CpG  
 Culture avec CpG

**Figure supplémentaire 2 :** Niveaux d'IRF4, 7 et 8 des cellules c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup> issus de 18h de culture soit en présence de 1µg/mL de CpG (rouge) soit sans CpG (bleu). Les niveaux des différents facteurs de transcription sont comparés à ceux de la population des pDC matures de la rate (noir).

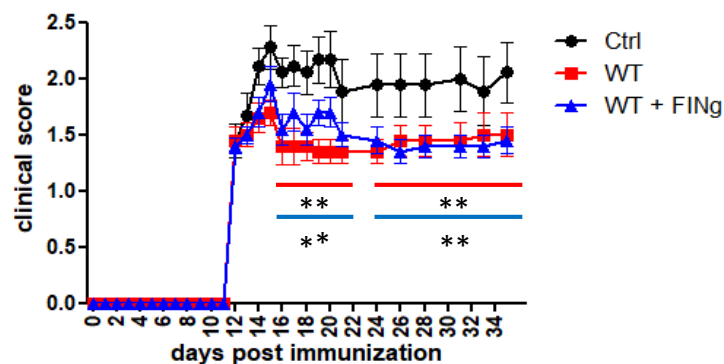
L'ajout de CpG ne semble pas faire varier le niveau d'expression d'IRF7, ce qui est en accord avec la bibliographie, IRF7 régissant la production d'IFN de type I de façon indépendante des TLR. De la même manière la présence ou non de CpG ne semble pas faire varier le niveau d'IRF4 dans les pre-pDC de la moelle osseuse qui semblent constitutivement plus positives pour ce facteur de transcription que les pDC matures spléniques. En revanche sans CpG, le niveau d'IRF8 des pre-pDC de phénotype similaire aux CpG-pre-pDC est plus haut encore que dans la rate et c'est bien l'ajout de CpG qui fait diminuer ce facteur. Afin d'étudier l'implication de ce facteur dans les capacités protectrices de la population des CpG-pre-pDC, nous avons entrepris d'augmenter leur niveau d'IRF8. Du fait du rétrocontrôle des IFN sur leur propre synthèse, nous avons donc traité les cellules pendant les 18h de culture CpG soit avec 3ng/mL d'IFN $\gamma$  seul, soit avec 3ng/mL d'IFN $\alpha$  seul, soit avec une combinaison des deux, chacun à 3ng/mL (figure supplémentaire 3).



**Figure supplémentaire 3 :** modification des niveaux d'IRF8 avec différents traitements. **a :** effet de l'IFN $\gamma$  pendant la culture CpG-pre-pDC. Isotype (noir), CpG-pre-pDC issus de la culture avec du CpG seul pendant 18h (rouge), CpG-pre-pDC issus de la culture avec du CpG et 3ng/mL d'IFN $\gamma$  pendant les 18h de culture (vert), pDC matures issues de la rate (noir pointillé). **b :** effet de l'IFN $\alpha$  ou de la combinaison de l'IFN $\alpha$  et IFN $\gamma$  sur les CpG-pre-pDC pendant les 18h de culture avec le CpG. Noir plein : isotype, rouge : CpG-pre-pDC issus de la culture avec du CpG seul pendant 18h, bleu : CpG-pre-pDC issus de la culture avec du CpG et 3ng/mL d'IFN $\alpha$  pendant les 18h de culture, vert : CpG-pre-pDC issus de la culture avec du CpG, 3ng/mL d'IFN $\gamma$  et 3ng/mL d'IFN $\alpha$  pendant les 18h de culture, noir pointillé : pDC matures issues de la rate.

Il est intéressant de noter que pour chacun des interférons utilisés, quatre doses ont été testées : 3ng/mL, 6ng/mL, 9ng/mL et 12ng/mL, l'augmentation relative du niveau d'expression d'IRF8 n'est pas sensible à la dose, son augmentation semblant donc plutôt de type on/off plutôt que dose/réponse (résultats non présentés). Il semble ainsi que l'IFN $\gamma$  soit le seul capable d'augmenter le niveau d'IRF8 de façon significative même si l'expression d'IRF8 résultante reste assez faible en comparaison avec les pDC matures de la rate. L'IFN $\alpha$  augmente beaucoup plus faiblement l'expression d'IRF8 et l'ajout d'IFN $\gamma$  n'a que peu d'effet s'il est combiné à l'IFN $\alpha$ . Les niveaux d'IRF4 et IRF7 sont restés inchangés suite à ces traitements (résultats non présentés).

Nous avons testé les capacités protectrices des CpG-pre-pDC prétraitées à l'IFN $\gamma$  injectés au jour 12 après l'immunisation de souris pour l'EAE (figure supplémentaire 4).



**Figure supplémentaire 4 :** Comparaison de la protection des CpG-pre-pDC avec 3ng/mL IFN $\gamma$  (bleu) ou sans pendant la culture CpG (rouge) avec les animaux contrôles n'ayant pas reçus les précurseurs d'intérêt (noir). n=10 souris par groupe, Analyse statistique réalisée à l'aide d'un ANOVA à deux voies. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Si avec et sans le traitement, les CpG-pre-pDC sont capables de protéger des animaux de l'EAE, il semble néanmoins que pendant environ les 7 jours qui suivent leur injection, les cellules traitées à l'IFN $\gamma$  sont moins efficaces que leur équivalent natif. De façon intéressante, cette protection rejoint exactement celle des cellules non traitées après cette période ce qui démontre une résistance du phénotype régulateur. Nous ne savons en revanche pas si le retour à la protection est une propriété intrinsèque des CpG-pre-pDC ou si elle est liée à l'environnement inflammatoire. Par ailleurs, il est également possible que les propriétés protectrices des cellules restent bonnes mais que leur adressage au système nerveux central fasse défaut par diminution de leur expression membranaire de CD11b, CCR9 ou de la chémérine par exemple. Pour confirmer si le faible niveau d'IRF8 et d'IFN $\alpha$  peut être effectivement associé aux propriétés régulatrices des CpG-pre-pDC, il faudrait probablement restaurer plus complètement le niveau d'IRF8 afin de savoir si la protection est intégralement perdue, voire si les CpG-pre-pDC deviennent pathogènes.

Il a été démontré dans la littérature que l'épuisement fonctionnel des pDC matures semble induire la perte de capacités protectrices de ces cellules (Strasiulek et al., 2006). Toutefois, dans le cas de cellules encore immatures, il est parfaitement possible qu'un phénotype fonctionnellement épuisé, à fortiori sur un

aspect bien précis qui est la production d'IFN de type I, soit bénéfique. En particulier, dans le cas des pDC matures, cette protection semble liée à leurs molécules de co-stimulation et à leur capacité à présenter l'antigène. Dans le cas des CpG-pre-pDC, les précurseurs ne possèdent que des niveaux très faibles de molécules de co-stimulation et de CMH-II. Il semble donc que les mécanismes de protection décrits entre les pDC matures issues du LCR des patients et les CpG-pre-pDC soient différents. Dans ce cas, un phénotype épuisé peut donc se traduire par un effet différent, voire opposé sur leurs capacités protectrices. Par ailleurs, il est connu que si l'IFN $\beta$  est à un rôle positif pour la régulation de la SEP, le rôle de l'IFN $\alpha$  est beaucoup plus nuancé. Dans notre étude, nous n'avons toujours mesuré que la production d'IFN $\alpha$  et il n'est pas impossible que les CpG-pre-pDC soient toujours capables de produire de l'IFN $\beta$ , ce qui est à vérifier. Si tel est le cas, alors il n'est pas anormal que la perte de la production d'IFN $\alpha$  par les CpG-pre-pDC soit liée à un phénotype protecteur.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que les CpG-pre-pDC ne produisent ni IL-27 ni TGF $\beta$  à la sortie de la culture (figure 1, e ; non présenté pour le TGF $\beta$ ) mais que la descendance en est en revanche capable, ce qui démontre l'acquisition d'un phénotype régulateur par le biais de l'environnement inflammatoire de l'animal.

De façon intéressante, les CpG-pre-pDC sont capables de protéger à toutes les phases de la maladie avec une seule injection de seulement 80 000 précurseurs. La régulation de l'EAE par le transfert de T régulateurs spécifiques de MOG requiert bien souvent que la greffe des cellules ait lieu avant ou juste après l'immunisation, ce qui d'un point de vue applications thérapeutiques futures à l'Homme paraît difficilement faisable (Stephens et al., 2009; Tischner et al., 2006). En effet, du fait de la relative rareté de la sclérose en plaque et que le nombre et la modalité des antigènes impliqués est grande, il paraît impossible de générer pour chaque individu un panel étendu et conséquent de Tregs afin de prévenir la survenue de la maladie. Il paraît donc beaucoup plus intéressant de pouvoir non pas prévenir mais traiter la SEP une fois les symptômes présents. Plusieurs études se sont intéressées à l'étude du potentiel curatif des Tregs dans le cadre de l'EAE mais davantage par induction de la division in vivo, rarement par transfert direct (Ephrem et al., 2008b). L'étude menée par Fernanda Duraes et al. en 2016, utilisant des pDC matures chargées avec l'antigène MOG<sub>35-55</sub> a en revanche pu démontrer que ces cellules sont protectrices à jour 12, au début des signes cliniques. Par comparaison avec ces pDC matures, le nombre de précurseurs utilisés ici est 10 fois plus faible. Il est intéressant de noter que, si la régulation cytokinique semble similaire, les mécanismes sont assez différents. En effet, les CpG-pre-pDC ne recrutent pas significativement les pDC matures endogènes et sont actives sans avoir été chargées avec le peptide MOG. Le rôle du CMH-II de leur descendance est ainsi à éclaircir dans notre modèle afin de déterminer si, comme dans le cas des pDC matures, la suppression est spécifique de l'inflammation du SNC ou si elle est plus générale, ce qui pourrait s'avérer problématique pour

les patients. Un modèle d'immunisation des animaux par l'ovalbumine serait un bon moyen de vérifier ce paramètre.

À l'heure actuelle, seule la dose de 80 000 CpG-pre-pDC par souris a été testée. Bien qu'efficace, il pourrait s'avérer intéressant de réaliser une gamme dose-réponse afin de déterminer si une dose plus faible serait tout aussi efficace et si une dose plus importante serait soit plus efficace, soit inefficace (comme dans le cas de la population de proB précédemment décrite par l'équipe), soit toxique. Il pourrait également être intéressant d'injecter les cellules à plusieurs reprises, comme cela peut se faire en pathologie humaine, afin d'en augmenter les effets en s'affranchissant relativement du risque toxique et de la contrainte technique de la préparation de doses aussi importantes de cellules.

Nous avons également démontré que les cellules de phénotype  $c\text{-Kit}^+ \text{Sca-1}^+ \text{B220}^{\text{int}} \text{PDCA-1}^+$  issues de la moelle osseuse, cultivées sans CpG ne sont pas capables de protéger les animaux face à l'EAE. Ceci démontre que la présence de CpG lors des 18h de culture est nécessaire pour conférer aux CpG-pre-pDC leur capacité protectrice contre l'EAE. Il est par ailleurs possible d'obtenir une population équivalente des CpG-pre-pDC émergeant dans la moelle osseuse à la suite l'injection de CpG *in vivo*. Ceci pourrait suggérer que la seule injection de CpG pourrait être protectrice dans l'EAE. L'injection de CpG dans le cadre de l'EAE n'est pas une idée nouvelle et une bibliographie assez fournie mais contradictoire existe sur le sujet. Ainsi, certaines équipes ont pu démontrer que l'injection de CpG seul est capable d'induire un syndrome ressemblant à l'EAE (Waldner et al., 2004) et que l'injection d'agonistes du TLR9 est capable d'augmenter significativement l'inflammation (Prinz et al., 2006), en recrutant en particulier des APC, dont des pDC, induisant des Th17 (Chastain et al., 2011; Tigno-Aranjuez et al., 2009). Toutefois, d'autres équipes sont parvenues à des résultats opposés en démontrant que l'injection répétée de CpG-A mais pas de CpG-B est capable de réduire la sévérité de l'EAE en induisant des pDC tolérogènes productrices d'IFN $\alpha$  (Crooks et al., 2017). Ceci est en accord avec deux autres travaux plus anciens qui démontrent que l'injection de CpG *in vivo* aux animaux présentant une EAE sont capables d'induire une régulation de la maladie par l'induction de pDC et de lymphocytes B régulateurs producteurs d'IL-10, ce qui semble assez conforme aux travaux de notre équipe (Longhini et al., 2014; Miles et al., 2012). Dans l'objectif d'application future à l'Homme, il n'est pas envisageable de prendre le risque d'aggraver la SEP des patients et l'approche par l'induction *ex vivo* de cellules régulatrices est donc plus rationnelle. Par ailleurs, il n'est pas impossible que l'effet protecteur du CpG dans l'EAE soit en partie dû à une aplasie médullaire, incapacitant ainsi le compartiment T, surtout en cas d'injection répétée de CpG comme discuté dans l'introduction de ce travail.

Nous avons pu également démontrer que des cellules de phénotype semblable à celui des CpG-pre-pDC émergent *in vivo* dans la moelle osseuse des animaux présentant une EAE et ce, en dehors de toute injection de CpG. Ces cellules triées et réinjectées à 80.000 cellules par animal n'apporte pas de protection face à l'EAE (expérience non présentée).



Nous avons pu mettre en évidence dans ce travail que les CpG-pre-pDC injectées migrent spécifiquement au site inflammatoire, la moelle épinière. À l'heure actuelle, nous n'avons pas encore étudié une éventuelle augmentation de molécules impliquées dans l'entrée au SNC comme CCR9, N-CAM ou encore la chémérine. Cependant, il est envisageable que la migration des CpG-pre-pDC et/ou de leur descendance au niveau du système nerveux central soit en partie permise par l'expression de l'intégrine CD11b. Il a en effet été démontré que le couple CD11b/CD18 est une des voies essentielles du recrutement de cellules myéloïdes mais également des lymphocytes au niveau du SNC inflammé (Yilmaz and Granger, 2008). Il serait donc intéressant d'évaluer les capacités protectrices de CpG-pre-pDC dérivés de souris CD11b<sup>-/-</sup>, ce qui se heurte à la dépendance de l'émergence des précurseurs d'intérêt vis-à-vis du compartiment CD11b<sup>+</sup> de la moelle osseuse.

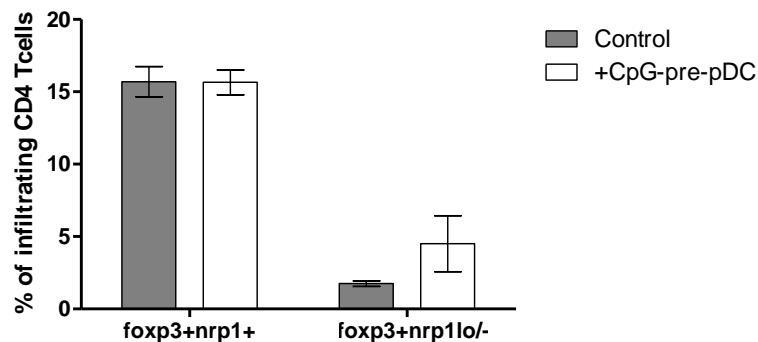
Nous avons également pu mettre en évidence que la descendance des CpG-pre-pDC, une fois au niveau de la moelle épinière, est capable de se différencier tout en conservant une relative immaturité au regard de leur forte expression de Sca-1 et un niveau faible mais persistant de c-Kit. Il semble donc qu'à l'instar des tolDC, les CpG-pre-pDC présentent une relative résistance à la maturation. De façon intéressante, il est cependant possible de différencier les précurseurs *in vitro*, ce qui démontre que cette résistance à la maturation est acquise lors de l'obtention de leur phénotype régulateur après transfert à l'hôte murin. Il est donc intéressant de questionner l'implication relative des précurseurs et de leur descendance dans la mise en place de la protection face à l'EAE. Il serait possible, bien que difficile, de trier la descendance des CpG-pre-pDC à partir de la moelle épinière des souris protégées et de les réinjecter à des souris au moment du déclenchement des signes cliniques. Il est en revanche beaucoup plus difficile de bloquer la différenciation des CpG-pre-pDC vers leur descendance *in vivo* car les gènes impliqués dans la différenciation des pDC sont déjà exprimés par les CpG-pre-pDC, comme E2.2. Or la perte de ces gènes empêchera soit la survie, soit l'émergence de la population, soit la fera diverger vers un autre phénotype.

De façon intéressante, une étude approfondie de la différenciation *in vivo* des CpG-pre-pDC met en évidence qu'entre 20 et 30% de la descendance est positive pour les marqueurs CD115, CD64 et Gr1. Une population particulière de pDC B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> a été décrite comme l'équivalent humain producteur d'IFN $\alpha$  (Ferrero et al., 2002). De façon intéressante, cette population n'est pas CD11b<sup>+</sup>, ce qui peut expliquer la légère hétérogénéité sur ce marqueur ainsi que les marqueurs de type myéloïde cités. Il n'est pas exclu que les CpG-pre-pDC soient effectivement capables de donner deux types de descendance.

Au niveau de l'hôte, l'injection de CpG-pre-pDC est capable de réorienter la production de cytokines d'un profil pro-inflammatoire vers un profil anti-inflammatoire. De façon très intéressante, si la production d'IFN $\gamma$  par les CD4<sup>+</sup> de l'hôte est significativement diminuée, la production d'IL-12p40 reste inchangée. Cela va dans le sens d'un switch fonctionnel des T davantage que le remplacement de la population infiltrant le SNC. En effet, il est possible que les Th1 (et par extension les Th17) infiltrants cessent de produire de l'IFN $\gamma$

tout en conservant la possibilité de produire de l'IL-12 et en acquérant la possibilité de produire d'autres cytokines anti-inflammatoires. La plasticité des Th17 est un argument de choix pour la conversion fonctionnelle des lymphocytes T encéphalitogènes vers un phénotype régulateur. Afin de pouvoir déterminer cela avec certitude, nous aurions besoin de réaliser une expérience de fate mapping afin de déterminer si les cellules désormais anti-inflammatoires ont exprimé par le passé soit l'IL-17, soit l'IFN $\gamma$ , soit les deux.

De façon étonnante, malgré la quantité de TGF $\beta$  produite par la descendance, il ne semble pas y avoir beaucoup plus de Tregs foxp3+ au niveau du SNC des animaux traités. Cela est d'ailleurs d'autant plus étonnant que les CpG-pre-pDC expriment IDO (résultats obtenus par PCR, non présentés). Il est possible que l'étude de la proportion relative des populations de CD4+ infiltrant le SNC des animaux ait été réalisée à un temps trop précoce suivant l'injection des CpG-pre-pDC pour l'observation des Tregs. En effet, la protection par ces précurseurs nécessite aux alentours de 3 jours pour s'instaurer. Ce délai correspond probablement au temps nécessaire aux précurseurs pour migrer au niveau du système nerveux central. Nous avons choisi ce temps d'analyse assez court car la persistance des CpG-pre-pDC dans l'hôte est assez courte (jusqu'à jour 21). Ce timing permet donc l'observation simultanée de la descendance et des cellules de l'hôte. Il est donc possible que l'induction de Tregs ait effectivement lieu, mais à des temps plus tardifs. La différence non significative du nombre de Tregs entre les deux lots d'animaux est cependant liée à une induction faible de pTreg (figure supplémentaire 5).



**Figure supplémentaire 5** : importance relative des tTreg(nrp1+) et des pTreg (nrp1lo/-) au niveau du système nerveux central des animaux au moment du pic de la maladie (J18). L'étude statistique par ANOVA à une voie ne permet pas de déterminer une différence significative. (n=5)

Enfin, il est frappant que le traitement des animaux au pic de la maladie ne se traduit pas seulement par un arrêt de la progression des symptômes mais également par une amélioration clinique des animaux, ce qui suggère une régénération des tissus nerveux endommagés. Il est probable que cet effet soit lié à la production de facteurs de croissance du système nerveux tel que le NGF ou des molécules de la famille des neurorégulines (Stassart et al., 2013).

Dans ce travail nous avons pu mettre en évidence une nouvelle population de précurseurs hématopoïétiques orientées dans la voie de différenciation des pDC. Ces cellules immatures sont capables de réguler l'encéphalite auto-immune expérimentale, un modèle murin d'auto-immunité. Les capacités protectrices robustes et l'adaptation des précurseurs à leur hôte, en particulier par la migration spécifique vers les organes inflammés, nous ont amenés à nous interroger sur la possibilité de réguler un modèle allogénique plus systémique à l'aide des CpG-pre-pDC. Par ailleurs, dans la perspective d'études translationnelles, l'encéphalite auto-immune expérimentale xénogénique est un modèle difficile à mettre en place. La maladie du greffon contre l'hôte est en revanche un modèle allogénique, relativement systémique et dont les différents modèles xénogéniques sont bien caractérisés. Nous avons donc choisi de tester les capacités régulatrices de la population des CpG-pre-pDC dans un modèle murin de maladie du greffon contre l'hôte.

## **Partie 2**

Rôle protecteur des CpG-pre-pDC dans le cadre d'une réponse allogénique :  
la maladie du greffon contre l'hôte

Hélène LETSCHER, Viviane AGBOGAN, Emmanuel TEJERINA, Christophe GRAS, Jérôme MEGRET  
et Flora ZAVALA

## Résumé

Le rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dans la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) reste obscur. La possibilité pour des signaux innés de conférer un phénotype régulateur robuste à des cellules dendritiques plasmacytoïdes immatures issues de la moelle osseuse a déjà été démontrée en contexte auto-immun. Nous démontrons ici qu'il est possible de protéger l'hôte de la GVHD par le transfert adoptif de CpG-pre-pDC induits par l'activation *ex vivo* de la moelle osseuse du donneur avec un agoniste du TLR9. Ces cellules migrent essentiellement au niveau de la rate et du foie où elles se différencient en cellules dendritiques plasmacytoïdes matures produisant du TGF $\beta$  et de l'IL-12p40. Sur place, ces cellules sont capables de diminuer la production d'IL-17 à la fois par les lymphocytes T CD4+ et CD8+, les deux populations pathogènes centrales de cette maladie. Ces résultats démontrent que les CpG-pre-pDC, initialement décrits comme capables de réguler l'encéphalite auto-immune expérimentale, un modèle murin de sclérose en plaque, sont également capables de réguler en partie la réponse inflammatoire dans un modèle allogénique, la GVHD. Ces résultats ouvrent donc des perspectives de thérapie cellulaire de la GVHD par les CpG-pre-pDC soit seuls soit en complément des traitements déjà utilisés dans le cadre de cette pathologie.

## Introduction

Le transfert de cellules souches hématopoïétiques allogéniques (aHSCT) reste encore aujourd'hui le seul traitement curatif de certaines formes agressives de cancers liquides et de désordres hématologiques. Malgré de nombreuses avancées dans la compréhension et le traitement des suites de la greffe, la maladie du greffon contre l'hôte aiguë (aGVHD) reste la principale cause de mortalité et de morbidité associée à cette procédure<sup>1</sup>. L'aGVHD est caractérisée par la dérégulation des cellules du donneur ce qui conduit à une prolifération massive de ses lymphocytes T et la destruction des tissus de l'hôte<sup>2</sup>.

À l'heure actuelle, les traitements de l'aGVHD reposent essentiellement sur l'utilisation d'immunosuppresseurs non spécifiques tels que les glucocorticoïdes et les cyclosporines. La définition de la dose optimale de ces traitements, propre à chaque patient, requiert une phase d'adaptation plus ou moins longue durant laquelle le risque de repousse tumorale est réel. Par ailleurs, les risques d'infections opportunistes fongiques et bactériennes associés à l'utilisation d'immunosuppresseurs non spécifiques constituent l'une des causes principales de morbidité associées à la GVHD<sup>3</sup>. Enfin, une immunosuppression trop forte risque d'empêcher une bonne activation du système immunitaire du donneur, qui ne sera plus à même de détruire ou contrôler le cancer (GVL) et qui se traduira à terme par une repousse tumorale agressive qui est souvent fatale au patient. Il paraît donc nécessaire de proposer des thérapies spécifiques afin d'améliorer la survie à long terme des patients. Plusieurs études ont pu démontrer les effets bénéfiques de thérapies cellulaires avec les Tregs<sup>4,5</sup>. Toutefois, l'utilisation de ces cellules aboutit à des effets contrastés. En effet, il a été démontré qu'en condition inflammatoire, les Tregs ainsi injectées changeaient d'identité en

perdant Foxp3 pour adopter un phénotype semblable à celui des Tfh<sup>6</sup>. L'utilisation de Tregs issus du sang de cordon ou traités avec de la rapamycine semble résoudre en partie ce problème en stabilisant l'expression de foxp3, toutefois la survie de ces cellules reste insuffisante<sup>7,8</sup>. Les Tregs allo-spécifiques sont une voie de recherche prometteuse, mais aucun essai clinique n'a été proposé jusqu'à présent<sup>9</sup>.

L'utilisation de cellules immatures pour la régulation de pathologies immunitaires est pourtant déjà pratiquée depuis le début des années 2000. Les cellules souches mésenchymateuses en particulier se sont révélées être de puissantes cellules régulatrices y compris dans la GVHD<sup>10,11</sup>. Notre laboratoire a également caractérisé plusieurs précurseurs régulateurs dans différents modèles d'auto-immunité. Nous avons montré que le G-CSF est capable de mobiliser des cellules multipotentes de type 2 (MPP2) depuis la moelle osseuse à la rate capable de protéger les souris diabétiques non-obèses (NOD) contre le diabète de type I en induisant la prolifération des Tregs<sup>12</sup>. Plus récemment, notre équipe a démontré qu'il est possible de faire émerger des cellules de type proB régulatrices par la stimulation de moelle osseuse totale avec un agoniste du TLR9, le CpG (CpG proB). Ces CpG-proB sont également capables de prévenir efficacement le diabète de type I chez les souris NOD en induisant l'apoptose des lymphocytes T<sup>13</sup>. Plus récemment, nous avons démontré que les CpG-proB peuvent émerger dans la moelle osseuse de souris C57Bl/6 et ces cellules sont capables de réguler l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle murin de sclérose en plaques<sup>14</sup>. Nous avons également démontré qu'il est possible de faire émerger un autre sous-type de cellules immatures régulatrices par la culture de moelle osseuse avec le CpG. Ces précurseurs sont engagés dans la voie des cellules dendritiques plasmacytoïdes et sont capables de réguler l'EAE en convertissant la production cytokinique pro-inflammatoire des CD4+ infiltrant le SNC vers un profil anti-inflammatoire.

Plusieurs études ont pu démontrer le rôle protecteur des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) chez l'Homme au cours de la GVHD<sup>15</sup>, bien qu'elles puissent être également pathogènes dans certains cas<sup>16</sup>. Chez la souris, les pDC sont également versatiles et sont capables d'augmenter la GVHD sans augmenter la GVHD<sup>17</sup> mais peuvent également être délétères en exerçant un rôle de cellule présentatrice d'antigène qui induira la différenciation d'une réponse CD4+ principalement orientée vers Th17<sup>18</sup>. Le rôle pourtant protecteur des pDC immatures issues de la moelle osseuse n'est en revanche que très peu caractérisé dans la GVHD. Il a cependant été démontré que la GVHD empêche la maturation des pDC<sup>19</sup>. Malgré le potentiel thérapeutique de cette population, aucune expérience de transfert adoptif de ces pDC immatures n'a été réalisée à notre connaissance jusqu'à présent. Ce type de thérapie cellulaire paraît donc intéressant à évaluer chez l'animal.

Nous démontrons ici que l'injection de CpG-pre-pDC avant le début des signes cliniques est capable de réduire à la fois le score clinique des animaux ainsi traités mais également de retarder et de diminuer la mortalité associée à la GVHD dans un modèle semi allogénique induit par le transfert de moelle osseuse et de lymphocytes T issus de C57Bl/6 à un animal receveur B6C3F1. Une double injection de CpG-pre-pDC syngéniques du donneur juste après la greffe et au déclenchement des signes cliniques potentialise cet effet.

Les cellules injectées migrent principalement vers la rate et plus modérément au niveau du foie. Dans ces organes, les cellules mûrissent, tout en gardant un phénotype de pDC dans chacun des organes considérés, et produisent du TGF $\beta$  et de l'IL-12p40. Elles réduisent la production d'IL-17 pathogénique à la fois par les lymphocytes CD4+ et CD8+. Ces résultats sont, à notre connaissance, la première démonstration du rôle protecteur de pDC immatures dans un modèle murin de GVHD. Des travaux complémentaires pourraient permettre de comprendre finement les mécanismes de cette protection et d'envisager de chercher un équivalent humain qui pourrait être utilisé pour traiter la GVHD, soit seul, soit en combinaison avec les traitements déjà utilisés dans cette pathologie.

## Résultats

**L'injection précoce de CpG-pre-pDC est capable de protéger contre l'aGVHD.** Afin de déterminer les capacités protectrices des cellules c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>B220<sup>int</sup> PDCA-1<sup>+</sup> (CpG-pre-pDC) triées électriquement dans un contexte d'alloréactivité, 200 000 de ces précurseurs issus du donneur sont transférés à des souris irradiées reconstituées avec une moelle semi allogénique (C57Bl/6 → B6C3F1) à différents temps. L'injection de 200 000 CpG-pre-pDC du donneur est capable de réduire la sévérité des manifestations cliniques de la maladie et d'augmenter la survie des animaux. Nous montrons en outre que le transfert adoptif de ces cellules permet également de diminuer la mortalité lorsque les précurseurs sont injectés à J+1, soit le lendemain de la greffe de moelle osseuse (figure 1a). L'injection de 200 000 CpG-pre-pDC à la fois à J+1 et au moment de l'initiation des manifestations cliniques (J+14) limite la sévérité de la maladie (figure 1b). Une tendance vers l'amélioration de la survie des animaux ( $p=0.11$ ) laisse augurer que l'augmentation du nombre d'animaux traités pourrait permettre d'atteindre la confirmation statistique de cette différence. En revanche, l'injection de 200 000 CpG-pre-pDC à j14 seulement ne semble favoriser ni l'amélioration clinique ni la survie des animaux receveurs (figure 1c).

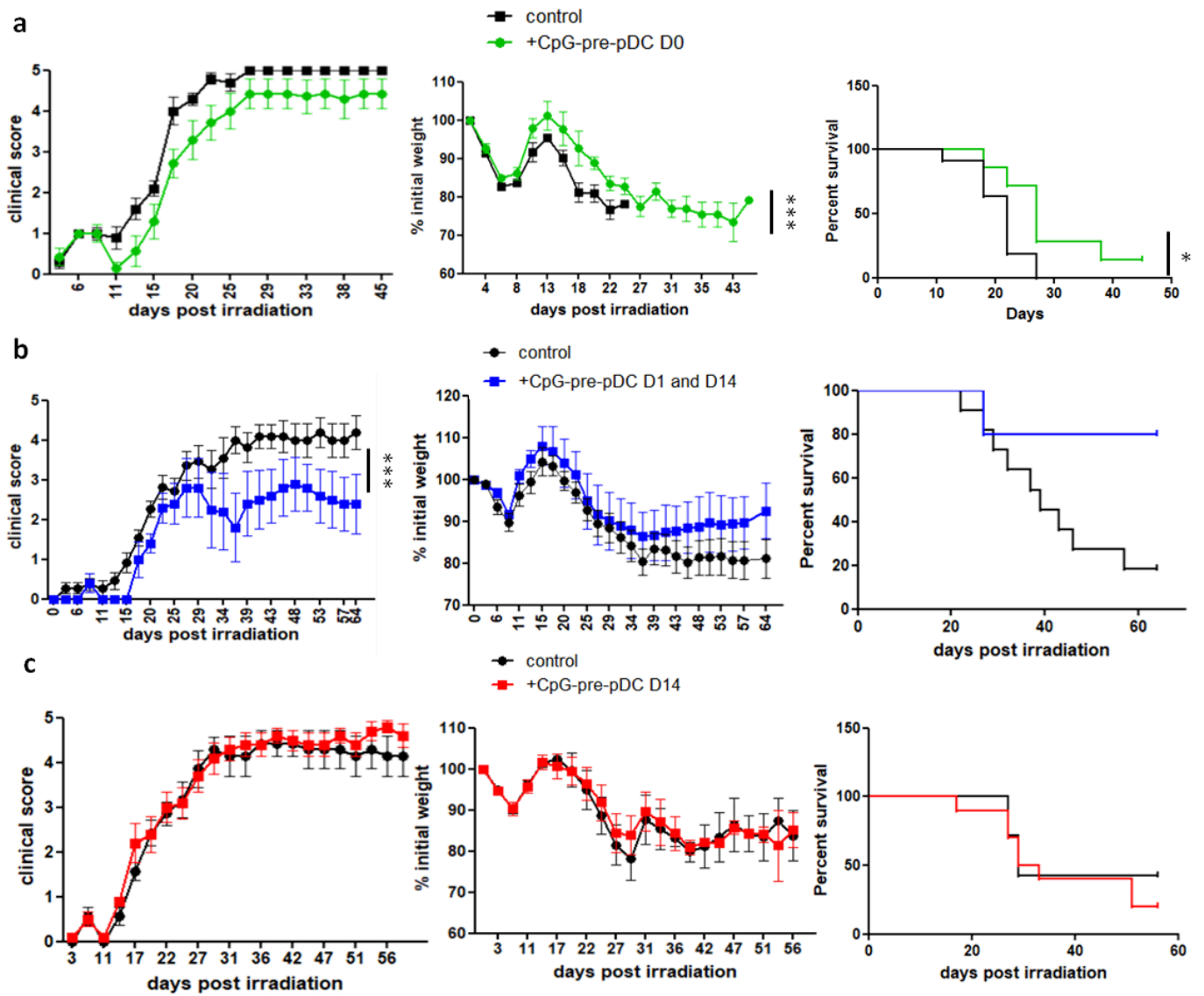
**Migration, différenciation et propriétés fonctionnelles des CpG-pre-pDC transférés précocement chez un receveur développant une GVHD.** L'injection de 200 000 CpG-pre-pDC actine-GFP à J+1 nous a permis de suivre la migration et l'expansion de l'inoculum chez les animaux ainsi traités. 7 jours après injection, les CpG-pre-pDC ont essentiellement migré au niveau de la rate, de la moelle osseuse et plus modérément au niveau du foie (figure 2a). De façon intéressante, le nombre de précurseurs retrouvés est environ 7.5 fois plus élevé que le nombre initial, ce qui suggère une forte expansion des cellules dans ce contexte. L'injection de CpG-pre-pDC issus de donneurs CD45.1 chez des receveurs CD45.2 nous a permis de définir le phénotype de la descendance des précurseurs injectés au niveau des trois organes dans lesquels les cellules GFP<sup>+</sup> ont été retrouvées. Quel que soit l'organe considéré, la descendance des CpG-pre-pDC, sélectionnées sur CD45.1<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>, est homogène et présente le phénotype c-Kit<sup>lo/-</sup> Sca-1<sup>+</sup> PDCA-1<sup>+</sup> B220<sup>int</sup> Siglec-H<sup>+</sup> CD11c<sup>lo</sup> attendu (figure 2b). L'activation PMA/ionomycine des cellules isolées à partir de la rate met en évidence qu'en moyenne 84% des cellules CD45.1<sup>+</sup> produisent de l'IL-12p40 et environ 60% produisent le LAP (figure 2c). Plus de 20% de ces cellules produisent également de l'IL-6 et de l'IFN $\gamma$  et plus de 10% produisent du TNF $\alpha$ , ce qui semble en accord avec leur orientation dans la voie de différenciation des cellules dendritiques plasmacytoïdes.

**L'injection de CpG-pre-pDC atténue l'état inflammatoire de l'hôte à la fois pour les CD4<sup>+</sup> et les CD8<sup>+</sup>.** Le compte total des différentes populations cellulaires a été réalisé au niveau de la rate des animaux contrôles et traités afin de déceler une éventuelle population cellulaire fortement impactée. Aucun sous-type

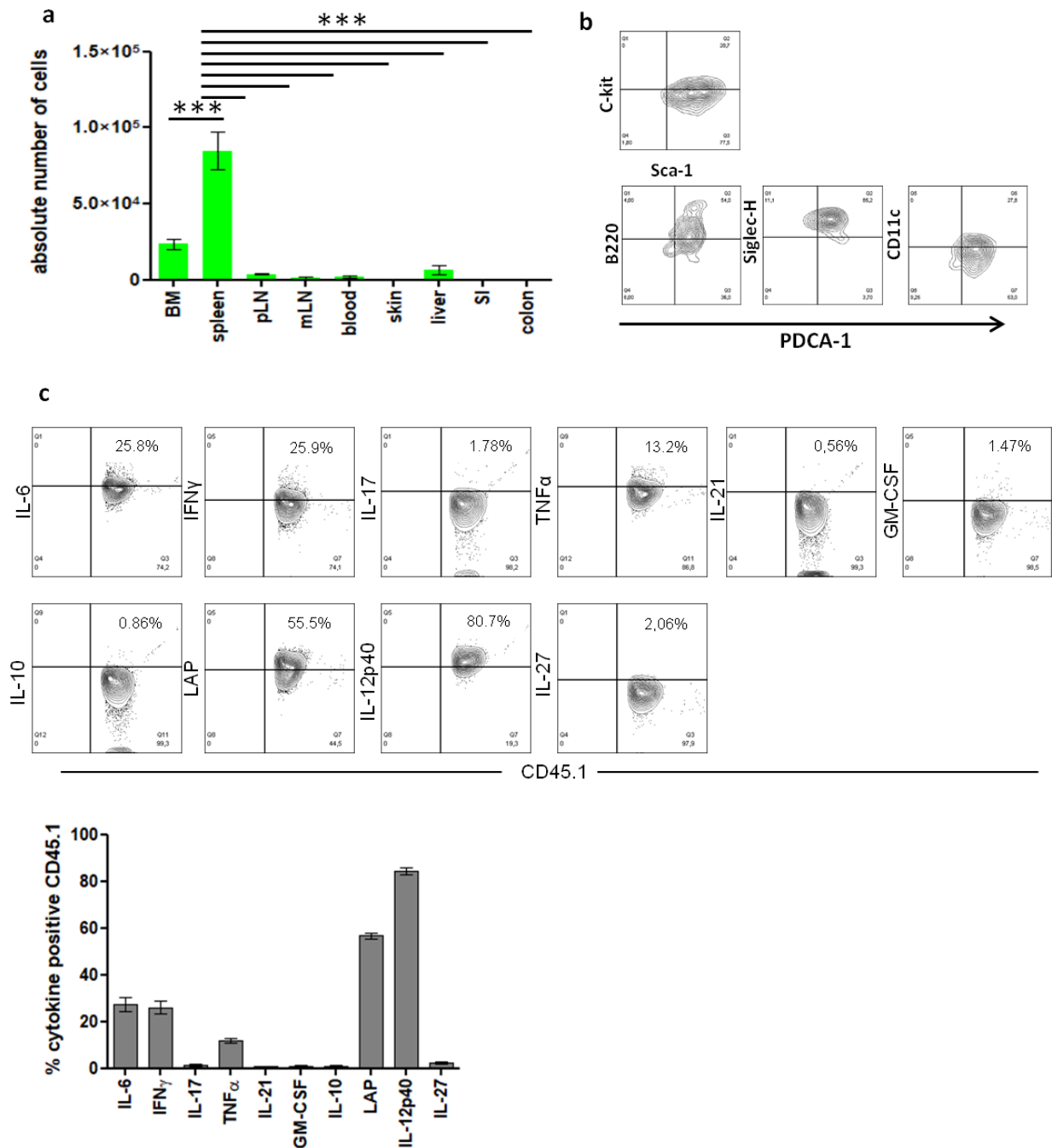


cellulaire n'est significativement diminué ou augmenté à l'exception notable des cellules PDCA-1+ (figure 3a). Par ailleurs, au sein des lymphocytes T CD4+, la proportion de Tregs foxp3+ n'est pas modifiée (figure 3b). Nous nous sommes donc concentrés sur l'étude des cellules pathogènes directement impliquées dans la GVHD, les lymphocytes T CD4+ et CD8+. L'analyse de la production cytokinique des lymphocytes T après stimulation PMA/ionomycine met en avant une diminution significative de la production d'IL-17 à la fois par les CD4+ et les CD8+ chez les animaux traités avec 200 000 CpG-pre-pDC au jour j+1 (figure 3c). Par ailleurs, chez ces souris, les CD8+ expriment significativement moins de GM-CSF, une tendance que l'on peut retrouver chez les CD4+. Par ailleurs, bien que ce ne soit pas significatif, les CD8+ produisent davantage d'IFN $\gamma$  chez les animaux traités par les CpG-pre-pDC que chez les animaux contrôles. L'étude de la production des cytokines anti-inflammatoires ne révèle aucune modification notable du profil anti-inflammatoire des lymphocytes T du donneur, tant CD4+ que CD8+ (figure 3d).

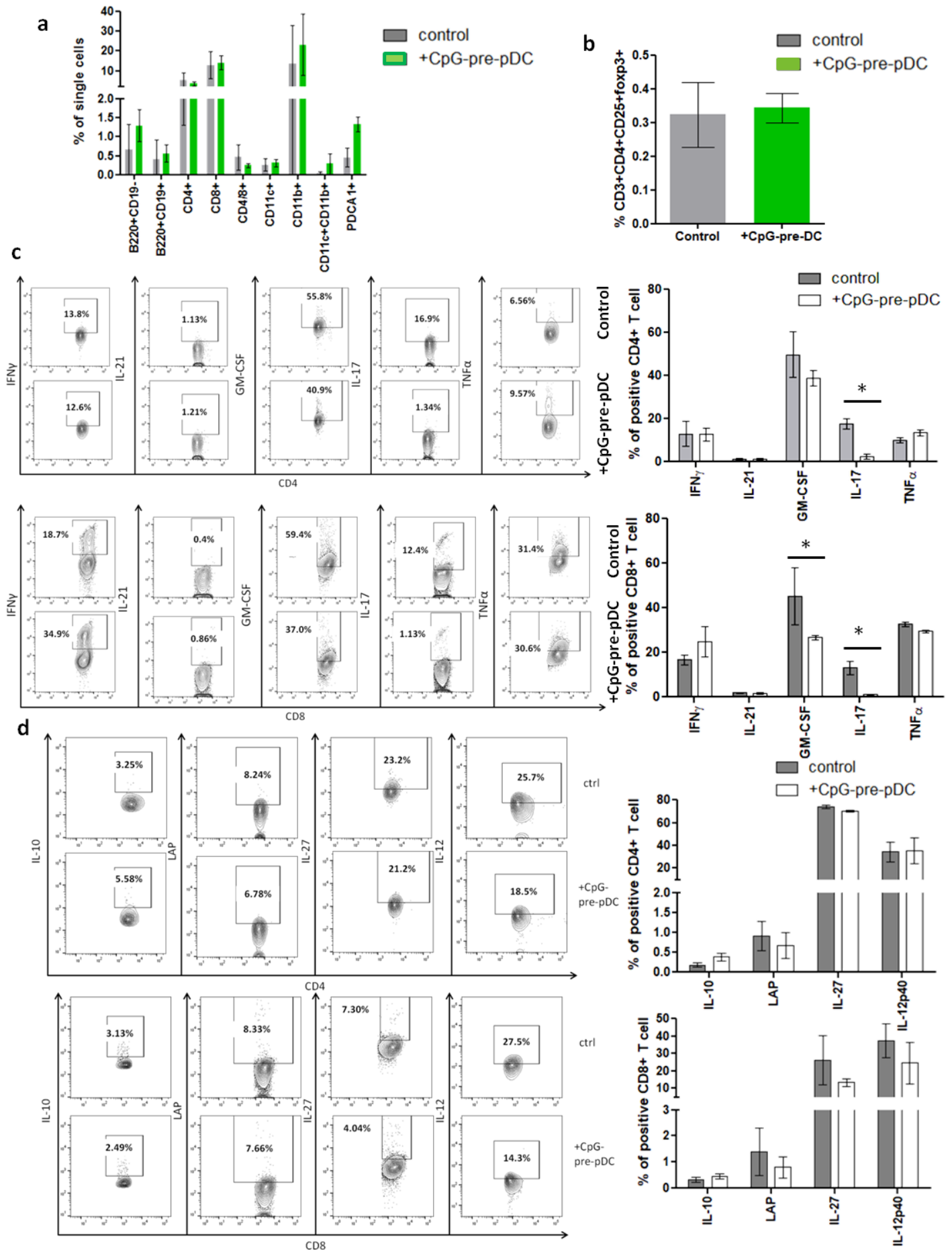
**Rôle du TGF $\beta$  dans la protection des CpG-pre-pDC contre l'aGVHD.** Afin de rendre compte du rôle du TGF $\beta$  produit par les CpG-pre-pDC dans la protection induite par ces cellules face à l'aGVHD, nous avons préparé des précurseurs à partir d'animaux WT puis transfectés avec une construction chariot/anticorps neutralisant anti LAP comme précédemment décrit. L'injection de 200 000 CpG-pre-pDC traités au Chariot-LAP au jour j+1 n'est pas capable de moduler la protection mise en place par les cellules dans la mesure où les animaux ayant reçu les CpG-pre-pDC incapables de produire du TGF $\beta$  sont parfaitement comparables en termes de survie aux animaux toujours capables de produire cette molécule (figure 4).



**Figure 1 : Protection face à la GVHD par les CpG-pre-pDC et détermination de la fenêtre thérapeutique.** Score clinique, perte de poids et survie associés à la GVHD des souris B6C3F1 après transfert de moelle osseuse et de lymphocytes T issus de souris C57Bl/6. 200 000 CpG-pre-pDC triés électroniquement sur les critères Sca-1<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup> B220<sup>int</sup> PDCA-1<sup>+</sup> IgM<sup>-</sup> ont été injectés i.v à différents temps soit **(a)** une seule injection 1 jour après la greffe de moelle osseuse, **(b)** deux injections à jour 1 et jour 14 après la greffe de moelle osseuse ou **(c)** une seule injection 14 jours après la greffe de moelle osseuse. Dans chacun de ces cas, les animaux contrôles ont reçu du PBS à la place des précurseurs. Les scores cliniques sont représentés par leur moyenne et l'erreur-type de la moyenne (SEM) durant 45 à 60 jours. n=7-12 par groupe. L'analyse statistique du score clinique a été réalisée par un ANOVA à deux voies, la perte de poids par un test de Student à deux voies et la survie par un test de Mantel-Cox. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001

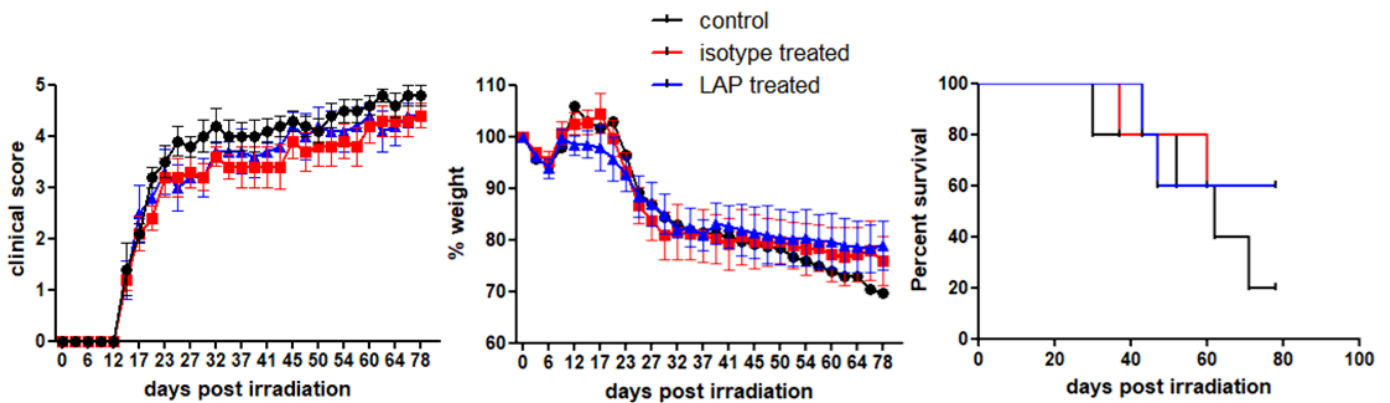


**Figure 2: Migration, différenciation et production de cytokines par la descendance des CpG-pre-pDC dans les souris aGVHD. (a)** 200 000CpG-pre-pDC actine-GFP<sup>+</sup> sont injectés à J1 chez des souris B6C3F1 ayant été irradiées et reçu de la moelle osseuse semi-allogénique. Les nombres absolus de cellules GFP<sup>+</sup> ont été analysé dans les organes cibles de l’aGVHD que sont la peau, le foie et le tractus digestif (intestin grêle (SI) et colon). La moelle osseuse (BM), la rate et les ganglions périphériques (pLN) et mésentériques (mLN) ont également été analysés. Le test statistique utilisé est un ANOVA à une voie avec un post test multiple de Bonferroni. \*\*\*p<0.001. **(b)** Le phénotype de la descendance CD45.1<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup> a été recherché 8 jours après irradiation (soit 7 jours après greffe) et a été évalué par cytométrie de flux. Seule la descendance splénique est présentée **(c)** La production de cytokine de la descendance CD45.1<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup> a été évaluée dans la rate par cytométrie de flux après une préincubation de 4h en PMA/ionomycine +Brefledine A. Haut : images représentatives obtenues par cytométrie de flux. Bas : histogrammes résumant l’expression par la descendance des différentes cytokines considérées. n=4 souris par cytokine, moyenne et SEM.



**Figure 3 : L'injection de CpG-pre-pDC à j1 atténue la signature inflammatoire des lymphocytes T activés.**

**(a)** Représentation respective à j8 des différentes populations cellulaires présentes dans la rate des animaux B6C3F1 en aGVHD avec (vert) ou sans (gris) traitement par 200 000 CpG-pre-pDC à j1 analysées par cytométrie de flux. n=2 **(b)** Représentation de lymphocytes T CD4+ foxp3+ au sein de la rate totale des animaux contrôles (gris) et traités par l'injection de CpG-pre-pDC à j1. **(c)** Analyse des cytokines pro-inflammatoires produites par les lymphocytes T spléniques du donneur des animaux traités (barres blanches) comparées aux animaux ayant reçu du PBS (barres grises). **(d)** Analyse des cytokines anti-inflammatoires produites par les lymphocytes T du donneur des animaux traités (barres blanches) comparées aux animaux ayant reçu du PBS (barres grises). Gauche : images représentatives obtenues par cytométrie de flux. Droite : histogrammes résumant l'expression par la descendance des différentes cytokines considérées. Haut : étude des lymphocytes T CD4+ du donneur. Bas : étude des lymphocytes T CD8+ du donneur. Étude statistique réalisée par le biais d'un test ANOVA à deux voies. n=6, \*p<0.05



**Figure 4 : Rôle du TGF $\beta$  dans la protection induite par l'injection de CPG-pre-pDC dans l'aGVHD.** 200 000 CpG-pre-pDC transfectés soit avec un anticorps neutralisant anti-LAP (bleu) ou un isotype contrôle (rouge), résultant soit dans des cellules déficientes pour le TGF ou dans l'équivalent de cellules non touchées, ont été injectées à J1 chez des animaux induits pour l'aGVHD. n=5.

## **Matériel et méthodes :**

**Animaux.** Les souris femelles B6C3F1 de 10 semaines d'âge ont été achetées auprès d'Envigo (Huntington, Royaume-Uni). Les souris C57Bl/6 femelles de 8 semaines d'âge ont été achetées auprès de Janvier Labs (LeGenest Sainte Isle, France). Les animaux ont eu un temps d'acclimatation de 2 semaines minimum avant l'induction de la maladie. Les animaux congéniques CD45.1 et actine-GFP ont été élevés à l'animalerie de l'institut Necker Enfants Malades en condition exempte de pathogènes.

**Induction de la GVHD aiguë.** Les souris B6C3F1 ont été irradiées aux rayons X à 9Gy la veille de la greffe de moelle osseuse et de lymphocytes T. 22-24h après irradiation, les animaux sont reconstitués par l'injection i.v de  $1.10^7$  cellules issues de la moelle osseuse totale+  $2.10^6$  de lymphocytes T totaux isolés à l'aide du kit magnétique d'isolation des lymphocytes totaux (Stemcells technologies, Grenoble, France). Le score clinique et le poids des animaux ont été évalués tous les deux jours sur une échelle de 0 à 5. Le score se compose de 5 critères, chacun noté 0 en cas d'absence de symptôme, 0.5 lorsque certains critères associés au symptôme considéré sont absents ou faibles, 1 si tous les critères considérés sont présents. Les cinq points considérés sont : la peau (présence de rash cutané, peau rougie au niveau des pattes, desquamation), la diarrhée (présence de diarrhée, anus rougi et/ou humide), la posture de l'animal (prostration, voussure dorsale, inactivité), le poids (perte de poids > 10% du poids initial) et la qualité du poil (terne, sale, ébouriffé). Si l'animal présente tous les critères, soit un score maximal de 5, ou une perte de poids >30% de son poids initial, il est immédiatement sacrifié.

**Tri électronique des CpG-pre-pDC issus de la moelle osseuse totale activée par le CpG.** La moelle osseuse est flushée des tibias, fémurs et hanches des souris C57Bl/6 donneuses âgées de 10 à 12 semaines puis incubée dans du RPMI 1640 complet comprenant 10% de sérum de veau fœtal, 1% d'antibiotiques (pénicilline/stréptomycine) pendant 18h en présence d' $1\mu\text{g}/\text{mL}$  de CpG-B (Invivogen, Toulouse, France). Les cellules c-kit<sup>+</sup> sont ensuite enrichies à l'aide d'un kit magnétique de séparation et de l'automate RoboSep (Stemcells technologies). Les cellules ainsi enrichies sont ensuite marquées à l'aide d'un ensemble d'anticorps dirigés contre Sca-1, B220 (BD bioscience, Le pont de Claix, France), PDCA-1 (ebioscience, Paris, France) et triées électroniquement sur le phénotype c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>B220<sup>int</sup>PDCA-1<sup>+</sup> à l'aide d'un FACS trieur Aria IIIu (BD bioscience).

**Isolation de cellules infiltrantes du foie.** Les animaux sont euthanasiés et le foie est abondamment perfusé avec du PBS froid par la veine porte jusqu'à obtention d'une couleur café au lait. L'organe est ensuite transféré dans une plaque 6 puits puis broyé successivement deux fois dans 5mL de PBS, 5%SVF sur un tamis cellulaire de 70 $\mu\text{m}$  à l'aide du piston d'une seringue de 5mL. Les surnageants sont collectés et rassemblés dans un même falcon 50 puis centrifugés une première fois 5 minutes à 50g (600 rpm). Le surnageant est

collecté puis centrifugé à 500g (1600 rpm) pendant 5 minutes. Le culot résultant est ensuite remis en suspension puis compté.

**Isolation de cellules infiltrantes de la peau.** Des biopsies de peau sont prélevées au niveau des oreilles de l'animal et finement découpées à l'aide de ciseaux (1-2mm). L'échantillon est ensuite transféré dans un falcon 15mL et incubées pendant 45 minutes à 37°C sous agitation mécanique dans un milieu de digestion comprenant 1mg/mL de collagénase et 1000UI de DNase I (Sigma-Aldrich, Fleury-Mérogis, France) dans du RPMI 1640, 1% SVF. Après digestion, chaque suspension est filtrée à l'aide de tamis cellulaires de 100µm. S'il reste sur le filtre des éléments non digérés, ils sont broyés à l'aide du piston d'une seringue de 5mL. Les filtres sont rincés à l'aide de 30mL RPMI 10% puis centrifugés 5 minutes à 500g (1600 rpm). Les surnageants seront centrifugés une seconde fois et les deux culots sont rincés dans 15mL de PBS total, centrifugés 5 minutes à 500g avant de compter les cellules.

**Isolation de cellules infiltrantes du tube digestif.** Après prélèvement, le colon et de l'intestin grêle sont soigneusement dégraissés et vidés de leur contenu à l'aide d'une poire fine. Le mucus est retiré en pressant délicatement l'organe du bas vers le haut à l'aide d'un outil plat. Le tube digestif est ouvert dans le sens de la longueur avec des ciseaux et coupé en segments d'un à deux centimètres. Les prélèvements sont placés dans des tubes falcon contenant 30 mL de PBS1X. De l'EDTA est ajouté à une concentration finale de 30mM et le prélèvement est incubé sur glace pendant 30 minutes. À la fin du temps d'incubation, les prélèvements sont secoués énergiquement afin de décoller l'épithélium. Les prélèvements sont ensuite transférés dans un nouveau falcon contenant 20 mL de PBS 1X et le cycle est répété trois fois, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de mousse. Au besoin, le restant d'épithélium est enlevé avec des pinces. Les prélèvements sont égoutés puis transférés dans une plaque 6 puits. Ils sont ensuite découpés finement et 3mL de milieu de digestion composé de DMEM 2% SVF, 2ng/mL de DNase I et 1mg/mL de Collagénase est ajouté après quoi, ils sont incubés 15 minutes à 37°C. À la fin de l'incubation, les échantillons sont flushés à l'aide d'un cône de 1mL coupé afin de dissocier mécaniquement les tissus. La résultante est filtrée sur un tamis cellulaire de 70µm et l'opération est répétée deux fois. Les culots sont ensuite repris dans 5mL de percoll 40% isotonique auxquels sont ajoutés 5mL de percoll 80% avant d'être centrifugés 20 minutes à température ambiante à 1300g (2800rpm) sans frein. L'anneau est récupéré et rincé abondamment dans du RPMI 10% avant que les cellules ne soient comptées.

**Marquages et analyse par cytométrie de flux.** Le marquage non-spécifique est limité par la préincubation des cellules avec du 2.4G2, un bloqueur des récepteurs Fc. Les cellules sont ensuite marquées avec les anticorps fluorescents appropriés dirigés contre CD4, CD8, B220, PDCA-1, Siglec-H (eBioscience), CD19, IgM,

CD11b, CD11c, c-Kit (CD117), Sca-1 (anti-Ly6A/E), CD45.1, CD45.2 (BD Biosciences). L'expression de Foxp3 a été mesurée par FACS en accord avec les recommandations du fabricant (eBioscience).

**Lecture des cytokines.** L'expression intra-cytoplasmique des cytokines des cellules issues de la rate a été mesurée après une pré-incubation de 4h avec de la PMA (10 ng/ml), de la ionomycine (500 ng/ml) et de la Brefeldine A (2mg/mL). Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées par l'utilisation d'un mélange de PFA/saponine. Le marquage est réalisé à l'aide d'anticorps marqués permettant de marquer APC-IFN $\gamma$ , APC-IL-10, APC-IL-17 (BD bioscience), PE-GM-CSF, PE-IL-27 et APC-IL-12p40 (eBioscience), PE-TNF $\alpha$ , PE-LAP (Biolegend) et APC-IL-21 (R&D, Abingdon, UK) ou des isotypes contrôles (BD bioscience et eBioscience). La lecture des marquages ainsi réalisés a été effectuée à l'aide d'un Canto II (BD Bioscience). Leur analyse a été faite à l'aide du logiciel FlowJo (Treestar, Ashland, États-Unis).

**Neutralisation du TGF $\beta$  à l'aide du Chariot.** Une construction est réalisée pendant 30 minutes à température ambiante à l'aide de 0.2mg de Chariot (Active motif, La Hupe, Belgique) et de 100  $\mu$ g soit d'anticorps neutralisant anti-LAP purifié, soit d'un isotype IgG1 contrôle (Biolegend), en accord avec les recommandations du fabricant. Les CpG-pre-pDC électriquement triés sont alors incubés avec cette construction pendant 20 minutes puis rincés avec du PBS 1X. Les cellules ainsi transfectées sont ensuite injectées i.v à une concentration de  $2 \cdot 10^6$  cellules/mL dans du PBS 2% SVF.

**Analyse statistique.** L'analyse des données statistiques a été réalisée à l'aide de Prism5. L'analyse des courbes de poids est réalisée à l'aide d'un test de Student multiple, le score clinique est analysé avec un ANOVA à deux voies, la mortalité par un test de Mantel-Cox et la comparaison entre les sites de migration à l'aide d'un ANOVA à une voie.

## Références

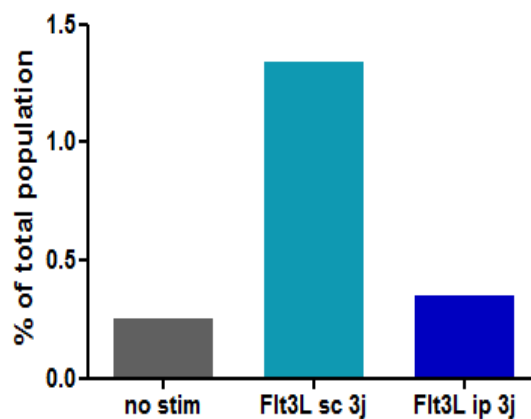
1. Nassereddine, S., Rafei, H., Elbahesh, E. & Tabbara, I. Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. *Anticancer Res.* **37**, 1547–1555 (2017).
2. Sung, A. D. & Chao, N. J. Concise Review: Acute Graft-Versus-Host Disease: Immunobiology, Prevention, and Treatment. *Stem Cells Transl. Med.* **2**, 25–32 (2013).
3. Matsumura-Kimoto, Y. *et al.* Association of Cumulative Steroid Dose with Risk of Infection after Treatment for Severe Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **22**, 1102–1107 (2016).
4. Martelli, M. F. *et al.* HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood* **124**, 638–644 (2014).
5. Pierini, A. *et al.* Donor Requirements for Regulatory T Cell Suppression of Murine Graft-versus-Host Disease. *J. Immunol.* **195**, 347–355 (2015).
6. Sawant, D. V. & Vignali, D. A. A. Once a Treg, always a Treg? *Immunol. Rev.* **259**, 173–191 (2014).



7. Brunstein, C. G. *et al.* Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood* **127**, 1044–1051 (2016).
8. Thomson, A. W., Turnquist, H. R. & Raimondi, G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 324–337 (2009).
9. Pidala, J. & Anasetti, C. Can antigen-specific regulatory T cells protect against graft versus host disease and spare anti-malignancy alloresponse? *Haematologica* **95**, 660–665 (2010).
10. Bader, P. *et al.* Effective treatment of steroid and therapy-refractory acute graft-versus-host disease with a novel mesenchymal stromal cell product (MSC-FFM). *Bone Marrow Transplant.* **1** (2018). doi:10.1038/s41409-018-0102-z
11. Zappia, E. *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* **106**, 1755–1761 (2005).
12. Kared, H. *et al.* Jagged2-expressing hematopoietic progenitors promote regulatory T cell expansion in the periphery through notch signaling. *Immunity* **25**, 823–834 (2006).
13. Montandon, R. *et al.* Innate pro-B-cell progenitors protect against type 1 diabetes by regulating autoimmune effector T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E2199–2208 (2013).
14. Korniotis, S. *et al.* Treatment of ongoing autoimmune encephalomyelitis with activated B-cell progenitors maturing into regulatory B cells. *Nat. Commun.* **7**, 12134 (2016).
15. Mohty, M. *et al.* Impact of plasmacytoid dendritic cells on outcome after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* **19**, 1–6 (2005).
16. Bossard, C. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Leukemia* **26**, 1471–1474 (2012).
17. Li, J.-M. *et al.* Activation, immune polarization, and graft-versus-leukemia activity of donor T cells are regulated by specific subsets of donor bone marrow antigen-presenting cells in allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 7799–7809 (2009).
18. Koyama, M. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. *Blood* **113**, 2088–2095 (2009).
19. Banovic, T. *et al.* Graft-versus-host disease prevents the maturation of plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 912–920 (2009).

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES PARTIE 2

Dans cette deuxième partie, nous avons démontré qu'il est possible de réduire les manifestations cliniques de la maladie aiguë du greffon contre l'hôte par l'injection de 200 000 CpG-pre-pDC le lendemain de la greffe. Si la protection contre la pathologie n'est que partielle, les résultats obtenus sont néanmoins très encourageants. Nous avons pu démontrer qu'il est possible de potentialiser l'effet des CpG-pre-pDC par une deuxième injection de 200 000 de ces précurseurs au moment de l'apparition des signes cliniques. Une autre possibilité d'amélioration de la protection passerait par l'augmentation du nombre de CpG-pre-pDC injectées à J1. À l'état d'équilibre, cela semble peu envisageable car le nombre de CpG-pre-pDC que l'on peut obtenir à partir de la moelle osseuse d'un animal est assez limité ( $\approx 100\ 000$ /donneur), il est donc nécessaire d'expandre ces cellules. Nous avons essayé plusieurs protocoles d'expansion *in vitro* utilisant des combinaisons de TPO, SCF et de milieu adapté à l'entretien de cellules immatures (Stemspan, Stemline II) afin de les figer dans un état de précurseurs mais ces cellules sont éminemment fragiles et entrent en apoptose rapidement. Par ailleurs, la culture en conditions appropriées aux cellules dendritiques plasmacytoïdes (IL-3 et Flt3L) de ces CpG-pre-pDC pendant des périodes de temps supérieures ne permet pas de les maintenir à l'état immature. Nous avons donc proposé de développer un protocole de multiplication *in vivo* par l'injection de 300ng Flt3L/souris/jour pendant 3 jours par donneur avant sacrifice (figure supplémentaire 1).



**Figure supplémentaire 1 :** Proportion des CpG-pre-pDC dans la population de la moelle osseuse totale après 18h de stimulation CpG de moelle osseuse issue d'animaux non traités (gris), d'animaux ayant reçu trois injection de 300ng/jour de Flt3L par voie sous cutanée (bleu clair) ou par voie intra péritonéale (bleu foncé)

À l'issu de ce traitement et après culture de la moelle osseuse totale avec du CpG, il est alors possible de ne sélectionner par tri électronique que les cellules dont le phénotype correspond à celui des CpG-pre-pDC. Dans ces conditions, nous avons pu établir que l'injection de cette cytokine par voie sous-cutanée (sc) est capable, contrairement à la voie intra péritonéale (ip), d'induire une forte prolifération (environ 6 fois plus) des précurseurs des cellules dendritiques dont les CpG-pre-pDC. Cette stimulation sous cutanée efficace

permet d'envisager d'injecter  $1.10^6$  CpG-pre-pDC obtenus après stimulation des donneurs avec Flt3L (CpG-pre-pDC Flt3L) à comparer avec la dose habituelle de 200 000 CpG-pre-pDC également obtenus après stimulation des donneurs avec cette cytokine. Nous avons donc injecté ces deux doses de cellules le lendemain de la reconstitution des animaux, comme précédemment décrit. Toutefois, pour des raisons internes à notre animalerie, l'aGVHD des animaux, quel que soit le groupe, y compris contrôle, a été fulgurante, se traduisant par un poids extrêmement rapidement variable, une mortalité précoce et trop rapide pour n'être liée qu'à la maladie (0% de survivants 34 jours après irradiation). Ces résultats seraient à reproduire dans des conditions adéquates afin de pouvoir vérifier si les CpG-pre-pDC Flt3L sont identiques aux cellules issues de donneurs non traités du point de vue de leur fonction, de leur différenciation et de leur migration. Par ailleurs, nous pourrions évaluer si l'augmentation de la dose de précurseurs injectés est capable de protéger les animaux de manière plus efficace contre la GVHD et en particulier contre la mortalité associée.

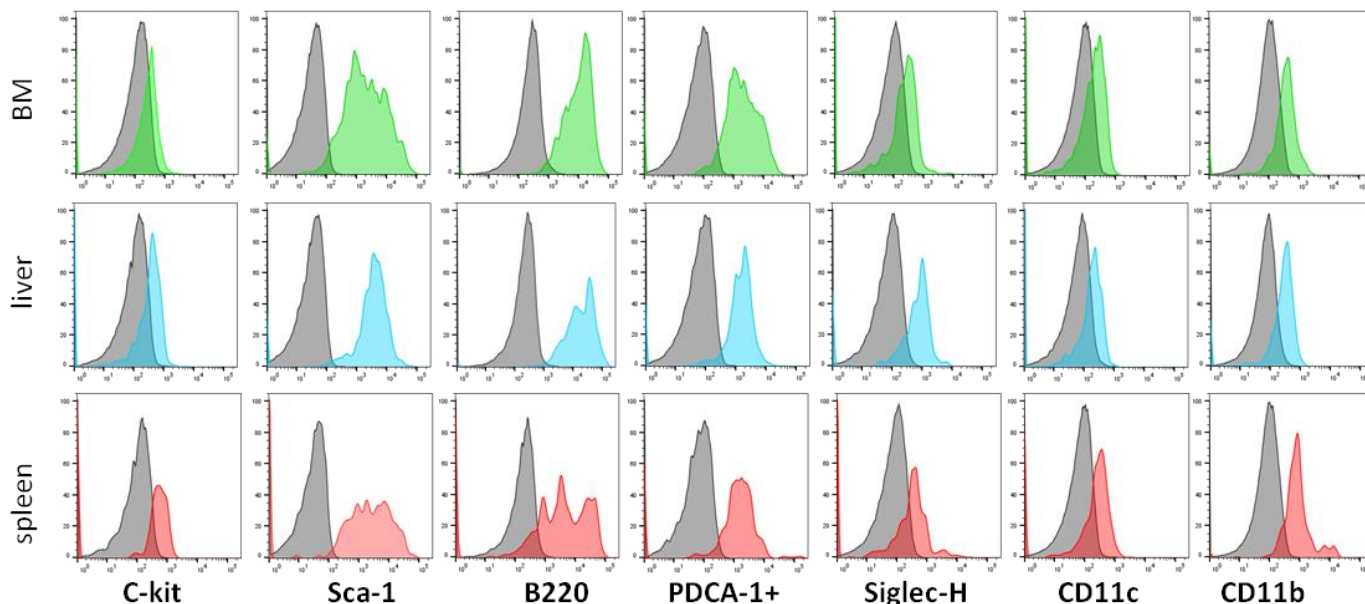
Il est intéressant de constater que l'injection des CpG-pre-pDC au jour 14 après l'irradiation n'est pas capable de réguler la GVHD aiguë, alors que la deuxième injection de ces précurseurs à j14 est cependant capable d'améliorer la protection mise en place par les précurseurs injectés à jour1. Plusieurs hypothèses peuvent venir expliquer cela. Tout d'abord, il est connu que le type d'immunité mis en jeu dans les phases d'initiation de la GVHD (tempête cytokinique) et au moment du déclenchement des signes cliniques (immunité cellulaire) sont différents. Dans la mesure où les CpG-pre-pDC répondent à l'état inflammatoire de l'animal, il est fortement probable que ce changement influe fortement sur leur propre profil, que ce soit au niveau de leur fonction, de leur migration, de leur différenciation ou même de leur survie. Il est également possible que les CpG-pre-pDC injectés au jour1 soient capables de potentialiser la réponse de la seconde vague de précurseurs qui n'ont peut être pas le même phénotype que ceux de la première vague, du fait d'un signal inflammatoire plus doux. Ces cellules avec un phénotype différent pourraient alors peut être diminuer la production d'autres cytokines que l'IL-17 et le GM-CSF. Par ailleurs, des symptômes de la GVHD diminués par la double injection de CpG-pre-pDC, la diarrhée est le plus affecté. Il est donc possible que la diminution de la signature pro-inflammatoire puisse permettre aux CpG-pre-pDC d'acquérir d'autres molécules d'adressage et de migrer au tube digestif. Toutefois, contrairement à l'EAE, le fait que les CpG-pre-pDC ne soient plus capables de réguler la pathologie après le début de ses manifestations cliniques n'est pas un problème. En effet, à la différence de la sclérose en plaques dont le déclenchement est sporadique et imprédictible dans la population, la GVHD est une pathologie déclenchée par l'Homme dans des conditions bien définies. Si la sévérité de la maladie est difficile à prévoir, il est en revanche systématique que les patients ayant reçu une aHSCT sont à risque vis-à-vis de la GVHD avant même son déclenchement.

Dans ce modèle, nous n'avons pas vérifié si le signal CpG est requis pour l'acquisition du phénotype protecteur des cellules. À nouveau, à l'état basal, il ne semble pas possible de réaliser cette expérience car

le nombre de cellules obtenues sans stimulation TLR9 est de l'ordre du tiers du rendement obtenu avec le CpG. La quantité requise d'animaux pour réaliser cette expérience ne semble pas éthiquement justifiable. Toutefois, si nous parvenons à démontrer qu'il est possible de multiplier les cellules c-Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> B220<sup>int</sup> PDCA-1<sup>+</sup> par le traitement des animaux donneurs avec le Flt3L et que ces cellules ont des propriétés similaires aux cellules non multipliées *in vivo*, il sera alors envisageable de réaliser cette vérification. Par ailleurs, nous n'avons recherché ni l'existence de cellules au phénotype similaire à celui des CpG-pre-pDC qui aurait été induite par la GVHD directement ni leurs potentielles propriétés protectrices contre la pathologie. À nouveau, la question du nombre de cellules à injecter dans ces modèles se pose comme la contrainte principale. En effet, l'inoculum de moelle totale initial est de « seulement »  $1.10^7$  cellules, et les pDC étant une population assez rare, il faudra attendre un temps important pour que la reconstitution médullaire soit suffisante afin d'obtenir assez de cellules pour réaliser cette expérience. De fait, cela nous empêche d'utiliser les cellules induites précocement par la maladie car le nombre de cellules plasmacytoïdes à ce stade est trop faible et contient encore une proportion non négligeable de cellules issues du receveur, qui finiront par mourir rapidement à cause du conditionnement. Il serait tentant d'utiliser du Flt3L à ce stade, toutefois, les APC du receveur et du donneur conditionnant la maladie, le risque d'aggraver brutalement la pathologie est très important. Enfin, il ne paraît pas non plus envisageable de chercher à faire émerger les précurseurs d'intérêt par l'injection de CpG *in vivo* à nouveau pour des questions de nombre de cellules à injecter aux receveurs qui serait trop grand. Il est possible que ce problème soit également résolu par le prétraitement des donneurs avec le Flt3L, mais la manière dont le Flt3L et le CpG vont interagir *in vivo* pour réorienter l'hématopoïèse des DC et donc des CpG-pre-pDC n'est pas connue. Cela demanderait donc davantage d'étapes de validation des cellules ainsi obtenues.

Sept jours après leur injection la descendance des CpG-pre-pDC a migré au niveau de la rate, plus modérément au niveau de la moelle osseuse et du foie. Il est intéressant de noter que contrairement à l'EAE, dans le cas de la GVHD, les CpG-pre-pDC ne migrent pas aux organes cibles. Cependant, l'état inflammatoire de l'animal étant assez généralisé dans ce modèle, il est probable que l'acquisition des molécules nécessaires à la migration spécifique dans les organes cibles soit plus difficile. Il pourrait donc sembler que la migration au niveau de la rate et de la moelle osseuse apparaisse comme une destination « par défaut » des CpG-pre-pDC et de leur descendance. Toutefois, si tel était le cas, nous devrions retrouver un fort pourcentage de cellules infiltrantes au niveau du foie et des poumons, ces deux organes étant connus pour leur effet rétenteur des cellules injectées par voie intraveineuse. Or le nombre de cellules CD45.1<sup>+</sup> retrouvées dans le foie et dans le lavage broncho-alvéolaire (données non présentées) est très faible par comparaison avec la rate. Par ailleurs, la moelle osseuse n'est pas connue pour être un site de rétention des cellules injectées i.v. On pourrait envisager que comme les CpG-pre-pDC sont issues de la moelle osseuse, elles conservent les signaux d'adressage pour cet organe et y retournent. Toutefois, cela n'est pas le cas dans l'EAE, il apparaît

donc que ces deux sites de migration de la descendance des CpG-pre-pDC sont le résultat d'une migration active, bien que nous n'ayons pas recherché l'implication spécifique des molécules impliquées dans la migration des CpG-pre-pDC et leur descendance dans ce modèle. Par ailleurs, il est intéressant de noter que le phénotype de la descendance des CpG-pre-pDC est similaire quel que soit l'organe considéré (figure supplémentaire 2).



**Figure supplémentaire 2 :** phénotype de la descendance des CpG-pre-pDC dans les différents organes au sein desquels ils migrent : la moelle osseuse (BM, en vert), le foie (bleu) et la rate (rouge). Les différents histogrammes présentés sont gatés sur la population CD45.1<sup>+</sup>CD45.2<sup>-</sup>. Les histogrammes ont été normalisés à 100% d'expression (modal).

À l'exception de quelques différences mineures sur certains antigènes (notamment l'apparition de niveaux très faibles de B220 dans la rate), la différenciation des CpG-pre-pDC est homogène et les cellules gardent la même relative résistance à la maturation (conservation de l'expression de Sca-1) tout en restant orientées dans la voie de différenciation des cellules dendritiques plasmacytoïdes, ce qui n'est pas sans rappeler le profil de différenciation de la descendance de ces mêmes cellules dans l'EAE. Par ailleurs, en parallèle des tests avec CpG-pre-pDC *in vivo*, nous avons tenté d'éclaircir les mécanismes moléculaires de cette protection par le biais de l'étude *in vitro* en MLR de la suppression des lymphocytes T. De façon très intéressante, dans ce modèle, les CpG-pre-pDC favorisent fortement l'expansion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (données non présentées) et ne permettent pas l'expression de cytokines associées à la régulation (en particulier le TGFβ et l'IL-27). Ce comportement *in vitro* des précurseurs d'intérêt est radicalement différent de ce qui est observable *in vivo* chez les animaux traités, ce qui montre que les CpG-pre-pDC sont éminemment sensibles à l'environnement inflammatoire dans lequel ils sont. Il semble donc que si les modalités d'action et de migration de la descendance des CpG-pre-pDC sont dictées par l'environnement inflammatoire, leur voie de différenciation et leur capacité de maturation seraient quant à elles intrinsèques.

La descendance des CpG-pre-pDC est capable de produire plusieurs cytokines dont l'IL-12p40 et le TGF $\beta$ . L'IL-12p40 est ambivalent et peut être pathogène ou protecteur suivant l'équilibre cytokinique et cellulaire de l'animal. Il est en effet intéressant de constater que la régulation soit par les Th1 soit par les Th17 obéit à un équilibre et donc peut être envisagé du point de vue de l'homéostasie des deux populations. De son côté si le TGF $\beta$  est clairement une cytokine profitable dans la phase aiguë de la pathologie, elle est également connue pour faciliter le passage en phase chronique. L'observation prolongée d'animaux (jusqu'à 80 jours post irradiation) ne semble toutefois pas indiquer de GVHD chronique (cGVHD) chez les animaux traités par les CpG-pre-pDC. En particulier, ils ne présentent pas de plaque de desquamation sévères au niveau des épaules. Toutefois, il pourrait être intéressant de chercher à élucider ce point particulier dans un modèle plus adapté au développement de la cGVHD. Par ailleurs, du fait de leur capacité d'adaptation aux conditions inflammatoires, il est possible que les CpG-pre-pDC soient capables de réguler la cGVHD.

L'injection de CpG-pre-pDC aux animaux qui vont déclencher une GVHD ne change pas significativement la composition cellulaire de leur compartiment immunitaire. Toutefois, la tendance générale à un compte cellulaire légèrement plus important dans chacune des sous-populations pourrait suggérer une meilleure prise de greffe permise par les précurseurs et leur descendance, ce qui peut faire écho aux cellules facilitatrices de Suzanne Ildstad.

Lorsqu'ils sont injectés au jour 1, les CpG-pre-pDC sont capables de diminuer significativement l'expression d'IL-17 à la fois par les T CD4+ et CD8+ et la production de GM-CSF par les CD8+. Toutefois, il ne semble pas que les précurseurs empêchent la différenciation des lymphocytes T en particulier Th17. En effet, si la quantité d'IL-17 est significativement diminuée, le nombre total de lymphocytes T n'est pas diminué. Par ailleurs, la quantité d'autres cytokines n'est pas significativement augmentée, ce qui est compatible avec l'hypothèse d'une extinction de l'expression de l'IL-17 plutôt qu'une perte des Th17. La légère augmentation d'IFN $\gamma$  est probablement davantage liée à la production d'IL-12p40 qui oriente la différenciation des Th1 *de novo*, bien que nous ne puissions pas l'affirmer à ce stade. Il est par ailleurs intéressant de constater que, si le rôle de l'IL-17 est largement reconnu comme pathogène dans la GVHD (Espinoza et al., 2011; Kappel et al., 2009; van der Waart et al., 2014), une étude récente de Cai et son équipe a mis en avant que l'IL-17, s'il n'est pas sécrété par les CD4+, peut parfois être régulateur en diminuant l'expression d'IL-12 (Cai et al., 2018). Ceci démontre bien que les rôles de l'IL-17 et de l'IL-12 sont encore relativement mal compris.

Parmi les symptômes de la GVHD, la diarrhée, témoin de l'atteinte digestive, est le mieux régulé par l'injection des CpG-pre-pDC. La mesure de la taille des colons des animaux traités et non traités ne traduit pas de différences significatives (données non présentées). Ceci démontre que si les manifestations cliniques de la pathologie sont améliorées par l'injection des précurseurs, l'état inflammatoire local de l'animal reste élevé. Il serait intéressant cependant de procéder à une étude histologique des organes cibles de la GVHD

afin de déterminer si *in situ*, certaines populations cellulaires sont plus ou moins représentées lorsque les animaux sont traités avec les précurseurs d'intérêt.

Lorsque nous avons recherché les lymphocytes T régulateurs (CD3+CD4+foxp3+) 8 jours après l'irradiation, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'augmentation de leur nombre pour les animaux traités. En effet, au temps auquel nous avons réalisé l'analyse, les signes cliniques des animaux ne sont pas encore visibles. Il est donc raisonnable de penser que si la pathologie n'est pas entièrement développée, sa régulation n'est probablement pas pleinement développée. Il est donc possible que le temps d'analyse que nous avons choisi pour mettre en évidence les cellules régulatrices ne soit pas optimal et qu'il faille attendre un temps plus tardif, probablement après stabilisation de la pathologie, afin de voir émerger des Tr1 et/ou des Th3. Par ailleurs, nous avons analysé les proportions des Tregs dans la rate et il est possible, si ces cellules régulatrices sont induites par les CpG-pre-pDC et leur descendance, que les Tregs ne restent pas au niveau de la rate mais migrent au niveau d'autres organes, en particulier les tissus cibles. Il nous faudrait donc analyser le compartiment régulateur au sein de différents organes mais également des ganglions drainants qui leur sont associés.

Il est intéressant de noter que des précurseurs ne disposant plus de la capacité à produire du TGF $\beta$  sont tout aussi capables de protéger les receveurs que leurs équivalents traités avec l'isotype contrôle. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela. Tout d'abord, il est possible que le TGF $\beta$  produit par les CpG-pre-pDC ne soit réellement pas nécessaire pour la protection permise par les précurseurs dans ce modèle. Par ailleurs, l'incapacité de production de TGF $\beta$  induite par la transfection des CpG-pre-pDC avec un anticorps neutralisant cette cytokine dépend d'une quantité finie de complexe chariot/anti-LAP. Or lorsque les CpG-pre-pDC sont injectés dans le modèle de la GVHD, ces précurseurs se multiplient très activement ce qui divise d'autant la quantité de complexe disponible par cellule. Ainsi, lorsque cette quantité n'est plus suffisante, il devient alors possible pour les cellules de réexprimer la cytokine. Par ailleurs, quand bien même la quantité de complexe resterait suffisante par cellule fille, il est un fait que la stabilité biologique de cette construction n'excède pas trois semaines. Or, dans le modèle de GVHD considéré, les animaux doivent être suivis pendant environ 50 jours. Ainsi, si le TGF $\beta$  est requis passé le délai des trois semaines, les cellules sont de nouveau parfaitement capables de le produire à ce moment là. Afin de contourner ce problème, nous avons injecté une première fois des CpG-pre-pDC WT puis une seconde fois à j14 comme décrit dans la figure 1b mais cette fois avec des cellules invalidées pour leur production de TGF $\beta$ . Cependant, pour des raisons internes à notre animalerie, les animaux sont à nouveau décédés massivement et très rapidement ce qui ne nous a pas permis de conclure sur la nécessité du TGF $\beta$  à ce temps précis.

Si l'objectif pour le traitement de la GVHD est la survie de tous les animaux, il n'est cependant pas de l'abroger mais plutôt de l'alléger. En effet, la perte totale de la pathologie peut signifier soit une mauvaise prise de greffe soit une suppression immunitaire généralisée exposant donc le patient à la repousse tumorale

par la perte de la GVL. Dans le cas présent des souris traitées avec les CpG-pre-pDC, il sera nécessaire de vérifier que la relative suppression immunitaire des animaux n'empêche pas une bonne réponse anti-leucémique. Dans l'état actuel, du fait de la conservation de cytokines telles que l'IFN $\gamma$  ou le TNF $\alpha$ , il est fort probable que l'animal soit toujours compétent pour une réponse anti-tumorale forte, bien que cela doive être vérifié *in vivo*. Toutefois, si nous parvenons à mettre en place les traitements faisant intervenir des grandes quantités de CpG-pre-pDC comme nous l'avons suggéré, il sera d'autant plus nécessaire de vérifier l'intégrité de la réponse GVL chez les receveurs.



### I/ Résumé des résultats de la Thèse et comparaison des résultats obtenus dans les deux modèles

Dans ce travail nous avons démontré que la culture de la moelle osseuse totale de souris C57Bl/6 avec des agonistes des TLR dépendant de MyD88 et principalement le CpG est capable de faire émerger une population décrite par le phénotype  $c\text{-Kit}^+\text{Sca-1}^+\text{B220}^{\text{int}}\text{PDCA-1}^+\text{IgM}^-$ . Cette population présente des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles qui sont compatibles avec des cellules engagées dans la voie des cellules dendritiques plasmacytoïdes, ce qui est confirmé par leur double expression des facteurs de transcription E2.2 et PU.1. Par ailleurs, ces cellules sont encore immatures et acquièrent après culture *in vitro* un phénotype de pDC mature, ce qui tend à montrer que ces cellules sont des précurseurs de cellules dendritiques plasmacytoïdes. De ce fait, nous avons nommé ces cellules CpG-pre-pDC. De façon intéressante, ces précurseurs ne sont pas capables de produire d'IFN de type I, ce qui est soit lié à un épuisement induit par l'activation avec le CpG, soit simplement à leur stade de développement précoce.

L'injection de seulement 80 000 de ces CpG-pre-pDC est capable de moduler l'EAE, un modèle murin de sclérose en plaques, à toutes les phases de la maladie : à J0, au moment de l'immunisation, à J12, au début des signes cliniques et à J18 au pic de la maladie. Nous avons pu mettre en évidence que le signal par le CpG est requis afin de conférer aux CpG-pre-pDC leur phénotype régulateur dans l'EAE. De façon importante, cette capacité régulatrice peut également être conférée aux CpG-pre-pDC par l'injection de CpG *in vivo*. Dans un souci de réalité clinique pour d'éventuels travaux translationnels vers l'Homme, nous avons décidé de focaliser notre étude sur les mécanismes de régulation mis en jeu lors de l'injection des CpG-pre-pDC au début des signes cliniques. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la descendance des CpG-pre-pDC migre quasiment exclusivement à la moelle épinière, le site inflammatoire de ce modèle et là, adopte un phénotype de pDC plus mature et produit principalement du TGF $\beta$  et de l'IL-27, une cytokine de la famille de l'IL-12. De façon intéressante, par rapport aux animaux non traités, les T CD4<sup>+</sup> les animaux ayant reçu les précurseurs d'intérêt changent leur profil de sécrétion cytokinique en diminuant significativement leur production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17, le GM-CSF, l'IFN $\gamma$  et l'IL-6 et en augmentant non moins significativement leur production de cytokines anti-inflammatoires comme le TGF $\beta$  et l'IL-27. Ces deux dernières cytokines produites par les CpG-pre-pDC fonctionnent séquentiellement dans la protection face à l'EAE : tout d'abord le TGF $\beta$  est essentiel aux phases précoces puis le relais est passé à l'IL-27 qui assure la protection plus tardivement, probablement suite à l'épuisement de la production du TGF $\beta$ .

L'injection de 200 000 de ces mêmes précurseurs dans un modèle murin de GVHD le lendemain de la reconstitution est également capable de réguler cette pathologie en diminuant à la fois les signes cliniques

et la mortalité associés à cette pathologie. Dans ce modèle, les CpG-pre-pDC ne migrent qu'assez peu directement aux organes cibles mais davantage au niveau de la rate et plus modérément à la moelle osseuse. De façon intéressante, dans chacun de ces organes, les CpG-pre-pDC se différencient en un unique phénotype assimilable à celui des pDC semi matures. Dans ce modèle, les CpG-pre-pDC produisent toujours fortement du TGF $\beta$ . En revanche, ils ne produisent presque plus d'IL-27, mais de l'IL-12p40, une autre cytokine de la même famille. Par ailleurs au niveau des cellules T pathogènes, les CD4+ et les CD8+ activés éteignent leur production d'IL-17 et dans une moindre mesure de GM-CSF. Toutefois, les T ne se mettent pas à produire de cytokines anti-inflammatoires comme c'était le cas dans l'EAE.

Il est intéressant de remarquer un certain nombre de mécanismes communs dans le fonctionnement des CpG-pre-pDC dans chacun de ces modèles. Tout d'abord au niveau des précurseurs eux-mêmes : les CpG-pre-pDC restent relativement immatures dans chacun de ces modèles en perdant dans tous les cas l'expression de c-kit mais en conservant des niveaux élevés de Sca-1. Ceci démontre que malgré des conditions inflammatoires très différentes et très intenses dans le cas de la GVHD, les précurseurs conservent une relative résistance à la maturation. Par ailleurs, il est remarquable que des cellules encore immatures restent absolument dans la voie de différenciation des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans des conditions inflammatoires aussi rigoureuses. Et ce, alors que les pDC matures peuvent sous certaines conditions d'activation se convertir en cDC. Il semble donc que la fidélité de lignage de ces cellules soit assurée par leur état immature et leur résistance à la maturation.

Par ailleurs, du point de vue de leur fonction, les précurseurs ne produisent pas les cytokines protectrices que leurs descendances se mettront à produire après avoir mûri dans leur modèle pathologique respectif. Il est donc intéressant de considérer les CpG-pre-pDC comme encore très malléables, parfaitement capables de s'adapter à des contextes inflammatoires divers. Par ailleurs, les CpG-pre-pDC en tant que tels ne semblent pas spécialement biaisés vers un phénotype anti-inflammatoire comme démontré par l'expérience de MLR. Il semble donc que l'environnement inflammatoire, davantage qu'un simple conditionnement des CpG-pre-pDC et leur descendance soit en réalité un élément clef de l'obtention d'un phénotype régulateur. Par ailleurs, suivant le modèle, les CpG-pre-pDC et leur descendance démontrent des capacités de prolifération très différentes. Cependant, dans l'EAE où les cellules ne prolifèrent pas, l'animal receveur présente un compartiment immunitaire plein et ne laisse donc que peu d'espace aux précurseurs injectés. En revanche dans le modèle de la GVHD, l'animal ayant été irradié létalement, il est généralement considéré comme quasiment vide. Or dans ce modèle les CpG-pre-pDC se multiplient intensément, probablement de manière homéostatique. Il est donc intéressant de considérer que l'expansion des précurseurs est en revanche un paramètre qui, bien que souvent associé à l'état immature, ne semble dépendre que de l'espace laissé dans la niche hématopoïétique.

Il est par ailleurs intéressant de constater que le profil migratoire des CpG-pre-pDC est dépendant du modèle pathologique auquel ces cellules sont confrontées. Nous avons postulé que, dans le cas de l'EAE, les CpG-pre-pDC et leur descendance migrent au niveau de la moelle épinière par le biais de l'intégrine CD11b. Cependant, cette même intégrine est également exprimée à la surface de la descendance des précurseurs dans le modèle de GVHD aiguë. Il est donc probable que l'expression de CD11b soit un élément constitutif de l'identité des précurseurs et de leur descendance qui pourrait les rendre particulièrement efficaces pour les modèles d'inflammation du SNC. Toutefois, l'implication relative du CD11b dans la migration au SNC doit encore être vérifiée. Les territoires assez différents dans lesquels migrent les différentes descendance des CpG-pre-pDC indiquent que si la fidélité de lignage est respectée, des modulations spécifiques peuvent être apportées en plus aux cellules afin de moduler finement leur activité et leur fonction. Il sera donc intéressant d'étudier dans le détail les modalités de migration de la descendance des CpG-pre-pDC dans chacun de ces modèles. Par ailleurs, il n'est pas invraisemblable que les CpG-pre-pDC et leur descendance induisent l'expansion de cellules régulatrices endogènes. En effet, nous avons pu mettre en évidence que dans le cas de l'EAE, ni les précurseurs ni leur descendance ne recrutent de pDC endogènes, dans le cas de l'aGVHD, une augmentation de cellules PDCA-1+ est notable dans la rate. En vertu du compte des cellules ainsi augmenté, il est fort probable que cette augmentation soit directement liée à la multiplication des précurseurs injectés, il n'est cependant pas impossible que les pDC matures présentes dans la moelle osseuse du donneur subissent également une expansion plus discrète. Il n'est en revanche que très peu probable que cette augmentation soit liée aux pDC du receveur dans la mesure où ce type cellulaire est peu radiorésistant et meurt rapidement après l'irradiation.

Malgré un socle commun de production du TGF $\beta$  pour les descendance des précurseurs d'intérêt, dans aucun cas nous n'avons pu constater une augmentation de CD3+CD4+foxp3+. Il n'est pas impossible que dans chacun des modèles étudiés, la cinétique d'observation ait été trop précoce. Toutefois, au moins dans le cas de l'EAE, nous avons pu démontrer grâce à des études précédentes que l'induction de Tregs peut parfaitement être détectable à J18. Il est donc probable que le mécanisme d'action du TGF $\beta$  dans ces modèles soit davantage par son action anti-inflammatoire directe que par l'induction de Tregs. Par ailleurs, les Tregs foxp3+ ne sont pas les seuls lymphocytes T régulateurs connus et nous avons postulé qu'au moins dans le modèle de l'EAE, l'induction de Th3 fasse partie du mécanisme de protection. Enfin, il est également possible que l'induction de Tregs ne fasse réellement pas partie des deux mécanismes de protection observés ici, mais que la régulation soit directement liée à la réduction des cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, les cellules T, en particulier les cellules mémoires, sont des cellules à très longue durée de vie. Il est donc probable que les effets obtenus au moins dans le cas de l'EAE puissent s'apparenter à une réponse vaccinale. Il serait donc intéressant de restimuler les animaux, ou ces lymphocytes T avec le peptide MOG<sub>35</sub>.

55 afin vérifier si ces cellules sont devenues hyperactives ou si une sous-classe de T se réactive rapidement afin d'empêcher la prolifération et/ou la production de cytokines pro-inflammatoires dans ce contexte.

Il existe au niveau du nombre de CpG-pre-pDC employés pour le traitement de l'EAE et de l'aGVHD une différence substantielle (80 000 contre 200 000). Bien que dans les deux cas, le nombre de cellules injectées reste faible, le traitement de la GVHD requiert plus du double de précurseurs pour un traitement de la pathologie moins convainquant que pour l'EAE. Il semble donc que pour pouvoir obtenir une protection d'ordre comparable à celle obtenue dans l'EAE, il faille encore augmenter le nombre de précurseurs injectés. Cette différence est probablement liée à deux différences majeures entre les deux pathologies. D'une part, l'EAE est un modèle auto-immun circonscrit à un organe, ce qui permet que les précurseurs ne soient pas éparpillés dans l'organisme mais restent focalisés sur un seul site migratoire. D'autre part, la GVHD est un modèle inflammatoire beaucoup plus violent que l'EAE et la tempête cytokinique qui se déroule juste après la greffe fait intervenir des quantités particulièrement importantes de cytokines qui sont capables, seules, de provoquer la mort cellulaire. Il est donc probable qu'en plus de se disperser dans le cas de la maladie systémique qu'est la GVHD, une partie des CpG-pre-pDC meurent par AICD ce qui requiert donc un inoculum plus important afin de bénéficier de nombre équivalent de précurseurs actifs dans l'animal.

Il reste également un point très important qu'il nous faudra éclaircir concernant les CpG-pre-pDC : les capacités protectrices de ces cellules sont-elles assurées par le précurseur lui-même, sa descendance ou les deux. Pour étudier cela, nous aurions besoin de pouvoir bloquer la relative maturation des cellules, or il n'y a pas de facteur bloquant la différenciation des CpG-pre-pDC qui ne soit pas déjà exprimé au stade du précurseur. Il est probable que l'analyse transcriptomique de la population permette de mettre en avant l'expression de gènes qui pourraient s'avérer utiles dans cette approche.

## **II/ Comparaison entre la protection offerte par des cellules matures et immatures**

Il est intéressant de constater que jusqu'à aujourd'hui les cellules immatures sont encore regardées comme une étape vers un phénotype plus différencié et non pas comme un état à part entière qui peut être doté de caractéristiques fonctionnelles originales. Ces dernières années ont pourtant vu la connaissance scientifique s'enrichir de populations de cellules qui ont besoin de régresser dans leurs stades développementaux afin d'acquérir certaines caractéristiques requises pour répondre à un besoin physiologique, comme c'est le cas de la microglie (Yokoyama et al., 2004).

Généralement, les DC sont considérées comme pouvant présenter deux états : « matures » et « immatures ». Dans la littérature, les DC immatures sont présentées comme des cellules peu capables

de présenter l'antigène du fait de leurs niveaux d'expression du CMH-II et de molécules de costimulation faibles. Il conviendrait de mieux définir en quoi consiste l'immaturation des DC. En effet, les DC dites immatures ne le sont souvent qu'au regard de leur fonction d'APC et ne nécessitent qu'un antigène à traiter pour être catégorisées comme « matures ». Or, le CMH-II ne peut pas être présent en grande quantité à la surface d'une cellule s'il est vide : il est alors très instable et est très rapidement recyclé (Reich et al., 1997), d'où le niveau faible de CMH-II à la surface des DC dites « immatures ». Par contraste, les autres cellules immunitaires catégorisées comme immatures sont des cellules qui ne sont pas ou peu engagées dans un lignage et qui gardent un potentiel prolifératif important. Au stade CMH-II<sup>lo</sup>, CD80/86<sup>lo</sup>, les DC sont déjà pleinement engagées dans leur lignage et ne possèdent pas ou très peu de potentiel prolifératif y compris dans des conditions adéquates (Cavanagh et al., 1998), à l'exception notable des DC cancéreuses, connues pour un phénotype régressif.

Par comparaison avec les tolDC, les CpG-pre-pDC et leur descendance semblent présenter un certain nombre d'avantages. Tout d'abord, il est connu que l'injection de DC tolérogènes dans certains modèles fortement inflammatoires peut entraîner la maturation de ces cellules et la perte de leur phénotype régulateur au profit d'un profil activateur délétère, en particulier chez l'Homme (Berger et al., 2009). Il semble dans notre cas que malgré un environnement inflammatoire très fort, les CpG-pre-pDC restent non seulement immatures mais conservent leur phénotype régulateur. Dans le cas de l'EAE, le risque de réversion phénotypique est par ailleurs assez faible puisque nous ne parvenons pas à retrouver les cellules injectées au-delà de jour 21 (soit 9 jours après injection), ce qui suggère que les CpG-pre-pDC et leur descendance sont actifs le temps de la mise en place de la protection puis, soit meurent, soit migrent vers un autre organe comme cela a pu être mis en évidence avec d'autres précurseurs utilisés par notre équipe (Montandon et al., 2013). Par ailleurs, de manière générale, le nombre de DC tolérogènes requises afin de mettre en place une protection que ce soit dans un modèle auto-immun ou allogénique est compris entre  $5 \cdot 10^6$  et plusieurs millions par animal receveur (Zhou et al., 2016). Il est probable que la différence observable dans les quantités de cellules requises soit en partie due au fait que contrairement aux tolDC, les CpG-pre-pDC sont capables de se diviser *in vivo* dans l'hôte après injection. Enfin, de la même manière que pour les tolDC, si la durée de vie des CpG-pre-pDC est assez courte, l'effet induit par ces cellules est de longue durée par l'induction de cellules T présentant un phénotype régulateur qui ont par ailleurs la potentialité de devenir des cellules mémoires.

Le traitement par thérapie cellulaire utilisant directement des Tregs matures compte de nombreux succès. Toutefois, à nouveau, le traitement par l'utilisation de CpG-pre-pDC présente un certain nombre d'avantages. Tout d'abord, comme ce sera le cas pour l'écrasante majorité des cellules matures, le nombre de Tregs requis pour mettre en place une protection efficace contre l'EAE est bien plus important que celui des CpG-pre-pDC. Cependant, les Tregs présentent le très gros avantage de pouvoir être multipliés et

entretenus pendant plusieurs semaines *ex vivo* assez simplement. Cette méthode de multiplication *ex vivo* des cellules est ainsi le plus souvent un pré-requis pour la thérapie cellulaire utilisant des Tregs bien qu'elle comporte un certain nombre de risques, en particulier en pouvant favoriser une population effectrice contaminante autrement discrète. Par ailleurs, tout comme dans le cas des DC, les Tregs présentent en condition inflammatoire un phénotype labile pouvant diverger vers un phénotype activateur de type Tfh. Enfin, contrairement aux CpG-pre-pDC, les Tregs sont soumis à un récepteur spécifique qui restreint leur activité, ce qui peut, entre autres, expliquer l'utilisation de quantités cellulaires très importantes pour un effet parfois assez modique. Les nouvelles approches de CAR Tregs actuellement testées chez l'animal pourront se révéler être une solution adéquate pour surmonter ces limitations. Par contraste, l'utilisation des CpG-pre-pDC est plus simple, plus rapide et ne requiert pas l'emploi du génie génétique. Dans le cas de l'EAE en particulier, les CpG-pre-pDC présentent l'avantage indéniable d'être efficaces à toutes les phases de la pathologie là où les Tregs ne sont réellement efficaces que lorsqu'ils sont injectés en préventif ce qui limite fortement leur intérêt en clinique (Vandenbark and Offner, 2008). Dans le cas de la GVHD, les Tregs nécessitent d'être injectés en quantité pharaonique pour être efficaces et les résultats obtenus sont très mitigés en particulier en clinique humaine. Par ailleurs, dans le cadre de réponses allogéniques, la question de la source des Tregs est un réel problème, qui ne se pose pas avec les CpG-pre-pDC.

Les mécanismes de protection mis en place par les Bregs et les CpG-pre-pDC présentent un certain nombre de points communs, en particulier dans la régulation de l'auto-immunité. Dans le cas de la protection face à l'EAE induite par les Bregs, trois cytokines sont centrales : l'IL-10, l'IL-35 et le TGF $\beta$ . Nous avons démontré que ni les CpG-pre-pDC ni leur descendance ne produisent d'IL-10, ni ne l'induisent chez les lymphocytes T. En revanche, l'IL-35 est de la même famille moléculaire que l'IL-12 et l'IL-27 qui sont fortement exprimés respectivement dans la GVHD et l'EAE. Si dans le cas de la GVHD, le rôle de l'IL-12 n'a pas encore été démontré, nous avons mis en évidence que l'IL-27, en combinaison avec le TGF $\beta$  sont un couple de cytokines clefs pour la protection contre l'EAE. Par ailleurs, la régulation induite par les Bregs passe par la modulation de l'équilibre Th1-Th17/Th2 (Han et al., 2016). Si nous n'avons pas mis en évidence une augmentation du nombre de Th2 dans les souris EAE traitées par les CpG-pre-pDC, nous avons par contre montré une nette diminution des cytokines de type Th17 et Th1. Il serait donc intéressant de mesurer la quantité de T producteurs d'IL-4 au niveau de la moelle épinière des animaux traités par les CpG-pre-pDC. Par ailleurs, l'un des mécanismes potentialisant la régulation par les Bregs est la suppression de l'activité des macrophages et des DC. Nous n'avons pas documenté cet aspect cellulaire de la protection par les précurseurs étudiés. Si les CpG-pre-pDC utilisent un relais par les DC, cela pourrait également expliquer la raison pour laquelle un inoculum si faible est capable d'induire un effet aussi puissant. Toutefois, les mécanismes de protection par les Bregs et les CpG-pre-pDC présentent un certain nombre de différences. Tout d'abord, comme pour tous les cas de cellules matures détaillés ici, le nombre de Breg nécessaire pour

protéger des animaux face à l'EAE est compris entre  $1.10^6$  et  $5.10^6$  cellules par animal traité. Cependant, à nouveau les Bregs peuvent être multipliés *ex vivo*, bien qu'ils présentent, comme les CpG-pre-pDC, une certaine fragilité en culture. De plus, l'un des mécanismes phare de la protection par les Breg et qui constitue probablement la principale différence avec les CpG-pre-pDC, est l'induction de Tregs, laquelle implique le TGF $\beta$ , l'IL-10 et l'IL-35 précédemment évoqués. Par ailleurs, dans le cadre de l'EAE, une partie des cellules B est pathogène. À l'heure actuelle, la stabilité du phénotype des Bregs *in vivo* n'est pas claire et est probablement variable entre les différentes sous-classes de Bregs suivant qu'elles sont issues de cellules naïves, mémoire ou transistionnelles (Rosser and Mauri, 2015). Ainsi, là où nous sommes confiants dans la stabilité du phénotype et de la fonction des CpG-pre-pDC et de leur descendance, les Bregs pourraient présenter un risque potentiel en cas de bifurcation vers un phénotype activateur.

Il est difficile de comparer les CpG-pre-pDC aux pDC matures régulatrices du fait du nombre faible d'études s'étant intéressées au transfert adoptif de ces populations. L'élément principal, au regard des mécanismes décrits jusqu'ici pour la régulation par les pDC matures, repose souvent sur la production d'IFN de type I par ces cellules, ce qui n'est pas ici le cas. Par ailleurs, comme précédemment décrit, les pDC peuvent, sous certaines conditions d'activation, se différencier vers un phénotype de DC conventionnelles, ce qui n'est pas non plus le cas des CpG-pre-pDC. Par ailleurs, un certain nombre de mécanismes régulateurs mis en place par les pDC tolérogènes impliquent l'induction de Treg ce qui n'est à nouveau pas le cas avec les CpG-pre-pDC (Matta et al., 2010). Il pourrait être intéressant de caractériser les capacités régulatrices de CpG-pre-pDC induits par la culture de moelle osseuse totale avec du CpG-P, spécialisé dans l'induction d'IFN de type I afin d'évaluer si dans ces conditions les précurseurs ainsi induits sont non seulement toujours capables de protéger mais si les mécanismes de protection alors mis en jeu se rapprocheraient davantage de ceux connus des pDC matures. Il pourrait ainsi être intéressant de comparer les signatures moléculaires des différentes populations de pDC protectrices afin d'éventuellement définir une signature régulatrice commune.

La nouvelle population de CpG-pre-pDC décrite présente également un certain nombre de limites par comparaison avec des cellules matures. La première étant les conditions de culture très exigeantes requises pour l'émergence de cette population. En particulier ces précurseurs nécessitent une absence stricte d'endotoxine dans le milieu de culture, sous peine de perdre le phénotype régulateur des CpG-pre-pDC en parallèle d'un rendement particulièrement faible. Par ailleurs, le nombre de ces cellules que nous pouvons obtenir est relativement fixe, du fait de l'impossibilité de maintenir et de multiplier ces cellules *ex vivo* actuellement. Toutefois, dans la mesure où, bien souvent, le nombre de cellules nécessaires pour établir une protection chez les humains est beaucoup moins élevé que pour les souris, il n'est pas certain que ce dernier point soit limitant pour une éventuelle application à l'Homme.

### **III/ Comparaison entre les CpG-pre-pDC et les CpG-proB**

Notre laboratoire a déjà décrit une autre population immature régulatrice capable de réguler plusieurs pathologies : les CpG-proB (en annexe). Ces cellules et les CpG-pre-pDC présentent un certain nombre de similarités à commencer par leur émergence dans des conditions identiques. Par ailleurs, les CpG-pre-pDC, comme les CpG-proB, présentent des modalités de protection dépendantes de la pathologie à laquelle ces progéniteurs doivent faire face, ce qui dénote donc une relative malléabilité du phénotype régulateur. Cependant de nombreux points divergent entre les CpG-pre-pDC et les CpG-proB. Tout d'abord, les CpG-proB ne sont pas actifs à toutes les phases comme les CpG-pre-pDC mais ont besoin de rencontrer des lymphocytes T activés, requérant de l'INF $\gamma$  pour la mise en place de leur protection. De ce point de vue, il semble donc que les CpG-pre-pDC soient plus souples. Par ailleurs, l'action des CpG-proB n'est que brièvement assurée par le progéniteur lui-même mais dépend fortement de sa descendance, de type B régulatrice. Ces cellules adoptent un phénotype mature au stade actif bien qu'elles bénéficient de la souplesse de la phase immature en étant capables de s'adapter au type de pathologie auquel elles doivent faire face. Par ailleurs, la protection établie par les CpG-proB dans l'EAE repose sur deux facteurs : l'induction de Tr1 et de B10 et la séquestration des T pathogènes en périphérie. Cette rétention dans les ganglions n'est pas sans faire penser aux sites immunoprivilégiés, en interdisant l'accès du système nerveux central aux cellules encéphalitogènes. De cette façon, la protection mise en place présente les mêmes risques que ceux relatifs aux sites immunoprivilégiés, à savoir que si pour une raison quelconque l'exemption est perdue, l'animal est ainsi exposé à une arrivée massive de cellules pathogènes pouvant se traduire par une poussée fulgurante de la maladie, malgré la présence des Tregs. Dans la mesure où nous ne connaissons pas la durée de vie de ces cellules, nous ne savons pas si le privilège sera perdu après la mort de la descendance des CpG-proB ou s'il sera toujours assuré par des cellules tierces et/ou mémoires. De ce point de vue, la protection plus directe permise par les CpG-pre-pDC semble intéressante par l'allègement du risque latent de reprise de la pathologie. De plus, les CpG-proB présentent des contraintes propres qui empêchent l'injection de grandes quantités de ces cellules à l'animal receveur dans le cadre de l'EAE, ce qui ne semble pas être le cas des CpG-pre-pDC. En revanche, les CpG-proB présentent l'énorme avantage par rapport aux CpG-pre-pDC de pouvoir être multipliées *ex vivo* tout en conservant leur phénotype immature.

### **IV/ Perspectives**

L'objectif à long terme est l'application de ces CpG-pre-pDC pour le traitement de la sclérose en plaques et la maladie du greffon contre l'hôte humain. À l'heure actuelle, ces deux pathologies sont assez



répandues et, étant donné la tendance à l'augmentation du nombre de cas ces dernières années, il est réellement urgent de pouvoir définir des voies thérapeutiques efficaces et sûres pour les patients. Ceci est à fortiori le cas pour ceux qui présentent des formes réfractaires, dont la prise en charge est actuellement difficile, et se solde trop souvent par le décès de l'intéressé. Il n'est pas certain de pouvoir trouver un équivalent exact des CpG-pre-pDC chez l'Homme, en particulier car certains antigènes utilisés pour la définition des CpG-pre-pDC n'existent pas chez l'Homme. Par conséquent il faudra probablement tester plusieurs phénotypes potentiels afin de définir la ou les populations qui se rapprocheront au maximum de celles décrites chez l'animal. Par ailleurs, la source de ces cellules pourra poser question : faudra-t-il utiliser la moelle osseuse humaine adulte sachant que les animaux utilisés dans nos études sont l'équivalent d'animaux encore jeunes ou plutôt se tourner vers du sang de cordon, plus riche en CD34<sup>+</sup> ? Par ailleurs, dans la mesure où nous savons que les CpG-pre-pDC se comportent de manière très différentes *in vitro* et *in vivo*, nous ne savons dans quelle mesure il sera possible d'anticiper le comportement de l'équivalent humain de ces cellules. Il sera donc probable que l'utilisation d'animaux humanisés très coûteux soit requise pour cette étude. Par ailleurs, les CpG-pre-pDC étant très rares dans la moelle osseuse des animaux (0.1-0.2%), il nous faudra estimer le prélèvement de moelle osseuse au patient afin de définir un cadre d'application, en excluant en particulier les patients trop faibles pour supporter une procédure aussi lourde. Par ailleurs, il serait nécessaire de définir les modalités du phénotype régulateur des CpG-pre-pDC, chez la souris puis chez l'Homme. En particulier, il est très probable que cette population obtienne sa fonction régulatrice par la modulation épigénétique de certains gènes cibles. Il serait intéressant, voire nécessaire, de s'intéresser à la nature de ces modifications. Il serait alors envisageable d'estimer, par exemple, la stabilité à long terme de la « mémoire épigénétique » régulatrice des CpG-pre-pDC.

Malgré toutes ces contraintes à venir pour une éventuelle application des CpG-pre-pDC à l'Homme, ces cellules sont un outil thérapeutique potentiel puissant qui pourrait permettre de traiter les formes conventionnelles et réfractaires de la SEP et de la GVHD, soit seules soit en combinaison avec les traitements déjà utilisés actuellement pour la prise en charge de ces maladies.

**Annexe : Collaboration scientifique**

**Article n°2**

**Treatment of ongoing autoimmune encephalomyelitis with activated B-cell progenitors maturing into regulatory B cells.**

**Nature Communications, 2016 Jul 11;7:12134.**

Korniotis S, Gras C\*, Letscher H\*, Montandon R, Mégret J, Siegert S, Ezine S, Fallon PG, Luther SA, Fillatreau S, Zavala F.

ARTICLE

Received 3 Sep 2015 | Accepted 2 Jun 2016 | Published 11 Jul 2016

DOI: 10.1038/ncomms12134

OPEN

# Treatment of ongoing autoimmune encephalomyelitis with activated B-cell progenitors maturing into regulatory B cells

Sarantis Korniotis<sup>1,2</sup>, Christophe Gras<sup>1,2,\*</sup>, Hélène Letscher<sup>1,2,\*</sup>, Ruddy Montandon<sup>1,2,†</sup>, Jérôme Mégret<sup>2,3</sup>, Stefanie Siegert<sup>4</sup>, Sophie Ezine<sup>1,2</sup>, Padraic G. Fallon<sup>5</sup>, Sanjiv A. Luther<sup>4</sup>, Simon Fillatreau<sup>1,2,6,7</sup> & Flora Zavala<sup>1,2</sup>

The influence of signals perceived by immature B cells during their development in bone marrow on their subsequent functions as mature cells are poorly defined. Here, we show that bone marrow cells transiently stimulated *in vivo* or *in vitro* through the Toll-like receptor 9 generate proB cells (CpG-proBs) that interrupt experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) when transferred at the onset of clinical symptoms. Protection requires differentiation of CpG-proBs into mature B cells that home to reactive lymph nodes, where they trap T cells by releasing the CCR7 ligand, CCL19, and to inflamed central nervous system, where they locally limit immunopathogenesis through interleukin-10 production, thereby cooperatively inhibiting ongoing EAE. These data demonstrate that a transient inflammation at the environment, where proB cells develop, is sufficient to confer regulatory functions onto their mature B-cell progeny. In addition, these properties of CpG-proBs open interesting perspectives for cell therapy of autoimmune diseases.

<sup>1</sup>Institut Necker Enfants Malades, Immunology, Infectiology and Haematology Department, Inserm U1151, CNRS UMR 8253, 14 rue Maria Helena Vieira da Silva, CS 61431, Paris 75014, France. <sup>2</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine Site Necker, 14 rue Maria Helena Vieira da Silva, CS 61431, Paris 75014, France. <sup>3</sup>Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US 24, CNRS UMS 3633, Paris 75014, France. <sup>4</sup>Department of Biochemistry, University of Lausanne, Epalinges 1066, Switzerland. <sup>5</sup>Department of Medicine, Trinity Biomedical Sciences Institute, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland. <sup>6</sup>Assistance Publique—Hopitaux de Paris (AP-HP), Hopital Necker Enfants Malades, Paris 75015, France. <sup>7</sup>Deutsches Rheuma-Forschungszentrum, a Leibniz Institute, Chariteplatz 1, Berlin 10117, Germany. \* These authors contributed equally to this work. † Present address: Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SA, UK. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.Z. (email: flora.zavala@inserm.fr).



**B** lymphocytes exert complex functions in autoimmune diseases. On the one hand they can promote these diseases, as shown by the beneficial effects of B-cell depletion therapies in rheumatoid arthritis or multiple sclerosis (MS)<sup>1–3</sup>. On the other hand, their negative regulatory functions can provide protection, as initially shown in models of ulcerative colitis<sup>4</sup>, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)<sup>5</sup> and collagen-induced arthritis<sup>6</sup>. More precisely, mice with an interleukin (IL)-10 deficiency restricted to B cells developed a severe chronic form of EAE, while those harbouring wild-type (WT) B cells rapidly recovered from disease<sup>5</sup>. The unique capacity of B cells to reduce the severity of autoimmune diseases through provision of IL-10 has kindled enormous interest in the identification of the responsible B-cell sub-populations, and the signals controlling their expression of suppressive functions. Several B-cell subsets can produce IL-10 on stimulation *in vitro*, and protect recipient mice from autoimmune disease on adoptive transfer. These include B10 cells with a CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>high</sup> phenotype, transitional type 2 (T2)-marginal zone precursors, and CD5<sup>+</sup> B-1 cells (refs 7–9). Moreover, analysis of the cells producing IL-10 in a suppressive manner *in vivo* identified CD138<sup>hi</sup> plasma cells residing either in spleen<sup>10</sup> or LN<sup>11</sup> as major IL-10 producers during EAE. In addition, IL-35 (ref. 10) and PD-L1 (ref. 12) were recently shown to mediate protection against EAE displayed by B regulatory cells.

Toll-like receptor (TLR) agonists are particularly important in this context because of their unique capacity to induce IL-10 expression in mature naive B cells, and the requirement for intrinsic TLR signalling in B cells for recovery from EAE<sup>13</sup>. Similarly, CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>high</sup> B cells depend on activation by TLR-4 or -9 agonists to produce IL-10 *in vitro*<sup>14</sup>. In addition to intrinsic TLR signalling, signals provided to B cells through the BCR or CD40 are also necessary to achieve a fully protective B-cell-mediated regulation<sup>5,15–19</sup>.

Human B cells can also produce IL-10, and evidence is accumulating that they can subsequently behave as negative regulators of immunity. Duddy *et al.*<sup>20</sup> found that B cells from MS patients produce lower amounts of IL-10 on activation than their counterparts from healthy individuals, suggesting that MS is facilitated by a defect in this regulatory circuit. This defective IL-10 production was subsequently confirmed by Correale and Farez<sup>21</sup> who observed that helminth infections could restore normal IL-10 production by B cells in this disease, which correlated with an improvement of the disease course compared with non-infected patients. These data suggest that promoting B-cell-mediated regulation might help to reduce MS progression. Of note, some MS treatments, such as interferon (IFN)- $\beta$ <sup>22</sup> or glatiramer acetate<sup>23,24</sup> have been shown to enhance IL-10 secretion by B cells.

Although our knowledge of the peripheral B-cell subsets implicated in immune regulation, and the signals controlling their regulatory activity has greatly improved, we still have little data on whether B-cell development in bone marrow (BM) might influence the subsequent capacity of mature B cells to negatively regulate immunity in periphery. We recently gained some evidence of this by showing that proB cells emerging from BM cell cultures transiently stimulated with the TLR-9 agonist CpG prevented type 1 diabetes in NOD mice on adoptive transfer<sup>25</sup>. These cells, which we termed as CpG-proB cells, differentiated into various more mature B-cell subsets in recipient mice. We could demonstrate that they provided protection by reducing pathogenic IL-21 secretion by T cells, and by promoting apoptosis of T-effector cells<sup>25</sup>. However, it was difficult to further analyse how the administered CpG-proBs protected recipient mice from disease in this model due to the lack of mutant mouse strains on the NOD background. We therefore

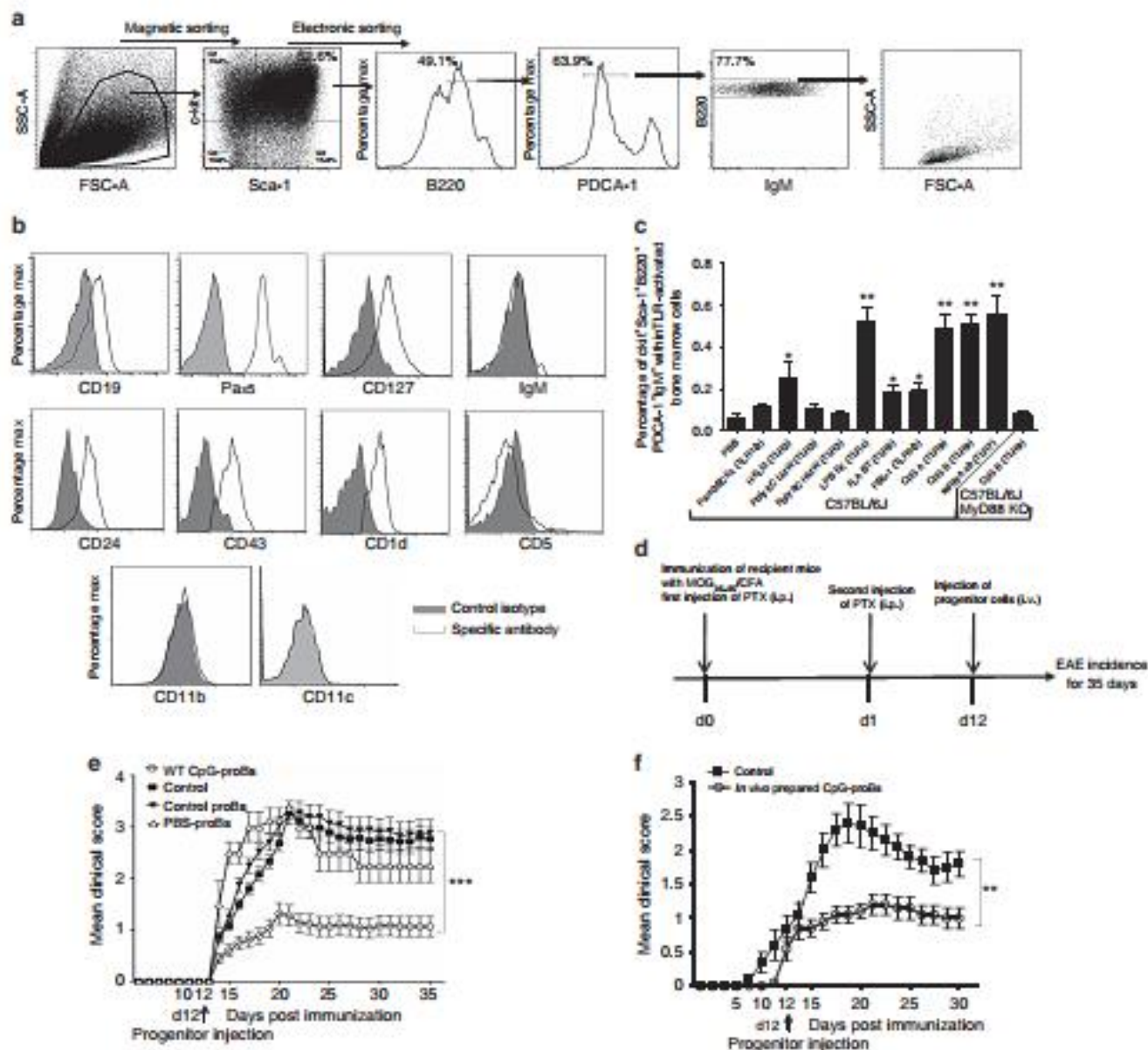
addressed the question, whether a similar subset emerged in the C57BL/6 mouse strain. To this end, we used the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)<sub>35–55</sub>-induced EAE model in which B-cell-mediated regulation has been extensively studied. So far described regulatory B-cell subsets only acted at the initiation phase of the disease, except PD-L1<sup>hi</sup> mature splenic B cells of which 1 million cells injected at day 7 after immunization provided protection against EAE<sup>12</sup>, albeit milder than when injected at day 0. However, we find that a single injection of only 60,000 CpG-proB cells at the onset of EAE clinical signs markedly reduces disease progression in recipient mice. In contrast, adoptive transfer of control non-stimulated proBs does not influence the disease course in recipient mice. This suppression requires the differentiation of the administered CpG-proB cells into mature B cells in the periphery and in the central nervous system (CNS). Collectively, these results shed light on the importance of the BCR-independent signals that B-cell progenitors receive in the BM environment to develop into mature B cells with regulatory rather than inflammatory functions. In addition, these properties of CpG-proBs open interesting perspectives for cell therapy of autoimmune diseases.

## Results

**ProB cells exposed to CpG protect against ongoing EAE.** We previously found that on short-term incubation with CpG-1668 (CpG-B), BM cells from NOD mice gave rise to a population of pro-B cells that protected recipient mice from diabetes on adoptive transfer<sup>25</sup>. To assess whether a similar process took place in a strain of mice which are more amenable to genetic studies, we evaluated the effect of CpG-B on BM cells from C57BL/6J mice. This treatment led to emergence of cells expressing a c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> phenotype, and heterogeneous in terms of PDCA-1 expression (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1). A similar BM population was observed *in vivo* in mice after i.p. injection of CpG-B, validating the use of *in vitro* cultures (Supplementary Fig. 2). The bright B220<sup>+</sup> cells are gated out since they correspond to the more mature B cells contaminating the c-kit<sup>+</sup> magnetically sorted cells. Moreover, since TLR-9 stimulation has been shown to promote deviation of hematopoiesis away from the B-cell lineage towards the PDCA-1<sup>+</sup> plasmacytoid dendritic cell lineage<sup>26</sup>, B-cell precursors were further sorted by excluding the PDCA-1<sup>+</sup> fraction (Fig. 1a). The resulting PDCA-1<sup>-</sup> population was closely related to the pro-B cell stage of differentiation, being CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>, as well as expressing the IL-7R $\alpha$  chain (CD127), CD43 and the transcription factor Pax5 (Fig. 1b and Supplementary Fig. 3a) characterizing B-cell lineage commitment. They all expressed CD1d, but were negative for CD5 (Fig. 1b). It is noteworthy that this effect was not restricted to TLR-9 agonists, because agonists of TLR-2, -4, -5, -6 and -7 induced development of a similar population, unlike agonists of TLR-1 and -3 (Fig. 1c). As expected, these cells did not appear in BM cell cultures from MyD88-deficient mice after incubation with CpG-B (Fig. 1c). Collectively, these data suggest that TLR agonists induce *in vitro* and *in vivo* the formation of a unique population of proB cells in BM from C57BL/6 mice, as previously found in NOD mice<sup>25</sup>.

We next examined whether these cells could protect recipient mice from EAE on adoptive transfer. Remarkably, a single injection of only 60,000 CpG-proBs (Fig. 1d) isolated either from *in vitro* BM cell culture activated with CpG (Fig. 1e, Table 1) or from BM of CpG-injected donors (Fig. 1f) to mice at the time of EAE onset (d12 after immunization) resulted in a marked attenuation of the disease course, relative to control mice that received only phosphate-buffered saline (PBS). Conversely, neither control pro-B cells isolated using their typical markers





**Figure 1 | Phenotypic analysis of CpG-induced  $c\text{-kit}^+ Sca\text{-1}^+ B220^+ PDCA\text{-1}^- IgM^-$  BM cells and assessment of disease protection against ongoing EAE. (a)** BM cells incubated for 18 h with CpG-B ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), were magnetically selected for  $c\text{-kit}^+$  cells, further labelled for Sca-1, B220, PDCA-1 and IgM and electronically sorted into small-size ( $FSC^{\text{low}}SSC^{\text{low}}$ )  $c\text{-kit}^+ Sca\text{-1}^+ B220^+ PDCA\text{-1}^- IgM^-$  cells. **(b)** Flow cytometry analysis of indicated B-cell markers expression by CpG-proB cells after cell-sorting as in **a**. **(a,b)** Cells were stained with specific antibodies (open histograms) or isotype controls (filled histograms). **(c)** Frequency of  $c\text{-kit}^+ Sca\text{-1}^+ B220^+ PDCA\text{-1}^- IgM^-$  cells emerging among BM cells after 18 h of incubation with different TLR agonists. CpG-B was tested in BM cell cultures of both WT and MyD88<sup>-/-</sup> C57BL/6J mice. Results are expressed as means  $\pm$  s.e.m. from three experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$  when comparing stimulated and unstimulated BM cells, using non-parametric Mann-Whitney's  $t$ -test. **(d)** Experimental protocol for MOG<sub>35-55</sub> EAE disease induction and intravenous progenitor cell transfer (60,000 cells per mouse) at day 12 post-immunization. **(e,f)** EAE clinical scores (mean  $\pm$  s.e.m.) over 35 days of the indicated groups of mice. **(e)**  $n = 30$  mice per group, except for PBS-ProB-recipients in which  $n = 4$  mice. **(f)**  $n = 10$  mice per group; \*\*\* $P < 0.001$  when comparing control mice injected with PBS and recipients of WT CpG-proBs by two-way repeated measures ANOVA test. \*\* $P < 0.005$ , between mice injected with *in vivo* prepared CpG-proBs and other groups, non significant between all other groups.

**Table 1 | Adoptive transfer of CpG-proB cells but not of control pro-B cells inhibits ongoing EAE.**

Group	Mice	Mean maximum score $\pm$ s.e.m.	Day of onset $\pm$ s.e.m.	Disease incidence
Control	30	3.51 $\pm$ 0.89	13.56 $\pm$ 1.40	100%
WT CpG-proBs	30	1.56 $\pm$ 1.26**	14.50 $\pm$ 2.22	76.7%*
Control ProBs	20	3.57 $\pm$ 0.92	13.30 $\pm$ 2.22	100%
PBS-proBs	4	3.50 $\pm$ 0.05	12.00 $\pm$ 0.00	100%

Clinical parameters from data in Fig. 1e, including the maximum clinical score (mean  $\pm$  s.e.m.) of each treatment group and the day of disease onset (mean  $\pm$  s.e.m.) among mice with EAE as well as the disease incidence over the entire observation period (35 days). Control mice received PBS injection instead of progenitor injection. Significant differences between CpG-proB recipients versus control mice are indicated; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , assessed by non-parametric Mann-Whitney's  $t$ -test.



CD24 and CD43, from fresh non-stimulated BM, as c-kit<sup>+</sup> Sca1<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> CD24<sup>hi</sup> CD43<sup>hi</sup> cells (Fig. 1e and Supplementary Fig. 3b), nor cells detected within BM culture with PBS over 18 h exhibiting the same phenotype as CpG-proB cells but at a 6–10-fold less frequency, termed PBS-proBs, had any effect in recipient mice (Fig. 1e). Therefore transient *in vitro* and *in vivo* TLR-9-dependent activation within the BM confers protective properties onto proB cells against ongoing EAE. A dose-response study (Supplementary Fig. 4) showed that injection of 60,000 CpG-proBs was optimal for protection against EAE. Neither 25,000 nor 90,000 injected cells provided significant protection, the latter possibly resulting from cell aggregation or, alternatively, from hindrance in access of cells into the hematopoietic niche of non-irradiated recipients.

#### CpG-proB cells modify immune cell response and distribution.

To characterize the protective effect of the injected progenitors on encephalitogenic T cells, we analysed the expression of pro-inflammatory cytokines by CD4<sup>+</sup> T cells in treated mice at the peak of the disease (d18–d21). In spinal cord, which is a major target organ in EAE, mice treated with CpG-proB cells had reduced numbers of CD4<sup>+</sup> T cells producing all pathogenic cytokines tested, namely GM-CSF, IL-17 and IFN- $\gamma$  (Fig. 2a,c). In LN, production of GM-CSF by CD4<sup>+</sup> T cells was reduced, whereas expression of IL-17 and IFN- $\gamma$  were not affected in treated mice compared with controls (Fig. 2b,c). In addition, production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by CD4<sup>+</sup> T and B220<sup>+</sup> B cells was enhanced in treated mice in both tissues (Fig. 2d–g), which was paralleled by an increased frequency of CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Fig. 2h,i), showing a modestly enhanced Foxp3 expression (Fig. 2j).

To further delineate how the transferred CpG-proBs protected from EAE, we analysed immune cell distribution in recipient mice, in comparison with control mice with EAE. Remarkably, mice treated with CpG-proB cells displayed increased cell numbers and particularly CD4<sup>+</sup> T cells in LN, while having markedly fewer total and CD4<sup>+</sup> T cells in spinal cord compared with controls (Fig. 2k).

In sum, these data show that the administered B cells impact on the disease process both at the level of the CNS and LN.

#### CpG-proB cells migrate and differentiate into mature Bregs.

To trace the migration and follow the differentiation of the administered CpG-proB immature cells, we injected 60,000 CpG-proB cells prepared from BM of congenic CD45.1 mice into CD45.2 recipient mice at day 12 after EAE induction (Fig. 3a). On day 9 after transfer, CD45.1<sup>+</sup> cells were mainly found in reactive, cervical, axillary and inguinal, but not mesenteric, lymph nodes (LNs; 113,900  $\pm$  3,500 cells, mean  $\pm$  s.e.m.), and spinal cord (27,880  $\pm$  3,218 cells), with only few cells present in spleen (5,000  $\pm$  1,098 cells; Fig. 3b). It is noteworthy that the total number of donor-derived cells was about threefold higher in recipients than the number of injected cells, indicating that they expanded *in vivo*. Using different B-cell and other lineage markers, we assessed that the transferred CpG-proBs differentiated exclusively into the B-cell lineage (Fig. 3c,d). In LN, the recovered CD45.1<sup>+</sup> cells displayed a B220<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> IgG<sup>-</sup> CD1d<sup>+</sup> CD21<sup>+</sup> CD23<sup>hi</sup> phenotype typical of transitional B cells (Fig. 3c). This population was, however, heterogeneous, comprising about 70% of CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup>, and 20% of CD5<sup>+</sup> cells (Fig. 3c). In spinal cord, donor-derived B cells were comparable to their LN counterparts in their B220<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> IgG<sup>-</sup> phenotype (Fig. 3d) but with lower levels of CD21 and CD23 than in LNs and exclusively CD1d<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>, therefore similar to B10 cells. While the CD45.1<sup>+</sup> B-cell progeny of injected

progenitors represented only 0.77  $\pm$  0.14% of B cells in the LNs, they represented nearly eightfold more, that is, 5.97  $\pm$  1.32% of B cells, in the spinal cord (Fig. 3e,f). Remarkably, CD45.1<sup>+</sup> B cells produced the anti-inflammatory cytokine IL-10 in spinal cord, but not in LN (Fig. 3g).

These data demonstrate that the transferred CpG-proB cells give rise to more mature B cells that accumulate in reactive—cervical and inguinal—LN and inflamed CNS during EAE.

To assess whether such differentiation of CpG-proB cells into more mature B cells was required for protection against EAE, CpG-proB cells from CD45.1<sup>+</sup> Rag2<sup>-/-</sup> mice (prepared as in Supplementary Fig. 5) whose differentiation into mature B lymphocytes is blocked, were adoptively transferred. They had no effect on the disease course (Fig. 4a). Injected cells from CD45.1<sup>+</sup> Rag2<sup>-/-</sup> donors could not be found in LNs or spinal cord at 3, 5 or 7 days after injection, in contrast to CpG-proB cells from WT donors, suggesting that their reduced lifespan as progenitors hampered them to confer protection against EAE. Therefore, transient treatment of BM cells with TLR-9 agonist generates proB cells that differentiate into more mature B cells with protective function in EAE. Remarkably, CpG-proB cells from Rag2<sup>-/-</sup> mice had no effect on cell numbers in LN and CNS (Fig. 4b), suggesting that this alteration of cell distribution directly contributed to the beneficial effect afforded by CpG-proB cells.

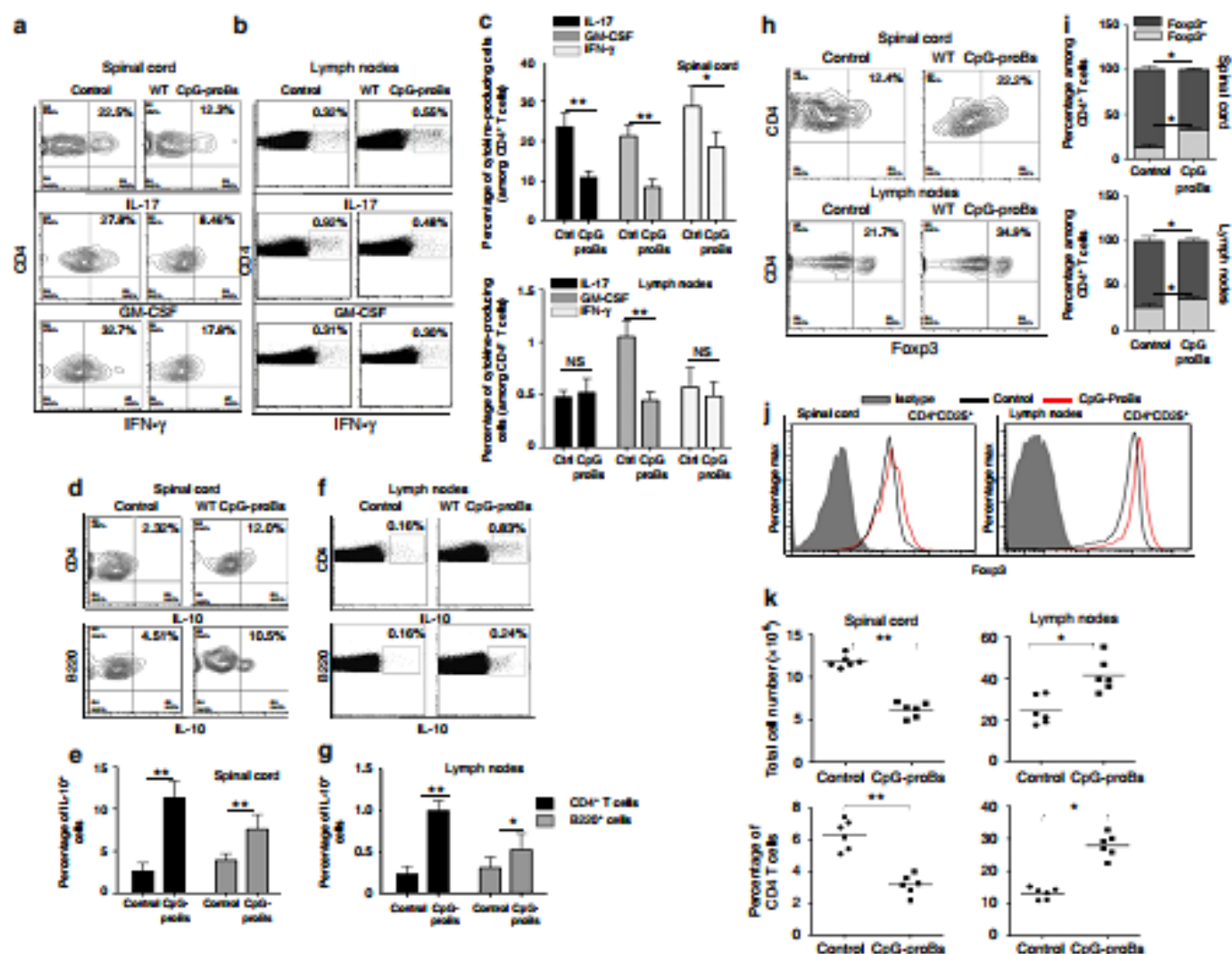
**Roles of IL-10 production by donor-derived B cells.** Since IL-10 is generally a key mediator of B-cell-mediated regulation, we assessed its importance for the suppressive function of CpG-proB cells. IL-10 was necessary for the protective function of CpG-proB cells, because mice treated with IL-10-deficient CpG-proBs (prepared as in Supplementary Fig. 5) were not protected against disease (Fig. 4c), and production of pathogenic cytokines by CD4<sup>+</sup> T cells in spinal cord was not decreased (Fig. 4d,e). However, IL-10-deficient CpG-proBs still promoted CD4<sup>+</sup> T cell accumulation in the reactive LN and reduced their numbers in spinal cord (Fig. 4f) suggesting the involvement of an additional mechanism in this latter effect.

Altogether, these data show that an efficient control of disease by CpG-proBs requires IL-10 production by their mature B-cell progeny. IL-10 produced by these cells is important to reduce inflammation locally in spinal cord, while trapping of immune cells in reactive LN is achieved via an IL-10-independent mechanism.

#### Role of IFN- $\gamma$ in LN entrapment of T cells by CpG-proBs.

To identify the IL-10-independent mechanism involved in the accumulation of immune cells in the reactive LN of CpG-proB cells-treated mice, we analysed cytokine production by these cells (Fig. 5a,b) in a comprehensive manner, because B cells primarily inhibit immunity through cytokine production<sup>5,10</sup>. Remarkably, freshly prepared CpG-proB cells did not produce IL-10 (Fig. 5a,b) or IL-35 (Fig. 5b), but produced abundant amounts of IFN- $\gamma$ , with levels about 30 times higher than those detected for the other cytokines, following stimulation for 5 h with PMA plus ionomycin (Fig. 5a). Expression of IFN- $\gamma$  by these cells was also confirmed by flow cytometry (Fig. 5b) and was not significantly different in WT and IL-10-deficient CpG-proBs (Supplementary Fig. 6). Moreover, the WT CD45.1<sup>+</sup> B-cell progeny recovered from reactive LN and from the spinal cord still produced IFN- $\gamma$ , although less in spinal cord than in LN, as measured by qRT-PCR analysis (Fig. 5c) and intracellular flow cytometry (Supplementary Fig. 7). Since IFN- $\gamma$  has protective functions in EAE<sup>27,28</sup>, this prompted us to investigate whether IFN- $\gamma$  played a role in the protective function of CpG-proB cells against EAE.

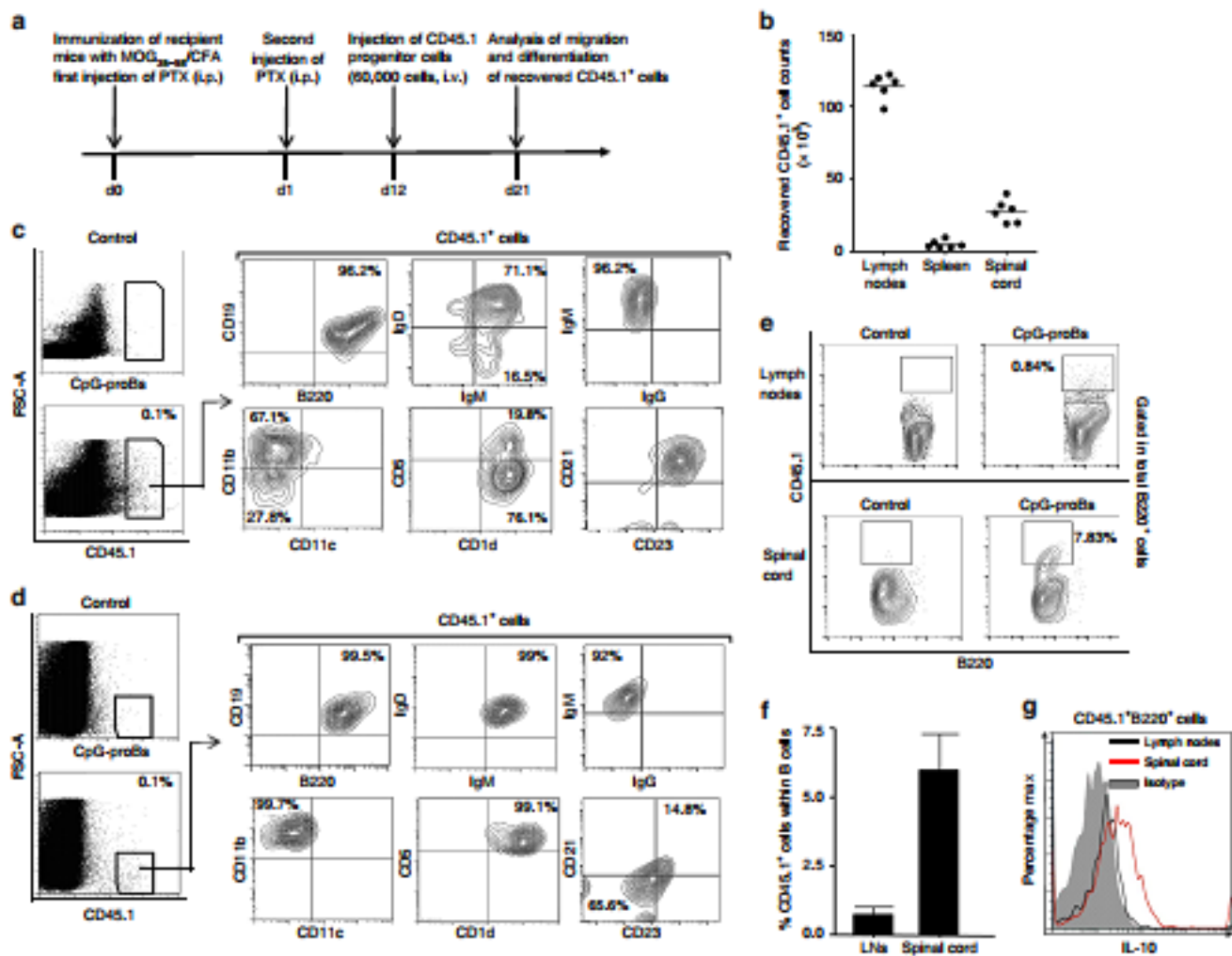




**Figure 2 | Protective effects of CpG-proBs at the peak of disease.** (a–c) Frequency at day 21 of disease of CD4<sup>+</sup> cells producing IL-17, GM-CSF, IFN- $\gamma$  in spinal cord in a representative experiment (a) and in four experiments (c), and in reactive (cervical, axillary and inguinal) LN (b,c) prepared as described in the ‘Methods’ section. (d–g) Production of IL-10 by CD4<sup>+</sup> T cells and B220<sup>+</sup> B cells from spinal cord (d,e) or reactive LN (f,g) of control or CpG-proB-recipient mice in a representative experiment (d,f) and in three experiments (e,g) in which values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. (h) Frequency within gated CD4<sup>+</sup> cells of cells with nuclear expression of the transcription factor Foxp3 in spinal cord and reactive LN. (i) Percentages of Foxp3<sup>+</sup> and Foxp3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells from spinal cord and reactive LN out of four experiments (i), also shown in j from a representative flow cytometry experiment in control mice (black line) and CpG-proB recipients (red line). Cells were stained for Foxp3 (open histograms) versus isotype control (filled histograms). (k) Total cell counts and percentage of CD4<sup>+</sup> T cells within spinal cord and reactive LN of control or CpG-proB-recipient mice at the peak of the disease. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , when comparing CpG-proB-injected mice and other groups.  $n = 6$  mice per group (Students’  $t$ -test).

We tested the role of IFN- $\gamma$  using CpG-proBs prepared from IFN- $\gamma$ -deficient mice. IFN- $\gamma$ -deficient CpG-proB cells did not protect recipient mice against EAE on adoptive transfer (Fig. 5d). Moreover, although the cells derived from IFN- $\gamma$ -deficient CpG-proBs actually reached the spinal cord, where they released as much IL-10 as the WT progeny (Supplementary Fig. 7), they also produced there fivefold more GM-CSF than the WT progeny. They failed to reduce the encephalitogenic cytokines production by CD4<sup>+</sup> T cells and to enhance IL-10-producing CD4<sup>+</sup> and B220<sup>+</sup> cells in spinal cord (Supplementary Fig. 8). Similarly, they failed to drive an accumulation of CD4<sup>+</sup> T cells in reactive LN of recipient mice, in contrast to WT CpG-proBs (Fig. 5e). This suggested to us that IFN- $\gamma$  produced by donor-derived B cells contributed to protection from disease not only by limiting encephalitogenic cytokine production within the spinal cord, but also by retaining encephalitogenic T cells in reactive LN, thereby preventing their accumulation in the CNS.

To characterize how IFN- $\gamma$  produced by donor-derived B cells controlled T-cell accumulation in reactive LN, we examined its effect on expression by T cells of the chemokine receptor CCR7 known to control T-cell localization within LN<sup>29</sup>, and to be implicated in neuro-inflammation<sup>30,31</sup>. CCR7 expression was reduced in LN CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells of the CpG-proB-treated group relative to controls (Fig. 5f,g). Remarkably, CpG-proBs derived from IFN- $\gamma$ -deficient mice, barely affected CCR7 staining on CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 5f,g), contrasting with those derived from IL-10-deficient mice that were as efficient as WT CpG-proBs at retaining CD4<sup>+</sup> T cells within LNs (Supplementary Fig. 9). When we performed a short acid wash (0.2 M acetic acid, 0.5 mM NaCl), known to eliminate bound ligands from their receptor<sup>32</sup>, before CCR7 staining, the reduction in CCR7 staining in LN T cells from CpG-proB recipients relative to controls was no longer observed (Fig. 5h,i). This suggested that increased local chemokine concentrations in LNs of CpG-proB recipients bound to CCR7 and prevented antibody binding,



**Figure 3 | Phenotypic characterization of CD45.1<sup>+</sup> cells recovered from reactive LNs and spinal cord.** (a) Experimental protocol: EAE disease was induced in CD45.2 C57BL/6J mice which then were injected at day 12 of the disease with CpG-proB cells, prepared from the BM of congenic CD45.1<sup>+</sup> C57BL/6J and stimulated with CpG-B for 18 h. The recovery (b) and differentiation status (c–e) of CD45.1<sup>+</sup> injected cells were analysed at day 21. (b) Absolute CD45.1<sup>+</sup> cell counts recovered within reactive LN, spleen and spinal cord of injected mice at day 21 after immunization, that is, at the peak of the disease,  $n = 6$  mice per group. (c) Flow cytometry analysis of the frequency of CD45.1<sup>+</sup> cells recovered in reactive LN at day 21, and of the frequency of gated CD45.1<sup>+</sup> cells expressing the B-cell markers B220, CD19, IgM, IgD, IgG, as well as the markers CD5 and CD1d, CD11b, and CD11c, CD21 and CD23. (d) Flow cytometry analysis of the frequency of the CD45.1<sup>+</sup> progeny of CpG-proB cell recipients, recovered within the spinal cord of CpG-proB-injected mice at day 21 of the disease, expressing B220, CD19, IgM, IgD, IgG, CD5, CD1d, and CD11b, CD11c, CD21 and CD23. (e,f) Frequency of CD45.1<sup>+</sup> cells derived from injected CpG-proBs gated within total B220<sup>+</sup> cells in a representative experiment (e) and as mean  $\pm$  s.e.m. of three determinations (f). (g) Frequency of IL-10-producing CD45.1<sup>+</sup> cells in spinal cord and reactive LN, determined by intracellular flow cytometry as shown in the 'Methods' section.

as shown by Britschgi *et al.*<sup>33</sup>. Therefore, the IFN- $\gamma$ -dependent release of CCR7 ligands by CpG-proBs may play a role in inducing the retention of T cells in reactive LN in recipient mice.

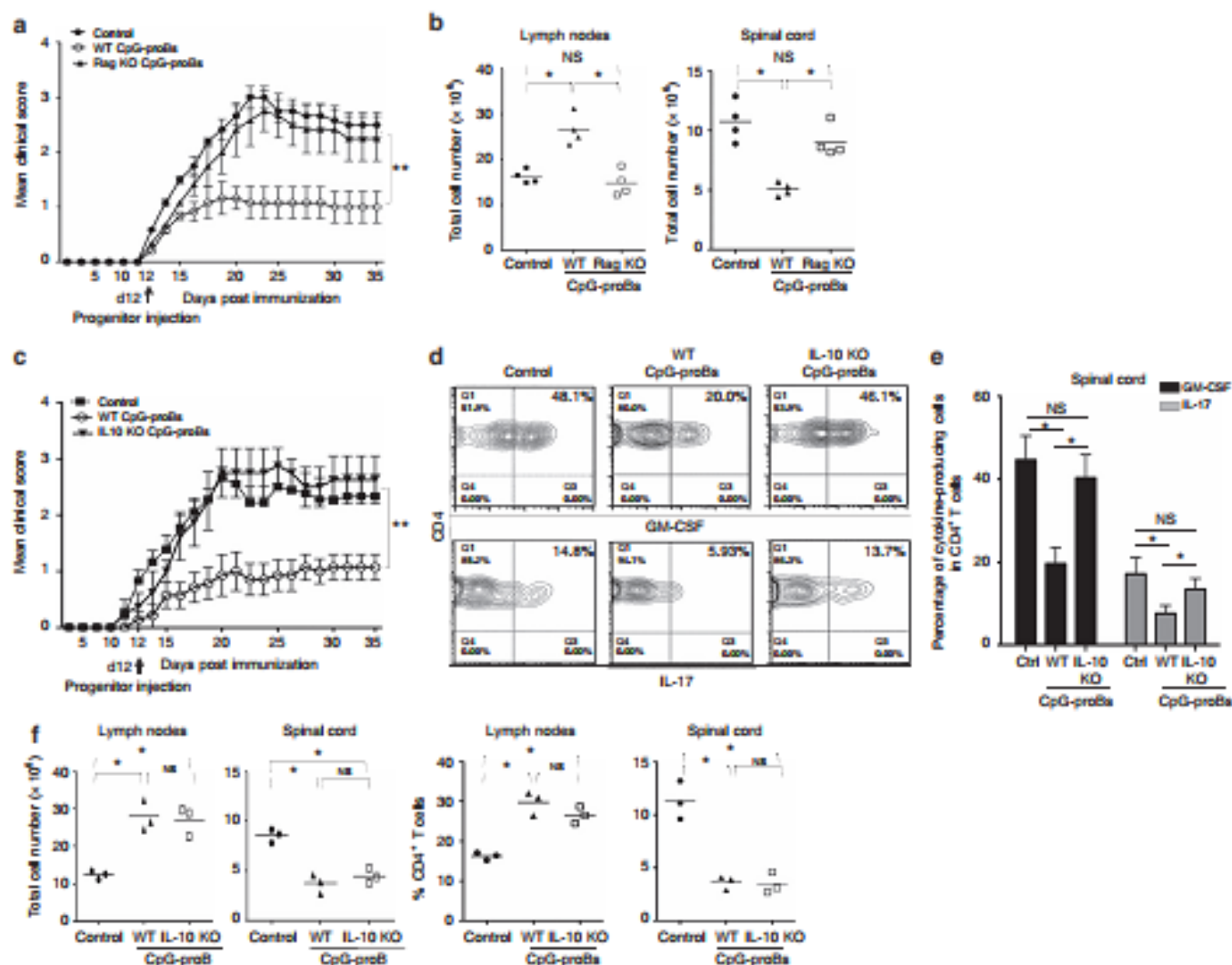
#### Role of CCL19 in T-cell entrapment and disease protection.

The protection afforded by B-cell-derived IFN- $\gamma$  identifies a new mechanism of B-cell-mediated regulation in EAE. We sought to gain further insight into this mechanism. Given that IFN- $\gamma$  can modulate chemokine expression<sup>27</sup>, we evaluated whether CpG-proB cells and/or their progeny themselves might be a source of CCL19 and/or CCL21 via a mechanism controlled by IFN- $\gamma$ . To this end, we first quantified *Ccl19* and *Ccl21* mRNA in WT CpG-proBs, IFN- $\gamma$ -deficient CpG-proBs, and IFN- $\gamma$ -deficient CpG-proBs cultured in presence of IFN- $\gamma$ . We found that WT CpG-proB cells produced both CCL19 and CCL21 (Fig. 6a). The production of these chemokines was reduced in

IFN- $\gamma$ -deficient CpG-proBs, and this defect could be erased by exogenous addition of IFN- $\gamma$  (Fig. 6a). Remarkably, in LN, the mature B-cell progeny generated from CpG-proBs in recipients expressed markedly higher levels of *Ccl21*, and even more *Ccl19* than they do in spinal cord and both expressions were higher than in the originally administered CpG-proB cells (Fig. 6b). CCL19 has been shown to induce CCR7 internalization more efficiently than CCL21 (ref. 33). In addition, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> LN T cells from mice that received WT but not *Ccl19*-deficient CpG-proBs displayed reduced cell surface expression of CCR7 (Fig. 6c,d).

Moreover, CpG-proBs sorted from *Ccl19*-deficient mice neither restrained immune cells in reactive LN (Fig. 6e), nor provided protection against EAE (Fig. 6f), confirming that CCL19 production by CpG-proB cells was essential for T-cell sequestration inside the LN and protection against disease. From these data, we conclude that CCL19 produced by CpG-proB-derived B





**Figure 4 | Role of maturation and IL-10 production capacities of CpG-proBs in the protection against EAE.** (a) EAE clinical scores (mean  $\pm$  s.e.m.) over 35 days of the indicated groups of mice.  $n = 30$  mice per group for control mice and for recipients of WT CpG-proBs,  $n = 8$  mice per group for recipients of WT CpG-proBs,  $n = 8$  mice per group for recipients of WT CpG-proBs,  $n = 8$  mice per group for recipients of WT CpG-proBs;  $***P < 0.001$  when comparing control mice injected with PBS and recipients of WT CpG-proBs by two-way repeated measures ANOVA test.  $**P < 0.005$ , between mice injected with WT CpG-proBs and other groups, non significant between all other groups. (b) Total cell number found in LNs and spinal cord of control mice and recipients of WT or Rag2<sup>-/-</sup> CpG-proBs ( $n = 4$  mice per group). (c) EAE clinical scores (mean  $\pm$  s.e.m.) in control mice or recipients of CpG-proB cells derived from the BM of WT or IL-10<sup>-/-</sup> mice.  $n = 8$  mice per group.  $**P < 0.005$ , as assessed by two-way repeated measures ANOVA test, only between mice injected with WT CpG-proBs and other groups, non significant between all other groups. (d,e) Frequency of CD4<sup>+</sup> T cells producing GM-CSF and IL-17 in the spinal cord of control mice with EAE, recipients of WT- or of IL-10<sup>-/-</sup> CpG-proBs, shown in a representative experiment (d), and in three experiments (e) in which values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. (f) Total cell counts and frequency of CD4<sup>+</sup> T cells recovered from reactive LN and spinal cord of control mice with EAE, or from recipients of WT- and IL-10<sup>-/-</sup> CpG-proBs ( $n = 3$  mice per group).  $*P < 0.05$  (Students' *t*-test).

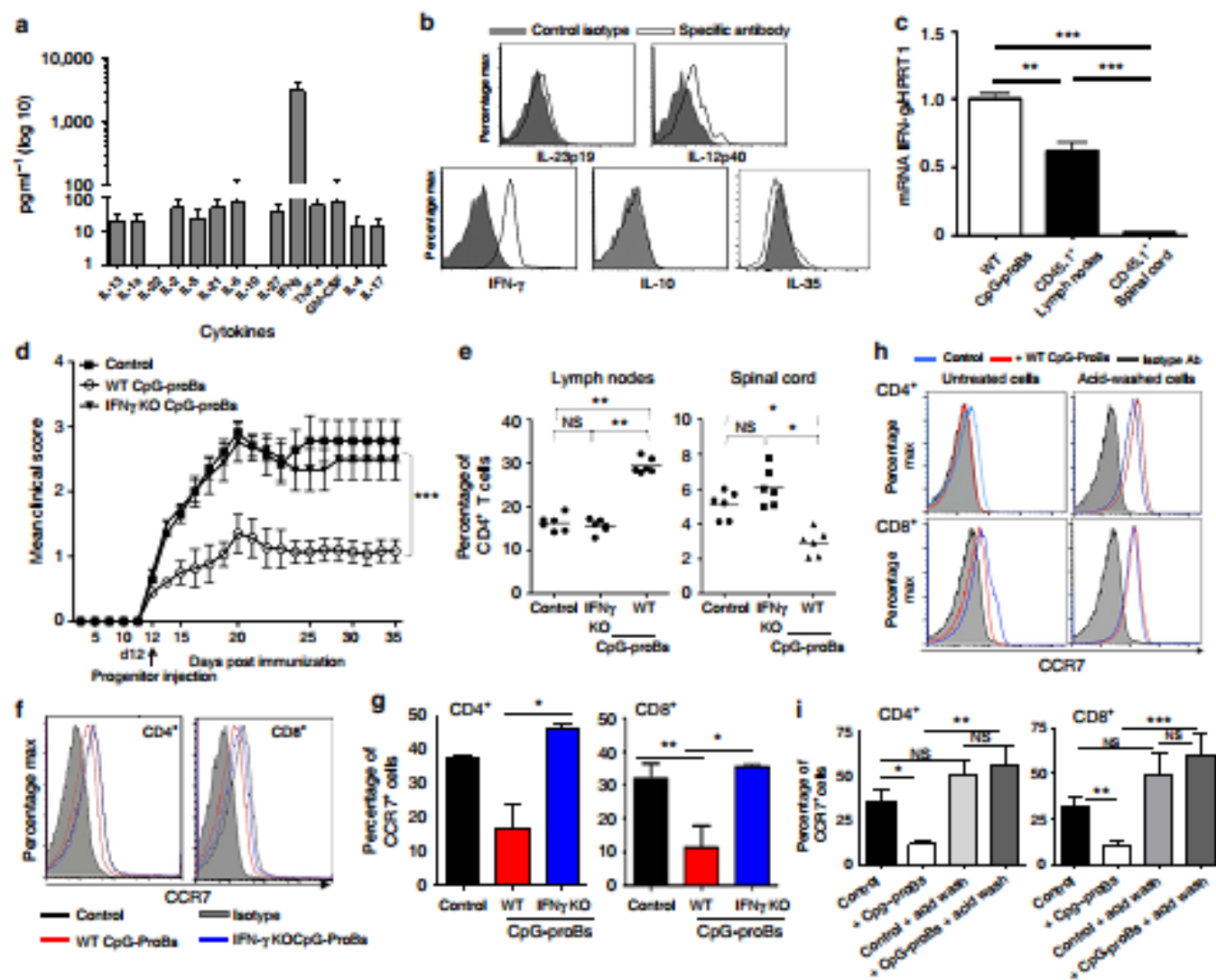
cells in response to autocrine IFN- $\gamma$  induces sequestration of T cells via CCR7 in the reactive LN, subsequently limiting their accumulation in the CNS and improving the disease course.

## Discussion

In adults, immature B cells develop in BM and then seed secondary lymphoid organs, where they can acquire diverse effector functions depending on their mode of activation. Here, we show that signals perceived by immature B cells in a BCR-independent manner can determine their subsequent effector functions as mature B cells. Indeed, we demonstrate that a transient stimulation of BM cells via TLR-9 is sufficient to divert the differentiation of pro-B precursors towards suppressive B cells. In brief, adoptive transfer of as little as 60,000 pro-B cells

recovered from BM cultures shortly stimulated with CpG-B or from the BM of CpG-injected mice markedly reduced the severity of EAE in recipient mice, while unstimulated pro-B cells had no effect even though they encountered the same inflammatory environment in recipient mice. Donor-derived mature B cells mediated this protection because the latter depended on RAG expression.

The protection from disease mediated by the transferred CpG-proB cells involved two complementary mechanisms, one limiting local inflammation in CNS through IL-10 production, and the other restraining encephalitogenic T cells in reactive LN. The latter was achieved through LN retention of T cells, which was mediated by increased CCL19 production by CpG-proB-derived B cells under IFN- $\gamma$  autocrine control. None of these effects were observed with control unstimulated pro-B cells.



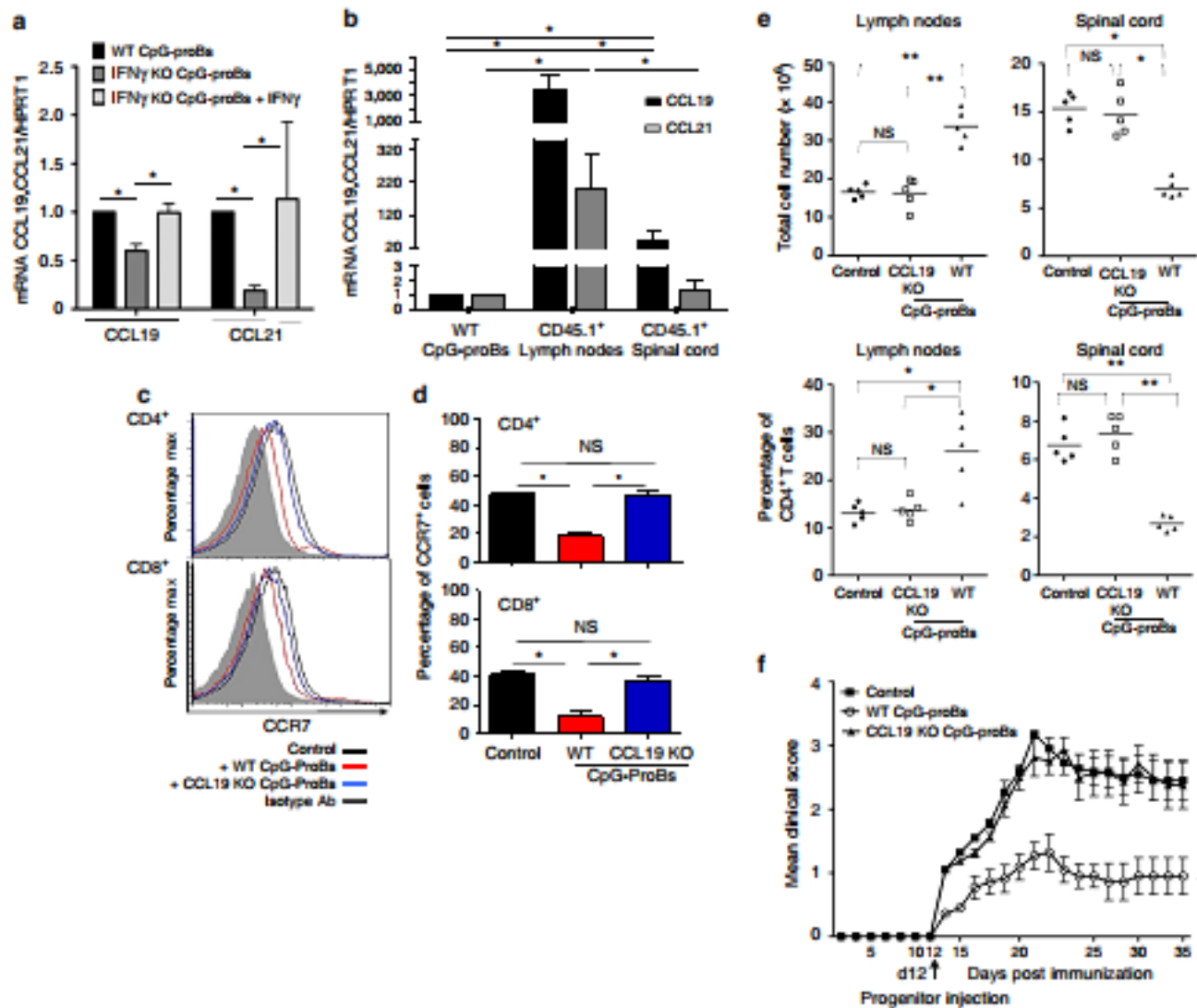
**Figure 5 | Role of IFN- $\gamma$  in the protective properties of CpG-proBs.** (a) Cytokine level determination by multiplex ELISA for Th1/Th2/Th17 cytokines and GM-CSF (expressed in  $\text{pg ml}^{-1}$ ) in supernatants of CpG-proB cells (50,000 cells per 200  $\mu\text{l}$ ) stimulated for 5 h with PMA + ionomycin. (b) Constitutive cytokine production by WT CpG-proB cells. Immediately after FACS sorting, WT CpG-proB cells were stained for intracytoplasmic production of cytokines IL-23p19, IL-12p40, IFN- $\gamma$ , IL-10 and IL-35 using specific antibodies (open histograms) or isotype controls (filled histograms). (c) IFN- $\gamma$  mRNA levels relative to HPRT1, as determined by qRT-PCR in WT CpG-proBs, their CD45.1<sup>+</sup> progeny recovered from reactive LN or from spinal cord. Values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. of three experiments (d) EAE clinical score (mean  $\pm$  s.e.m.) in control mice ( $n=30$ ) and mice injected at day 12 of the disease with 60,000 WT ( $n=30$ ) or IFN- $\gamma^{-/-}$  CpG-proB cells ( $n=20$ ). Data are pooled from two independent experiments. \*\*\* $P<0.001$  when comparing disease scores for control mice with those obtained after treatment with WT CpG-proB cells by two-way repeated measures ANOVA test. (e) Frequency of CD4<sup>+</sup> T cells found in reactive LN and spinal cord of control mice versus mice transferred WT or IFN- $\gamma^{-/-}$  CpG-proB cells,  $n=6$  mice per group, \* $P<0.05$  (Students' *t*-test). (f-g) Expression of CCR7 analysed by flow cytometry in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells from reactive LN of control mice with EAE versus mice transferred either WT or IFN- $\gamma^{-/-}$  CpG-proB cells. Shown are a representative experiment (f) and the mean  $\pm$  s.e.m. of the percentages of CCR7-positive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells out of four experiments (g). (h,i) Expression of CCR7 analysed by flow cytometry either in untreated cells or after an acid wash and shown in a representative experiment (h) and as the mean  $\pm$  s.e.m. of the percentages of CCR7-positive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells out of three experiments (i). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.005$  (Students' *t*-test).

These data demonstrate that transient changes in the BM environment of pro-B cells can markedly influence their subsequent effector functions as mature B cells in periphery, favouring their anti-inflammatory activities.

The production of IL-10 is a key mechanism, by which B cells can suppress autoimmune diseases<sup>4-6,11</sup>. CpG-proBs did not produce IL-10 themselves, but their mature progeny became IL-10-competent strictly in spinal cord of recipient mice. Although CpG-proBs from IL-10-deficient mice normally retained immune cells in reactive LN, this was insufficient to provide protection against EAE since at the onset of clinical signs,

pathogenic cells have already reached the CNS and triggered neuro-inflammation. We propose that IL-10 produced by donor-derived B cells is particularly important in the CNS in our model. In addition, the prevalence of IL-10 over GM-CSF production in the spinal cord by the progeny of CpG-proBs may be essential to control neuro-inflammation, as shown in Supplementary Fig. 7. The enhanced production of IL-10 by host CD4<sup>+</sup> T cells and B220<sup>+</sup> B cells in CNS of mice treated with WT CpG-proB might further help to control local inflammation in the target organ. In addition, mice treated with WT CpG-proB cells displayed an increased expansion of Tregs, suggesting that





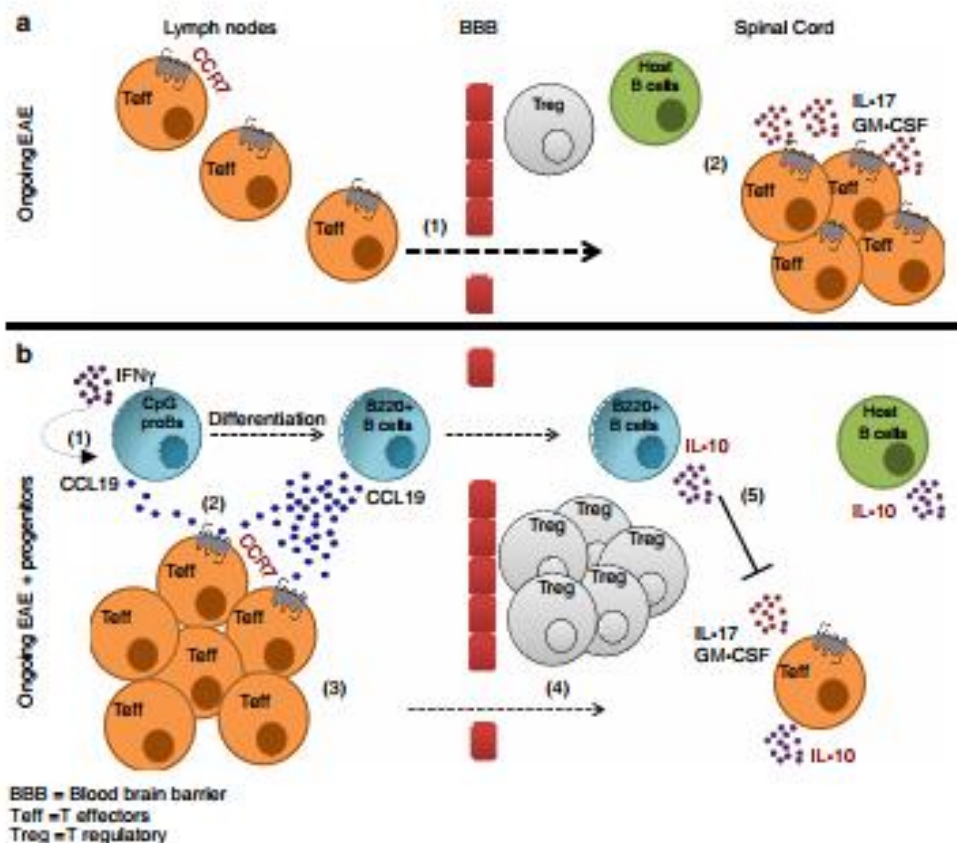
**Figure 6 | Role of CCL19 in the protective properties of CpG-proBs.** (a) CCL19 and CCL21 mRNA levels relative to HPRT1 in WT or IFN- $\gamma^{-/-}$  CpG-proBs cells isolated from BM cells stimulated with CpG-B or CpG-B + IFN- $\gamma$  for 18 h followed by PMA + ionomycin for 5 h. Data are expressed as means  $\pm$  s.e.m. of three experiments. \* $P < 0.05$  by the non-parametric Mann-Whitney's  $t$ -test. (b) CCL19 and CCL21 mRNA levels were assessed as in a in the progeny of WT CD45.1 $^{+}$  CpG-proBs recovered in reactive LN and spinal cord of CD45.2 $^{+}$  recipients 6 days after adoptive transfer of CD45.1 $^{+}$  CpG-proBs, and compared with levels in WT CpG-proBs. Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. from 3–5 experiments. \* $P < 0.05$  (Student's  $t$ -test). (c,d) CCR7 expression analysis in CD4 $^{+}$  and CD8 $^{+}$  T cells from reactive LN of control mice (black line) and mice transferred with WT-CpG-proBs (red line) or CCL19-KO CpG-proBs (blue line), after staining with a specific anti-CCR7 antibody (open histograms) or with an isotype control (filled histogram) of intact and permeabilized cells. A representative experiment is shown in c and the mean  $\pm$  s.e.m. out of three experiments in d. (e) Control mice or mice injected at day 12 with CpG-proBs derived from WT or CCL19-deficient donors were killed on day 21 of the disease and reactive LN and spinal cord cells counted. Shown are total cell counts and percentage of CD4 $^{+}$  T cells recovered per organ, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$  (Student's  $t$ -test). (f) EAE clinical scores (mean  $\pm$  s.e.m.) in control mice ( $n = 10$ ) or mice injected either with WT ( $n = 10$ ) or CCL19-deficient CpG-proBs ( $n = 10$ ). \*\*\* $P < 0.001$ , between controls or CCL19 $^{-/-}$  and WT CpG-proB recipients, non significant between controls and CCL19 $^{-/-}$  CpG-proB-treated mice, using the two-way repeated measures ANOVA test.

host Tregs are also involved in the protective effect of the transferred B cells, in line with results from other studies<sup>15,19,34,35</sup>.

An important finding of this study is the identification of a novel mechanism of B-cell-mediated immune regulation involving IFN- $\gamma$  production by B cells. Looking for other non IL-10 possible mediators for the protective effects of CpG-proBs against EAE, we found that both CpG-proBs and their LN but not spinal cord progeny displayed a massive production of IFN- $\gamma$ , a cytokine considered pro-inflammatory but that has also been credited with possible regulatory functions. In EAE, both IFN- $\gamma^{-/-}$  and IFN $\gamma$ R $^{-/-}$  mice suffer from a more severe disease in both chronic and Relapsing-Relapsing-EAE

models<sup>27,28</sup>. The capacity to produce IFN- $\gamma$  has been reported for B cells at different levels of maturation and in various activation conditions. Thus BM immature B cells constitutively produce IFN- $\gamma$  at low levels<sup>36–38</sup>, whereas mature follicular and marginal zone B cells produce massive amounts of IFN- $\gamma$  on TLR-activation that condition the Th1 response to *Salmonella enterica* infection<sup>39</sup>. Co-culture with Th1 cells emerging in pathogen-infected animals give rise to so-called Be1 effector B cells producing large amounts of IFN- $\gamma$  that subsequently polarize T cells towards a type 1 immune response<sup>40</sup>. Bao *et al.*<sup>41</sup> recently reported that innate B cells with a CD11a<sup>hi</sup> CD16/32<sup>hi</sup> phenotype that emerged from follicular B cells on bacterial and viral





**Figure 7 | Protection against EAE by CpG-proBs relies on cooperative action of their LN and spinal cord B-cell progeny.** (a) At the onset of clinical signs of EAE in untreated mice, autoreactive T cells migrate to the spinal cord (1) and release pathogenic cytokines IL-17 and GM-CSF (2). (b) In mice protected against EAE by adoptive transfer of only 60,000 CpG-proBs per recipient, the IFN- $\gamma$ -dependent release by CpG-proB's progeny of CCL19 (1-2) anchors T cells via CCR7 (3), leading to effector T cells (Teff) accumulation in reactive LN. As a result, fewer T cells reach the spinal cord (4). In the spinal cord, the CpG-proB's progeny releases IL-10 (5), that reduces IL-17 and GM-CSF production by T cells, enhances Foxp3<sup>+</sup> Treg accumulation and triggers IL-10 release by host B cells.

infections, produced as much IFN- $\gamma$  as NK cells when re-stimulated *ex vivo* with anti-CD40. Their provision of IFN- $\gamma$  was required for protection against *L. Monocytogenes* infection. Conversely, Olalekan *et al.*<sup>42</sup> reported that IFN- $\gamma$  production by B cells was essential for the development of autoimmune experimental arthritis. Therefore, IFN- $\gamma$  production by CpG-proBs as well as other described B cells have functional, either protective or deleterious, roles and may link innate and adaptive immune responses.

Since PD-L1<sup>hi</sup> mature splenic B cells were recently shown to provide protection against EAE<sup>12</sup> and PD-L1 can be induced by IFN- $\gamma$ , we investigated the possible role of PD-L1 in CpG-proB-induced protection. There was no correlation between the level of PD-L1 expression on WT versus IL-10 and IFN- $\gamma$ -deficient CpG-proBs and their relative protective capacity against EAE (Supplementary Fig. 10a). Furthermore, CpG-proBs isolated from PD-L1-deficient C57BL/6 donor mice showed only a slight (non significant) reduction in their protective effect against EAE (Supplementary Fig. 10b). Therefore, PD-L1 is not playing a significant role in disease protection against EAE by CpG-proBs.

Our data indicate that the protective effect mediated by B-cell-derived IFN- $\gamma$  operates at least in part by sequestering CD4<sup>+</sup> T cells in the reactive LN. Many presently available treatments of MS aim at preventing T cells from entering the CNS. Several chemokine receptors and their ligands have been shown to take part in the process of neuroinflammation, including CCR7 whose ligands CCL19 and CCL21 are produced by endothelial cells at the inflamed BBB in mice and men<sup>43,44</sup>.

CCR7<sup>-/-</sup> or *plt/plt* mice that lack CCL19 and CCL21 are resistant to EAE<sup>45</sup>, demonstrating the requirement of CCL19/CCR7 interactions for the development of EAE. When expressed in peripheral tissues, CCL19 and CCL21 are able to mediate cell recruitment *in vivo* of both naive and recently activated T cells<sup>46</sup>. CpG-proB recipients showed downregulated staining for CCR7 at the surface of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> LN T cells. We found that IFN- $\gamma$  affected CCR7 expression on T cells indirectly by enhancing the production by CpG-proB cells of both CCR7 ligands, CCL19 and CCL21. Once in the LN, the B-cell progeny produced both chemokines at far higher rates than the progenitors they derived from. The observation that similar levels of cell surface CCR7 were recovered once ligands were eliminated by an acid wash suggested that high-receptor occupancy by CCL19 or CCL21 was taking place in T cells from CpG-proB recipients, anchoring T cells within LN. Britschgi *et al.*<sup>33</sup> have demonstrated that CCR7 levels and occupancy reflect the amount of CCL19 present in the environment and that high levels of CCL19 reduce CCR7 staining by the same antibody we used. Similarly, increased levels of the CCR7 ligands in inflamed tissues have been reported to reduce CCR7 detection and to induce locally T-cell retention<sup>47</sup>. Thus, high occupancy of CCR7 by its ligands and particularly CCL19 occurs in LN of CpG-proB recipients and impedes leucocyte migration. The particular anchoring role of CCL19 produced by the B-cell progeny was confirmed by the findings that CpG-proB cells isolated from CCL19-deficient mice did not reduce surface CCR7 expression measured without acidic washing procedure and concomitantly



lost their capacity to sequester T cells within reactive LN, and to protect against EAE disease. Importantly, the markedly (3,000-fold) enhanced production of CCL19 in LN rather than spinal cord progeny of CpG-proBs strongly supports a major role of this protective mechanism in the reactive LN to keep T cells away from the CNS. Notably, we did not observe significant reduction of S1P1R expression of LN-trapped T cells in CpG-proB recipients relative to control mice with EAE. Therefore, different from FTY720 (ref. 48) which targets the LN egress signal, CpG-proBs promote entrapment of pathogenic T cells inside secondary lymphoid organs by targeting instead the retention signal.

In summary (Fig. 7), the powerful protective effect of CpG-proBs against EAE is due to the capacity of their progeny to anchor T cells within the LNs particularly by releasing CCL19, thereby retaining them away from the spinal cord. This process is indispensable, but not sufficient to confer protection against EAE, at disease onset when T cells have already migrated into the CNS. The B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> B-cell progeny of injected CpG-proBs must further release IL-10 within the spinal cord, which is ultimately required for switching the host cytokine profile from inflammatory to immunoregulatory. These molecular mechanisms were obtained using progenitors in which each individual mediator was deficient at a time. BM chimera exhibiting concomitant deficiencies in all the mentioned molecular mediators may be necessary to provide full demonstration of their roles in the protection afforded by CpG-proBs. CpG-proBs are, to our knowledge, the most efficient B-cell subset so far reported to be able, at only 60,000 cells per recipient, to stably inhibit ongoing encephalomyelitis. These properties of CpG-proBs therefore open interesting perspectives for cell therapy of autoimmune diseases. In addition, these data shed light on the importance of the BCR-independent signals that B-cell progenitors receive in the BM environment to develop into mature B cells with regulatory rather than inflammatory functions.

## Methods

**Mice.** WT CD45.2<sup>+</sup> C57BL/6J mice were obtained from Janvier Laboratories (Le Genest Saint Isle, France). Congenic CD45.1<sup>+</sup>, MyD88<sup>-/-</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>, Rag2<sup>-/-</sup> C57BL/6J, all backcrossed for at least ten generations, were bred in our animal facility under specific pathogen-free conditions. CCL19<sup>-/-</sup> C57BL/6J mice were raised at the Department of Biochemistry at the University of Lausanne. IL-10<sup>-/-</sup> C57BL/6J mice at the DRFZ, Berlin and PD-L1<sup>-/-</sup> C57BL/6J mice<sup>49</sup> at Trinity Biomedical Sciences Institute, Trinity College Dublin. Knock-out animals and their WT controls from the same origin were systematically used as donor mice for CpG-proBs. Female 12-week-old C57BL/6J mice were used as a model for MOG<sub>35-55</sub>-induced EAE and received intravenous progenitor cell transfers at day-12 post-immunization.

**EAE induction.** Active EAE was induced in 12-week-old female mice by s.c. immunization at two sites, upper and lower back, with 200  $\mu$ g MOG<sub>35-55</sub> peptide emulsified in CFA containing 400  $\mu$ g heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Hooke Laboratories, Lawrence, MA, USA), on day 0. In addition, mice received 200 ng pertussis toxin (Hooke Laboratories) i.p. in 0.1 ml per mouse on days 0 and 1. Clinical signs of EAE were assessed daily with a 0- to 5-point scoring system defined as follows: 0, no obvious changes in motor function compared with non-immunized mice; 0.5, tip of tail is limp; 1, limp tail; 1.5, limp tail and hind leg inhibition; 2, limp tail and weakness of hind legs; 2.5, limp tail and dragging of hind legs; 3, limp tail and complete paralysis of hind legs or paralysis of one front and one hind leg; 3.5, limp tail and complete paralysis of hind legs that are together on one side of body; 4, limp tail, complete hind leg and partial front leg paralysis; mouse is still minimally moving and appears feeding; 4.5, complete hind leg and partial front leg paralysis; no movement around the cage, mouse is not alert; 5, death or severe paralysis. Mice with score  $\geq 4$  for two consecutive days and mice with score 5 were killed.

**Sorting of TLR-activated BM progenitors.** BM cells removed from tibiae and femurs of 8–12-week-old C57BL/6J mice were incubated in RPMI-1640 medium (PAA) supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) for 18 h with 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> of the oligodeoxynucleotides

CpG 1,585 (CpG-A; InvivoGen), CpG 1,668 (CpG-B; Eurogentec, Angers, France) or with the respective agonists of TLR-1–9, supplied in a commercial kit (InvivoGen, Toulouse, France), including: Pam3CSK4 (0.5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), FSL1 (1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), HKLM (2  $\times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>), Poly I:C (HMW; 5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), Poly I:C (LMW; 5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), LPS-EK standard (1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), FLA-ST standard (1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) and ssRNA40/LyoVec (2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) as well as CpG 1,826 (CpG-B; 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>).

c-kit<sup>+</sup> BM cells were sorted by immuno-magnetic separation using a RoboSep automaton (StemCell Technologies, Grenoble, France). Sorted cells were further stained with appropriate fluorochrome-conjugated mAbs against Sca-1, B220, PDCA-1, IgM and electronically sorted as a small-size, c-kit<sup>low</sup>Sca-1<sup>low</sup>B220<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> cell subset using a FACS-Aria 1 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

**Isolation of immune cells from the spinal cord.** Spinal cords isolated from control and CpG-proB-recipient mice were incubated for 30 min in digestion buffer of DNase and liberase (27 WU ml<sup>-1</sup>) in PBS 1  $\times$  at 37 °C, mixing every 5 min. EDTA (100 mM, 500  $\mu$ l) was added for 1 min to end the digestion. The cells were passed through a cell strainer, using a syringe plunger (back side) to smash the tissue. Cells were then resuspended in 3–5 ml of 40% Percoll underlaid with the same volume of 70% Percoll (in PBS) and centrifuged for 35 min at 1,300 g (2,800 r.p.m.) without brakes to form a smooth interface. Cells were collected with a Pasteur pipette and diluted 10 times with complete medium RPMI 10% SVF. After centrifugation cells were resuspended in 2–3 ml of complete medium and further stained with appropriately labelled mAbs.

**Staining of cells for flow cytometry analysis.** To block non-specific Fc receptor binding, cells were pre-incubated for 10 min at room temperature with FcR blocker 2A2G2 mAb. Cells were then stained with appropriately labelled mAbs against CD4, B220, CD21, CD23, CD24, IgM, IgD, IgG, CD1d, CD5, CD43, CD93, PDCA-1, CD8 (eBioscience, Paris, France), CD19, CD127, CD25, CD11b, CD11c, c-Kit (CD117), Sca-1 (anti-Ly6A/E), CCR7 (clone 4B12), CD25, CD45.1 (BD Biosciences) and PDCA-1 (Miltenyi Biotec, Paris, France). Nuclear Foxp3 expression was measured by FACS analysis as per the manufacturer's instructions (eBioscience). Pax5 expression was measured in B-cell progenitors permeabilized with the same buffer as for Foxp3, using an anti-Pax5 antibody from eBioscience. Intracytoplasmic expression of cytokines was assessed after a 5-h stimulation with PMA (10 ng ml<sup>-1</sup>) plus ionomycin (500 ng ml<sup>-1</sup>) in the presence of Brefeldin A (20  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), followed by fixation/permeabilization with PFA/saponin and subsequent staining with specific antibodies including APC-labelled anti-IL-23p19, APC-labelled anti-IL-12p40, APC-labelled anti-IL-10, PE-labelled anti-IFN- $\gamma$ , APC-labelled anti-IL-17 (all from BD Biosciences), PE-labelled anti-GM-CSF (from eBioscience), Per-CP-labelled anti-human/mouse IL-12/IL-35 p35 (from RnD Systems) or isotype controls (from BD Biosciences and eBioscience). Membrane and intracellular antigen expression was analysed in a FACS Canto II cytometer (BD Biosciences) using FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

**Cytokine assays.** Control and CpG-ProB-recipient mice were killed at the peak of the disease, 18–21 days after immunization. Cytokines were measured in supernatants of recovered LN cells from control or CpG-ProB-recipient mice, re-stimulated with the MOG<sub>35-55</sub> peptide for 3 days followed by 5-h stimulation with PMA + ionomycin. For determination of spinal cord cytokines, isolation of spinal cord cells was followed by incubation at 37 °C/5% CO<sub>2</sub> in the presence of Golgi-stop (+ PMA/ionomycin) for 3 h. Th1/Th2/Th17 cytokines and GM-CSF were measured by multiplex ELISA using Flow Cytomix analyte detection reagents from eBioscience.

**Isolation of mRNA and real-time qRT-PCR.** Total RNA was prepared using RNeasy-4PCR (Ambion, Life Technologies, St Aubin, France). Reverse-transcription was performed with high-capacity cDNA reverse-transcription kits (Applied Biosystems, Life Technologies). Resulting cDNA was amplified in triplicates by the SYBR-Green PCR assay. PCR reactions were incubated for 2 min at 50 °C and for 10 min at 95 °C, followed by 40 amplification cycles with 1 min annealing/extension at 60 °C and 15-s denaturation at 95 °C. Quantitative real-time PCR of mouse CCL19 and CCL21 was performed by the comparative threshold cycle ( $\Delta\Delta C_t$ ) method and normalized to mouse HPRT1 using AB 7,900 HT real-time PCR system (Applied Biosystems). The primer sequences used for CCL19 identify functional CCL19 (ref. 50). Primer sequences were as described<sup>50</sup>: CCL19 forward: 5'-CTGGCTCAGATTATCTCGCAT-3', CCL19 reverse: 5'-GTCTTCCGCATGATTAGCAC-3'; CCL21 forward: 5'-ATCCCGGCAATCCTGTCTC-3', CCL21 reverse: 5'-GGTTCCTGGACCCAGCCTC-3'; HPRT1 forward: 5'-CCTTCACCAATGACTOCTATGAC-3', HPRT1 reverse: 5'-CAAGTTTACAGCCAAGATTAC-3'.

**Study approval.** All mouse procedures were approved by the Paris Descartes University Animal Experimentation and Ethics Committee. Sample sizes were chosen to ensure reproducibility of the experiments and according to the 3Rs of animal ethics regulation.



**Statistics.** Non-parametric Mann-Whitney's *t*-test was used to compare values between the two groups. Disease curves were analysed using two-way repeated measures ANOVA test.

**Data availability.** All relevant data are available from the authors.

## References

- Lund, F. E. & Randall, T. D. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4<sup>+</sup> T cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 236–247 (2010).
- Hsue, P. Y. *et al.* Depletion of B-cells with rituximab improves endothelial function and reduces inflammation among individuals with rheumatoid arthritis. *J. Am. Heart Assoc.* 3, e001267 (2014).
- Lehmann-Horn, K., Kronsbein, H. C. & Weber, M. S. Targeting B cells in the treatment of multiple sclerosis: recent advances and remaining challenges. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 6, 161–173 (2013).
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S. & Bhan, A. K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 16, 219–230 (2002).
- Filatreau, S., Swenick, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. & Anderton, S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* 3, 944–950 (2002).
- Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N. & Londei, M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J. Exp. Med.* 197, 489–501 (2003).
- Evans, J. G. *et al.* Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J. Immunol.* 178, 7868–7878 (2007).
- Yanaba, K. *et al.* A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5<sup>+</sup> phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 28, 639–650 (2008).
- Shimomura, Y. *et al.* Regulatory role of B-1 B cells in chronic colitis. *Int. Immunol.* 20, 729–737 (2008).
- Shen, P. *et al.* IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 507, 366–370 (2014).
- Matsumoto, M. *et al.* Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 41, 1040–1051 (2014).
- Khan, A. R. *et al.* PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat. Commun.* 6, 5997 (2015).
- Lampropoulou, V. *et al.* TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J. Immunol.* 180, 4763–4773 (2008).
- Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Matsushita, T., Tsubata, T. & Tedder, T. F. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J. Immunol.* 182, 7459–7472 (2009).
- Mauri, C. & Bosma, A. Immune regulatory function of B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 221–241 (2012).
- Baba, Y., Matsumoto, M. & Kurosaki, T. Calcium signaling in B cells: regulation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and its sensor molecules, STIM1 and STIM2. *Mol. Immunol.* 62, 339–343 (2014).
- Mann, M. K., Maresz, K., Shriver, L. P., Tan, Y. & Dittel, B. N. B cell regulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 178, 3447–3456 (2007).
- Yoshizaki, A. *et al.* Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 491, 264–268 (2012).
- Blair, P. A. *et al.* Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J. Immunol.* 182, 3492–3502 (2009).
- Duddy, M. *et al.* Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 178, 6092–6099 (2007).
- Correale, J. & Farez, M. F. Does helminth activation of toll-like receptors modulate immune response in multiple sclerosis patients? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 112 (2012).
- Ramgolam, V. S. *et al.* B cells as a therapeutic target for IFN-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Immunol.* 186, 4518–4526 (2011).
- Begum-Haque, S. *et al.* Augmentation of regulatory B cell activity in experimental allergic encephalomyelitis by glatiramer acetate. *J. Neuroimmunol.* 232, 136–144 (2011).
- Kala, M. *et al.* B cells from glatiramer acetate-treated mice suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp. Neurol.* 221, 136–145 (2010).
- Montandon, R. *et al.* Innate pro-B-cell progenitors protect against type 1 diabetes by regulating autoimmune effector T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (2013).
- Welner, R. S. *et al.* Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection. *Blood* 112, 3753–3761 (2008).

- Tran, E. H., Prince, E. N. & Owens, T. IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J. Immunol.* 164, 2759–2768 (2000).
- Hindinger, C. *et al.* IFN-gamma signaling to astrocytes protects from autoimmune mediated neurological disability. *PLoS ONE* 7, e42088 (2012).
- Pham, T. H., Okada, T., Matlobian, M., Lo, C. G. & Cyster, J. G. S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity* 28, 122–133 (2008).
- Noor, S. & Wilson, E. H. Role of C-C chemokine receptor type 7 and its ligands during neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* 9, 77 (2012).
- Engelhardt, B. & Ransohoff, R. M. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol.* 33, 579–589 (2012).
- Kobout, T. A. *et al.* Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J. Biol. Chem.* 279, 23214–23222 (2004).
- Britschgi, M. R., Link, A., Lissandrin, T. K. & Luther, S. A. Dynamic modulation of CCR7 expression and function on naive T lymphocytes in vivo. *J. Immunol.* 181, 7681–7688 (2008).
- Amu, S. *et al.* Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 1114–1124 e1118 (2010).
- Carter, N. A. *et al.* Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J. Immunol.* 186, 5569–5579 (2011).
- Zavala, F., Korniotis, S. & Montandon, R. Characterization and immunoregulatory properties of innate Pro-B-cell progenitors. *Methods Mol. Biol.* 1371, 79–88 (2016).
- Flaishon, L. *et al.* Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. *J. Exp. Med.* 192, 1381–1388 (2000).
- Hart, G., Flaishon, L., Becker-Herman, S. & Shachar, I. Tight regulation of IFN-gamma transcription and secretion in immature and mature B cells by the inhibitory MHC class I receptor, Ly49G2. *J. Immunol.* 175, 5034–5042 (2005).
- Barr, T. A., Brown, S., Mastroeni, P. & Gray, D. TLR and B cell receptor signals to B cells differentially program primary and memory Th1 responses to *Salmonella enterica*. *J. Immunol.* 185, 2783–2789 (2010).
- Harris, D. P. *et al.* Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* 1, 475–482 (2000).
- Bao, Y. *et al.* Identification of IFN-gamma-producing innate B cells. *Cell Res.* 24, 161–176 (2014).
- Olalekan, S. A., Cao, Y., Hamel, K. M. & Finnegan, A. B cells expressing IFN-gamma suppress Treg-cell differentiation and promote autoimmune experimental arthritis. *Eur. J. Immunol.* 45, 988–998 (2015).
- Alt, C., Laschinger, M. & Engelhardt, B. Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 32, 2133–2144 (2002).
- Columba-Cabezas, S., Serafini, B., Ambrosini, E. & Aloisi, F. Lymphoid chemokines CCL19 and CCL21 are expressed in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the maintenance of chronic neuroinflammation. *Brain Pathol.* 13, 38–51 (2003).
- Kuwabara, T. *et al.* CCR7 ligands are required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis through generating IL-23-dependent Th17 cells. *J. Immunol.* 183, 2513–2521 (2009).
- Luther, S. A. *et al.* Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J. Immunol.* 169, 424–433 (2002).
- McNamee, E. N. *et al.* Ectopic lymphoid tissue alters the chemokine gradient, increases lymphocyte retention and exacerbates murine ileitis. *Gut* 62, 53–62 (2013).
- Brinkmann, V. *et al.* Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 883–897 (2010).
- Dong, H. *et al.* B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Immunity* 20, 327–336 (2004).
- Luther, S. A., Tang, H. L., Hyman, P. L., Farr, A. G. & Cyster, J. G. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the p19<sup>plp</sup> mouse. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 12694–12699 (2000).

## Acknowledgements

We thank Dr Elke Schneider for editing the manuscript, and Emilie Panafieu, Fabrice Valette, Nadia Elgarfond and Leonardo Scarpellino for expert technical help. This work was supported by core funding from CNRS and INSERM. It was also funded by grants to F.Z. from ARSEP foundation (<https://www.arsp.org/>) and from Humanis. S.K. was supported by a fellowship from DIM StemPôle, Région Ile de France (<http://www.dim-biotherapies.com/>) and subsequently from ARSEP and Greek State Scholarship (IKY) foundations. H.L. was supported by a fellowship from DIM Biothérapies, Région Ile de France.

## Bibliographie

- A'T'Hart, B., Van Kooyk, Y., Geurts, J.J.G and Gran B (2015) The primate autoimmune encephalomyelitis model; a bridge between mouse and man. *Ann Clin Transl Neurol.* 2(5): 581–593.
- Abdul-Majid, K.-B., Wefer, J., Stadelmann, C., Stefferl, A., Lassmann, H., Olsson, T., and Harris, R.A. (2003). Comparing the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis in CD4<sup>-/-</sup> and CD8<sup>-/-</sup> DBA/1 mice defines qualitative roles of different T cell subsets. *J. Neuroimmunol.* 141, 10–19.
- Abrahamsson, S.V., Angelini, D.F., Dubinsky, A.N., Morel, E., Oh, U., Jones, J.L., Carassiti, D., Reynolds, R., Salvetti, M., Calabresi, P.A., et al. (2013). Non-myeloablative autologous haematopoietic stem cell transplantation expands regulatory cells and depletes IL-17 producing mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis. *Brain* 136, 2888–2903.
- Adolfsson, J., Borge, O.J., Bryder, D., Theilgaard-Mönch, K., Åstrand-Grundström, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y., and Jacobsen, S.E.W. (2001). Upregulation of Flt3 Expression within the Bone Marrow Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup> Stem Cell Compartment Is Accompanied by Loss of Self-Renewal Capacity. *Immunity* 15, 659–669.
- Aggarwal, S., and Pittenger, M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815–1822.
- Agle, K., Vincent, B.G., Piper, C., Belle, L., Zhou, V., Shlomchik, W., Serody, J.S., and Drobyski, W.R. (2018). Bim regulates the survival and suppressive capability of CD8<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells during murine GVHD. *Blood.*
- Aharoni, R., Eilam, R., Domev, H., Labunskay, G., Sela, M., and Arnon, R. (2005). The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 19045–19050.
- Ahlgren, C., Odén, A., Torén, K., and Andersen, O. (2009). Multiple sclerosis incidence in the era of measles-mumps-rubella mass vaccinations. *Acta Neurol. Scand.* 119, 313–320.
- Aitken, J.B., Thomas, S.E., Stocker, R., Thomas, S.R., Takikawa, O., Armstrong, R.S., and Lay, P.A. (2004). Determination of the nature of the heme environment in nitrosyl indoleamine 2,3-dioxygenase using Multiple-scattering analyses of X-ray absorption fine structure. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 4892–4898.
- Akiyama, K., Chen, C., Wang, D., Xu, X., Qu, C., Yamaza, T., Cai, T., Chen, W., Sun, L., and Shi, S. (2012). Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* 10, 544–555.
- Albanesi, C., Cavani, A., and Girolomoni, G. (1999). IL-17 Is Produced by Nickel-Specific T Lymphocytes and Regulates ICAM-1 Expression and Chemokine Production in Human Keratinocytes: Synergistic or Antagonist Effects with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *J. Immunol.* 162, 494–502.
- Albert, M.L., Pearce, S.F.A., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., and Bhardwaj, N. (1998). Immature Dendritic Cells Phagocytose Apoptotic Cells via  $\alpha\beta 5$  and CD36, and Cross-present Antigens to Cytotoxic T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188, 1359–1368.
- Aliberti, J., Schulz, O., Pennington, D.J., Tsujimura, H., Reis e Sousa, C., Ozato, K., and Sher, A. (2003). Essential role for ICSBP in the in vivo development of murine CD8 $\alpha$  + dendritic cells. *Blood* 101, 305–310.
- Allavena, P., Piemonti, L., Longoni, D., Bernasconi, S., Stoppacciaro, A., Ruco, L., and Mantovani, A. (1998). IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur. J. Immunol.* 28, 359–369.
- Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J.P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., and Bhandoola, A. (2003). Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat. Immunol.* 4, 168–174.
- Aloisi, F., Penna, G., Cerase, J., Menéndez Iglesias, B., and Adorini, L. (1997). IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 1604–1612.
- Amir, A.L., D'Orsogna, L.J.A., Roelen, D.L., van Loenen, M.M., Hagedoorn, R.S., de Boer, R., van der Hoorn, M.A.W.G., Kester, M.G.D., Doxiadis, I.I.N., Falkenburg, J.H.F., et al. (2010). Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common. *Blood* 115, 3146–3157.
- Anderson, B.E., McNiff, J.M., Jain, D., Blazar, B.R., Shlomchik, W.D., and Shlomchik, M.J. (2005). Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood* 105, 2227–2234.
- Andersson, J., Tran, D.Q., Pesu, M., Davidson, T.S., Ramsey, H., O'Shea, J.J., and Shevach, E.M. (2008). CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>

regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- $\beta$ -dependent manner. *J. Exp. Med.* *205*, 1975–1981.

Angell, J.E., Lindner, D.J., Shapiro, P.S., Hofmann, E.R., and Kalvakolanu, D.V. (2000). Identification of GRIM-19, a novel cell death-regulatory gene induced by the interferon-beta and retinoic acid combination, using a genetic approach. *J. Biol. Chem.* *275*, 33416–33426.

Anstadt, E.J., Fujiwara, M., Nichols, F., and Clark, R.B. (2016). TLR2 tolerance in EAE. *J. Immunol.* *196*, 118.12-118.12.

Antin, J.H., and Ferrara, J.L. (1992). Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* *80*, 2964–2968.

Arnold, B., Schönrich, G., and Hämmerling, G.J. (1993). Multiple levels of peripheral tolerance. *Immunol. Today* *14*, 12–14.

Arpinati, M., Green, C.L., Heimfeld, S., Heuser, J.E., and Anasetti, C. (2000). Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* *95*, 2484–2490.

Asakura, A. (2012). Skeletal Muscle-derived Hematopoietic Stem Cells: Muscular Dystrophy Therapy by Bone Marrow Transplantation. *J. Stem Cell Res. Ther. Suppl* *11*.

Astier, A.L., and Hafler, D.A. (2007). Abnormal Tr1 differentiation in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* *191*, 70–78.

Auffermann-Gretzinger, S., Lossos, I.S., Vayntrub, T.A., Leong, W., Grumet, F.C., Blume, K.G., Stockerl-Goldstein, K.E., Levy, R., and Shizuru, J.A. (2002). Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* *99*, 1442–1448.

Aung, L.L., and Balashov, K.E. (2015). Decreased Dicer expression is linked to increased expression of co-stimulatory molecule CD80 on B cells in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* *21*, 1131–1138.

Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J.P.S., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R.A., Kuchroo, V.K., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2007). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat. Immunol.* *8*, 1380–1389.

Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schröder, R., Deckert, M., Schmidt, S., et al. (2000). Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* *192*, 393–404.

Bacigalupo, A., Lamparelli, T., Barisione, G., Bruzzi, P., Guidi, S., Alessandrino, P.E., di Bartolomeo, P., Oneto, R., Bruno, B., Sacchi, N., et al. (2006). Thymoglobulin prevents chronic graft-versus-host disease, chronic lung dysfunction, and late transplant-related mortality: long-term follow-up of a randomized trial in patients undergoing unrelated donor transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *12*, 560–565.

Bader, P., Kuçi, Z., Bakhtiar, S., Basu, O., Bug, G., Dennis, M., Greil, J., Barta, A., Kállay, K.M., Lang, P., et al. (2018). Effective treatment of steroid and therapy-refractory acute graft-versus-host disease with a novel mesenchymal stromal cell product (MSC-FFM). *Bone Marrow Transplant.* *1*.

Badillo, A.T., Peranteau, W.H., Heaton, T.E., Quinn, C., and Flake, A.W. (2008). Murine bone marrow derived stromal progenitor cells fail to prevent or treat acute graft-versus-host disease. *Br. J. Haematol.* *141*, 224–234.

Bai, L., Lennon, D., Eaton, V., Maier, K., Caplan, A., Miller, S., and Miller, R. (2009). Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Induce Th2-Polarized Immune Response and Promote Endogenous Repair in Animal Models of Multiple Sclerosis. *Glia* *57*, 1192–1203.

Bailey, S.L., Schreiner, B., McMahon, E.J., and Miller, S.D. (2007). CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides “preferentially” polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat. Immunol.* *8*, 172–180.

Bailey-Bucktrout, S.L., Martinez-Llordella, M., Zhou, X., Anthony, B., Rosenthal, W., Luche, H., Fehling, H.J., and Bluestone, J.A. (2013). Self-antigen-driven activation induces instability of regulatory T cells during an inflammatory autoimmune response. *Immunity* *39*, 949–962.

Bajaña, S., Roach, K., Turner, S., Paul, J., and Kovats, S. (2012). IRF4 promotes cutaneous dendritic cell migration to lymph nodes during homeostasis and inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 3368–3377.

Baker, M.B., Riley, R.L., Podack, E.R., and Levy, R.B. (1997). Graft-versus-host-disease-associated lymphoid hypoplasia and B cell dysfunction is dependent upon donor T cell-mediated Fas-ligand function, but not perforin function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 1366–1371.

Balandina, A., Lécart, S., Dartevelle, P., Saoudi, A., and Berrih-Aknin, S. (2005). Functional defect of regulatory



CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 105, 735–741.

Balashov, K.E., Khoury, S.J., Hafler, D.A., and Weiner, H.L. (1995). Inhibition of T cell responses by activated human CD8+ T cells is mediated by interferon-gamma and is defective in chronic progressive multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 95, 2711–2719.

Balashov, K.E., Aung, L.L., Vaknin-Dembinsky, A., Dhib-Jalbut, S., and Weiner, H.L. (2010). Interferon- $\beta$  inhibits toll-like receptor 9 processing in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 68, 899–906.

Ball, L.M., Bernardo, M.E., Roelofs, H., van Tol, M.J.D., Contoli, B., Zwaginga, J.J., Avanzini, M.A., Conforti, A., Bertaina, A., Giorgiani, G., et al. (2013). Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease. *Br. J. Haematol.* 163, 501–509.

Ballen, K.K., Gluckman, E., and Broxmeyer, H.E. (2013). Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood* 122, 491–498.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.

Banovic, T., MacDonald, K.P.A., Morris, E.S., Rowe, V., Kuns, R., Don, A., Kelly, J., Ledbetter, S., Clouston, A.D., and Hill, G.R. (2005). TGF- $\beta$  in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe? *Blood* 106, 2206–2214.

Banovic, T., Markey, K.A., Kuns, R.D., Olver, S.D., Raffelt, N.C., Don, A.L., Degli-Esposti, M.A., Engwerda, C.R., MacDonald, K.P.A., and Hill, G.R. (2009). Graft-versus-host disease prevents the maturation of plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 912–920.

Barnes, D.W., and Loutit, J.F. (1967). Haemopoietic stem cells in the peripheral blood. *Lancet Lond. Engl.* 2, 1138–1141.

Barnett, M.H., McLeod, J.G., Hammond, S.R., and Kurtzke, J.F. (2016). Migration and multiple sclerosis in immigrants from United Kingdom and Ireland to Australia: a reassessment. III: risk of multiple sclerosis in UKI immigrants and Australian-born in Hobart, Tasmania. *J. Neurol.* 263, 792–798.

Bar-On, L., Birnberg, T., Lewis, K.L., Edelson, B.T., Bruder, D., Hildner, K., Buer, J., Murphy, K.M., Reizis, B., and Jung, S. (2010). CX3CR1+ CD8alpha+ dendritic cells are a steady-state population related to plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14745–14750.

Bar-Or, A., Fawaz, L., Fan, B., Darlington, P.J., Rieger, A., Ghorayeb, C., Calabresi, P.A., Waubant, E., Hauser, S.L., Zhang, J., et al. (2010). Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann. Neurol.* 67, 452–461.

Barr, T.A., Shen, P., Brown, S., Lampropoulou, V., Roch, T., Lawrie, S., Fan, B., O'Connor, R.A., Anderton, S.M., Bar-Or, A., et al. (2012). B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J. Exp. Med.* 209, 1001–1010.

Baughman, E.J., Mendoza, J.P., Ortega, S.B., Ayers, C.L., Greenberg, B.M., Frohman, E.M., and Karandikar, N.J. (2011). Neuroantigen-specific CD8+ regulatory T-cell function is deficient during acute exacerbation of multiple sclerosis. *J. Autoimmun.* 36, 115–124.

Becher, B., Durell, B.G., and Noelle, R.J. (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J. Clin. Invest.* 110, 493–497.

Bechmann, I., Mor, G., Nilsen, J., Eliza, M., Nitsch, R., and Naftolin, F. (1999). FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* 27, 62–74.

Beelen, D.W., Elmaagacli, A., Müller, K.-D., Hirche, H., and Schaefer, U.W. (1999). Influence of Intestinal Bacterial Decontamination Using Metronidazole and Ciprofloxacin or Ciprofloxacin Alone on the Development of Acute Graft-Versus-Host Disease After Marrow Transplantation in Patients With Hematologic Malignancies: Final Results and Long-Term Follow-Up of an Open-Label Prospective Randomized Trial. *Blood* 93, 3267–3275.

Berer, K., Mues, M., Koutrolos, M., Rasbi, Z.A., Boziki, M., Johner, C., Wekerle, H., and Krishnamoorthy, G. (2011). Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479, 538–541.

Beres, A., Komorowski, R., Mihara, M., and Drobyski, W.R. (2011). Instability of Foxp3 expression limits the ability of induced regulatory T cells to mitigate graft versus host disease. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 3969–3983.

- Beres, A.J., Haribhai, D., Chadwick, A.C., Gonyo, P.J., Williams, C.B., and Drobyski, W.R. (2012). CD8+ Foxp3+ regulatory T cells are induced during graft-versus-host disease and mitigate disease severity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *189*, 464–474.
- Bergman, R.K., Munoz, J.J., and Portis, J.L. (1978). Vascular permeability changes in the central nervous system of rats with hyperacute experimental allergic encephalomyelitis induced with the aid of a substance from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* *21*, 627–637.
- Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H.L., Lington, C., Sobel, R.A., and Kuchroo, V.K. (2003). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J. Exp. Med.* *197*, 1073–1081.
- Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007). T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat. Immunol.* *8*, 345–350.
- Beverly, B., Kang, S.M., Lenardo, M.J., and Schwartz, R.H. (1992). Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *Int. Immunol.* *4*, 661–671.
- Bhadri, V.A., Trahair, T.N., and Lock, R.B. (2012). Glucocorticoid resistance in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *J. Paediatr. Child Health* *48*, 634–640.
- Bhattacharya, A., Parillon, X., Zeng, S., Han, S., and Eissa, N.T. (2014). Deficiency of Autophagy in Dendritic Cells Protects against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Biol. Chem.* *289*, 26525–26532.
- Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T., and Brück, W. (2000). Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain J. Neurol.* *123 ( Pt 6)*, 1174–1183.
- Björnses, P., Aaltonen, J., Horelli-Kuitunen, N., Yaspo, M.L., and Peltonen, L. (1998). Gene defect behind APECED: a new clue to autoimmunity. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 1547–1553.
- Blasius, A.L., and Beutler, B. (2010). Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* *32*, 305–315.
- Blasius, A., Vermi, W., Krug, A., Facchetti, F., Cella, M., and Colonna, M. (2004). A cell-surface molecule selectively expressed on murine natural interferon-producing cells that blocks secretion of interferon- $\alpha$ . *Blood* *103*, 4201–4206.
- Blasius, A.L., Cella, M., Maldonado, J., Takai, T., and Colonna, M. (2006). Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood* *107*, 2474–2476.
- Blazar, B., White, E.S., and Couriel, D. (2012). Understanding Chronic GVHD from Different Angles. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *18*, S184–S188.
- Blazar, B.R., Korngold, R., and Vallera, D.A. (1997). Recent advances in graft-versus-host disease (GVHD) prevention. *Immunol. Rev.* *157*, 79–109.
- Blazar, B.R., McKenna, H.J., Panoskaltis-Mortari, A., and Taylor, P.A. (2001). Flt3 ligand (FL) treatment of murine donors does not modify graft-versus-host disease (GVHD) but FL treatment of recipients post-bone marrow transplantation accelerates GVHD lethality. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *7*, 197–207.
- Bluestone, J.A., Buckner, J.H., Fitch, M., Gitelman, S.E., Gupta, S., Hellerstein, M.K., Herold, K.C., Lares, A., Lee, M.R., Li, K., et al. (2015). Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* *7*, 315ra189.
- Boieri, M., Shah, P., Jalapothu, D., Zaitseva, O., Walter, L., Rolstad, B., Naper, C., Dressel, R., and Inngjerdingen, M. (2017). Rat acute GvHD is Th1 driven and characterized by predominant donor CD4+ T-cell infiltration of skin and gut. *Exp. Hematol.* *50*, 33–45.e3.
- Boks, M.A., Kager-Groenland, J.R., Haasjes, M.S.P., Zwaginga, J.J., van Ham, S.M., and ten Brinke, A. (2012). IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *142*, 332–342.
- Bolton, H.A., Roediger, B., and Groth, B.F. de S. The effects of IL-2 and Treg cells on dendritic cell homeostasis are mediated indirectly via activation of conventional T cells. *Eur. J. Immunol.* *45*, 1141–1147.
- Borghesi, L., Hsu, L.-Y., Miller, J.P., Anderson, M., Herzenberg, L., Herzenberg, L., Schlissel, M.S., Allman, D., and Gerstein, R.M. (2004). B Lineage-specific Regulation of V(D)J Recombinase Activity Is Established in Common Lymphoid Progenitors. *J. Exp. Med.* *199*, 491–502.

- Bossard, C., Malard, F., Arbez, J., Chevallier, P., Guillaume, T., Delaunay, J., Mosnier, J.-F., Tiberghien, P., Saas, P., Mohty, M., et al. (2012). Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Leukemia* 26, 1471–1474.
- Brattsand, R., and Linden, M. (1996). Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10 Suppl 2, 81-90; discussion 91-92.
- Brawand, P., Fitzpatrick, D.R., Greenfield, B.W., Brasel, K., Maliszewski, C.R., and Smedt, T.D. (2002). Murine Plasmacytoid Pre-Dendritic Cells Generated from Flt3 Ligand-Supplemented Bone Marrow Cultures Are Immature APCs. *J. Immunol.* 169, 6711–6719.
- de Brito, C., Tomkowiak, M., Ghittoni, R., Caux, C., Leverrier, Y., and Marvel, J. (2011). CpG promotes cross-presentation of dead cell-associated antigens by pre-CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells [corrected]. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 1503–1511.
- Brod, S.A., and Hood, Z. (2007). Ingested (oral) SIRS peptide 1-21 inhibits acute EAE by inducing Th2-like cytokines. *J. Neuroimmunol.* 183, 89–95.
- Broxmeyer, H.E. (1996). Is interleukin 17, an inducible cytokine that stimulates production of other cytokines, merely a redundant player in a sea of other biomolecules? *J. Exp. Med.* 183, 2411–2415.
- Bruin, A.M. de, Libregts, S.F., Valkhof, M., Boon, L., Touw, I.P., and Nolte, M.A. (2012). IFN $\gamma$  induces monopoiesis and inhibits neutrophil development during inflammation. *Blood* 119, 1543–1554.
- de Bruin, A.M., Buitenhuis, M., van der Sluijs, K.F., van Gisbergen, K.P.J.M., Boon, L., and Nolte, M.A. (2010). Eosinophil differentiation in the bone marrow is inhibited by T cell-derived IFN-gamma. *Blood* 116, 2559–2569.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paeper, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27, 68–73.
- Brunner, T., Mogil, R.J., LaFace, D., Yoo, N.J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S.J., Force, W.R., Lynch, D.H., Ware, C.F., et al. (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373, 441–444.
- Brunstein, C.G., Wagner, J.E., Weisdorf, D.J., Cooley, S., Noreen, H., Barker, J.N., DeFor, T., Verneris, M.R., Blazar, B.R., and Miller, J.S. (2009). Negative effect of KIR alloreactivity in recipients of umbilical cord blood transplant depends on transplantation conditioning intensity. *Blood* 113, 5628–5634.
- Brunstein, C.G., Miller, J.S., Cao, Q., McKenna, D.H., Hippen, K.L., Curtsinger, J., DeFor, T., Levine, B.L., June, C.H., Rubinstein, P., et al. (2011). Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 117, 1061–1070.
- Bryder, D., Ramsfjell, V., Dybedal, I., Theilgaard-Mönch, K., Högerkorp, C.M., Adolfsson, J., Borge, O.J., and Jacobsen, S.E. (2001). Self-renewal of multipotent long-term repopulating hematopoietic stem cells is negatively regulated by Fas and tumor necrosis factor receptor activation. *J. Exp. Med.* 194, 941–952.
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., and van Noort, J.M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 1013–1021.
- Burdelya, L.G., Krivokrysenko, V.I., Tallant, T.C., Strom, E., Gleiberman, A.S., Gupta, D., Kurnasov, O.V., Fort, F.L., Osterman, A.L., DiDonato, J.A., et al. (2008). An Agonist of Toll-Like Receptor 5 Has Radioprotective Activity in Mouse and Primate Models. *Science* 320, 226–230.
- Burt, R.K., Burns, W., Ruvolo, P., Fischer, A., Shiao, C., Guimaraes, A., Barrett, J., and Hess, A. (1995). Syngeneic bone marrow transplantation eliminates V beta 8.2 T lymphocytes from the spinal cord of Lewis rats with experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* 41, 526–531.
- Burt, R.K., Padilla, J., Begolka, W.S., Canto, M.C., and Miller, S.D. (1998). Effect of disease stage on clinical outcome after syngeneic bone marrow transplantation for relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 91, 2609–2616.
- Burt, R.K., Padilla, J., Dal Canto, M.C., and Miller, S.D. (1999). Viral hyperinfection of the central nervous system and high mortality after hematopoietic stem cell transplantation for treatment of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *Blood* 94, 2915–2922.
- Burt, R.K., Cohen, B.A., Russell, E., Spero, K., Joshi, A., Oyama, Y., Karpus, W.J., Luo, K., Jovanovic, B., Traynor, A., et

- al. (2003). Hematopoietic stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: failure of a total body irradiation-based conditioning regimen to prevent disease progression in patients with high disability scores. *Blood* *102*, 2373–2378.
- Burt, R.K., Loh, Y., Cohen, B., Stefoski, D., Stefosky, D., Balabanov, R., Katsamakakis, G., Oyama, Y., Russell, E.J., Stern, J., et al. (2009). Autologous non-myeloablative haemopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I/II study. *Lancet Neurol.* *8*, 244–253.
- Burt, R.K., Balabanov, R., Han, X., Sharrack, B., Morgan, A., Quigley, K., Yaung, K., Helenowski, I.B., Jovanovic, B., Spahovic, D., et al. (2015). Association of nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation with neurological disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *JAMA* *313*, 275–284.
- Calcaterra, C., Sfondrini, L., Rossini, A., Sommariva, M., Rumio, C., Ménard, S., and Balsari, A. (2008). Critical role of TLR9 in acute graft-versus-host disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 6132–6139.
- Calvet, L., Cabrespine, A., Boiret-Dupré, N., Merlin, E., Paillard, C., Berger, M., Bay, J.-O., Tournilhac, O., and Halle, P. Hematologic, immunologic reconstitution, and outcome of 342 autologous peripheral blood stem cell transplantations after cryopreservation in a –80°C mechanical freezer and preserved less than 6 months. *Transfusion (Paris)* *53*, 570–578.
- Carlson, M.J., West, M.L., Coghill, J.M., Panoskaltzis-Mortari, A., Blazar, B.R., and Serody, J.S. (2009). In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood* *113*, 1365–1374.
- Carter, N.A., Vasconcellos, R., Rosser, E.C., Tulone, C., Muñoz-Suano, A., Kamanaka, M., Ehrenstein, M.R., Flavell, R.A., and Mauri, C. (2011). Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 5569–5579.
- Casella, G., Finardi, A., Descamps, H., Colombo, F., Maiorino, C., Ruffini, F., Patrone, M., Degano, M., Martino, G., Muzio, L., et al. (2017). IL-27, but not IL-35, inhibits neuroinflammation through modulating GM-CSF expression. *Sci. Rep.* *7*, 16547.
- Castellazzi, M., Tamborino, C., Cani, A., Negri, E., Baldi, E., Seraceni, S., Tola, M.R., Granieri, E., Contini, C., and Fainardi, E. (2010). Epstein-Barr virus-specific antibody response in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* *16*, 883–887.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* *5*, 919–923.
- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat. Immunol.* *1*, 305–310.
- Chakraverty, R., Eom, H.-S., Sachs, J., Buchli, J., Cotter, P., Hsu, R., Zhao, G., and Sykes, M. (2006). Host MHC class II+ antigen-presenting cells and CD4 cells are required for CD8-mediated graft-versus-leukemia responses following delayed donor leukocyte infusions. *Blood* *108*, 2106–2113.
- Chamorro, S., García-Vallejo, J.J., Unger, W.W.J., Fernandes, R.J., Bruijns, S.C.M., Laban, S., Roep, B.O., 't Hart, B.A., and van Kooyk, Y. (2009). TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 2984–2994.
- Chandra, J., Kuo, P.T., Hahn, A.M., Belz, G.T., and Frazer, I.H. (2017). Batf3 selectively determines acquisition of CD8+ dendritic cell phenotype and function. *Immunol. Cell Biol.* *95*, 215–223.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* *198*, 1875–1886.
- Chen, X., Vodanovic-Jankovic, S., Johnson, B., Keller, M., Komorowski, R., and Drobyski, W.R. (2007). 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* *110*, 3804–3813.
- Chen, X., Das, R., Komorowski, R., Beres, A., Hessner, M.J., Mihara, M., and Drobyski, W.R. (2009). Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood* *114*, 891–900.

- Chen, Z., Yang, D., Peng, X., Lin, J., Su, Z., Li, J., Zhang, X., and Weng, Y. (2018). Beneficial effect of atorvastatin-modified dendritic cells pulsed with myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantigen on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroreport* 29, 317–327.
- Cheng, H., Tian, J., Li, Z., Zeng, L., Pan, B., Song, G., Chen, W., and Xu, K. (2012). TH17 cells are critical for skin-specific pathological injury in acute graft-versus-host disease. *Transplant. Proc.* 44, 1412–1418.
- Chien, C.-H., and Chiang, B.-L. (2017). Regulatory T cells induced by B cells: a novel subpopulation of regulatory T cells. *J. Biomed. Sci.* 24, 86.
- Chitu, V., and Stanley, E.R. (2006). Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 39–48.
- Chiu, C.Y., Greninger, A.L., Kanada, K., Kwok, T., Fischer, K.F., Runckel, C., Louie, J.K., Glaser, C.A., Yagi, S., Schnurr, D.P., et al. (2008). Identification of cardioviruses related to Theiler's murine encephalomyelitis virus in human infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14124–14129.
- Choi, B.Y., Kim, J.H., Kho, A.R., Kim, I.Y., Lee, S.H., Lee, B.E., Choi, E., Sohn, M., Stevenson, M., Chung, T.N., et al. (2015). Inhibition of NADPH oxidase activation reduces EAE-induced white matter damage in mice. *J. Neuroinflammation* 12, 104.
- Choi, H., Lee, R.H., Bazhanov, N., Oh, J.Y., and Prockop, D.J. (2011). Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- $\kappa$ B signaling in resident macrophages. *Blood* 118, 330–338.
- Choi, S.W., Kitko, C.L., Braun, T., Paczesny, S., Yanik, G., Mineishi, S., Krijanovski, O., Jones, D., Whitfield, J., Cooke, K., et al. (2008). Change in plasma tumor necrosis factor receptor 1 levels in the first week after myeloablative allogeneic transplantation correlates with severity and incidence of GVHD and survival. *Blood* 112, 1539–1542.
- Chong, W.P., Horai, R., Mattapallil, M.J., Silver, P.B., Chen, J., Zhou, R., Sergeev, Y., Villasmil, R., Chan, C.-C., and Caspi, R.R. (2014). IL-27p28 inhibits central nervous system autoimmunity by concurrently antagonizing Th1 and Th17 responses. *J. Autoimmun.* 50, 12–22.
- Chorny, A., Gonzalez-Rey, E., Fernandez-Martin, A., Ganea, D., and Delgado, M. (2006). Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells that prevent acute graft-versus-host disease while maintaining the graft-versus-tumor response. *Blood* 107, 3787–3794.
- Chou, H.-S., Hsieh, C.-C., Charles, R., Wang, L., Wagner, T., Fung, J.J., Qian, S., and Lu, L.L. (2012). Myeloid-derived suppressor cells protect islet transplants by B7-H1 mediated enhancement of T regulatory cells. *Transplantation* 93, 272–282.
- Christensen, J.L., and Weissman, I.L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14541–14546.
- Ciceri, F., Bonini, C., Stanghellini, M.T.L., Bondanza, A., Traversari, C., Salomoni, M., Turchetto, L., Colombi, S., Bernardi, M., Peccatori, J., et al. (2009). Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I–II study. *Lancet Oncol.* 10, 489–500.
- Clark, F.J., Freeman, L., Dzionek, A., Schmitz, J., McMullan, D., Simpson, P., Mason, J., Mahendra, P., Craddock, C., Griffiths, M., et al. (2003). Origin and subset distribution of peripheral blood dendritic cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* 75, 221–225.
- Cocuzza, C.E., Piazza, F., Musumeci, R., Oggioni, D., Andreoni, S., Gardinetti, M., Fusco, L., Frigo, M., Banfi, P., Rottoli, M.R., et al. (2014). Quantitative Detection of Epstein-Barr Virus DNA in Cerebrospinal Fluid and Blood Samples of Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *PLOS ONE* 9, e94497.
- Codarri, L., Gyölvézi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T. and Becher, B. (2011) ROR $\gamma$ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature Immunology* 560–567
- Cohen, J.A., Imrey, P.B., Planchon, S.M., Bermel, R.A., Fisher, E., Fox, R.J., Bar-Or, A., Sharp, S.L., Skaramagas, T.T., Jagodnik, P., et al. (2018). Pilot trial of intravenous autologous culture-expanded mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 24, 501–511.
- Coles, A.J., Wing, M.G., Molyneux, P., Paolillo, A., Davie, C.M., Hale, G., Miller, D., Waldmann, H., and Compston, A.

- (1999). Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* *46*, 296–304.
- Colson, Y.L., Christopher, K., Glickman, J., Taylor, K.N., Wright, R., and Perkins, D.L. (2004). Absence of clinical GVHD and the in vivo induction of regulatory T cells after transplantation of facilitating cells. *Blood* *104*, 3829–3835.
- Compston, A., and Coles, A. (2002). Multiple sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* *359*, 1221–1231.
- Cook, A.D., Turner, A.L., Braine, E.L., Pobjoy, J., Lenzo, J.C., and Hamilton, J.A. (2018). Regulation of systemic and local myeloid cell subpopulations by bone marrow cell-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* *63*, 2340–2351.
- Cooke, K.R., Gerbitz, A., Crawford, J.M., Teshima, T., Hill, G.R., Tesolin, A., Rossignol, D.P., and Ferrara, J.L. (2001). LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* *107*, 1581–1589.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* *204*, 1757–1764.
- Copland, D.A., Calder, C.J., Raveney, B.J.E., Nicholson, L.B., Phillips, J., Cherwinski, H., Jenmalm, M., Sedgwick, J.D., and Dick, A.D. (2007). Monoclonal Antibody-Mediated CD200 Receptor Signaling Suppresses Macrophage Activation and Tissue Damage in Experimental Autoimmune Uveoretinitis. *Am. J. Pathol.* *171*, 580–598.
- Coppin, E., Florentin, J., Vasamsetti, S.B., Arunkumar, A., Sembrat, J., Rojas, M., and Dutta, P. Splenic hematopoietic stem cells display a pre-activated phenotype. *Immunol. Cell Biol.*
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V., et al. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* *107*, 367–372.
- Correale, J., and Farez, M.F. (2013). Parasite Infections in Multiple Sclerosis Modulate Immune Responses through a Retinoic Acid-Dependent Pathway. *J. Immunol.* *191*, 3827–3837.
- Correale, J., Fiol, M., and Gilmore, W. (2006). The risk of relapses in multiple sclerosis during systemic infections. *Neurology* *67*, 652–659.
- Cossío, I., Scala, M.D., Adrover, J.M., Casanova-Acebes, M., Weiss, L., Weber, C., Lucas-Alcaraz, D., and Hidalgo, A. (2017). Replenishment of Damaged Bone Marrow Niches By Circulating Hematopoietic Stem Cells. *Blood* *130*, 3750–3750.
- Couriel, D.R., Saliba, R., de Lima, M., Giralt, S., Andersson, B., Khouri, I., Hosing, C., Ippoliti, C., Shpall, E.J., Champlin, R., et al. (2009). A phase III study of infliximab and corticosteroids for the initial treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *15*, 1555–1562.
- Croxford, A., Lanzinger, M., Hartmann, F., Schreiner, B., Mair, F., Pelczar, P., Clausen, B.E., Jung, S., Greter, M., Becher, B. (2015a) The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2+ Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity* *43*, 502-514
- Croxford, A., Spath, S., Becher, B. (2015b) GM-CSF in Neuroinflammation: Licensing Myeloid Cells for Tissue Damage. *Trend in immunol*, *36*, 651-662
- Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., et al. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* *421*, 744–748.
- Cudrici, C., Ito, T., Zafranskaia, E., Niculescu, F., Mullen, K.M., Vlaicu, S., Judge, S.I.V., Calabresi, P.A., and Rus, H. (2007). Dendritic cells are abundant in non-lesional gray matter in multiple sclerosis. *Exp. Mol. Pathol.* *83*, 198–206.
- Cunnusamy, K., Baughman, E.J., Franco, J., Ortega, S.B., Sinha, S., Chaudhary, P., Greenberg, B.M., Frohman, E.M., and Karandikar, N.J. (2014). Disease exacerbation of multiple sclerosis is characterized by loss of terminally differentiated autoregulatory CD8+ T cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *152*, 115–126.
- Dann, A., Poeck, H., Croxford, A.L., Gaupp, S., Kierdorf, K., Knust, M., Pfeifer, D., Maihoefer, C., Endres, S., Kalinke, U., et al. (2011). Cytosolic RIG-I-like helicases act as negative regulators of sterile inflammation in the CNS. *Nat. Neurosci.* *15*, 98–106.
- Darlak, K.A., Wang, Y., Li, J.-M., Harris, W.A.C., Owens, L.M., and Waller, E.K. (2013). Enrichment of IL-12-producing

plasmacytoid dendritic cells in donor bone marrow grafts enhances graft-versus-leukemia activity in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **19**, 1331–1339.

Darlington, P.J., Touil, T., Doucet, J.-S., Gaucher, D., Zeidan, J., Gauchat, D., Corsini, R., Kim, H.J., Duddy, M., Jalili, F., et al. Diminished Th17 (not Th1) responses underlie multiple sclerosis disease abrogation after hematopoietic stem cell transplantation. *Ann. Neurol.* **73**, 341–354.

Daro, E., Pulendran, B., Brasel, K., Teepe, M., Pettit, D., Lynch, D.H., Vremec, D., Robb, L., Shortman, K., McKenna, H.J., et al. (2000). Polyethylene Glycol-Modified GM-CSF Expands CD11b<sup>high</sup>CD11c<sup>high</sup> But Not CD11b<sup>low</sup>CD11c<sup>high</sup> Murine Dendritic Cells In Vivo: A Comparative Analysis with Flt3 Ligand. *J. Immunol.* **165**, 49–58.

Davis, L.S., and Lipsky, P.E. (1993). Tolerance induction of human CD4<sup>+</sup> T cells: markedly enhanced sensitivity of memory versus naive T cells to peripheral anergy. *Cell. Immunol.* **146**, 351–361.

Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1257–1265.

Degowin, R.L., and Lass, S.L. (1985). Chronic inflammation impairs hematopoiesis and survival after irradiation. *J. Lab. Clin. Med.* **105**, 299–304.

Depaolo, R.W., Tang, F., Kim, I., Han, M., Levin, N., Ciletti, N., Lin, A., Anderson, D., Schneewind, O., and Jabri, B. (2008). Toll-like receptor 6 drives differentiation of tolerogenic dendritic cells and contributes to LcrV-mediated plague pathogenesis. *Cell Host Microbe* **4**, 350–361.

Derfuss, T., Parikh, K., Velhin, S., Braun, M., Mathey, E., Krumbholz, M., Kümpfel, T., Moldenhauer, A., Rader, C., Sonderegger, P., et al. (2009). Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8302–8307.

Derfuss, T., Linington, C., Hohlfeld, R., and Meinl, E. (2010). Axo-glial antigens as targets in multiple sclerosis: implications for axonal and grey matter injury. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **88**, 753–761.

DeRijk, R.H., Eskandari, F., and Sternberg, E.M. (2004). Corticosteroid resistance in a subpopulation of multiple sclerosis patients as measured by ex vivo dexamethasone inhibition of LPS induced IL-6 production. *J. Neuroimmunol.* **151**, 180–188.

Deshpande, P., King, I.L., and Segal, B.M. (2007). Cutting edge: CNS CD11c<sup>+</sup> cells from mice with encephalomyelitis polarize Th17 cells and support CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cell-mediated immunosuppression, suggesting dual roles in the disease process. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 6695–6699.

Desreumaux, P., Foussat, A., Allez, M., Beaugerie, L., Hébuterne, X., Bouhnik, Y., Nachury, M., Brun, V., Bastian, H., Belmonte, N., et al. (2012). Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology* **143**, 1207-1217.e1-2.

Dexter, T.M., Allen, T.D., and Lajtha, L.G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J. Cell. Physiol.* **91**, 335–344.

Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., Krasovsky, J., Munz, C., and Bhardwaj, N. (2001). Antigen-Specific Inhibition of Effector T Cell Function in Humans after Injection of Immature Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* **193**, 233–238.

Di Caro, V., Phillips, B., Engman, C., Harnaha, J., Trucco, M., and Giannoukakis, N. (2014). Involvement of Suppressive B-Lymphocytes in the Mechanism of Tolerogenic Dendritic Cell Reversal of Type 1 Diabetes in NOD Mice. *PLoS ONE* **9**.

Di Dario, M., Colombo, E., Govi, C., De Feo, D., Messina, M.J., Romeo, M., Sangalli, F., Moiola, L., Rodegher, M., Martino, G., et al. (2015). Myeloid cells as target of fingolimod action in multiple sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* **2**, e157.

Di Ianni, M., Falzetti, F., Carotti, A., Terenzi, A., Castellino, F., Bonifacio, E., Del Papa, B., Zei, T., Ostini, R.I., Cecchini, D., et al. (2011). Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* **117**, 3921–3928.

Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A.M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**, 3838–3843.

- Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sørensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., Xue, Y., Mellman, I., Banchereau, J., and Connolly, J.E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat. Immunol.* *9*, 551–557.
- Diao, J., Winter, E., Cantin, C., Chen, W., Xu, L., Kelvin, D., Phillips, J., and Cattral, M.S. (2006). In situ replication of immediate dendritic cell (DC) precursors contributes to conventional DC homeostasis in lymphoid tissue. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 7196–7206.
- DiLillo, D.J., Matsushita, T., and Tedder, T.F. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1183*, 38–57.
- Diveu, C., McGeachy, M.J., Boniface, K., Stumhofer, J.S., Sathe, M., Joyce-Shaikh, B., Chen, Y., Tato, C.M., McClanahan, T.K., de Waal Malefyt, R., et al. (2009). IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 5748–5756.
- Dombrowski, Y., O’Hagan, T., Dittmer, M., Penalva, R., Mayoral, S.R., Bankhead, P., Fleville, S., Eleftheriadis, G., Zhao, C., Naughton, M., et al. (2017). Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nat. Neurosci.* *20*, 674–680.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* *8*, 315–317.
- Duarte, J.H., Zelenay, S., Bergman, M.-L., Martins, A.C., and Demengeot, J. (2009). Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur. J. Immunol.* *39*, 948–955.
- Duffner, U.A., Maeda, Y., Cooke, K.R., Reddy, P., Ordemann, R., Liu, C., Ferrara, J.L.M., and Teshima, T. (2004). Host Dendritic Cells Alone Are Sufficient to Initiate Acute Graft-versus-Host Disease. *J. Immunol.* *172*, 7393–7398.
- Duraes, F.V., Lippens, C., Steinbach, K., Dubrot, J., Brighthouse, D., Bendriss-Vermare, N., Issazadeh-Navikas, S., Merkler, D., and Hugues, S. (2016). pDC therapy induces recovery from EAE by recruiting endogenous pDC to sites of CNS inflammation. *J. Autoimmun.* *67*, 8.
- Durakovic, N., Bezak, K.B., Skarica, M., Radojicic, V., Fuchs, E.J., Murphy, G.F., and Luznik, L. (2006). Host-derived Langerhans cells persist after MHC-matched allografting independent of donor T cells and critically influence the alloresponses mediated by donor lymphocyte infusions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 4414–4425.
- Durelli, L., Conti, L., Clerico, M., Boselli, D., Contessa, G., Ripellino, P., Ferrero, B., Eid, P., and Novelli, F. (2009). T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann. Neurol.* *65*, 499–509.
- Dutt, S., Ermann, J., Tseng, D., Liu, Y.P., George, T.I., Fathman, C.G., and Strober, S. (2005). L-selectin and beta7 integrin on donor CD4 T cells are required for the early migration to host mesenteric lymph nodes and acute colitis of graft-versus-host disease. *Blood* *106*, 4009–4015.
- Ebert, L.M., Schaerli, P., and Moser, B. (2005). Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol. Immunol.* *42*, 799–809.
- Edinger, M., Hoffmann, P., Ermann, J., Drago, K., Fathman, C.G., Strober, S., and Negrin, R.S. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat. Med.* *9*, 1144–1150.
- Elmaagacli, A.H., Koldehoff, M., and Beelen, D.W. (2009). Improved outcome of hematopoietic SCT in patients with homozygous gene variant of Toll-like receptor 9. *Bone Marrow Transplant.* *44*, 295–302.
- Elyaman, W., Bradshaw, E.M., Wang, Y., Oukka, M., Kivisäkk, P., Chiba, S., Yagita, H., and Houry, S.J. (2007). Jagged1 and Delta1 Differentially Regulate the Outcome of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* *179*, 5990–5998.
- Emmer, P.M., van der Vlag, J., Adema, G.J., and Hilbrands, L.B. (2006). Dendritic cells activated by lipopolysaccharide after dexamethasone treatment induce donor-specific allograft hyporesponsiveness. *Transplantation* *81*, 1451–1459.
- Ephrem, A., Chamat, S., Miquel, C., Fisson, S., Mouthon, L., Caligiuri, G., Delignat, S., Elluru, S., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., et al. (2008). Expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *111*, 9.
- Eriguchi, Y., Takashima, S., Oka, H., Shimoji, S., Nakamura, K., Uryu, H., Shimoda, S., Iwasaki, H., Shimono, N., Ayabe, T., et al. (2012). Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of



$\alpha$ -defensins. *Blood* 120, 223–231.

Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F.G., Higgins, J.P., Negrin, R.S., Fathman, C.G., and Strober, S. (2005). Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 105, 2220–2226.

Espinoza, J.L., Kotecha, R., and Nakao, S. (2017). Microbe-Induced Inflammatory Signals Triggering Acquired Bone Marrow Failure Syndromes. *Front. Immunol.* 8.

Esplin, B.L., Shimazu, T., Welner, R.S., Garrett, K.P., Nie, L., Zhang, Q., Humphrey, M.B., Yang, Q., Borghesi, L.A., and Kincade, P.W. (2011). Chronic Exposure to a TLR Ligand Injures Hematopoietic Stem Cells. *J. Immunol.* 186, 5367–5375.

Fagius, J., Lundgren, J., and Oberg, G. (2009). Early highly aggressive MS successfully treated by hematopoietic stem cell transplantation. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 15, 229–237.

Fallarino, F., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Marshall, B., Keskin, D.B., Mellor, A.L., Fioretti, M.C., Grohmann, U., et al. (2002). Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells. *Int. Immunol.* 14, 65–68.

Fan, H., Peck, O.M., Tempel, G.E., Halushka, P.V., and Cook, J.A. (2004). Toll-like receptor 4 coupled G1 protein signaling pathways regulate extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and AP-1 activation independent of NFkappaB activation. *Shock Augusta Ga* 22, 57–62.

Fancke, B., Suter, M., Hochrein, H., and O’Keeffe, M. (2008). M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin. *Blood* 111, 150–159.

Farber, D.L., and Ahmadzadeh, M. (2002). Dissecting the complexity of the memory T cell response. *Immunol. Res.* 25, 247–259.

Farias, A.S., Spagnol, G.S., Bordeaux-Rego, P., Oliveira, C.O.F., Fontana, A.G.M., de Paula, R.F.O., Santos, M.P.A., Pradella, F., Moraes, A.S., Oliveira, E.C., et al. (2013). Vitamin D3 induces IDO+ tolerogenic DCs and enhances Treg, reducing the severity of EAE. *CNS Neurosci. Ther.* 19, 269–277.

Fassas, A., Anagnostopoulos, A., Kazis, A., Kapinas, K., Sakellari, I., Kimiskidis, V., and Tsompanakou, A. (1997). Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study. *Bone Marrow Transplant.* 20, 631–638.

Fauci, A.S., and Dale, D.C. (1975a). Alternate-day prednisone therapy and human lymphocyte subpopulations. *J. Clin. Invest.* 55, 22–32.

Fauci, A.S., and Dale, D.C. (1975b). The effect of Hydrocortisone on the kinetics of normal human lymphocytes. *Blood* 46, 235–243.

Feng, J., Misu, T., Fujihara, K., Sakoda, S., Nakatsuji, Y., Fukaura, H., Kikuchi, S., Tashiro, K., Suzumura, A., Ishii, N., et al. (2004). Ibudilast, a nonselective phosphodiesterase inhibitor, regulates Th1/Th2 balance and NKT cell subset in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 10, 494–498.

Ferrara, J.L., and Deeg, H.J. (1991). Graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* 324, 667–674.

Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* 3, 944–950.

Fiore, N., Castellano, G., Blasi, A., Capobianco, C., Loverre, A., Montinaro, V., Netti, S., Torres, D., Manno, C., Grandaliano, G., et al. (2008). Immature myeloid and plasmacytoid dendritic cells infiltrate renal tubulointerstitium in patients with lupus nephritis. *Mol. Immunol.* 45, 259–265.

Fischer, H.G., and Reichmann, G. (2001). Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 2717–2726.

Fitzgerald, D.C., Ciric, B., Touil, T., Harle, H., Grammatikopolou, J., Das Sarma, J., Gran, B., Zhang, G.-X., and Rostami, A. (2007). Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 3268–3275.

Fleetwood, A.J., Cook, A.D., and Hamilton, J.A. (2005). Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Crit. Rev. Immunol.* 25, 405–428.

Fleming, A., and Allison, V.D. (1922). Observations on a Bacteriolytic Substance (“Lysozyme”) Found in Secretions and

Tissues. *Br. J. Exp. Pathol.* **3**, 252–260.

- Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M.R., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2013). CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci. Transl. Med.* **5**, 173ra23.
- Flores-Romo, L., Björck, P., Duvert, V., van Kooten, C., Saeland, S., and Banchereau, J. (1997). CD40 ligation on human cord blood CD34+ hematopoietic progenitors induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells. *J. Exp. Med.* **185**, 341–349.
- Flowers, M.E.D., Inamoto, Y., Carpenter, P.A., Lee, S.J., Kiem, H.-P., Petersdorf, E.W., Pereira, S.E., Nash, R.A., Mielcarek, M., Fero, M.L., et al. (2011). 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* **117**, 3214–3219.
- Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* **311**, 83–87.
- Foley, J.E., Mariotti, J., Ryan, K., Eckhaus, M., and Fowler, D.H. (2008). Th2 Cell Therapy of Established Acute Graft-Versus-Host Disease Requires IL-4 and IL-10 and Is Abrogated by IL-2 or Host-type Antigen-Presenting-Cells. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **14**, 959–972.
- Fonteneau, J.-F., Larsson, M., Beignon, A.-S., McKenna, K., Dasilva, I., Amara, A., Liu, Y.-J., Lifson, J.D., Littman, D.R., and Bhardwaj, N. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J. Virol.* **78**, 5223–5232.
- Fowler, D.H., Kurasawa, K., Husebekk, A., Cohen, P.A., and Gress, R.E. (1994). Cells of Th2 cytokine phenotype prevent LPS-induced lethality during murine graft-versus-host reaction. Regulation of cytokines and CD8+ lymphoid engraftment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **152**, 1004–1013.
- Fowler, D.H., Breglio, J., Nagel, G., Eckhaus, M.A., and Gress, R.E. (1996). Allospecific CD8+ Tc1 and Tc2 populations in graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **157**, 4811–4821.
- Franke-Fayard, B., Fonager, J., Braks, A., Khan, S.M., and Janse, C.J. (2010). Sequestration and Tissue Accumulation of Human Malaria Parasites: Can We Learn Anything from Rodent Models of Malaria? *PLoS Pathog.* **6**.
- Fransson, M., Piras, E., Burman, J., Nilsson, B., Essand, M., Lu, B., Harris, R.A., Magnusson, P.U., Brittebo, E., and Loskog, A.S. (2012). CAR/FoxP3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery. *J. Neuroinflammation* **9**, 112.
- Fritz-French, C., and Tyor, W. (2012). Interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) neurotoxicity. *Cytokine Growth Factor Rev.* **23**, 7–14.
- Fritzsching, B., Haas, J., König, F., Kunz, P., Fritzsching, E., Pöschl, J., Krammer, P.H., Brück, W., Suri-Payer, E., and Wildemann, B. (2011). Intracerebral human regulatory T cells: analysis of CD4+ CD25+ FOXP3+ T cells in brain lesions and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *PloS One* **6**, e17988.
- Fu, J., Wang, D., Yu, Y., Heinrichs, J., Wu, Y., Schutt, S., Kaosaard, K., Liu, C., Haarberg, K., Bastian, D., et al. (2015). T-bet is critical for the development of acute graft-versus-host disease through controlling T cell differentiation and function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 388–397.
- Fugier-Vivier, I.J., Rezzoug, F., Huang, Y., Graul-Layman, A.J., Schanie, C.L., Xu, H., Chilton, P.M., and Ildstad, S.T. (2005). Plasmacytoid precursor dendritic cells facilitate allogeneic hematopoietic stem cell engraftment. *J. Exp. Med.* **201**, 373–383.
- Fujii, W., Ashihara, E., Hirai, H., Nagahara, H., Kajitani, N., Fujioka, K., Murakami, K., Seno, T., Yamamoto, A., Ishino, H., et al. (2013). Myeloid-derived suppressor cells play crucial roles in the regulation of mouse collagen-induced arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**, 1073–1081.
- Fujimoto, M., Fujimoto, Y., Poe, J.C., Jansen, P.J., Lowell, C.A., DeFranco, A.L., and Tedder, T.F. (2000). CD19 regulates Src family protein tyrosine kinase activation in B lymphocytes through processive amplification. *Immunity* **13**, 47–57.
- Fujita, S., Sato, Y., Sato, K., Eizumi, K., Fukaya, T., Kubo, M., Yamashita, N., and Sato, K. (2007). Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood* **110**, 3793–3803.
- Funderburg, N.T., Jadowsky, J.K., Lederman, M.M., Feng, Z., Weinberg, A., and Sieg, S.F. (2011). The Toll-like receptor 1/2 agonists Pam3CSK4 and human  $\beta$ -defensin-3 differentially induce interleukin-10 and nuclear factor- $\kappa$ B

signalling patterns in human monocytes. *Immunology* 134, 151–160.

Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 162–174.

Gadani, S.P., Walsh, J.T., Smirnov, I., Zheng, J., and Kipnis, J. (2015). The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury. *Neuron* 85, 703–709.

Galimberti, D., Scalabrini, D., Fenoglio, C., De Riz, M., Comi, C., Venturelli, E., Cortini, F., Piola, M., Leone, M., Dianzani, U., et al. (2008). Gender-specific influence of the chromosome 16 chemokine gene cluster on the susceptibility to Multiple Sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 267, 86–90.

Gallicchio, V.S., Shedlofsky, S.I., Swim, A.T., Robinson, J.M., Hulette, B.C., Messino, M.J., and Doukas, M.A. (1989). Modulation of murine hematopoiesis in vivo with recombinant murine interleukin-1. *J. Biol. Response Mod.* 8, 422–439.

Gandhi, R., Farez, M.F., Wang, Y., Kozoriz, D., Quintana, F.J., and Weiner, H.L. (2010). Cutting edge: human latency-associated peptide+ T cells: a novel regulatory T cell subset. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 4620–4624.

Garcia, M.R., Ledgerwood, L., Yang, Y., Xu, J., Lal, G., Burrell, B., Ma, G., Hashimoto, D., Li, Y., Boros, P., et al. (2010). Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 2486–2496.

Gautreau, L., Arcangeli, M.-L., Pasqualetto, V., Joret, A.-M., Garcia-Cordier, C., Mégret, J., Schneider, E., and Ezine, S. (2007). Identification of an IL-7-Dependent Pre-T Committed Population in the Spleen. *J. Immunol.* 179, 2925–2935.

van Gelder, M., Kinwel-Bohré, E.P., and van Bekkum, D.W. (1993). Treatment of experimental allergic encephalomyelitis in rats with total body irradiation and syngeneic BMT. *Bone Marrow Transplant.* 11, 233–241.

Geissman, F., Manz, M., Jung, S., Sieweke, M., Merad, M., and Ley, C., Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science*. 2010 Feb 5; 327(5966): 656–661.

Gerdoni, E., Gallo, B., Casazza, S., Musio, S., Bonanni, I., Pedemonte, E., Mantegazza, R., Frassoni, F., Mancardi, G., Pedotti, R., et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* 61, 219–227.

Gerritse, K., Laman, J.D., Noelle, R.J., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Boersma, W.J., and Claassen, E. (1996). CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 2499–2504.

Ghannam, S., Pène, J., Torcy-Moquet, G., Jorgensen, C., and Yssel, H. (2010). Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation and Function and Induce a T Regulatory Cell Phenotype. *J. Immunol.* 185, 302–312.

Ghirelli, C., Zollinger, R., and Soumelis, V. (2010). Systematic cytokine receptor profiling reveals GM-CSF as a novel TLR-independent activator of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 115, 5037–5040.

Ghosh, H.S., Cisse, B., Bunin, A., Lewis, K.L., and Reizis, B. (2010). Continuous expression of the transcription factor E2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 33, 905–916.

Giannoukakis, N., Phillips, B., Finegold, D., Harnaha, J., and Trucco, M. (2011). Phase I (Safety) Study of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells in Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes Care* 34, 2026–2032.

Gilliet, M., Boonstra, A., Paturel, C., Antonenko, S., Xu, X.-L., Trinchieri, G., O'Garra, A., and Liu, Y.-J. (2002). The Development of Murine Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors Is Differentially Regulated by FLT3-ligand and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J. Exp. Med.* 195, 953–958.

Giordana, M.T., Cavalla, P., Uccelli, A., Laroni, A., Bandini, F., Vercellino, M., and Mancardi, G. (2018). Overexpression of sphingosine-1-phosphate receptors on reactive astrocytes drives neuropathology of multiple sclerosis rebound after fingolimod discontinuation. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 1352458518763095.

Giovannoni, G., Cutter, G., Sormani, M.P., Belachew, S., Hyde, R., Koendgen, H., Knappertz, V., Tomic, D., Leppert, D., Herndon, R., et al. (2017). Is multiple sclerosis a length-dependent central axonopathy? The case for therapeutic lag and the asynchronous progressive MS hypotheses. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 12, 70–78.

Glenn, J.D., Smith, M.D., Calabresi, P.A., and Whartenby, K.A. (2014). Mesenchymal stem cells differentially modulate effector CD8+ T cell subsets and exacerbate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 2744–2755.

- Glucksberg, H., Storb, R., Fefer, A., Buckner, C.D., Neiman, P.E., Clift, R.A., Lerner, K.G., and Thomas, E.D. (1974). Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* *18*, 295–304.
- Gniadek, P., Aktas, O., Wandinger, K.-P., Bellmann-Strobl, J., Wengert, O., Weber, A., von Wussow, P., Obert, H.-J., and Zipp, F. (2003). Systemic IFN- $\beta$  treatment induces apoptosis of peripheral immune cells in MS patients. *J. Neuroimmunol.* *137*, 187–196.
- Godfrey, D.I., Kennedy, J., Mombaerts, P., Tonegawa, S., and Zlotnik, A. (1994). Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8- thymocyte differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *152*, 4783–4792.
- Gonçalves, M.V., Yamamoto, M., Kimura, E.Y.S., Colturato, V.A.R., de Souza, M.P., Mauad, M., Ikoma, M.V., Novis, Y., Rocha, V., Ginani, V.C., et al. (2015). Low Counts of Plasmacytoid Dendritic Cells after Engraftment Are Associated with High Early Mortality after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *21*, 1223–1229.
- Gowdy, K.M., Nugent, J.L., Martinu, T., Potts, E., Snyder, L.D., Foster, W.M., and Palmer, S.M. (2012). Protective role of T-bet and Th1 cytokines in pulmonary graft-versus-host disease and peribronchiolar fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *46*, 249–256.
- Grajales-Reyes, G.E., Iwata, A., Albring, J., Wu, X., Tussiwand, R., Kc, W., Kretzer, N.M., Briseño, C.G., Durai, V., Bagadia, P., et al. (2015). Batf3 maintains autoactivation of Irf8 for commitment of a CD8 $\alpha$ (+) conventional DC clonogenic progenitor. *Nat. Immunol.* *16*, 708–717.
- Gray, R.C., Kuchtey, J., and Harding, C.V. (2007). CpG-B ODNs potently induce low levels of IFN- $\alpha$  and induce IFN- $\alpha$ -dependent MHC-I cross-presentation in DCs as effectively as CpG-A and CpG-C ODNs. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 1075–1085.
- Graze, P.R., and Gale, R.P. (1979). Chronic graft versus host disease: A syndrome of disordered immunity. *Am. J. Med.* *66*, 611–620.
- Gregori, S., Tomasoni, D., Pacciani, V., Scirpoli, M., Battaglia, M., Magnani, C.F., Hauben, E., and Roncarolo, M.-G. (2010). Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* *116*, 935–944.
- Greter, M., Heppner, F.L., Lemos, M.P., Odermatt, B.M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R.J., and Becher, B. (2005). Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* *11*, 328–334.
- Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., et al. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* *3*, 1097–1101.
- Grouard, G., Risoan, M.C., Figueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* *185*, 1101–1111.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1996). Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* *184*, 19–29.
- Gruh, I., and Martin, U. (2009). Transdifferentiation of stem cells: a critical view. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* *114*, 73–106.
- Gu, J., Lu, L., Chen, M., Xu, L., Lan, Q., Li, Q., Liu, Z., Chen, G., Wang, P., Wang, X., et al. (2014). TGF- $\beta$ -induced CD4+Foxp3+ T cells attenuate acute graft-versus-host disease via suppressing expansion and killing of effector CD8+ cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 3388–3397.
- Guo, B., Chang, E.Y., and Cheng, G. (2008). The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 1680–1690.
- Guo, W., Wang, C., Wang, X., Luo, C., Yu, D., Wang, Y., Chen, Y., Lei, W., Gao, X., and Yao, W. (2015). A novel human truncated IL12r $\beta$ 1-Fc fusion protein ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis via specific binding of p40 to inhibit Th1 and Th17 cell differentiation. *Oncotarget* *6*, 28539–28555.
- Hadeiba, H., Butcher, E.C. Thymus-homing dendritic cells in central tolerance. (2013) *Eur J Immunol.* *43*(6): 1425–1429.
- Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., and Butcher, E.C. (2008). CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* *9*, 1253–1260.

- Haider, L., Zrzavy, T., Hametner, S., Höftberger, R., Bagnato, F., Grabner, G., Trattnig, S., Pfeifenbring, S., Brück, W., and Lassmann, H. (2016). The topography of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Brain J. Neurol.* *139*, 807–815.
- Han, J., Sun, L., Fan, X., Wang, Z., Cheng, Y., Zhu, J., Jin, T., (2016) Role of Regulatory B Cells in Neuroimmunologic Disorders. *J. of Neuro. Res.* *94*:693–701
- Harada, S., Kimura, T., Fujiki, H., Nakagawa, H., Ueda, Y., Itoh, T., Yamagishi, H., and Sonoda, Y. (2007). Flt3 ligand promotes myeloid dendritic cell differentiation of human hematopoietic progenitor cells: Possible application for cancer immunotherapy. *Int. J. Oncol.*
- Haribhai, D., Williams, J.B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E.G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S.-H., Relland, L.M., et al. (2011). A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* *35*, 109–122.
- Harp, C.T., Ireland, S., Davis, L.S., Remington, G., Cassidy, B., Cravens, P.D., Stuve, O., Lovett-Racke, A.E., Eagar, T.N., Greenberg, B.M., et al. (2010). Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN- $\gamma$  production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur. J. Immunol.* *40*, 2942–2956.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* *6*, 1123–1132.
- Harrison, T.J. (1978). The Fine Structure of the Nervous System: the Neurons and Supporting Cells. *J. Anat.* *127*, 638.
- Hart, C., Drewel, D., Mueller, G., Grassinger, J., Zaiss, M., Kunz-Schughart, L.A., Andreesen, R., Reichle, A., Holler, E., and Hennemann, B. Expression and Function of Homing-Essential Molecules and Enhanced In Vivo Homing Ability of Human Peripheral Blood-Derived Hematopoietic Progenitor Cells after Stimulation with Stem Cell Factor. *STEM CELLS* *22*, 580–589.
- Hassan, M., Lin, K., Li, J., Harris, W., and Waller, E.K. (2016). Defining the optimal plasmacytoid dendritic cell graft source for hematopoietic stem cell transplantation. *J. Immunol.* *196*, 140.37-140.37.
- Haus, E., Lakatua, D.J., Swoyer, J., and Sackett-Lundeen, L. (1983). Chronobiology in hematology and immunology. *Am. J. Anat.* *168*, 467–517.
- He, T., Tang, C., Xu, S., Moyana, T., and Xiang, J. (2007). Interferon gamma stimulates cellular maturation of dendritic cell line DC2.4 leading to induction of efficient cytotoxic T cell responses and antitumor immunity. *Cell. Mol. Immunol.* *4*, 105–111.
- Heath, W.R., Allison, J., Hoffmann, M.W., Schönrich, G., Hämmerling, G., Arnold, B., and Miller, J.F. (1992). Autoimmune diabetes as a consequence of locally produced interleukin-2. *Nature* *359*, 547–549.
- Heinrichs, J., Li, J., Nguyen, H., Wu, Y., Bastian, D., Daethanasanmak, A., Sofi, M.-H., Schutt, S., Liu, C., Jin, J., et al. (2016). CD8(+) Tregs promote GVHD prevention and overcome the impaired GVL effect mediated by CD4(+) Tregs in mice. *Oncoimmunology* *5*, e1146842.
- Helft, J., Böttcher, J., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B.U., Goubau, D., and Reis e Sousa, C. (2015). GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* *42*, 1197–1211.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K., and Akira, S. (2003). The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 3059–3064.
- Herndler-Brandstetter, D., and Flavell, R.A. (2014). Producing GM-CSF: a unique T helper subset? *Cell Res.* *24*, 1379–1380.
- Herzog, E.L., Chai, L., and Krause, D.S. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* *102*, 3483–3493.
- Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* *14*, 821–830.
- Hicheri, Y., Bouchekioua, A., Hamel, Y., Henry, A., Rouard, H., Pautas, C., Beaumont, J.-L., Kuentz, M., Cordonnier, C., Cohen, J.L., et al. (2008). Donor regulatory T cells identified by FoxP3 expression but also by the membranous CD4+CD127low/neg phenotype influence graft-versus-tumor effect after donor lymphocyte infusion. *J. Immunother.*

Hagerstown Md 1997 31, 806–811.

Hickey, W.F., and Kimura, H. (1987). Graft-vs.-host disease elicits expression of class I and class II histocompatibility antigens and the presence of scattered T lymphocytes in rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 2082–2086.

Highfill, S.L., Rodriguez, P.C., Zhou, Q., Goetz, C.A., Koehn, B.H., Veenstra, R., Taylor, P.A., Panoskaltis-Mortari, A., Serody, J.S., Munn, D.H., et al. (2010). Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 116, 5738–5747.

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097–1100.

Hill, G.R., and Ferrara, J.L. (2000). The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 95, 2754–2759.

Hill, G.R., Crawford, J.M., Cooke, K.R., Brinson, Y.S., Pan, L., and Ferrara, J.L.M. (1997a). Total Body Irradiation and Acute Graft-Versus-Host Disease: The Role of Gastrointestinal Damage and Inflammatory Cytokines. *Blood* 90, 3204–3213.

Hill, G.R., Crawford, J.M., Cooke, K.R., Brinson, Y.S., Pan, L., and Ferrara, J.L.M. (1997b). Total Body Irradiation and Acute Graft-Versus-Host Disease: The Role of Gastrointestinal Damage and Inflammatory Cytokines. *Blood* 90, 3204–3213.

Hill, G.R., Teshima, T., Gerbitz, A., Pan, L., Cooke, K.R., Brinson, Y.S., Crawford, J.M., and Ferrara, J.L.M. (1999). Differential roles of IL-1 and TNF- $\alpha$  on graft-versus-host disease and graft versus leukemia. *J. Clin. Invest.* 104, 459–467.

Hippen, K.L., Merkel, S.C., Schirm, D.K., Sieben, C.M., Sumstad, D., Kadidlo, D.M., McKenna, D.H., Bromberg, J.S., Levine, B.L., Riley, J.L., et al. (2011). Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (T(regs)) with minimal loss of in vivo functional activity. *Sci. Transl. Med.* 3, 83ra41.

Hirata, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., Kurisaki, A., Uemura, Y., Nishimura, Y., and Senju, S. (2007). Involvement of Regulatory T Cells in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis-Preventive Effect of Dendritic Cells Expressing Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein plus TRAIL. *J. Immunol.* 178, 918–925.

Hirota, M., Niino, M., Fukazawa, T., Kikuchi, S., Yabe, I., Hamada, S., Tajima, Y., and Sasaki, H. (2010). Decreased IL-10 production mediated by Toll-like receptor 9 in B cells in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 221, 95–100.

Ho, I.-C., and Glimcher, L.H. (2002). Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell* 109 Suppl, S109-120.

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

Hofstetter, C.P., Schwarz, E.J., Hess, D., Widenfalk, J., El Manira, A., Prockop, D.J., and Olson, L. (2002). Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2199–2204.

Holler, E., Kolb, H.J., Möller, A., Kempeni, J., Liesenfeld, S., Pechumer, H., Lehmacher, W., Ruckdeschel, G., Gleixner, B., and Riedner, C. (1990). Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood* 75, 1011–1016.

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

Horwitz, E.M. (2001). Marrow mesenchymal cell transplantation for genetic disorders of bone. *Cytotherapy* 3, 399–401.

Hosokai, R., Masuko, M., Shibasaki, Y., Saitoh, A., Furukawa, T., and Imai, C. (2017). Donor Killer Immunoglobulin-Like Receptor Haplotype B/x Induces Severe Acute Graft-versus-Host Disease in the Presence of Human Leukocyte Antigen Mismatch in T Cell-Replete Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 23, 606–611.

- Howell, C.D., Yoder, T., Claman, H.N., and Vierling, J.M. (1989). Hepatic homing of mononuclear inflammatory cells isolated during murine chronic graft-vs-host disease. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *143*, 476–483.
- Hoyo, G.M. del, Martín, P., Vargas, H.H., Ruiz, S., Arias, C.F., and Ardavin, C. (2002). Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* *415*, 1043–1047.
- Hsieh, M.H., and Korngold, R. (2000). Differential use of FasL- and perforin-mediated cytolytic mechanisms by T-cell subsets involved in graft-versus-myeloid leukemia responses. *Blood* *96*, 1047–1055.
- Hsu, P., Santner-Nanan, B., Hu, M., Skarratt, K., Lee, C.H., Stormon, M., Wong, M., Fuller, S.J., and Nanan, R. (2015). IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *195*, 3665–3674.
- Hsu, S.-M., Mathew, R., Taylor, A.W., and Stein-Streilein, J. (2014). Ex-vivo tolerogenic F4/80+ antigen-presenting cells (APC) induce efferent CD8+ regulatory T cell-dependent suppression of experimental autoimmune uveitis. *Clin. Exp. Immunol.* *176*, 37–48.
- Hu, Y., He, G.-L., Zhao, X.-Y., Zhao, X.-S., Wang, Y., Xu, L.-P., Zhang, X.-H., Yu, X.-Z., Liu, K.-Y., Chang, Y.-J., et al. (2017). Regulatory B cells promote graft-versus-host disease prevention and maintain graft-versus-leukemia activity following allogeneic bone marrow transplantation. *Oncoimmunology* *6*, e1284721.
- Huang, H., and Paul, W.E. (1998). Impaired interleukin 4 signaling in T helper type 1 cells. *J. Exp. Med.* *187*, 1305–1313.
- Huang, H., Ma, Y., Dawicki, W., Zhang, X., and Gordon, J.R. (2013). Comparison of induced versus natural regulatory T cells of the same TCR specificity for induction of tolerance to an environmental antigen. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *191*, 1136–1143.
- Huang, Y., Elliott, M.J., Yolcu, E.S., Miller, T.O., Ratajczak, J., Bozulic, L.D., Wen, Y., Xu, H., Ratajczak, M.Z., and Ildstad, S.T. (2016). Characterization of human CD8+TCR- facilitating cells in vitro and in vivo in a NOD/SCID/IL2rynull mouse model. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *16*, 440–453.
- Huber, M., Heink, S., Pagenstecher, A., Reinhard, K., Ritter, J., Visekruna, A., Guralnik, A., Bollig, N., Jeltsch, K., Heinemann, C., et al. (2013). IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest.* *123*, 247–260.
- Hundeshagen, A., Hecker, M., Paap, B.K., Angerstein, C., Kandulski, O., Fatum, C., Hartmann, C., Koczan, D., Thiesen, H.-J., and Zettl, U.K. (2012). Elevated type I interferon-like activity in a subset of multiple sclerosis patients: molecular basis and clinical relevance. *J. Neuroinflammation* *9*, 140.
- Huseby, E.S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlén, C., and Goverman, J. (2001). A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* *194*, 669–676.
- Huss, D.J., Winger, R.C., Peng, H., Yang, Y., Racke, M.K., and Lovett-Racke, A.E. (2010). TGF- $\beta$  Enhances Effector Th1 Cell Activation but Promotes Self-Regulation via IL-10. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *184*, 5628–5636.
- Ichikawa, E., Hida, S., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Takahara, K., Miyagawa, S., Inaba, K., and Taki, S. (2004). Defective development of splenic and epidermal CD4+ dendritic cells in mice deficient for IFN regulatory factor-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3909–3914.
- Iclozan, C., Yu, Y., Liu, C., Liang, Y., Yi, T., Anasetti, C., and Yu, X.-Z. (2010). T helper17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *16*, 170–178.
- Ifergan, I., Kebir, H., Alvarez, J.I., Marceau, G., Bernard, M., Bourbonnière, L., Poirier, J., Duquette, P., Talbot, P.J., Arbour, N., et al. (2011). Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on  $\alpha$ 4 integrin. *Brain J. Neurol.* *134*, 3560–3577.
- Imberti, L., Sottini, A., and Primi, D. (1993). T cell repertoire and autoimmune diseases. *Immunol. Res.* *12*, 149–167.
- Imhof, B.A., and Aurrand-Lions, M. (2004). Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 432–444.
- Inaba, K., Steinman, R.M., Pack, M.W., Aya, H., Inaba, M., Sudo, T., Wolpe, S., and Schuler, G. (1992). Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J. Exp. Med.* *175*, 1157–1167.
- Inoue, M., Williams, K.L., Oliver, T., Vandenabeele, P., Rajan, J.V., Miao, E.A., and Shinohara, M.L. (2012). IFN $\beta$

- therapy against EAE is effective only when development of the disease depends on the NLRP3 inflammasome. *Sci. Signal.* *5*, ra38.
- Inoue, M., Chen, P.-H., Siecinski, S., Li, Q.-J., Liu, C., Steinman, L., Gregory, S.G., Benner, E., and Shinohara, M.L. (2016). An interferon- $\beta$ -resistant and NLRP3 inflammasome-independent subtype of EAE with neuronal damage. *Nat. Neurosci.* *19*, 1599–1609.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham, A.H., Patsopoulos, N.A., Xifara, D.K., Davis, M.F., Kempainen, A., Cotsapas, C., Shah, T.S., Spencer, C., Booth, D., et al. (2013). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat. Genet.* *45*, 1353–1360.
- Ioannou, M., Alissafi, T., Lazaridis, I., Deraos, G., Matsoukas, J., Gravanis, A., Mastorodemos, V., Plaitakis, A., Sharpe, A., Boumpas, D., et al. (2012). Crucial Role of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Regulation of Central Nervous System Autoimmune Disease. *J. Immunol.* *188*, 1136–1146.
- Ireland, S.J., Blazek, M., Harp, C.T., Greenberg, B., Frohman, E.M., Davis, L.S., and Monson, N.L. (2012). Antibody-independent B cell effector functions in relapsing remitting multiple sclerosis: clues to increased inflammatory and reduced regulatory B cell capacity. *Autoimmunity* *45*, 400–414.
- Irla, M., Küpfer, N., Suter, T., Lissilaa, R., Benkhoucha, M., Skupsky, J., Lalive, P.H., Fontana, A., Reith, W., and Hugues, S. (2010). MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. *J. Exp. Med.* *207*, 1891–1905.
- Iruretagoyena, M.I., Sepúlveda, S.E., Lezana, J.P., Hermoso, M., Bronfman, M., Gutiérrez, M.A., Jacobelli, S.H., and Kalergis, A.M. (2006). Inhibition of Nuclear Factor- $\kappa$ B Enhances the Capacity of Immature Dendritic Cells to Induce Antigen-Specific Tolerance in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *318*, 59–67.
- Isakson, S.H., Katzman, S.D., and Hoyer, K.K. (2012). Spontaneous autoimmunity in the absence of IL-2 is driven by uncontrolled dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 1585–1593.
- Isaksson, M., Ardesjö, B., Rönnblom, L., Kämpe, O., Lassmann, H., Eloranta, M.-L., and Lobell, A. Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE. *Eur. J. Immunol.* *39*, 2925–2935.
- Iso, Y., Spees, J.L., Serrano, C., Bakondi, B., Pochampally, R., Song, Y.-H., Sobel, B.E., Delafontaine, P., and Prockop, D.J. (2007). Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *354*, 700–706.
- Iwasaki, H., Somoza, C., Shigematsu, H., Duprez, E.A., Iwasaki-Arai, J., Mizuno, S., Arinobu, Y., Geary, K., Zhang, P., Dayaram, T., et al. (2005). Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* *106*, 1590–1600.
- Iwata, Y., Furuichi, K., Kitagawa, K., Hara, A., Okumura, T., Kokubo, S., Shimizu, K., Sakai, N., Sagara, A., Kurokawa, Y., et al. (2010). Involvement of CD11b<sup>+</sup> GR-1 low cells in autoimmune disorder in MRL-Fas lpr mouse. *Clin. Exp. Nephrol.* *14*, 411–417.
- Jack, C.S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A., and Antel, J.P. (2005). TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 4320–4330.
- Jackson, S.W., Jacobs, H.M., Arkatkar, T., Dam, E.M., Scharping, N.E., Kolhatkar, N.S., Hou, B., Buckner, J.H., and Rawlings, D.J. (2016). B cell IFN- $\gamma$  receptor signaling promotes autoimmune germinal centers via cell-intrinsic induction of BCL-6. *J. Exp. Med.* *213*, 733–750.
- Jacobsen, M., Cepok, S., Quak, E., Happel, M., Gaber, R., Ziegler, A., Schock, S., Oertel, W.H., Sommer, N., and Hemmer, B. (2002). Oligoclonal expansion of memory CD8<sup>+</sup> T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain J. Neurol.* *125*, 538–550.
- Jain, P., Coisne, C., Enzmann, G., Rottapel, R., and Engelhardt, B. (2010).  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 Integrin Mediates the Recruitment of Immature Dendritic Cells across the Blood-Brain Barrier during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 7196–7206.
- Jasperson, L.K., Bucher, C., Panoskaltsis-Mortari, A., Taylor, P.A., Mellor, A.L., Munn, D.H., and Blazar, B.R. (2008). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical regulator of acute graft-versus-host disease lethality. *Blood* *111*, 3257–3265.
- Jasperson, L.K., Bucher, C., Panoskaltsis-Mortari, A., Mellor, A.L., Munn, D.H., and Blazar, B.R. (2009). Inducing the



tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality. *Blood* *114*, 5062.

Jauregui-Amezaga, A., Cabezón, R., Ramírez-Morros, A., España, C., Rimola, J., Bru, C., Pinó-Donnay, S., Gallego, M., Masamunt, M.C., Ordás, I., et al. (2015). Intraperitoneal Administration of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells for Refractory Crohn's Disease: A Phase I Study. *J. Crohns Colitis* *9*, 1071–1078.

Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* *165*, 302–319.

Jenq, R.R., Ubeda, C., Taur, Y., Menezes, C.C., Khanin, R., Dudakov, J.A., Liu, C., West, M.L., Singer, N.V., Equinda, M.J., et al. (2012). Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* *209*, 903–911.

Jiang, D., Chen, Y., and Schwarz, H. (2008). CD137 induces proliferation of murine hematopoietic progenitor cells and differentiation to macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 3923–3932.

Jiang, L., He, H., Yang, P., Lin, X., Zhou, H., Huang, X., and Kijlstra, A. (2009). Splenic CD8<sup>+</sup> T cells secrete TGF- $\beta$ 1 to exert suppression in mice with anterior chamber-associated immune deviation. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* *247*, 87–92.

Johnson, H.L., Willenbring, R.C., Jin, F., Manhart, W.A., LaFrance, S.J., Pirko, I., and Johnson, A.J. (2014). Perforin competent CD8 T cells are sufficient to cause immune-mediated blood-brain barrier disruption. *PLoS One* *9*, e111401.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A.H. (2000). Induction of Interleukin 10–Producing, Nonproliferating Cd4<sup>+</sup> T Cells with Regulatory Properties by Repetitive Stimulation with Allogeneic Immature Human Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* *192*, 1213–1222.

Joo, Y.-D., Lee, W.-S., Won, H.-J., Lee, S.-M., Choi, J.-H., Lee, S.-M., Han, K.-H., Park, S.-G., Choi, I.-W., and Seo, S.-K. (2011). Upregulation of TLR2 expression on G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells is responsible for their rapid engraftment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cytokine* *54*, 36–42.

Ju, J.-M., Lee, H., Oh, K., Lee, D.-S., and Choi, E.Y. (2014). Kinetics of IFN- $\gamma$  and IL-17 Production by CD4 and CD8 T Cells during Acute Graft-versus-Host Disease. *Immune Netw.* *14*, 89–99.

Judge, T.A., Wu, Z., Zheng, X.G., Sharpe, A.H., Sayegh, M.H., and Turka, L.A. (1999). The role of CD80, CD86, and CTLA4 in alloimmune responses and the induction of long-term allograft survival. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 1947–1951.

Jung, U., Foley, J.E., Erdmann, A.A., Eckhaus, M.A., and Fowler, D.H. (2003). CD3/CD28-costimulated T1 and T2 subsets: differential in vivo allosensitization generates distinct GVT and GVHD effects. *Blood* *102*, 3439–3446.

Kabashima, K., Banks, T.A., Ansel, K.M., Lu, T.T., Ware, C.F., and Cyster, J.G. (2005). Intrinsic Lymphotoxin- $\beta$  Receptor Requirement for Homeostasis of Lymphoid Tissue Dendritic Cells. *Immunity* *22*, 439–450.

Kalekar, L.A., Schmiel, S.E., Nandiwada, S.L., Lam, W.Y., Barsness, L.O., Zhang, N., Sritesky, G.L., Malhotra, D., Pauken, K.E., Linehan, J.L., et al. (2016). CD4(+) T cell anergy prevents autoimmunity and generates regulatory T cell precursors. *Nat. Immunol.* *17*, 304–314.

Kamath, A.T., Henri, S., Battye, F., Tough, D.F., and Shortman, K. (2002). Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* *100*, 1734–1741.

Kao, H., Lin, J., Littman, D.R., Shaw, A.S., and Allen, P.M. (2008). Regulated movement of CD4 in and out of the immunological synapse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 8248–8257.

Karandikar, N.J., Crawford, M.P., Yan, X., Ratts, R.B., Brenchley, J.M., Ambrozak, D.R., Lovett-Racke, A.E., Frohman, E.M., Stastny, P., Douek, D.C., et al. (2002). Glatiramer acetate (Copaxone) therapy induces CD8(+) T cell responses in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* *109*, 641–649.

Kared, H., Adle-Biassette, H., Foïs, E., Masson, A., Bach, J.-F., Chatenoud, L., Schneider, E., and Zavala, F. (2006). Jagged2-expressing hematopoietic progenitors promote regulatory T cell expansion in the periphery through notch signaling. *Immunity* *25*, 823–834.

Kared, H., Leforban, B., Montandon, R., Renand, A., Layseca Espinosa, E., Chatenoud, L., Rosenstein, Y., Schneider, E., Dy, M., and Zavala, F. (2008). Role of GM-CSF in tolerance induction by mobilized hematopoietic progenitors. *Blood* *112*, 2575–2578.

- Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I.L., and Manz, M.G. (2003). Flt3 Ligand Regulates Dendritic Cell Development from Flt3+ Lymphoid and Myeloid-committed Progenitors to Flt3+ Dendritic Cells In Vivo. *J. Exp. Med.* *198*, 305–313.
- Karussis, D.M., Slavin, S., Lehmann, D., Mizrahi-Koll, R., Abramsky, O., and Ben-Nun, A. (1992). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis and induction of tolerance with acute immunosuppression followed by syngeneic bone marrow transplantation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *148*, 1693–1698.
- Kasahara, H., Okamoto, S., Sekiya, T., and Yoshimura, A. (2017). Vitamin C Stabilizes Foxp3 Expression in Induced Treg Cells By Targeted DNA Demethylation and Prevents Murine Model of Acute Graft Versus Host Disease. *Blood* *130*, 70–70.
- Kaser, A., Deisenhammer, F., Berger, T., and Tilg, H. (1999). Interferon- $\beta$ 1b augments activation-induced T-cell death in multiple sclerosis patients. *The Lancet* *353*, 1413–1414.
- Kashiwada, M., Pham, N.-L.L., Pewe, L.L., Harty, J.T., and Rothman, P.B. (2011). NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8 $\alpha^+$  dendritic cell development. *Blood* *117*, 6193–6197.
- Kassem, A., Henning, P., Kindlund, B., Lindholm, C., and Lerner, U.H. (2015). TLR5, a novel mediator of innate immunity-induced osteoclastogenesis and bone loss. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *29*, 4449–4460.
- Kaufman, C.L., Colson, Y.L., Wren, S.M., Watkins, S., Simmons, R.L., and Ildstad, S.T. (1994). Phenotypic characterization of a novel bone marrow-derived cell that facilitates engraftment of allogeneic bone marrow stem cells. *Blood* *84*, 2436–2446.
- Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. (1986). Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* *163*, 1037–1050.
- Keir, M.E., Liang, S.C., Guleria, I., Latchman, Y.E., Qipo, A., Albacker, L.A., Koulmanda, M., Freeman, G.J., Sayegh, M.H., and Sharpe, A.H. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* *203*, 883–895.
- Kelly, A., Robinson, M.W., Roche, G., Biron, C.A., O'Farrelly, C., and Ryan, E.J. (2016). Immune Cell Profiling of IFN- $\lambda$  Response Shows pDCs Express Highest Level of IFN- $\lambda$ R1 and Are Directly Responsive via the JAK-STAT Pathway. *J. Interferon Cytokine Res.* *36*, 671–680.
- Kennedy, G.A., Varelias, A., Vuckovic, S., Zhang, P., MacDonald, K.P., Leach, J., Sturgeon, E., Avery, J., Olver, S.D., Lor, M., et al. (2013). The Addition Of Interleukin-6 Inhibition To Standard Gvhd Prophylaxis Prevents Acute Gvhd: Interim Results Of a Phase I/II Clinical Study. *Blood* *122*, 908–908.
- Khorooshi, R., Mørch, M.T., Holm, T.H., Berg, C.T., Dieu, R.T., Dræby, D., Issazadeh-Navikas, S., Weiss, S., Lienenklaus, S., and Owens, T. (2015). Induction of endogenous Type I interferon within the central nervous system plays a protective role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *130*, 107–118.
- Khoury, S.J., and Sayegh, M.H. (2004). The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. *Immunity* *20*, 529–538.
- Khoury, S.J., Hancock, W.W., and Weiner, H.L. (1992). Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J. Exp. Med.* *176*, 1355–1364.
- Kiefer, R., Schweitzer, T., Jung, S., Toyka, K.V., and Hartung, H.-P. (1998). Sequential Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$  by T-cells, Macrophages, and Microglia in Rat Spinal Cord during Autoimmune Inflammation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *57*, 385–395.
- Kiel, M.J., Radice, G.L., and Morrison, S.J. (2007). Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell Stem Cell* *1*, 204–217.
- Kim, J.M., Rasmussen, J.P., and Rudensky, A.Y. (2007). Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* *8*, 191–197.
- Kim, J.S., Kim, S.-J., Cheong, J.-W., Kim, Y., Hwang, D.Y., Yoon, S., Jang, J., Hyun, S.Y., and Min, Y.H. (2011). Clinical significance of B cell-activating factor (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) in acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Korean J. Hematol.* *46*, 175–179.

- King, I.L., Dickendesher, T.L., and Segal, B.M. (2009). Circulating Ly-6C<sup>+</sup> myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* *113*, 3190–3197.
- Kitko, C.L., Paczesny, S., Yanik, G., Braun, T., Jones, D., Whitfield, J., Choi, S.W., Hutchinson, R.J., Ferrara, J.L.M., and Levine, J.E. (2008). Plasma Elevations of Tumor Necrosis Factor-Receptor-1 at Day 7 Post Allogeneic Transplant Correlate with Graft Versus Host Disease Severity and Overall Survival in Pediatric Patients. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *14*, 759–765.
- Kleer, I. de, Vastert, B., Klein, M., Teklenburg, G., Arkesteijn, G., Yung, G.P., Albani, S., Kuis, W., Wulffraat, N., and Prakken, B. (2006). Autologous stem cell transplantation for autoimmunity induces immunologic self-tolerance by reprogramming autoreactive T cells and restoring the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immune regulatory network. *Blood* *107*, 1696–1702.
- Kleffel, S., Vergani, A., Tezza, S., Ben Nasr, M., Niewczas, M.A., Wong, S., Bassi, R., D’Addio, F., Schatton, T., Abdi, R., et al. (2015). Interleukin-10<sup>+</sup> Regulatory B Cells Arise Within Antigen-Experienced CD4<sup>+</sup> B Cells to Maintain Tolerance to Islet Autoantigens. *Diabetes* *64*, 158–171.
- Knaan-Shanzer, S., Houben, P., Kinwel-Bohré, E.P., and van Bekkum, D.W. (1991). Remission induction of adjuvant arthritis in rats by total body irradiation and autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* *8*, 333–338.
- Ko, H.-J., Brady, J.L., Ryg-Cornejo, V., Hansen, D.S., Vremec, D., Shortman, K., Zhan, Y., and Lew, A.M. (2014). GM-CSF-responsive monocyte-derived dendritic cells are pivotal in Th17 pathogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 2202–2209.
- Koehn, B.H., Apostolova, P., Haverkamp, J.M., Miller, J.S., McCullar, V., Tolar, J., Munn, D.H., Murphy, W.J., Brickey, W.J., Serody, J.S., et al. (2015). GVHD-associated, inflammasome-mediated loss of function in adoptively transferred myeloid-derived suppressor cells. *Blood* *126*, 1621–1628.
- Koenecke, C., Czeloth, N., Bubke, A., Schmitz, S., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Huehn, J., Gansner, A., Förster, R., and Prinz, I. (2009). Alloantigen-specific de novo-induced Foxp3<sup>+</sup> Treg revert in vivo and do not protect from experimental GVHD. *Eur. J. Immunol.* *39*, 3091–3096.
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 566–573.
- Kooij, G., Kroon, J., Paul, D., Reijerkerk, A., Geerts, D., van der Pol, S.M.A., van Het Hof, B., Drexhage, J.A., van Vliet, S.J., Hekking, L.H.P., et al. (2014). P-glycoprotein regulates trafficking of CD8(+) T cells to the brain parenchyma. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *127*, 699–711.
- Korniotis, S., Gras, C., Letscher, H., Montandon, R., Mégret, J., Siegert, S., Ezine, S., Fallon, P.G., Luther, S.A., Fillatreau, S., et al. (2016). Treatment of ongoing autoimmune encephalomyelitis with activated B-cell progenitors maturing into regulatory B cells. *Nat. Commun.* *7*, 12134.
- Koutouros, M., Berer, K., Kawakami, N., Wekerle, H., and Krishnamoorthy, G. (2014). Treg cells mediate recovery from EAE by controlling effector T cell proliferation and motility in the CNS. *Acta Neuropathol. Commun.* *2*.
- Koyama, M., Hashimoto, D., Aoyama, K., Matsuoka, K., Karube, K., Niuro, H., Harada, M., Tanimoto, M., Akashi, K., and Teshima, T. (2009). Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. *Blood* *113*, 2088–2095.
- Krenger, W., Snyder, K.M., Byon, J.C., Falzarano, G., and Ferrara, J.L. (1995). Polarized type 2 alloreactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> donor T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *155*, 585–593.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* *19*, 312–318.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., and Klinman, D.M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* *374*, 546–549.
- Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdörfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z.K., Endres, S., Krieg, A.M., and Hartmann, G. (2001). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *31*, 2154–2163.
- Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T.R., Bäckström, T., Sobel, R.A., Wucherpfennig, K.W.,

- Strom, T.B., Oukka, M. and Kuchroo, V.K. (2007) Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 13(4): 423–431.
- Kupfer, A., Singer, S.J., Janeway, C.A., and Swain, S.L. (1987). Coclustering of CD4 (L3T4) molecule with the T-cell receptor is induced by specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 5888–5892.
- Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J., et al. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* 1, 398–401.
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F.R., Miller, J.F.A.P., and Heath, W.R. (1997). Class I–restricted Cross-Presentation of Exogenous Self-Antigens Leads to Deletion of Autoreactive CD8+ T Cells. *J. Exp. Med.* 186, 239–245.
- Kurts, C., Sutherland, R.M., Davey, G., Li, M., Lew, A.M., Blanas, E., Carbone, F.R., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1999). CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12703–12707.
- Kushwah, R., Wu, J., Oliver, J.R., Jiang, G., Zhang, J., Siminovitch, K.A., and Hu, J. (2010). Uptake of apoptotic DC converts immature DC into tolerogenic DC that induce differentiation of Foxp3+ Treg. *Eur. J. Immunol.* 40, 1022–1035.
- Lafaille, J.J., de Keere, F.V., Hsu, A.L., Baron, J.L., Haas, W., Raine, C.S., and Tonegawa, S. (1997). Myelin Basic Protein–specific T Helper 2 (Th2) Cells Cause Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Immunodeficient Hosts Rather than Protect Them from the Disease. *J. Exp. Med.* 186, 307–312.
- Lafon, M., Megret, F., Lafage, M., and Prehaud, C. (2006). The innate immune facet of brain: human neurons express TLR-3 and sense viral dsRNA. *J. Mol. Neurosci.* MN 29, 185–194.
- Lamb, J.R., Skidmore, B.J., Green, N., Chiller, J.M., and Feldmann, M. (1983). Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. *J. Exp. Med.* 157, 1434–1447.
- Lambertsen, K.L., Gregersen, R., Meldgaard, M., Clausen, B.H., Heibøl, E.K., Ladeby, R., Knudsen, J., Frandsen, A., Owens, T., and Finsen, B. (2004). A Role for Interferon-Gamma in Focal Cerebral Ischemia in Mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 942–955.
- Lampert, I.A., Moore, R.H., Huby, R., and Cohen, J. (1988). Observations on the role of endotoxin in graft-versus-host disease. *Prog. Clin. Biol. Res.* 272, 351–359.
- Larochelle, C., Lécuyer, M.-A., Alvarez, J.I., Charabati, M., Saint-Laurent, O., Ghannam, S., Kebir, H., Flanagan, K., Yednock, T., Duquette, P., et al. (2015). Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation. *Ann. Neurol.* 78, 39–53.
- Lassmann, H., Zimprich, F., Vass, K., and Hickey, W.F. (1991). Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J. Neurosci. Res.* 28, 236–243.
- Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S.E., and Ringdén, O. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.* 57, 11–20.
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., and Ringdén, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet Lond. Engl.* 363, 1439–1441.
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D’Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., and Tough, D.F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14, 461–470.
- Leclerc, M., Naserian, S., Pilon, C., Thiolat, A., Martin, G.H., Pouchy, C., Dominique, C., Belkacemi, Y., Charlotte, F., Maury, S., et al. (2016). Control of GVHD by regulatory T cells depends on TNF produced by T cells and TNFR2 expressed by regulatory T cells. *Blood* 128, 1651–1659.
- Lee, H.M., and Hsieh, C.-S. (2009). Rare development of Foxp3+ thymocytes in the CD4+CD8+ subset. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 2261–2266.
- Lee, H.J., Oran, B., Saliba, R.M., Couriel, D.M., Shin, K., Massey, P., Neumann, J., de Lima, M., Champlin, R., and Giralt, S. (2006). Steroid myopathy in patients with acute graft-versus-host disease treated with high-dose steroid therapy.

Bone Marrow Transplant. 38, 299–303.

Lee, J., Richburg, J.H., Shipp, E.B., Meistrich, M.L., and Boekelheide, K. (1999). The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology* 140, 852–858.

Lee, S.J., Zahrieh, D., Agura, E., MacMillan, M.L., Maziarz, R.T., McCarthy, P.L., Ho, V.T., Cutler, C., Alyea, E.P., Antin, J.H., et al. (2004). Effect of up-front daclizumab when combined with steroids for the treatment of acute graft-versus-host disease: results of a randomized trial. *Blood* 104, 1559–1564.

Lee, S.-W., Park, Y., So, T., Kwon, B.S., Cheroutre, H., Mittler, R.S., and Croft, M. (2008a). Identification of Regulatory Functions for 4-1BB and 4-1BBL in Myelopoiesis and the Development of Dendritic Cells. *Nat. Immunol.* 9, 917–926.

Lee, W.-S., Kim, J.-Y., Won, H.-J., Lee, S.-M., Suh, Y.-S., Joo, Y.-D., Lee, J.-Y., Jang, W.-H., Kang, S.-W., Kang, M.-S., et al. (2015). Effect of upregulated TLR2 expression from G-CSF-mobilized donor grafts on acute graft-versus-host disease. *Int. Immunopharmacol.* 29, 488–493.

Lee, Y.-H., Ishida, Y., Rifa'i, M., Shi, Z., Isobe, K., and Suzuki, H. (2008b). Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 825–832.

Lee, Y.K., Turner, H., Maynard, C.L., Oliver, J.R., Chen, D., Elson, C.O., and Weaver, C.T. (2009). Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30, 92–107.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973–983.

León, B., and Ardavín, C. (2008). Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol. Cell Biol.* 86, 320–324.

León, B., López-Bravo, M., and Ardavín, C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26, 519–531.

Leuenberger, T., Paterka, M., Reuter, E., Herz, J., Niesner, R.A., Radbruch, H., Bopp, T., Zipp, F., and Siffrin, V. (2013). The role of CD8+ T cells and their local interaction with CD4+ T cells in myelin oligodendrocyte glycoprotein35-55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 4960–4968.

Levine, J.E., Uberti, J.P., Ayash, L., Reynolds, C., Ferrara, J.L. m, Silver, S.M., Braun, T., Yanik, G., Hutchinson, R., and Ratanatharathorn, V. (2003). Lowered-intensity preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation delays acute graft-versus-host disease but does not improve outcome for advanced hematologic malignancy. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 9, 189–197.

Levy, H., Assaf, Y., and Frenkel, D. (2010). Characterization of brain lesions in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *Exp. Neurol.* 226, 148–158.

Li, J.-M., and Waller, E.K. (2004). Donor antigen-presenting cells regulate T-cell expansion and antitumor activity after allogeneic bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 10, 540–551.

Li, H., Demetris, A.J., McNiff, J., Matte-Martone, C., Tan, H.S., Rothstein, D.M., Lakkis, F.G., and Shlomchik, W.D. (2012a). Profound depletion of host conventional dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, and B cells does not prevent graft-versus-host disease induction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 3804–3811.

Li, J., Li, J.-M., and Waller, E.K. (2016). Inhibition of vasoactive intestinal polypeptide signaling augments T cell activation by plasmacytoid dendritic cells: implications for cellular immunotherapy. *J. Immunol.* 196, 116.15-116.15.

Li, R., Rezk, A., Miyazaki, Y., Hilgenberg, E., Touil, H., Shen, P., Moore, C.S., Michel, L., Althekair, F., Rajasekharan, S., et al. (2015). Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci. Transl. Med.* 7, 310ra166.

Li, X., Mai, J., Virtue, A., Yin, Y., Gong, R., Sha, X., Gutchigian, S., Frisch, A., Hodge, I., Jiang, X., et al. (2012b). IL-35 Is a Novel Responsive Anti-inflammatory Cytokine — A New System of Categorizing Anti-inflammatory Cytokines. *PLOS ONE* 7, e33628.

Li, X.K., Okuyama, T., Tamura, A., Enosawa, S., Kaneda, Y., Takahara, S., Funashima, N., Yamada, M., Amemiya, H., and Suzuki, S. (1998). Prolonged survival of rat liver allografts transfected with Fas ligand-expressing plasmid. *Transplantation* 66, 1416–1423.

- Liang, Y., Huang, T., Zhang, C., Todorov, I., Atkinson, M., Kandeel, F., Forman, S., and Zeng, D. (2005). Donor CD8+ T cells facilitate induction of chimerism and tolerance without GVHD in autoimmune NOD mice conditioned with anti-CD3 mAb. *Blood* *105*, 2180–2188.
- Liblau, R. (1997). Experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-4-deficient mice. *Int. Immunol.* *9*, 799–803.
- Libregts, S.F.W.M., and Nolte, M.A. (2014). Parallels between immune driven-hematopoiesis and T cell activation: 3 signals that relay inflammatory stress to the bone marrow. *Exp. Cell Res.* *329*, 239–247.
- Libregts, S.F., Gutiérrez, L., de Bruin, A.M., Wensveen, F.M., Papadopoulos, P., van Ijcken, W., Özgür, Z., Philipsen, S., and Nolte, M.A. (2011). Chronic IFN- $\gamma$  production in mice induces anemia by reducing erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1 axis. *Blood* *118*, 2578–2588.
- Lim, J.-Y., Park, M.-J., Im, K.-I., Kim, N., Jeon, E.-J., Kim, E.-J., Cho, M.-L., and Cho, S.-G. (2014). Combination cell therapy using mesenchymal stem cells and regulatory T-cells provides a synergistic immunomodulatory effect associated with reciprocal regulation of TH1/TH2 and th17/treg cells in a murine acute graft-versus-host disease model. *Cell Transplant.* *23*, 703–714.
- Lindemans, C.A., and Hanash, A.M. (2014). The importance of bone marrow involvement in GVHD. *Blood* *124*, 837–838.
- Link, J. (1994). Interferon-gamma, interleukin-4 and transforming growth factor-beta mRNA expression in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* *158*, 1–58.
- Linker, R.A., Rott, E., Hofstetter, H.H., Hanke, T., Toyka, K.V., and Gold, R. (2005). EAE in beta-2 microglobulin-deficient mice: axonal damage is not dependent on MHC-I restricted immune responses. *Neurobiol. Dis.* *19*, 218–228.
- Liou, L.-Y., Blasius, A.L., Welch, M.J., Colonna, M., Oldstone, M.B.A., and Zuniga, E.I. (2008). In vivo conversion of BM plasmacytoid DC into CD11b+ conventional DC during virus infection. *Eur. J. Immunol.* *38*, 3388–3394.
- Lippens, C., Duraes, F.V., Dubrot, J., Brighthouse, D., Lacroix, M., Irla, M., Aubry-Lachainaye, J.-P., Reith, W., Mandl, J.N., and Hugues, S. (2016). IDO-orchestrated crosstalk between pDCs and Tregs inhibits autoimmunity. *J. Autoimmun.* *75*, 39–49.
- Liu, Y.-J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 275–306.
- Liu, J., Farmer, J.D., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* *66*, 807–815.
- Liu, K., Waskow, C., Liu, X., Yao, K., Hoh, J., and Nussenzweig, M. (2007). Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat. Immunol.* *8*, 578–583.
- Liu, K., Vitorica, G.D., Schwickert, T.A., Guermonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.-F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009). In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* *324*, 392–397.
- Liu, Y.C., Gray, R.C., Hardy, G.A.D., Kuchtey, J., Abbott, D.W., Emancipator, S.N., and Harding, C.V. (2010). CpG-B Oligodeoxynucleotides Inhibit TLR-Dependent and -Independent Induction of Type I IFN in Dendritic Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 3367–3376.
- Lohmann, T., Leslie, R.D., and Londei, M. (1996). T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *J. Autoimmun.* *9*, 385–389.
- López-Giral, S., Quintana, N.E., Cabrerizo, M., Alfonso-Pérez, M., Sala-Valdés, M., De Soria, V.G.G., Fernández-Rañada, J.M., Fernández-Ruiz, E., and Muñoz, C. (2004). Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J. Leukoc. Biol.* *76*, 462–471.
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., et al. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* *523*, 337–341.
- Lu, Y., Harris, W., Li, J.-M., and Waller, E.K. (2009). Donor BM Dendritic Cells Expressing IDO Limit Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Bone Marrow Transplant. *Blood* *114*, 1331–1331.

- Lu, Y., Giver, C.R., Sharma, A., Li, J.M., Darlak, K.A., Owens, L.M., Roback, J.D., Galipeau, J., and Waller, E.K. (2012). IFN- $\gamma$  and indoleamine 2,3-dioxygenase signaling between donor dendritic cells and T cells regulates graft versus host and graft versus leukemia activity. *Blood* *119*, 1075–1085.
- Lublin, F.D., Bowen, J.D., Huddlestone, J., Kremenchutzky, M., Carpenter, A., Corboy, J.R., Freedman, M.S., Krupp, L., Paulo, C., Hariri, R.J., et al. (2014). Human placenta-derived cells (PDA-001) for the treatment of adults with multiple sclerosis: a randomized, placebo-controlled, multiple-dose study. *Mult. Scler. Relat. Disord.* *3*, 696–704.
- Lui, G., Manches, O., Angel, J., Molens, J.-P., Chaperot, L., and Plumas, J. (2009). Plasmacytoid Dendritic Cells Capture and Cross-Present Viral Antigens from Influenza-Virus Exposed Cells. *PLOS ONE* *4*, e7111.
- Luo, X., Liu, L., Tang, N., Lu, K.Q., McCormick, T.S., Kang, K., and Cooper, K.D. (2005). Inhibition of monocyte-derived dendritic cell differentiation and interleukin-12 production by complement iC3b via a mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Exp. Dermatol.* *14*, 303–310.
- Lutz, M.B. (2004). IL-3 in dendritic cell development and function: a comparison with GM-CSF and IL-4. *Immunobiology* *209*, 79–87.
- Lutz, M.B. (2012). Therapeutic Potential of Semi-Mature Dendritic Cells for Tolerance Induction. *Front. Immunol.* *3*.
- Macaulay, I.C., Svensson, V., Labalette, C., Ferreira, L., Hamey, F., Voet, T., Teichmann, S.A., and Cvejic, A. (2016). Single-Cell RNA-Sequencing Reveals a Continuous Spectrum of Differentiation in Hematopoietic Cells. *Cell Rep.* *14*, 966–977.
- MacDonald, K.P.A., Kuns, R.D., Rowe, V., Morris, E.S., Banovic, T., Bofinger, H., O’Sullivan, B., Markey, K.A., Don, A.L., Thomas, R., et al. (2007). Effector and regulatory T-cell function is differentially regulated by RelB within antigen-presenting cells during GVHD. *Blood* *109*, 5049–5057.
- MacMillan, M.L., Weisdorf, D.J., Davies, S.M., DeFor, T.E., Burns, L.J., Ramsay, N.K.C., Wagner, J.E., and Blazar, B.R. (2002). Early antithymocyte globulin therapy improves survival in patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *8*, 40–46.
- Malard, F., Bossard, C., Brissot, E., Chevallier, P., Guillaume, T., Delaunay, J., Mosnier, J.-F., Moreau, P., Grégoire, M., Gaugler, B., et al. Increased plasmacytoid dendritic cells and ROR $\gamma$ t-expressing immune effectors in cutaneous acute graft-versus-host disease. *J. Leukoc. Biol.* *94*, 1337–1343.
- Maldonado, R.A., LaMothe, R.A., Ferrari, J.D., Zhang, A.-H., Rossi, R.J., Kolte, P.N., Griset, A.P., O’Neil, C., Altreuter, D.H., Browning, E., et al. (2015). Polymeric synthetic nanoparticles for the induction of antigen-specific immunological tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E156–E165.
- Malhotra, S., Río, J., Urcelay, E., Nurtdinov, R., Bustamante, M.F., Fernández, O., Oliver, B., Zettl, U., Brassat, D., Killestein, J., et al. (2015). NLRP3 inflammasome is associated with the response to IFN- $\beta$  in patients with multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* *138*, 644–652.
- Mansilla, M.J., Sellès-Moreno, C., Fàbregas-Puig, S., Amoedo, J., Navarro-Barriuso, J., Teniente-Serra, A., Grau-López, L., Ramo-Tello, C., and Martínez-Cáceres, E.M. Beneficial Effect of Tolerogenic Dendritic Cells Pulsed with MOG Autoantigen in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *CNS Neurosci. Ther.* *21*, 222–230.
- Mansson, R., Zandi, S., Welinder, E., Tzapogas, P., Sakaguchi, N., Bryder, D., and Sigvardsson, M. (2010). Single-cell analysis of the common lymphoid progenitor compartment reveals functional and molecular heterogeneity. *Blood* *115*, 2601–2609.
- Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., and Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* *97*, 3333–3341.
- Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E.R., Lyman, S.D., Shortman, K., and McKenna, H.J. (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* *184*, 1953–1962.
- Marek-Trzonkowska, N., Mysliwiec, M., Dobyszuk, A., Grabowska, M., Techmanska, I., Juscinska, J., Wujtewicz, M.A., Witkowski, P., Mlynarski, W., Balcerska, A., et al. (2012). Administration of CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-</sup> regulatory T cells preserves  $\beta$ -cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care* *35*, 1817–1820.
- Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M., and Rudensky, A.Y. (2005). TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* *201*, 1061–1067.
- Markey, K.A., Banovic, T., Kuns, R.D., Olver, S.D., Don, A.L.J., Raffelt, N.C., Wilson, Y.A., Raggatt, L.J., Pettit, A.R.,

- Bromberg, J.S., et al. (2009). Conventional dendritic cells are the critical donor APC presenting alloantigen after experimental bone marrow transplantation. *Blood* 113, 5644–5649.
- Markovic-Plese, S., Fukaura, H., Zhang, J., al-Sabbagh, A., Southwood, S., Sette, A., Kuchroo, V.K., and Hafler, D.A. (1995). T cell recognition of immunodominant and cryptic proteolipid protein epitopes in humans. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 155, 982–992.
- Martin, P.J., Schoch, G., Fisher, L., Byers, V., Anasetti, C., Appelbaum, F.R., Beatty, P.G., Doney, K., McDonald, G.B., and Sanders, J.E. (1990). A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 76, 1464–1472.
- Martin, P.J., Rizzo, J.D., Wingard, J.R., Ballen, K., Curtin, P.T., Cutler, C., Litzow, M.R., Nieto, Y., Savani, B.N., Schriber, J.R., et al. (2012). First and Second-Line Systemic Treatment of Acute Graft-versus-host Disease: Recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 18, 1150–1163.
- Martinez, N.E., Sato, F., Omura, S., Minagar, A., Alexander, J.S., and Tsunoda, I. (2013). Immunopathological Patterns from EAE and Theiler's Virus Infection: Is Multiple Sclerosis a Homogenous 1-stage or Heterogenous 2-stage Disease? *Pathophysiol. Off. J. Int. Soc. Pathophysiol. ISP* 20, 71–84.
- Martín, P., Hoyo, G.M. del, Anjuère, F., Ruiz, S.R., Arias, C.F., Marín, A.R., and Ardavín, C. (2000). Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> and CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>dendritic cells are generated from CD4<sup>low</sup>lymphoid-committed precursors. *Blood* 96, 2511–2519.
- Mascanfroni, I.D., Yeste, A., Vieira, S.M., Burns, E.J., Patel, B., Sloma, I., Wu, Y., Mayo, L., Ben-Hamo, R., Efroni, S., et al. (2013). IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. *Nat. Immunol.* 14, 1054–1063.
- Masjuan, J., Alvarez-Cermeño, J.C., García-Barragán, N., Díaz-Sánchez, M., Espiño, M., Sádaba, M.C., González-Porqué, P., Martínez San Millán, J., and Villar, L.M. (2006). Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology* 66, 576–578.
- Mathey, E.K., Derfuss, T., Storch, M.K., Williams, K.R., Hales, K., Woolley, D.R., Al-Hayani, A., Davies, S.N., Rasband, M.N., Olsson, T., et al. (2007). Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J. Exp. Med.* 204, 2363–2372.
- Matsumoto, H., Murakami, Y., Kataoka, K., Notomi, S., Mantopoulos, D., Trichonas, G., Miller, J.W., Gregory, M.S., Ksander, B.R., Marshak-Rothstein, A., et al. (2015). Membrane-bound and soluble Fas ligands have opposite functions in photoreceptor cell death following separation from the retinal pigment epithelium. *Cell Death Dis.* 6, e1986.
- Matte, C.C., Liu, J., Cormier, J., Anderson, B.E., Athanasiadis, I., Jain, D., McNiff, J., and Shlomchik, W.D. (2004). Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat. Med.* 10, 987–992.
- Matysiak, M., Makosa, B., Walczak, A., and Selmaj, K. (2008). Patients with multiple sclerosis resisted to glucocorticoid therapy: abnormal expression of heat-shock protein 90 in glucocorticoid receptor complex. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 14, 919–926.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301–305.
- Mavroudi, I., and Papadaki, H.A. (2011). The role of CD40/CD40 ligand interactions in bone marrow granulopoiesis. *ScientificWorldJournal* 11, 2011–2019.
- McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., et al. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 50, 121–127.
- McKenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J., Pulendran, B., et al. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95, 3489–3497.
- McLaughlin, K.A., Chitnis, T., Newcombe, J., Franz, B., Kennedy, J., McArdel, S., Kuhle, J., Kappos, L., Rostasy, K., Pohl, D., et al. (2009). Age-dependent B cell autoimmunity to a myelin surface antigen in pediatric multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 4067–4076.
- McRae, B.L., Vanderlugt, C.L., Dal Canto, M.C., and Miller, S.D. (1995). Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 182, 75–85.



- McRae, B.L., Semnani, R.T., Hayes, M.P., and van Seventer, G.A. (1998). Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *160*, 4298–4304.
- Medawar, P.B. (1948). Immunity to Homologous Grafted Skin. III. The Fate of Skin Homographs Transplanted to the Brain, to Subcutaneous Tissue, and to the Anterior Chamber of the Eye. *Br. J. Exp. Pathol.* *29*, 58–69.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394–397.
- Mehling, M., Kappos, L., and Derfuss, T. (2011). Fingolimod for multiple sclerosis: mechanism of action, clinical outcomes, and future directions. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *11*, 492–497.
- Meira, M., Sievers, C., Hoffmann, F., Rasenack, M., Kuhle, J., Derfuss, T., Kappos, L., and Lindberg, R.L.P. (2014). Unraveling Natalizumab Effects on Deregulated miR-17 Expression in CD4.
- Mellor, A.L., and Munn, D.H. (1999). Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol. Today* *20*, 469–473.
- Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., and Frenette, P.S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* *452*, 442–447.
- Méndez-Ferrer, S., Battista, M., and Frenette, P.S. (2010). Cooperation of  $\beta$ 2- and  $\beta$ 3-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1192*, 139–144.
- Menges, M., Rössner, S., Voigtländer, C., Schindler, H., Kukutsch, N.A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G., and Lutz, M.B. (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J. Exp. Med.* *195*, 15–21.
- Mensen, A., Jöhrens, K., Anagnostopoulos, I., Demski, S., Oey, M., Stroux, A., Hemmati, P., Westermann, J., Blau, O., Wittenbecher, F., et al. (2014). Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT. *Blood* *124*, 963–972.
- Meredith, L.W., Farquhar, M.J., Tarr, A.W., and McKeating, J.A. (2014). Type I interferon rapidly restricts infectious hepatitis C virus particle genesis. *Hepatology* *60*, 1891–1901.
- Mevorach, D., Zuckerman, T., Reiner, I., Shimoni, A., Samuel, S., Nagler, A., Rowe, J.M., and Or, R. (2014). Single Infusion of Donor Mononuclear Early Apoptotic Cells as Prophylaxis for Graft-versus-Host Disease in Myeloablative HLA-Matched Allogeneic Bone Marrow Transplantation: A Phase I/IIa Clinical Trial. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *20*, 58–65.
- Mielcarek, M., Furlong, T., Storer, B.E., Green, M.L., McDonald, G.B., Carpenter, P.A., Flowers, M.E.D., Storb, R., Boeckh, M., and Martin, P.J. (2015). Effectiveness and safety of lower dose prednisone for initial treatment of acute graft-versus-host disease: a randomized controlled trial. *Haematologica* *100*, 842–848.
- Mildner, A., Mack, M., Schmidt, H., Brück, W., Djukic, M., Zabel, M.D., Hille, A., Priller, J., and Prinz, M. (2009). CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain J. Neurol.* *132*, 2487–2500.
- Miller, A., Lider, O., Roberts, A.B., Sporn, M.B., and Weiner, H.L. (1992). Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 421–425.
- Millot, S., Andrieu, V., Letteron, P., Lyoumi, S., Hurtado-Nedelec, M., Karim, Z., Thibaudeau, O., Bennada, S., Charrier, J.-L., Lasocki, S., et al. (2010). Erythropoietin stimulates spleen BMP4-dependent stress erythropoiesis and partially corrects anemia in a mouse model of generalized inflammation. *Blood* *116*, 6072–6081.
- Min, C.-K., Kim, B.-G., Park, G., Cho, B., and Oh, I.-H. (2007). IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* *39*, 637–645.
- Misawa, E., Sakurai, T., Yamada, M., Tamura, Y., and Motoyoshi, K. (2004). Administration of macrophage colony-stimulating factor mobilized both CD11b+CD11c+ cells and NK1.1+ cells into peripheral blood. *Int. Immunopharmacol.* *4*, 791–803.
- Mitchell, R.E., Hassan, M., Burton, B.R., Britton, G., Hill, E.V., Verhagen, J., and Wraith, D.C. (2017). IL-4 enhances IL-10 production in Th1 cells: implications for Th1 and Th2 regulation. *Sci. Rep.* *7*, 11315.

- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R.S., and Bhan, A.K. (2002). Chronic Intestinal Inflammatory Condition Generates IL-10-Producing Regulatory B Cell Subset Characterized by CD1d Upregulation. *Immunity* *16*, 219–230.
- Mohty, M., Blaise, D., Faucher, C., Bardou, V.-J., Gastaut, J.-A., Viens, P., Olive, D., and Gaugler, B. (2005). Impact of plasmacytoid dendritic cells on outcome after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* *19*, 1–6.
- Molle, C., Nguyen, M., Flamand, V., Renneson, J., Trottein, F., Wit, D.D., Willems, F., Goldman, M., and Goriely, S. (2007). IL-27 Synthesis Induced by TLR Ligation Critically Depends on IFN Regulatory Factor 3. *J. Immunol.* *178*, 7607–7615.
- Montandon, R., Korniotis, S., Layseca-Espinosa, E., Gras, C., Mégret, J., Ezine, S., Dy, M., and Zavala, F. (2013). Innate pro-B-cell progenitors protect against type 1 diabetes by regulating autoimmune effector T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E2199-2208.
- Morecki, S., Gelfand, Y., Yacovlev, E., Eizik, O., Shabat, Y., and Slavin, S. (2008). CpG-induced myeloid CD11b+Gr-1+ cells efficiently suppress T cell-mediated immunoreactivity and graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic cell therapy. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *14*, 973–984.
- Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Tambussi, G., Viale, O., Orengo, A., Barbaresi, M., Merli, A., and Ciccone, E. (1990). Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J. Exp. Med.* *172*, 1589–1598.
- Morita, M., Miller, C., Fung, J., Lu, L., and Qian, S. (2014). Elimination of Activated T Cells Is Pre-Condition for Immune Suppressor Cells to Induce Transplant Tolerance.: Abstract# 2142. *Transplantation* *98*, 40.
- Morrison, S.J., and Weissman, I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* *1*, 661–673.
- Muffly, L., Sheehan, K., Armstrong, R., Jensen, K., Tate, K., Rezvani, A.R., Miklos, D., Arai, S., Shizuru, J., Johnston, L., et al. (2018). Infusion of donor-derived CD8+ memory T cells for relapse following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Adv.* *2*, 681–690.
- Muraro, P.A., Douek, D.C., Packer, A., Chung, K., Guenaga, F.J., Cassiani-Ingoni, R., Campbell, C., Memon, S., Nagle, J.W., Hakim, F.T., et al. (2005). Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J. Exp. Med.* *201*, 805–816.
- Muraro, P.A., Robins, H., Malhotra, S., Howell, M., Phippard, D., Desmarais, C., de Paula Alves Sousa, A., Griffith, L.M., Lim, N., Nash, R.A., et al. (2014). T cell repertoire following autologous stem cell transplantation for multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* *124*, 1168–1172.
- Muth, S., Schütze, K., Schild, H. and Probst, H.C. (2012) Release of dendritic cells from cognate CD4+ T-cell recognition results in impaired peripheral tolerance and fatal cytotoxic T-cell mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;109(23):9059-64
- Na, S.-Y., Cao, Y., Toben, C., Nitschke, L., Stadelmann, C., Gold, R., Schimpl, A., and Hünig, T. (2008). Naive CD8 T-cells initiate spontaneous autoimmunity to a sequestered model antigen of the central nervous system. *Brain J. Neurol.* *131*, 2353–2365.
- Nagai, Y., Garrett, K.P., Ohta, S., Bahrn, U., Kouro, T., Akira, S., Takatsu, K., and Kincade, P.W. (2006). Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* *24*, 801–812.
- Nagyoszi, P., Wilhelm, I., Farkas, A.E., Fazakas, C., Dung, N.T.K., Haskó, J., and Krizbai, I.A. (2010). Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem. Int.* *57*, 556–564.
- Naiditch, H., Shurin, M.R., and Shurin, G.V. (2011). Targeting myeloid regulatory cells in cancer by chemotherapeutic agents. *Immunol. Res.* *50*, 276–285.
- Naik, S.H., Metcalf, D., Nieuwenhuijze, A. van, Wicks, I., Wu, L., O’Keeffe, M., and Shortman, K. (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat. Immunol.* *7*, 663–671.
- Najafian, N., Chitnis, T., Salama, A.D., Zhu, B., Benou, C., Yuan, X., Clarkson, M.R., Sayegh, M.H., and Khoury, S.J. (2003). Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J. Clin. Invest.* *112*, 1037–1048.
- Nash, R.A., Hutton, G.J., Racke, M.K., Popat, U., Devine, S.M., Griffith, L.M., Muraro, P.A., Openshaw, H., Sayre, P.H.,

- Stüve, O., et al. (2015). High-dose immunosuppressive therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for relapsing-remitting multiple sclerosis (HALT-MS): a 3-year interim report. *JAMA Neurol.* *72*, 159–169.
- Nasso, M., Fedele, G., Spensieri, F., Palazzo, R., Costantino, P., Rappuoli, R., and Ausiello, C.M. (2009). Genetically detoxified pertussis toxin induces Th1/Th17 immune response through MAPKs and IL-10-dependent mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 1892–1899.
- Neumann, H., Medana, I.M., Bauer, J., and Lassmann, H. (2002). Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* *25*, 313–319.
- Nguyen, V.H., Zeiser, R., daSilva, D.L., Chang, D.S., Beilhack, A., Contag, C.H., and Negrin, R.S. (2007). In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood* *109*, 2649–2656.
- Nichols, W.G., Corey, L., Gooley, T., Davis, C., and Boeckh, M. (2002). High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J. Infect. Dis.* *185*, 273–282.
- Niino, M., Hirotani, M., Miyazaki, Y., and Sasaki, H. (2009). Memory and naïve B-cell subsets in patients with multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* *464*, 74–78.
- Nikolic, B., Lee, S., Bronson, R.T., Grusby, M.J., and Sykes, M. (2000). Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J. Clin. Invest.* *105*, 1289–1298.
- Noori-Zadeh, A., Mesbah-Namin, S.A., Bistoon-Beigloo, S., Bakhtiyari, S., Abbaszadeh, H.-A., Darabi, S., Rajabibazl, M., and Abdanipour, A. (2016). Regulatory T cell number in multiple sclerosis patients: A meta-analysis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* *5*, 73–76.
- Nossal, G.J., and Pike, B.L. (1980). Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 1602–1606.
- Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., Poepl, A., Jurisica, I., and Dick, J.E. (2011). Isolation of Single Human Hematopoietic Stem Cells Capable of Long-Term Multilineage Engraftment. *Science* *333*, 218–221.
- Nutt, S.L., Metcalf, D., D’Amico, A., Polli, M., and Wu, L. (2005). Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *J. Exp. Med.* *201*, 221–231.
- Obermeier, B., Mentele, R., Malotka, J., Kellermann, J., Kümpfel, T., Wekerle, H., Lottspeich, F., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2008). Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nat. Med.* *14*, 688–693.
- O’Connor, R.A., Prendergast, C.T., Sabatos, C.A., Lau, C.W.Z., Leech, M.D., Wraith, D.C., and Anderton, S.M. (2008). Cutting Edge: Th1 Cells Facilitate the Entry of Th17 Cells to the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 3750–3754.
- Ohashi, P.S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C.T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1991). Ablation of “tolerance” and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* *65*, 305–317.
- Oida, T., and Weiner, H.L. (2010). TGF- $\beta$  Induces Surface LAP Expression on Murine CD4 T Cells Independent of Foxp3 Induction. *PLoS ONE* *5*.
- Okamoto, S., Fujiwara, H., Nishimori, H., Matsuoka, K., Fujii, N., Kondo, E., Tanaka, T., Yoshimura, A., Tanimoto, M., and Maeda, Y. (2015). Anti-IL-12/23 p40 antibody attenuates experimental chronic graft-versus-host disease via suppression of IFN- $\gamma$ /IL-17-producing cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 1357–1363.
- O’Keeffe, J., Gately, C.M., Counihan, T., Hennessy, M., Leahy, T., Moran, A.P., and Hogan, E.L. (2008). T-cells expressing natural killer (NK) receptors are altered in multiple sclerosis and responses to alpha-galactosylceramide are impaired. *J. Neurol. Sci.* *275*, 22–28.
- O’Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Caminschi, I., Miller, J.L., Anders, E.M., Wu, L., Lahoud, M.H., Henri, S., Scott, B., et al. (2002). Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J. Exp. Med.* *196*, 1307–1319.
- Omatsu, Y., Iyoda, T., Kimura, Y., Maki, A., Ishimori, M., Toyama-Sorimachi, N., and Inaba, K. (2005). Development of Murine Plasmacytoid Dendritic Cells Defined by Increased Expression of an Inhibitory NK Receptor, Ly49Q. *J. Immunol.* *174*, 6657–6662.

- Onai, N., Kurabayashi, K., Hosoi-Amaiike, M., Toyama-Sorimachi, N., Matsushima, K., Inaba, K., and Ohteki, T. (2013). A Clonogenic Progenitor with Prominent Plasmacytoid Dendritic Cell Developmental Potential. *Immunity* 38, 943–957.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., et al. (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715–725.
- Orlandini, G.E., Holstein, A.F., and Möller, R. (1979). [Lymphatic system of the human testis]. *Bull. Assoc. Anat. (Nancy)* 63, 309–316.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell. *Science* 273, 242–245.
- Ota, K., Matsui, M., Milford, E.L., Mackin, G.A., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (1990). T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 346, 183–187.
- Owens, G.P., Ritchie, A.M., Burgoon, M.P., Williamson, R.A., Corboy, J.R., and Gilden, D.H. (2003). Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171, 2725–2733.
- Pan, B., Zeng, L., Cheng, H., Song, G., Chen, C., Zhang, Y., Li, Z., and Xu, K. (2012). Altered balance between Th1 and Th17 cells in circulation is an indicator for the severity of murine acute GVHD. *Immunol. Lett.* 142, 48–54.
- Pang, W. (2000). Role of muscle-derived cells in hematopoietic reconstitution of irradiated mice. *Blood* 95, 1106–1108.
- Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Haley, A.S., and Johnson, K.P. (1987). Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet Lond. Engl.* 1, 893–895.
- Paolini, R., Bernardini, G., Molfetta, R., and Santoni, A. (2015). NK cells and interferons. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26, 113–120.
- Papenfuss, T.L., Powell, N.D., McClain, M.A., Bedarf, A., Singh, A., Gienapp, I.E., Shawler, T., and Whitacre, C.C. (2011). Estriol Generates Tolerogenic Dendritic Cells In Vivo That Protect against Autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 3346–3355.
- Paraiso, K.H.T., Ghansah, T., Costello, A., Engelman, R.W., and Kerr, W.G. (2007). Induced SHIP deficiency expands myeloid regulatory cells and abrogates graft-versus-host disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 2893–2900.
- Parekh, V.V., Prasad, D.V.R., Banerjee, P.P., Joshi, B.N., Kumar, A., and Mishra, G.C. (2003). B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 5897–5911.
- Paris, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodiceci, P., Juan, G., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., and Kolesnick, R. (2001). Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 293, 293–297.
- Park, C.S., Lee, P.-H., Yamada, T., Burns, A., Shen, Y., Puppi, M., and Lacorazza, H.D. (2012). Kruppel-like factor 4 (KLF4) promotes the survival of natural killer cells and maintains the number of conventional dendritic cells in the spleen. *J. Leukoc. Biol.* 91, 739–750.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., et al. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6, 1133–1141.
- Park, M.-J., Lee, S.H., Lee, S.-H., Lee, E.-J., Kim, E.-K., Choi, J.Y., and Cho, M.-L. (2015). IL-1 Receptor Blockade Alleviates Graft-versus-Host Disease through Downregulation of an Interleukin-1 $\beta$ -Dependent Glycolytic Pathway in Th17 Cells. *Mediators Inflamm.* 2015.
- Pashenkov, M., Huang, Y.M., Kostulas, V., Haglund, M., Söderström, M., and Link, H. (2001). Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain J. Neurol.* 124, 480–492.
- Pelayo, R., Hirose, J., Huang, J., Garrett, K.P., Delogu, A., Busslinger, M., and Kincade, P.W. (2005). Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow. *Blood* 105, 4407–4415.
- Perez, V.L., Van Parijs, L., Biuckians, A., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Abbas, A.K. (1997). Induction of peripheral T cell

tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 6, 411–417.

Perretti, M., and Ahluwalia, A. The Microcirculation and Inflammation: Site of Action for Glucocorticoids. *Microcirculation* 7, 147–161.

Piancone, F., Saresella, M., Marventano, I., Rosa, F.L., Zoppis, M., Agostini, S., Longhi, R., Caputo, D., Mendozzi, L., Rovaris, M., et al. (2016). B Lymphocytes in Multiple Sclerosis: Bregs and BTLA/CD272 Expressing-CD19+ Lymphocytes Modulate Disease Severity. *Sci. Rep.* 6, 29699.

Pierson, E.R., Stromnes, I.M., and Goverman, J.M. (2014). B cells promote induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by facilitating reactivation of T cells in the CNS. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 929–939.

Pietras, E.M., Reynaud, D., Kang, Y.-A., Carlin, D., Calero-Nieto, F.J., Leavitt, A.D., Stuart, J.M., Göttgens, B., and Passegué, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell* 17, 35–46.

Platt, C.D., Ma, J.K., Chalouni, C., Ebersold, M., Bou-Reslan, H., Carano, R.A.D., Mellman, I., and Delamarre, L. (2010). Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4287–4292.

Pober, J.S. (1987). Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. *Ciba Found. Symp.* 131, 170–184.

Prockop, D.J., and Oh, J.Y. (2012). Medical therapies with adult stem/progenitor cells (MSCs): a backward journey from dramatic results in vivo to the cellular and molecular explanations. *J. Cell. Biochem.* 113, 1460–1469.

Prodinger, C., Bunse, J., Krüger, M., Schiefenhövel, F., Brandt, C., Laman, J.D., Greter, M., Immig, K., Heppner, F., Becher, B., et al. (2011). CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 121, 445–458.

Pronk, C.J.H., Veiby, O.P., Bryder, D., and Jacobsen, S.E.W. (2011). Tumor necrosis factor restricts hematopoietic stem cell activity in mice: involvement of two distinct receptors. *J. Exp. Med.* 208, 1563–1570.

Probst, H.C., Lagnel, J., Kollias, G. and Van den Broek, M. (2003) Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance. *Immunity* ;18(5):713-20.

Przepiorka, D., Kernan, N.A., Ippoliti, C., Papadopoulos, E.B., Giral, S., Khouri, I., Lu, J.G., Gajewski, J., Durett, A., Cleary, K., et al. (2000). Daclizumab, a humanized anti-interleukin-2 receptor alpha chain antibody, for treatment of acute graft-versus-host disease. *Blood* 95, 83–89.

Puliaev, R.A., Puliaeva, I.A., Ryan, A.E., and Via, C.S. (2005). The Parent-into-F1 Model of Graft-vs-Host Disease as a Model of In Vivo T Cell Function and Immunomodulation. *Curr. Med. Chem. Immunol. Endocr. Metab. Agents* 5, 575–583.

Purton, J.F., Tan, J.T., Rubinstein, M.P., Kim, D.M., Sprent, J., and Surh, C.D. (2007). Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent. *J. Exp. Med.* 204, 951–961.

Pyzer, A.R., Avigan, D.E., and Rosenblatt, J. (2014). Clinical trials of dendritic cell-based cancer vaccines in hematologic malignancies. *Hum. Vaccines Immunother.* 10, 3125–3131.

Qin, Y., Duquette, P., Zhang, Y., Talbot, P., Poole, R., and Antel, J. (1998). Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 102, 1045–1050.

Rafei, M., Hsieh, J., Zehntner, S., Li, M., Forner, K., Birman, E., Boivin, M.-N., Young, Y.K., Perreault, C., and Galipeau, J. (2009a). A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nat. Med.* 15, 1038–1045.

Rafei, M., Campeau, P.M., Aguilar-Mahecha, A., Buchanan, M., Williams, P., Birman, E., Yuan, S., Young, Y.K., Boivin, M.-N., Forner, K., et al. (2009b). Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting CD4 Th17 T Cells in a CC Chemokine Ligand 2-Dependent Manner. *J. Immunol.* 182, 5994–6002.

Raïch-Regué, D., Grau-López, L., Naranjo-Gómez, M., Ramo-Tello, C., Pujol-Borrell, R., Martínez-Cáceres, E., and Borràs, F.E. Stable antigen-specific T-cell hyporesponsiveness induced by tolerogenic dendritic cells from multiple sclerosis patients. *Eur. J. Immunol.* 42, 771–782.

Reddy, P., Maeda, Y., Liu, C., Krijanovski, O.I., Korngold, R., and Ferrara, J.L.M. (2005). A crucial role for antigen-

presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat. Med.* *11*, 1244–1249.

Reddy, V., Iturraspe, J.A., Tzolas, A.C., Meier-Kriesche, H.-U., Schold, J., and Wingard, J.R. (2004). Low dendritic cell count after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts relapse, death, and acute graft-versus-host disease. *Blood* *103*, 4330–4335.

Reichardt, W., Dürr, C., von Elverfeldt, D., Jüttner, E., Gerlach, U.V., Yamada, M., Smith, B., Negrin, R.S., and Zeiser, R. (2008). Impact of Mammalian Target of Rapamycin Inhibition on Lymphoid Homing and Tolerogenic Function of Nanoparticle-Labeled Dendritic Cells following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 4770–4779.

Reinhardt, K., Foell, D., Vogl, T., Mezger, M., Wittkowski, H., Fend, F., Federmann, B., Gille, C., Feuchtinger, T., Lang, P., et al. (2014). Monocyte-Induced Development of Th17 Cells and the Release of S100 Proteins Are Involved in the Pathogenesis of Graft-versus-Host Disease. *J. Immunol.* *193*, 3355–3365.

Reith, A.D., Rottapel, R., Giddens, E., Brady, C., Forrester, L., and Bernstein, A. (1990). W mutant mice with mild or severe developmental defects contain distinct point mutations in the kinase domain of the c-kit receptor. *Genes Dev.* *4*, 390–400.

Resnick, M., Roguel-Resnick, N., Bercovier, H., Levy, L., Toledo, J., and Zipori, D. (1990). Detection of Interleukin-3 in the Serum of Mice Infected with *Mycobacterium lepraemurium*. *J. Infect. Dis.* *162*, 1202–1204.

Rezende, R.M., Oliveira, R.P., Medeiros, S.R., Gomes-Santos, A.C., Alves, A.C., Loli, F.G., Guimarães, M.A.F., Amaral, S.S., da Cunha, A.P., Weiner, H.L., et al. (2013). Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Autoimmun.* *40*, 45–57.

Rice, C.M., Mallam, E.A., Whone, A.L., Walsh, P., Brooks, D.J., Kane, N., Butler, S.R., Marks, D.I., and Scolding, N.J. (2010). Safety and feasibility of autologous bone marrow cellular therapy in relapsing-progressive multiple sclerosis. *Clin. Pharmacol. Ther.* *87*, 679–685.

Richter, R., Forssmann, W., and Henschler, R. (2017). Current Developments in Mobilization of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Their Interaction with Niches in Bone Marrow. *Transfus. Med. Hemotherapy* *44*, 151–164.

Ringdén, O., Uzunel, M., Rasmusson, I., Remberger, M., Sundberg, B., Lönnies, H., Marschall, H.-U., Dlugosz, A., Szakos, A., Hassan, Z., et al. (2006). Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* *81*, 1390–1397.

Robb, R.J., Lineburg, K.E., Kuns, R.D., Wilson, Y.A., Raffelt, N.C., Olver, S.D., Varelias, A., Alexander, K.A., Teal, B.E., Sparwasser, T., et al. (2012). Identification and expansion of highly suppressive CD8<sup>(+)</sup>FoxP3<sup>(+)</sup> regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* *119*, 5898–5908.

Rodrigues, P.F., Alberti-Servera, L., Eremin, A., Grajales-Reyes, G.E., Ivanek, R. and Tussiwand, R., (2018) Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 711–722

Ross, D.D., Pollak, A., Akman, S.A., and Bachur, N.R. (1980). Diurnal variation of circulating human myeloid progenitor cells. *Exp. Hematol.* *8*, 954–960.

Rosser, E. C., Mauri, C., (2015) Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity*, 42(4):607-12.

Rosser, E.C., Oleinika, K., Tonon, S., Doyle, R., Bosma, A., Carter, N.A., Harris, K.A., Jones, S.A., Klein, N., and Mauri, C. (2014a). Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 production. *Nat. Med.* *20*, 1334–1339.

Rosser, E.C., Blair, P.A., and Mauri, C. (2014b). Cellular targets of regulatory B cell-mediated suppression. *Mol. Immunol.* *62*, 296–304.

Rothhammer, V., Kenison, J.E., Tjon, E., Takenaka, M.C., de Lima, K.A., Borucki, D.M., Chao, C.-C., Wilz, A., Blain, M., Healy, L., et al. (2017). Sphingosine 1-phosphate receptor modulation suppresses pathogenic astrocyte activation and chronic progressive CNS inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 2012–2017.

Ruuls, S.R., Bauer, J., Sontrop, K., Huitinga, I., 't Hart, B.A., and Dijkstra, C.D. (1995). Reactive oxygen species are involved in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.* *56*, 207–217.

Saenz, S.A., Siracusa, M.C., Perrigoue, J.G., Spencer, S.P., Urban, J.F., Tocker, J.E., Budelsky, A.L., Kleinschek, M.A., Kastelein, R.A., Kambayashi, T., et al. (2010). IL-25 elicits a multi-potent progenitor cell population that promotes Th2 cytokine responses. *Nature* *464*, 1362–1366.

- Sagar, D., Lamontagne, A., Foss, C.A., Khan, Z.K., Pomper, M.G., and Jain, P. (2012). Dendritic cell CNS recruitment correlates with disease severity in EAE via CCL2 chemotaxis at the blood–brain barrier through paracellular transmigration and ERK activation. *J. Neuroinflammation* *9*, 245.
- Saito, Y., Boddupalli, C.S., Borsotti, C., and Manz, M.G. (2013). Dendritic cell homeostasis is maintained by nonhematopoietic and T-cell-produced Flt3-ligand in steady state and during immune responses. *Eur. J. Immunol.* *43*, 1651–1658.
- Saitoh, K., Kon, S., Nakatsuru, T., Inui, K., Ihara, T., Matsumoto, N., Kitai, Y., Muromoto, R., and Matsuda, T. (2016). Anti-IL-17A blocking antibody reduces cyclosporin A-induced relapse in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Biochem. Biophys. Rep.* *8*, 139–145.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *155*, 1151–1164.
- Sakuishi, K., Miyake, S., and Yamamura, T. (2010). Role of NK cells and invariant NKT cells in multiple sclerosis. *Results Probl. Cell Differ.* *51*, 127–147.
- Sakurai, K., Zou, J.-P., Tschetter, J.R., Ward, J.M., and Shearer, G.M. (2002). Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* *129*, 186–196.
- Salzer, J., Svenningsson, R., Alping, P., Novakova, L., Björck, A., Fink, K., Islam-Jakobsson, P., Malmeström, C., Axelsson, M., Vågberg, M., et al. (2016). Rituximab in multiple sclerosis. *Neurology* *87*, 2074–2081.
- Santos E Sousa, P., Bennett, C.L., and Chakraverty, R. (2018). Unraveling the Mechanisms of Cutaneous Graft-Versus-Host Disease. *Front. Immunol.* *9*, 963.
- Sathe, P., Vremec, D., Wu, L., Corcoran, L., and Shortman, K. (2013). Convergent differentiation: myeloid and lymphoid pathways to murine plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *121*, 11–19.
- Sathe, P., Metcalf, D., Vremec, D., Naik, S.H., Langdon, W.Y., Huntington, N.D., Wu, L., and Shortman, K. (2014). Lymphoid tissue and plasmacytoid dendritic cells and macrophages do not share a common macrophage-dendritic cell-restricted progenitor. *Immunity* *41*, 104–115.
- Sato, K., Eizumi, K., Fukaya, T., Fujita, S., Sato, Y., Takagi, H., Yamamoto, M., Yamashita, N., Hijikata, A., Kitamura, H., et al. (2009). Naturally occurring regulatory dendritic cells regulate murine cutaneous chronic graft-versus-host disease. *Blood* *113*, 4780–4789.
- Satpathy, A.T., Kc, W., Albring, J.C., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2012). *Zbtb46* expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J. Exp. Med.* *209*, 1135–1152.
- Satpathy, A.T., Briseño, C.G., Lee, J.S., Ng, D., Manieri, N.A., Kc, W., Wu, X., Thomas, S.R., Lee, W.-L., Turkoz, M., et al. (2013). Notch2-dependent classical dendritic cells orchestrate intestinal immunity against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Immunol.* *14*, 937–948.
- Saxena, A., Bauer, J., Scheikl, T., Zappulla, J., Audebert, M., Desbois, S., Waisman, A., Lassmann, H., Liblau, R.S., and Mars, L.T. (2008). Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 1617–1621.
- Scheller, J., Garbers, C., and Rose-John, S. (2014). Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Semin. Immunol.* *26*, 2–12.
- Schmaltz, C., Alpdogan, O., Muriglian, S.J., Kappel, B.J., Rotolo, J.A., Ricchetti, E.T., Greenberg, A.S., Willis, L.M., Murphy, G.F., Crawford, J.M., et al. (2003). Donor T cell–derived TNF is required for graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity after bone marrow transplantation. *Blood* *101*, 2440–2445.
- Schmid, R.A., Stammberger, U., Hillinger, S., Gaspert, A., Boasquevisque, C.H., Malipiero, U., Fontana, A., and Weder, W. (2000). Fas ligand gene transfer combined with low dose cyclosporine A reduces acute lung allograft rejection. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* *13 Suppl 1*, S324–328.
- Schönrich, G., Kalinke, U., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A.M., Malissen, B., Hämmerling, G.J., and Arnold, B. (1991). Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* *65*, 293–304.
- Schönrich, G., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A.M., Malissen, B., Hämmerling, G.J., and Arnold, B.

- (1992). Distinct mechanisms of extrathymic T cell tolerance due to differential expression of self antigen. *Int. Immunol.* *4*, 581–590.
- Schultz, K.R., Paquet, J., Bader, S., and HayGlass, K.T. (1995). Requirement for B cells in T cell priming to minor histocompatibility antigens and development of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* *16*, 289–295.
- Schulz, O., Diebold, S.S., Chen, M., Näslund, T.I., Nolte, M.A., Alexopoulou, L., Azuma, Y.-T., Flavell, R.A., Liljeström, P., and Reis e Sousa, C. (2005). Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* *433*, 887–892.
- Schwab, N., Zozulya, A.L., Kieseier, B.C., Toyka, K.V., and Wiendl, H. (2010). An Imbalance of Two Functionally and Phenotypically Different Subsets of Plasmacytoid Dendritic Cells Characterizes the Dysfunctional Immune Regulation in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* *184*, 5368–5374.
- Seillet, C., Jackson, J.T., Markey, K.A., Brady, H.J.M., Hill, G.R., Macdonald, K.P.A., Nutt, S.L., and Belz, G.T. (2013). CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs can be induced in the absence of transcription factors Id2, Nfil3, and Batf3. *Blood* *121*, 1574–1583.
- Serafini, B., Columba-Cabezas, S., Di Rosa, F., and Aloisi, F. (2000). Intracerebral Recruitment and Maturation of Dendritic Cells in the Onset and Progression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* *157*, 1991–2002.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., and Aloisi, F. (2004a). Detection of Ectopic B-cell Follicles with Germinal Centers in the Meninges of Patients with Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Brain Pathol.* *14*, 164–174.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., Capello, E., Mancardi, G.L., and Aloisi, F. (2006). Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *65*, 124–141.
- Serafini, P., Carbley, R., Noonan, K.A., Tan, G., Bronte, V., and Borrello, I. (2004b). High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* *64*, 6337–6343.
- Severin, M.E., Lee, P.W., Liu, Y., Selhorst, A.J., Gormley, M.G., Pei, W., Yang, Y., Guerau-de-Arellano, M., Racke, M.K., and Lovett-Racke, A.E. (2016). MicroRNAs targeting TGF $\beta$  signalling underlie the regulatory T cell defect in multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* *139*, 1747–1761.
- Shameli, A., Clemente-Casares, X., Wang, J., and Santamaria, P. (2011). Development of memory-like autoregulatory CD8<sup>+</sup> T cells is CD4<sup>+</sup> T cell dependent. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 2859–2866.
- Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V.D., Jaimes, Y., Daridon, C., et al. (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* *507*, 366–370.
- Shevchenko, J.L., Kuznetsov, A.N., Ionova, T.I., Melnichenko, V.Y., Fedorenko, D.A., Kurbatova, K.A., Gorodokin, G.I., and Novik, A.A. (2015). Long-term outcomes of autologous hematopoietic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in multiple sclerosis: physician's and patient's perspectives. *Ann. Hematol.* *94*, 1149–1157.
- Shi, J., Tu, J.-L., Gale, S.D., Baxter, L., Vollmer, T.L., Campagnolo, D.I., Tyry, T.M., Zhuang, Y., and Kuniyoshi, S.M. (2011). APOE  $\epsilon$ 4 is associated with exacerbation of cognitive decline in patients with multiple sclerosis. *Cogn. Behav. Neurol. Off. J. Soc. Behav. Cogn. Neurol.* *24*, 128–133.
- Shin, S., Walz, K.A., Archambault, A.S., Sim, J., Bollman, B.P., Koenigsknecht-Talboo, J., Cross, A.H., Holtzman, D.M., and Wu, G.F. (2014). Apolipoprotein E Mediation of Neuro-inflammation in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *J. Neuroimmunol.* *271*, 8–17.
- SHINOMIYA, M., FAZLE AKBAR, S., SHINOMIYA, H., and ONJI, M. (1999). Transfer of dendritic cells (DC) ex vivo stimulated with interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) down-modulates autoimmune diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin. Exp. Immunol.* *117*, 38–43.
- Shlomchik, W.D., Couzens, M.S., Tang, C.B., McNiff, J., Robert, M.E., Liu, J., Shlomchik, M.J., and Emerson, S.G. (1999). Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* *285*, 412–415.
- Shortman, K., Sathe, P., Vremec, D., Naik, S., and O'Keefe, M. (2013a). Plasmacytoid dendritic cell development. *Adv. Immunol.* *120*, 105–126.



- Shortman, K., Sathe, P., Vremec, D., Naik, S., and O’Keeffe, M. (2013b). Plasmacytoid dendritic cell development. *Adv. Immunol.* *120*, 105–126.
- Sichien, D., Scott, C.L., Martens, L., Vanderkerken, M., Van Gassen, S., Plantinga, M., Joeris, T., De Prijck, S., Vanhoutte, L., Vanheerswynghe, M., et al. (2016). IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. *Immunity* *45*, 626–640.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* *284*, 1835–1837.
- Sim, B.C., Aftahi, N., Reilly, C., Bogen, B., Schwartz, R.H., Gascoigne, N.R., and Lo, D. (1998). Thymic skewing of the CD4/CD8 ratio maps with the T-cell receptor alpha-chain locus. *Curr. Biol.* *8*, 701–704.
- Simon, J.H., Jacobs, L.D., Campion, M., Wende, K., Simonian, N., Cookfair, D.L., Rudick, R.A., Herndon, R.M., Richert, J.R., Salazar, A.M., et al. (1998). Magnetic resonance studies of intramuscular interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *Ann. Neurol.* *43*, 79–87.
- Singh, A.K., Wilson, M.T., Hong, S., Olivares-Villagómez, D., Du, C., Stanic, A.K., Joyce, S., Sriram, S., Koezuka, Y., and Van Kaer, L. (2001). Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* *194*, 1801–1811.
- Sinha, P., Clements, V.K., Fulton, A.M., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* *67*, 4507–4513.
- Sinha, S., Itani, F.R., and Karandikar, N.J. (2014). Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. *Immunol. Res.* *59*, 254–265.
- Sinha, S., Boyden, A.W., Itani, F.R., Crawford, M.P., and Karandikar, N.J. (2015). CD8(+) T-Cells as Immune Regulators of Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* *6*, 619.
- Skihar, V., Silva, C., Chojnacki, A., Döring, A., Stallcup, W.B., Weiss, S., and Yong, V.W. (2009). Promoting oligodendrogenesis and myelin repair using the multiple sclerosis medication glatiramer acetate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17992–17997.
- Slifka, M.K., Whitmire, J.K., and Ahmed, R. (1997). Bone Marrow Contains Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *Blood* *90*, 2103–2108.
- Sloane, J.A., Batt, C., Ma, Y., Harris, Z.M., Trapp, B., and Vartanian, T. (2010). Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and remyelination through TLR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 11555–11560.
- Socié, G., Schmoor, C., Bethge, W.A., Ottinger, H.D., Stelljes, M., Zander, A.R., Volin, L., Ruutu, T., Heim, D.A., Schwerdtfeger, R., et al. (2011). 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* *117*, 6375–6382.
- Solanilla, A., Déchanet, J., El Andaloussi, A., Dupouy, M., Godard, F., Chabrol, J., Charbord, P., Reiffers, J., Nurden, A.T., Weksler, B., et al. (2000). CD40-ligand stimulates myelopoiesis by regulating flt3-ligand and thrombopoietin production in bone marrow stromal cells. *Blood* *95*, 3758–3764.
- Sordi, V., Bianchi, G., Buracchi, C., Mercalli, A., Marchesi, F., D’Amico, G., Yang, C.-H., Luini, W., Vecchi, A., Mantovani, A., et al. (2006). Differential effects of immunosuppressive drugs on chemokine receptor CCR7 in human monocyte-derived dendritic cells: selective upregulation by rapamycin. *Transplantation* *82*, 826–834.
- Soulika, A.M., Lee, E., McCauley, E., Miers, L., Bannerman, P., and Pleasure, D. (2009). Initiation and progression of axonopathy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 14965–14979.
- Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* *241*, 58–62.
- Spits, H., Couwenberg, F., Bakker, A.Q., Weijer, K., and Uittenbogaart, C.H. (2000). Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J. Exp. Med.* *192*, 1775–1784.
- Stanley, E.R., Chen, D.-M., and Lin, H.-S. (1978). Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. *Nature* *274*, 168–170.
- Stasiolek, M., Bayas, A., Kruse, N., Wiczarkowicz, A., Toyka, K.V., Gold, R., and Selmaj, K. (2006). Impaired maturation and altered regulatory function of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* *129*,

1293–1305.

- Steckel, N.K., Kuhn, U., Beelen, D.W., and Elmaagacli, A.H. (2003). Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance? *Scand. J. Immunol.* *57*, 185–191.
- Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J., and Enk, A.H. (2002). CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* *99*, 2468–2476.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. *J. Exp. Med.* *137*, 1142–1162.
- Stenger, E.O., Rosborough, B.R., Mathews, L.R., Ma, H., Mapara, M.Y., Thomson, A.W., and Turnquist, H.R. (2014). IL-12hi Rapamycin-Conditioned Dendritic Cells Mediate IFN- $\gamma$ —Dependent Apoptosis of Alloreactive CD4+ T Cells In Vitro and Reduce Lethal Graft-Versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *20*, 192–201.
- Steptoe, R.J., Ritchie, J.M., Wilson, N.S., Villadangos, J.A., Lew, A.M., and Harrison, L.C. (2007). Cognate CD4+ help elicited by resting dendritic cells does not impair the induction of peripheral tolerance in CD8+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 2094–2103.
- Stichel, C.C., and Luebbert, H. (2007). Inflammatory processes in the aging mouse brain: participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiol. Aging* *28*, 1507–1521.
- Streilein, J.W. (1993). Immune privilege as the result of local tissue barriers and immunosuppressive microenvironments. *Curr. Opin. Immunol.* *5*, 428–432.
- Stromnes, I.M., Cerretti, L.M., Liggitt, D., Harris, R.A., and Goverman, J.M. (2008). Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat. Med.* *14*, 337–342.
- Stuber, E., Buschenfeld, A., von Freier, A., Arendt, T., and Folsch, U. (1999). Intestinal crypt cell apoptosis in murine acute graft versus host disease is mediated by tumour necrosis factor  $\alpha$  and not by the FasL-Fas interaction: effect of pentoxifylline on the development of mucosal atrophy. *Gut* *45*, 229–235.
- Sun, D., Whitaker, J.N., Huang, Z., Liu, D., Coleclough, C., Wekerle, H., and Raine, C.S. (2001). Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 7579–7587.
- Suter, T., Biollaz, G., Gatto, D., Bernasconi, L., Herren, T., Reith, W., and Fontana, A. (2003). The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation. *Eur. J. Immunol.* *33*, 2998–3006.
- Suzuki, S., Honma, K., Matsuyama, T., Suzuki, K., Toriyama, K., Akitoyo, I., Yamamoto, K., Suematsu, T., Nakamura, M., Yui, K., et al. (2004). Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11bhighCD8alpha- dendritic cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8981–8986.
- Sweeney, C.M., Lonergan, R., Basdeo, S.A., Kinsella, K., Dungan, L.S., Higgins, S.C., Kelly, P.J., Costelloe, L., Tubridy, N., Mills, K.H.G., et al. (2011). IL-27 mediates the response to IFN- $\beta$  therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells. *Brain. Behav. Immun.* *25*, 1170–1181.
- Taglauer, E.S., Adams Waldorf, K.M., and Petroff, M.G. (2010). The hidden maternal-fetal interface: events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 421–430.
- Taguchi, T., Mitcham, J.L., Dower, S.K., Sims, J.E., and Testa, J.R. (1996). Chromosomal Localization of TIL $\alpha$  Gene Encoding a Protein Related to the Drosophila Transmembrane Receptor Toll, to Human Chromosome 4p14. *Genomics* *32*, 486–488.
- Taylor, P., Tamura, T., Kong, H.J., Kubota, T., Kubota, M., Borghi, P., Gabriele, L., and Ozato, K. (2007). The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8. *Immunity* *27*, 228–239.
- Takata, K., Kasahara, T., Kasahara, M., Ezaki, O., and Hirano, H. (1990). Erythrocyte/HepG2-type glucose transporter is concentrated in cells of blood-tissue barriers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *173*, 67–73.
- Takimoto, T., Wakabayashi, Y., Sekiya, T., Inoue, N., Morita, R., Ichiyama, K., Takahashi, R., Asakawa, M., Muto, G., Mori, T., et al. (2010). Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 842–855.
- Tamplin, O.J., Durand, E.M., Carr, L.A., Childs, S.J., Hagedorn, E.J., Li, P., Yzaguirre, A.D., Speck, N.A., and Zon, L.I.

- (2015). Hematopoietic Stem Cell Arrival Triggers Dynamic Remodeling of the Perivascular Niche. *Cell* *160*, 241–252.
- Tang, Q., Jiang, D., Alonso, S., Pant, A., Martínez Gómez, J.M., Kemeny, D.M., Chen, L., and Schwarz, H. (2013). CD137 ligand signaling enhances myelopoiesis during infections. *Eur. J. Immunol.* *43*, 1555–1567.
- Tauro, S., Nguyen, P., Li, B., and Geiger, T.L. (2013). Diversification and senescence of Foxp3+ regulatory T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* *43*, 1195–1207.
- Tawara, I., Sun, Y., Liu, C., Toubai, T., Nieves, E., Evers, R., Alrubaie, M., Mathewson, N., Tamaki, H., and Reddy, P. (2012). Donor- but not host-derived interleukin-10 contributes to the regulation of experimental graft-versus-host disease. *J. Leukoc. Biol.* *91*, 667–675.
- Taylor, M.W., and Feng, G.S. (1991). Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *5*, 2516–2522.
- Taylor, A., Verhagen, J., Blaser, K., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2006). Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* *117*, 433–442.
- Taylor, P.A., Lees, C.J., and Blazar, B.R. (2002). The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* *99*, 3493–3499.
- Taylor, P.A., Ehrhardt, M.J., Lees, C.J., Panoskaltis-Mortari, A., Krieg, A.M., Sharpe, A.H., Murphy, W.J., Serody, J.S., Hemmi, H., Akira, S., et al. (2008). TLR agonists regulate alloresponses and uncover a critical role for donor APCs in allogeneic bone marrow rejection. *Blood* *112*, 3508–3516.
- Tedder, T.F., and Leonard, W.J. (2014). Autoimmunity: regulatory B cells--IL-35 and IL-21 regulate the regulators. *Nat. Rev. Rheumatol.* *10*, 452–453.
- Teige, I., Treschow, A., Teige, A., Mattsson, R., Navikas, V., Leanderson, T., Holmdahl, R., and Issazadeh-Navikas, S. (2003). IFN-beta gene deletion leads to augmented and chronic demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 4776–4784.
- Teshima, T., Reddy, P., Lowler, K.P., KuKuruga, M.A., Liu, C., Cooke, K.R., and Ferrara, J.L.M. (2002a). Flt3 ligand therapy for recipients of allogeneic bone marrow transplants expands host CD8 alpha(+) dendritic cells and reduces experimental acute graft-versus-host disease. *Blood* *99*, 1825–1832.
- Teshima, T., Ordemann, R., Reddy, P., Gagin, S., Liu, C., Cooke, K.R., and Ferrara, J.L.M. (2002b). Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat. Med.* *8*, 575–581.
- Tezuka, H., Abe, Y., Asano, J., Sato, T., Liu, J., Iwata, M., and Ohteki, T. (2011). Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. *Immunity* *34*, 247–257.
- Thornton, A.M., Kilaru, G., Burr, P., Rieder, S., Muljo, S.A., and Shevach, E.M. (2016). Helios expression defines two distinct populations of Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* *196*, 125.6-125.6.
- Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A., and Kaufman, D.L. (2001). Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 1081–1089.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* *177*, 1009–1020.
- Tlaskalová-Hogenová, H., Mandel, L., Stěpánková, R., Bártová, J., Barot, R., Leclerc, M., Kovárů, F., and Trebichavský, I. (1992). Autoimmunity: from physiology to pathology. Natural antibodies, mucosal immunity and development of B cell repertoire. *Folia Biol. (Praha)* *38*, 202–215.
- Tobin, R.P., Davis, D., Jordan, K.R., and McCarter, M.D. (2017). The clinical evidence for targeting human myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *J. Leukoc. Biol.* *102*, 381–391.
- Tomchuck, S.L., Zvezdaryk, K.J., Coffelt, S.B., Waterman, R.S., Danko, E.S., and Scandurro, A.B. (2008). Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 99–107.
- Tompkins, S.M., Padilla, J., Dal Canto, M.C., Ting, J.P.-Y., Van Kaer, L., and Miller, S.D. (2002). De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 4173–4183.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* *302*, 575–581.

- Toubai, T., Sun, Y., Luker, G., Liu, J., Luker, K.E., Tawara, I., Evers, R., Liu, C., Mathewson, N., Malter, C., et al. (2013a). Host-derived CD8<sup>+</sup> dendritic cells are required for induction of optimal graft-versus-tumor responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* *121*, 4231–4241.
- Toubai, T., Sun, Y., Luker, G., Liu, J., Luker, K.E., Tawara, I., Evers, R., Liu, C., Mathewson, N., Malter, C., et al. (2013b). Host-derived CD8<sup>+</sup> dendritic cells are required for induction of optimal graft-versus-tumor responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* *121*, 4231–4241.
- Touil, T., Fitzgerald, D., Zhang, G.-X., Rostami, A.M., and Gran, B. (2006). Pathophysiology of interleukin-23 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Drug News Perspect.* *19*, 77–83.
- Traugott, U., Reinherz, E.L., and Raine, C.S. (1983). Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J. Neuroimmunol.* *4*, 201–221.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E.G., and Weissman, I.L. (2000). Development of CD8 $\alpha$ -Positive Dendritic Cells from a Common Myeloid Progenitor. *Science* *290*, 2152–2154.
- Trinchieri, G. (2007). Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J. Exp. Med.* *204*, 239–243.
- Trzonkowski, P., Bieniaszewska, M., Juścińska, J., Dobyszyk, A., Krzystyniak, A., Marek, N., Myśliwska, J., and Hellmann, A. (2009). First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T regulatory cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *133*, 22–26.
- Tsuchida, T., Parker, K.C., Turner, R.V., McFarland, H.F., Coligan, J.E., and Biddison, W.E. (1994). Autoreactive CD8<sup>+</sup> T-cell responses to human myelin protein-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 10859–10863.
- Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S., and Fagarasan, S. (2009). Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3<sup>+</sup> T cells in gut Peyer's patches. *Science* *323*, 1488–1492.
- Tsukada, N., Kobata, T., Aizawa, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (1999). Graft-Versus-Leukemia Effect and Graft-Versus-Host Disease Can Be Differentiated by Cytotoxic Mechanisms in a Murine Model of Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Blood* *93*, 2738–2747.
- Turner, M.S., Kane, L.P., and Morel, P.A. (2009). Dominant role of antigen dose in CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell induction and expansion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 4895–4903.
- Turnquist, H.R., Raimondi, G., Zahorchak, A.F., Fischer, R.T., Wang, Z., and Thomson, A.W. (2007). Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 7018–7031.
- Tussiwand, R., Lee, W.-L., Murphy, T.L., Mashayekhi, M., Kc, W., Albring, J.C., Satpathy, A.T., Rotondo, J.A., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., et al. (2012). Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature* *490*, 502–507.
- Tussiwand, R., Everts, B., Grajales-Reyes, G.E., Kretzer, N.M., Iwata, A., Bagaitkar, J., Wu, X., Wong, R., Anderson, D.A., Murphy, T.L., et al. (2015). Klf4 expression in conventional dendritic cells is required for T helper 2 cell responses. *Immunity* *42*, 916–928.
- Tyler, A.F., Mendoza, J.P., Firan, M., and Karandikar, N.J. (2013). CD8<sup>+</sup> T Cells Are Required For Glatiramer Acetate Therapy in Autoimmune Demyelinating Disease. *PLOS ONE* *8*, e66772.
- Ueda, Y., Cain, D.W., Kuraoka, M., Kondo, M., and Kelsoe, G. (2009). IL-1RI dependent HSC proliferation is necessary for Inflammatory Granulopoiesis and Reactive Neutrophilia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 6477–6484.
- Urcelay, E., Blanco-Kelly, F., de Las Heras, V., de la Concha, E.G., Arroyo, R., and Martínez, A. (2007). TLR4 haplotypes in multiple sclerosis: a case-control study in the Spanish population. *J. Neuroimmunol.* *192*, 215–218.
- Van Lint, M.T., Milone, G., Leotta, S., Uderzo, C., Scimè, R., Dallorso, S., Locasciulli, A., Guidi, S., Mordini, N., Sica, S., et al. (2006). Treatment of acute graft-versus-host disease with prednisolone: significant survival advantage for day +5 responders and no advantage for nonresponders receiving anti-thymocyte globulin. *Blood* *107*, 4177–4181.
- Varona, R., Cadenas, V., Lozano, M., Moreno-Ortiz, M.C., Kremer, L., Martínez-A, C., and Márquez, G. (2006). CCR6 regulates the function of alloreactive and regulatory CD4<sup>+</sup> T cells during acute graft-versus-host disease. *Leuk. Lymphoma* *47*, 1469–1476.

- van der Veen, R.C., and Stohlman, S.A. (1993). Encephalitogenic Th1 cells are inhibited by Th2 cells with related peptide specificity: Relative roles of interleukin (IL)-4 and IL-10. *J. Neuroimmunol.* *48*, 213–220.
- Venken, K., Hellings, N., Thewissen, M., Somers, V., Hensen, K., Rummens, J.-L., Medaer, R., Hupperts, R., and Stinissen, P. (2008). Compromised CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology* *123*, 79–89.
- Verhagen, J., Gabryšová, L., Shepard, E.R., and Wraith, D.C. (2014). CTLA-4 Modulates the Differentiation of Inducible Foxp3<sup>+</sup> Treg Cells but IL-10 Mediates Their Function in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLOS ONE* *9*, e108023.
- Vermi, W., Bonecchi, R., Facchetti, F., Bianchi, D., Sozzani, S., Festa, S., Berenzi, A., Cella, M., and Colonna, M. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J. Pathol.* *200*, 255–268.
- Vieira, P.L., Heystek, H.C., Wormmeester, J., Wierenga, E.A., and Kapsenberg, M.L. (2003). Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 4483–4488.
- Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H.L., et al. (2004). Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur. J. Immunol.* *34*, 251–262.
- Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *159*, 565–573.
- Vremec, D., Lieschke, G.J., Dunn, A.R., Robb, L., Metcalf, D., and Shortman, K. (1997). The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* *27*, 40–44.
- Vremec, D., O’Keeffe, M., Hochrein, H., Fuchsberger, M., Caminschi, I., Lahoud, M., and Shortman, K. (2007). Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood* *109*, 1165–1173.
- Vroegop, S.M., Chapman, D.L., Decker, D.E., Galinet, L.A., Brideau, R.J., Ready, K.A., Dunn, C.J., and Buxser, S.E. (1999). Pharmacokinetic properties, induction of interferon, and efficacy of selected 5-halo-6-phenyl pyrimidinones, broprimine analogues, in a model of severe experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. J. Immunopharmacol.* *21*, 647–662.
- Vuddamalay, Y., and van Meerwijk, J.P.M. (2017). CD28<sup>-</sup> and CD28<sup>low</sup>CD8<sup>+</sup> Regulatory T Cells: Of Mice and Men. *Front. Immunol.* *8*.
- Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* *1*, 405–413.
- Wang, D., Yu, Y., Haarberg, K., Fu, J., Kaosaard, K., Nagaraj, S., Anasetti, C., Gabrilovich, D., and Yu, X.-Z. (2013). Dynamic Change and Impact of Myeloid Derived Suppressor Cells in Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Mice. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *19*, 692–702.
- Wang, R.-X., Yu, C.-R., Dambuza, I.M., Mahdi, R.M., Dolinska, M.B., Sergeev, Y.V., Wingfield, P.T., Kim, S.-H., and Egwuagu, C.E. (2014). Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat. Med.* *20*, 633–641.
- Wanke, F., Moos, S., Heinen, A.P., Firmenich, S., Müller, W., Waisman, A., and Kurschus, F.C. (2014). 105: The role of IFN- $\gamma$  and IL-27 for Th17 plasticity in mouse CNS inflammation. *Cytokine* *70*, 53.
- Warabi, Y., Matsumoto, Y., and Hayashi, H. (2007). Interferon beta-1b exacerbates multiple sclerosis with severe optic nerve and spinal cord demyelination. *J. Neurol. Sci.* *252*, 57–61.
- Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jèze, G., Guermonprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., Shengelia, T., Yao, K., and Nussenzweig, M. (2008). FMS-like tyrosine kinase 3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* *9*, 676–683.
- Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L., and Betancourt, A.M. (2010). A New Mesenchymal Stem Cell (MSC)

Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLOS ONE* 5, e10088.

Webster, K.E., Walters, S., Kohler, R.E., Mrkvan, T., Boyman, O., Surh, C.D., Grey, S.T., and Sprent, J. (2009). In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. *J. Exp. Med.* 206, 751–760.

Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., Hu-Li, J., Yao, Z., Cui, K., Kanno, Y., Roh, T.-Y., Watford, W.T., et al. (2009). Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* 30, 155–167.

Weiss, G., and Goodnough, L.T. (2005). Anemia of Chronic Disease. *N. Engl. J. Med.* 352, 1011–1023.

Welner, R.S., Pelayo, R., Nagai, Y., Garrett, K.P., Wuest, T.R., Carr, D.J., Borghesi, L.A., Farrar, M.A., and Kincade, P.W. (2008). Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection. *Blood* 112, 3753–3761.

Westerlind, H., Ramanujam, R., Uvehag, D., Kuja-Halkola, R., Boman, M., Bottai, M., Lichtenstein, P., and Hillert, J. (2014). Modest familial risks for multiple sclerosis: a registry-based study of the population of Sweden. *Brain* 137, 770–778.

Whartenby, K.A., Calabresi, P.A., McCadden, E., Nguyen, B., Kardian, D., Wang, T., Mosse, C., Pardoll, D.M., and Small, D. (2005). Inhibition of FLT3 signaling targets DCs to ameliorate autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16741–16746.

Wiendl, H., Feger, U., Mittelbronn, M., Jack, C., Schreiner, B., Stadelmann, C., Antel, J., Brueck, W., Meyermann, R., Bar-Or, A., et al. (2005). Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Brain J. Neurol.* 128, 2689–2704.

Willenborg, D.O. (1979). Experimental Allergic Encephalomyelitis in the Lewis Rat: Studies on the Mechanism of Recovery from Disease and Acquired Resistance to Reinduction. *J. Immunol.* 123, 1145–1150.

Willenborg, D.O., Sjollem, P., and Danta, G. (1986). Immunoglobulin deficient rats as donors and recipients of effector cells of allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 11, 93–103.

Wilson, A., Held, W., and MacDonald, H.R. (1994). Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes. *J. Exp. Med.* 179, 1355–1360.

Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., et al. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135, 1118–1129.

Wilson, N.S., El-Sukkari, D., Belz, G.T., Smith, C.M., Steptoe, R.J., Heath, W.R., Shortman, K., and Villadangos, J.A. (2003). Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 102, 2187–2194.

van Winsen, L.L.M., Hooper-van Veen, T., van Rossum, E.F.C., Polman, C.H., van den Berg, T.K., Koper, J.W., and Uitdehaag, B.M.J. (2005). The impact of glucocorticoid receptor gene polymorphisms on glucocorticoid sensitivity is outweighed in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 167, 150–156.

van Winsen, L.M.L., Polman, C.H., Dijkstra, C.D., Tilders, F.J.H., and Uitdehaag, B.M.J. (2010). Suppressive effect of glucocorticoids on TNF-alpha production is associated with their clinical effect in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 16, 500–502.

Wong, G.H., Bartlett, P.F., Clark-Lewis, I., Batty, F., and Schrader, J.W. (1984). Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature* 310, 688–691.

Wosik, K., Biernacki, K., Khouzam, M.-P., and Prat, A. (2007). Death receptor expression and function at the human blood brain barrier. *J. Neurol. Sci.* 259, 53–60.

Wright, D.E., Wagers, A.J., Gulati, A.P., Johnson, F.L., and Weissman, I.L. (2001). Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 294, 1933–1936.

Wu, T., Young, J.S., Johnston, H., Ni, X., Deng, R., Racine, J., Wang, M., Wang, A., Todorov, I., Wang, J., et al. (2013a). Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 488–499.

- Wu, X., Satpathy, A.T., Kc, W., Liu, P., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2013b). Bcl11a Controls Flt3 Expression in Early Hematopoietic Progenitors and Is Required for pDC Development In Vivo. *PLOS ONE* 8, e64800.
- Wysocki, C.A., Jiang, Q., Panoskaltis-Mortari, A., Taylor, P.A., McKinnon, K.P., Su, L., Blazar, B.R., and Serody, J.S. (2005). Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood* 106, 3300–3307.
- Xu, L., Kitani, A., Fuss, I., and Strober, W. (2007). Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 6725–6729.
- Xun, C.Q., Thompson, J.S., Jennings, C.D., Brown, S.A., and Widmer, M.B. (1994). Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2- incompatible transplanted SCID mice. *Blood* 83, 2360–2367.
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., et al. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* 209, 1713–1722, S1-19.
- Yan, Y., Ding, X., Li, K., Ciric, B., Wu, S., Xu, H., Gran, B., Rostami, A., and Zhang, G.-X. (2012). CNS-specific therapy for ongoing EAE by silencing IL-17 pathway in astrocytes. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 1338–1348.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008). A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 28, 639–650.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Matsushita, T., Tsubata, T., and Tedder, T.F. (2009). The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 7459–7472.
- Yang, L., and Seki, E. (2012). Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms. *Front. Physiol.* 3, 138.
- Yang, Y.G., and Sykes, M. (1999). The role of interleukin-12 in preserving the graft-versus-leukemia effect of allogeneic CD8 T cells independently of GVHD. *Leuk. Lymphoma* 33, 409–420.
- Yang, C., Lai, W., Zhou, J., Zheng, X., Cai, Y., Yang, W., Xie, S., Gao, Y., and Du, C. (2018a). Betaine Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Dendritic Cell-Derived IL-6 Production and Th17 Differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 200, 1316–1324.
- Yang, F., Fang, H., Wang, D., Chen, Y., Zhai, Y., Zhou, B.-B.S., and Li, H. (2018b). HPRT1 activity loss is associated with resistance to thiopurine in ALL. *Oncotarget* 9, 2268–2278.
- Yang, X.O., Nurieva, R., Martinez, G.J., Kang, H.S., Chung, Y., Pappu, B.P., Shah, B., Chang, S.H., Schluns, K.S., Watowich, S.S., et al. (2008). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 29, 44–56.
- Yang, Y., Weiner, J., Liu, Y., Smith, A.J., Huss, D.J., Winger, R., Peng, H., Cravens, P.D., Racke, M.K., and Lovett-Racke, A.E. (2009). T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J. Exp. Med.* 206, 1549–1564.
- Yang, Y.G., Dey, B.R., Sergio, J.J., Pearson, D.A., and Sykes, M. (1998). Donor-derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12. *J. Clin. Invest.* 102, 2126–2135.
- Yang, Y.-G., Qi, J., Wang, M.-G., and Sykes, M. (2002). Donor-derived interferon gamma separates graft-versus-leukemia effects and graft-versus-host disease induced by donor CD8 T cells. *Blood* 99, 4207–4215.
- Yi, T., Zhao, D., Lin, C.-L., Zhang, C., Chen, Y., Todorov, I., LeBon, T., Kandeel, F., Forman, S., and Zeng, D. (2008). Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood* 112, 2101–2110.
- Yogev, N., Frommer, F., Lukas, D., Kautz-Neu, K., Karram, K., Ielo, D., von Stebut, E., Probst, H.-C., van den Broek, M., Riethmacher, D., et al. (2012). Dendritic Cells Ameliorate Autoimmunity in the CNS by Controlling the Homeostasis of PD-1 Receptor+ Regulatory T Cells. *Immunity* 37, 264–275.
- York, N.R., Mendoza, J.P., Ortega, S.B., Benagh, A., Tyler, A.F., Firan, M., and Karandikar, N.J. (2010). Immune regulatory CNS-reactive CD8+T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Autoimmun.* 35, 33–44.
- Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M., and Gabrilovich, D.I. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-

bearing mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 5791–5802.

Young, H.A., Klinman, D.M., Reynolds, D.A., Grzegorzewski, K.J., Nii, A., Ward, J.M., Winkler-Pickett, R.T., Ortaldo, J.R., Kenny, J.J., and Komschlies, K.L. (1997). Bone marrow and thymus expression of interferon-gamma results in severe B-cell lineage reduction, T-cell lineage alterations, and hematopoietic progenitor deficiencies. *Blood* **89**, 583–595.

Young, L.J., Wilson, N.S., Schnorrer, P., Proietto, A., Broeke, T. ten, Matsuki, Y., Mount, A.M., Belz, G.T., O’Keeffe, M., Ohmura-Hoshino, M., et al. (2008). Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1244–1252.

Yu, C.-F., Peng, W.-M., Oldenburg, J., Hoch, J., Bieber, T., Limmer, A., Hartmann, G., Barchet, W., Eis-Hübinger, A.M., and Novak, N. (2010). Human plasmacytoid dendritic cells support Th17 cell effector function in response to TLR7 ligation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 1159–1167.

Yu, X.-Z., Albert, M.H., and Anasetti, C. (2006). Alloantigen affinity and CD4 help determine severity of graft-versus-host disease mediated by CD8 donor T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 3383–3390.

Yu, Y., Wang, D., Liu, C., Kaosaard, K., Semple, K., Anasetti, C., and Yu, X.-Z. (2011). Prevention of GVHD while sparing GVL effect by targeting Th1 and Th17 transcription factor T-bet and ROR $\gamma$ t in mice. *Blood* **118**, 5011–5020.

Yvon, E.S., Vigouroux, S., Rousseau, R.F., Biagi, E., Amrolia, P., Dotti, G., Wagner, H.-J., and Brenner, M.K. (2003). Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells. *Blood* **102**, 3815–3821.

Zähringer, U., Lindner, B., Inamura, S., Heine, H., and Alexander, C. (2008). TLR2 – promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology* **213**, 205–224.

Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., et al. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* **106**, 1755–1761.

Zayoud, M., Malki, K.E., Frauenknecht, K., Trinschek, B., Kloos, L., Karram, K., Wanke, F., Georgescu, J., Hartwig, U.F., Sommer, C., et al. (2013). Subclinical CNS Inflammation as Response to a Myelin Antigen in Humanized Mice. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **8**, 1037–1047.

Zeponi, V., Lopez, V.M., Martinez-Cingolani, C., Boudil, A., Pasqualetto, V., Skhiri, L., Gautreau, L., Legrand, A., Megret, J., Zavala, F., et al. (2015). Lymphoid Gene Upregulation on Circulating Progenitors Participates in Their T-Lineage Commitment. *J. Immunol.* **195**, 156–165.

Zhan, Q., Korngold, R., Lezcano, C., McKeon, F., and Murphy, G.F. (2012). Graft-versus-Host Disease-Related Cytokine-Driven Apoptosis Depends on p73 in Cytokeratin 15-Positive Target Cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **18**, 841–851.

Zhan, Y., Kelso, A., and Cheers, C. (1993). Cytokine production in the murine response to brucella infection or immunization with antigenic extracts. *Immunology* **80**, 458–464.

Zhang, H., Gregorio, J.D., Iwahori, T., Zhang, X., Choi, O., Tolentino, L.L., Prestwood, T., Carmi, Y., and Engleman, E.G. (2017). A distinct subset of plasmacytoid dendritic cells induces activation and differentiation of B and T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 1988–1993.

Zhang, P., Tey, S.-K., Koyama, M., Kuns, R.D., Olver, S.D., Lineburg, K.E., Lor, M., Teal, B.E., Raffelt, N.C., Raju, J., et al. (2013). Induced regulatory T cells promote tolerance when stabilized by rapamycin and IL-2 in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**, 5291–5303.

Zhang, R., Ito, S., Nishio, N., Cheng, Z., Suzuki, H., and Isobe, K.-I. (2011). Dextran sulphate sodium increases splenic Gr1+CD11b+ cells which accelerate recovery from colitis following intravenous transplantation. *Clin. Exp. Immunol.* **164**, 417–427.

Zhang, W., Liang, S., Wu, J., and Horuzsko, A. (2008). Human inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 2 amplifies CD11b+Gr1+ myeloid-derived suppressor cells that promote long-term survival of allografts. *Transplantation* **86**, 1125–1134.

Zhang, X., Jin, J., Tang, Y., Speer, D., Sujkowska, D., and Markovic-Plese, S. (2009). IFN-beta1a inhibits the secretion of Th17-polarizing cytokines in human dendritic cells via TLR7 up-regulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 3928–3936.



- Zhang, Y., Shlomchik, W.D., Joe, G., Louboutin, J.-P., Zhu, J., Rivera, A., Giannola, D., and Emerson, S.G. (2002). APCs in the Liver and Spleen Recruit Activated Allogeneic CD8+ T Cells to Elicit Hepatic Graft-Versus-Host Disease. *J. Immunol.* *169*, 7111–7118.
- Zhang, Y., Yoneyama, H., Wang, Y., Ishikawa, S., Hashimoto, S., Gao, J.-L., Murphy, P., and Matsushima, K. (2004). Mobilization of Dendritic Cell Precursors Into the Circulation by Administration of MIP-1 $\alpha$  in Mice. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *96*, 201–209.
- Zhang, Y., Da, R.-R., Hilgenberg, L.G., Tourtellotte, W.W., Sobel, R.A., Smith, M.A., Olek, M., Nagra, R., Sudhir, G., van den Noort, S., et al. (2005). Clonal expansion of IgA-positive plasma cells and axon-reactive antibodies in MS lesions. *J. Neuroimmunol.* *167*, 120–130.
- Zhang, Y., Jalili, F., Ouamara, N., Zameer, A., Cosentino, G., Mayne, M., Hayardeny, L., Antel, J.P., Bar-Or, A., and John, G.R. (2010). Glatiramer acetate-reactive T lymphocytes regulate oligodendrocyte progenitor cell number in vitro: role of IGF-2. *J. Neuroimmunol.* *227*, 71–79.
- Zhao, Y., Liu, Q., Yang, L., He, D., Wang, L., Tian, J., Li, Y., Zi, F., Bao, H., Yang, Y., et al. (2013). TLR4 inactivation protects from graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cell. Mol. Immunol.* *10*, 165–175.
- Zheng, H., Matte-Martone, C., Jain, D., McNiff, J., and Shlomchik, W.D. (2009). Central Memory CD8+ T Cells Induce Graft-versus-Host Disease and Mediate Graft-versus-Leukemia. *J. Immunol.* *182*, 5938–5948.
- Zheng, J., Liu, Y., Liu, Y., Liu, M., Xiang, Z., Lam, K.-T., Lewis, D.B., Lau, Y.-L., and Tu, W. (2013). Human CD8+ Regulatory T Cells Inhibit GVHD and Preserve General Immunity in Humanized Mice. *Sci. Transl. Med.* *5*, 168ra9-168ra9.
- Zheng, S., Papalexi, E., Butler, A., Stephenson, W., and Satija, R. (2018). Molecular transitions in early progenitors during human cord blood hematopoiesis. *Mol. Syst. Biol.* *14*, e8041.
- Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., and Rudensky, A.Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the *Foxp3* gene in regulatory T-cell fate. *Nature* *463*, 808–812.
- Zheng, Z., Narita, M., Takahashi, M., Liu, A., Furukawa, T., Toba, K., and Aizawa, Y. (2004). Induction of T cell anergy by the treatment with IL-10-treated dendritic cells. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* *27*, 93–103.
- Zhou, S., Ueta, H., Xu, X.-D., Shi, C., and Matsuno, K. (2008). Predominant donor CD103+CD8+ T cell infiltration into the gut epithelium during acute GvHD: a role of gut lymph nodes. *Int. Immunol.* *20*, 385–394.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* *20*, 4–12.
- Zinöcker, S., Wang, M.-Y., Rolstad, B., and Vaage, J.T. (2012). Mesenchymal stromal cells fail to alleviate experimental graft-versus-host disease in rats transplanted with major histocompatibility complex-mismatched bone marrow. *Scand. J. Immunol.* *76*, 464–470.
- Zipp, F., Wendling, U., Beyer, M., Grieger, U., Waiczies, S., Wagenknecht, B., Haas, J., and Weller, M. (2000). Dual effect of glucocorticoids on apoptosis of human autoreactive and foreign antigen-specific T cells. *J. Neuroimmunol.* *110*, 214–222.
- Zozulya, A.L., Reinke, E., Baiu, D.C., Karman, J., Sandor, M., and Fabry, Z. (2007). Dendritic cell transmigration through brain microvessel endothelium is regulated by MIP-1 $\alpha$  chemokine and matrix metalloproteinases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 520–529.
- Zozulya, A.L., Ortler, S., Lee, J., Weidenfeller, C., Sandor, M., Wiendl, H., and Fabry, Z. (2009). Intracerebral dendritic cells critically modulate encephalitogenic versus regulatory immune responses in the CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 140–152.
- Zsebo, K.M., Williams, D.A., Geissler, E.N., Broudy, V.C., Martin, F.H., Atkins, H.L., Hsu, R.Y., Birkett, N.C., Okino, K.H., and Murdock, D.C. (1990). Stem cell factor is encoded at the *Sl* locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* *63*, 213–224.
- van Zwam, M., Huizinga, R., Melief, M.-J., Wierenga-Wolf, A.F., van Meurs, M., Voerman, J.S., Biber, K.P.H., Boddeke, H.W.G.M., Höpken, U.E., Meisel, C., et al. (2009). Brain antigens in functionally distinct antigen-presenting cell populations in cervical lymph nodes in MS and EAE. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *87*, 273–286.



## Summary

Hematopoietic progenitors can sense innate signals. The outcome of their early education by such signals within the bone marrow, prior to their egress, may have considerable impact on the outcome of immune responses. While mature plasmacytoid dendritic cells (pDC) are known to either aggravate or ameliorate disease both auto-immune and allogeneic, it remains unknown

whether immune regulatory function can be stably imprinted at the precursor stage in the pDC lineage onwards. We herein investigated whether activation with the oligonucleotide CpG, a Toll-like receptor-9 agonist, confers to bone marrow pDC precursors (CpG-prepDCs) characterized by the c-kit+Sca-1+B220intPDCA-1+ phenotype the capacity to protect against two kinds of murine immune pathologies: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), a model of multiple sclerosis which is an autoimmune disease and graft versus host disease (GVHD), an allogeneic response. We demonstrate that the adoptive transfer of relatively low number of CpG-pre-pDCs (80.000 in EAE and 200.000 in GVHD) was able to clinically reduce both diseases. Interestingly, CpG-pre-pDCs migrated to the spinal cord in EAE and to the spleen in GVHD where their progeny retained a relatively immature pDC phenotype. In EAE, the progeny of CpG-pre-pDCs massively produces IL-27 and TGF $\beta$  and moderately GM-CSF. In the inflamed central nervous system, the progeny switches the immune response of infiltrating CD4+ T cells from pro-inflammatory (IFN $\gamma$ + GM-CSF+ IL-17+) to anti-inflammatory (TGF $\beta$ +, IL-27+, IL-17-, GM-CSF $^{\text{lo}}$ ). The key role of TGF $\beta$  and IL-27 was assessed using precursors incapacitated for the production of each of those cytokines. These experiments demonstrated that the two soluble factors acted sequentially: TGF $\beta$  ensures early phases of the immunomodulation mediated by the CpG-pre-pDC while IL-27 is required for later protection. In GVHD, the mechanisms of protection are different yet similar in some ways. As for EAE, the progeny of CpG-pre-pDCs is still able to produce TGF $\beta$  but this time in combination with IL-12, another cytokine from the IL-27 family. Additionally, those cells were able to reduce the IL-17 production by both pathogenic CD4+ and CD8+ T cells. The human equivalent of CpG-pre-pDC could be a new therapeutic tool in patients with multiple sclerosis or graft versus host disease either per se or enriched in the hematopoietic stem cell transfer already implemented to treat those two immune conditions.

## Résumé

Les progéniteurs hématopoïétiques présentent la faculté de détecter des signaux infectieux et inflammatoires. Leur éducation précoce par de tels signaux au sein de la moelle osseuse avant leur sortie vers la périphérie peut influencer l'évolution des réponses immunes. Alors que les cellules dendritiques plasmacytoïdes matures peuvent soit aggraver soit améliorer des maladies auto-immunes ou allogéniques, nous avons exploré la possibilité que de tels signaux innés confèrent des propriétés immunorégulatrices à des précurseurs médullaires des pDC. Nous avons caractérisé une population médullaire émergente après interaction avec un agoniste du Toll-like receptor-9, l'oligonucléotide CpG, qui présente le phénotype c-kit+Sca-1+B220intPDCA-1+, est engagée dans la voie des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et l'avons dénommée CpG-pre-pDC. Nous avons évalué le potentiel immunorégulateur des CpG-pre-pDCs en opérant leur transfert adoptif dans deux types de pathologies murines : l'Encéphalite Auto-immune Expérimentale (EAE), un modèle de sclérose en plaques qui est une maladie auto-immune, ainsi que la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) qui est une réponse allogénique. Il s'est avéré que le transfert d'un nombre assez faible de précurseurs (80 000 en EAE et 200 000 en GVHD) est capable de limiter la maladie à différents temps cliniques. De façon intéressante, les CpG-pre-pDC migrent spécifiquement à la moelle épinière dans l'EAE et à la rate dans la GVHD où leur descendance conserve un phénotype de pDC encore relativement immature. Dans le cadre de l'EAE, la descendance des précurseurs injectés produit essentiellement de l'IL-27 et du TGF $\beta$  et plus modestement du GM-CSF. Au niveau du système nerveux central inflammé, elles font dévier la réponse immunitaire des lymphocytes T CD4+ infiltrants d'un profil pro-inflammatoire (IFN $\gamma$ + GM-CSF+ IL-17+) vers un profil anti-inflammatoire (TGF $\beta$ +, IL-27+, IL-17-, GM-CSF<sup>lo</sup>). L'utilisation de précurseurs déficients dans chacune de ces deux cytokines a permis de démontrer que TGF $\beta$  et IL-27 interviennent séquentiellement dans la protection conférée par les CpG-pre-pDCs, le TGF $\beta$  à des temps précoces et l'IL-27 aux phases tardives de la maladie. Des mécanismes semblables interviennent dans la protection envers la GVHD conférée par les CpG-pre-pDCs, car leur descendance est toujours capable de produire du TGF $\beta$  mais cette fois en association avec l'IL-12, une autre cytokine de la même famille que l'IL-27. Par ailleurs, ces cellules sont capables de diminuer la production d'IL-17 tant par les lymphocytes T CD4+ que par les CD8+. Une thérapie cellulaire avec l'équivalent humain des CpG-pre-pDCs pourrait constituer un nouvel outil thérapeutique pour le traitement à la fois de la sclérose en plaques réfractaire et de la maladie du greffon contre l'hôte soit injectés seuls soit en enrichissement des greffes de cellules souches hématopoïétiques qui sont pratiquées dans ces deux maladies.