



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A l'Université de Bourgogne, UMR 1098**

Ecole doctorale n°554
Environnement – Santé – E2S

Doctorat de Médecine, cancérologie, génétique, hématologie et immunologie

Par
Claire GERARD

**Développement d'une stratégie thérapeutique immunosuppressive dérivée
de cellules myéloïdes dans la maladie du greffon contre l'hôte**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 29 octobre 2020

Composition du Jury :

Pr. SAAS Philippe	PU-PH, INSERM 1098, UBFC	Président
Pr. RUBIO Marie-Thérèse	PU-PH, CNRS UMR 7365, Université de Lorraine	Rapporteur
Pr. GUILPAIN Philippe	PU-PH, IRMB INSERM 1183, Université de Montpellier	Rapporteur
Pr. BONNOTTE Bernard	PU-PH, INSERM 1098, UBFC	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Remerciements

A mon Directeur de Thèse,

Monsieur le Professeur Bernard Bonnotte,

Merci de m'avoir confié ce travail qui, je le sais bien, vous tiens à cœur. Je sais que vous auriez aimé que je sois un clone de Nona, malheureusement ce ne fut pas le cas mais j'ai fait de mon mieux ! En plus je partais avec un handicap, je suis pharmacienne... et en plus je ne voulais pas faire de fondamental, mauvaise pioche ! Vous m'avez donné les moyens techniques, financiers pour mener à bien ce projet, merci. Le mot d'ordre de cette thèse a été l'autonomie, vous m'avez fait confiance pour construire le projet, me laissant une grande liberté, un atout que je pourrai mettre en avant dans le futur. Malgré votre emploi du temps de ministre vous avez toujours pris le temps de répondre rapidement à mes mails et de nous voir pour discuter du projet, je vous en remercie grandement. Je retiendrai votre gentillesse, votre rigueur scientifique et surtout votre soutien, surtout quand j'ai eu de bonnes raisons de douter de mes capacités, tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir soutenu quand j'ai voulu présenter nos travaux à la SFI, qui aurait cru que l'on pouvait être sélectionné pour le prix poster ! Vous avez une équipe bien fournie maintenant, motivée et plein de projets en cours, vous allez publier à foison (et ne m'oubliez pas dans les futures publications, je serais vexée !).

A mon co-Directeur de Thèse,

Monsieur le Professeur Sylvain Audia,

Sylvain, je sais que mon projet était très très éloigné de tes thématiques de recherche. Néanmoins, tu as participé à la réussite de cette thèse notamment par tes remarques toujours pertinentes en réunion, grâce à toi j'ai réussi à analyser comme il faut mes données de cytométrie quand personne n'arrivait à trouver la solution. Encore désolée de nous avoir fait rater notre train à Besançon, mais tu as vu, j'y ai cru jusqu'au bout ! Je te souhaite d'avoir encore plein de belles publications ce qui ne sera pas un problème, j'en suis certaine.

Aux membres du jury

Madame le Professeur Marie-Thérèse Rubio, Monsieur le Professeur Philippe Guilpain

Merci aux membres du jury de me faire l'honneur de juger ce travail malgré leurs obligations professionnelles et leurs emplois du temps chargés.

Monsieur le Professeur Philippe Saas,

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury et de juger ce travail de thèse. Merci de m'avoir accueilli dans votre unité et de votre soutien dans ce projet.

A la BB team,

A Marine,

Il n'est pas trop de deux thèses pour te remercier. Merci pour tout, ta bonne humeur, ton soutien, ta bienveillance. Je ne sais pas ce que j'aurais fait sans toi, sûrement pas d'aller jusqu'au bout de cette thèse ! Tu es, je le redis ici, la personne la plus gentille que je connaisse. Il y a The Mother of Dragons, tu es The Godmother of HuMoSC, les post-doc et doctorants passent et toi tu es toujours là, à veiller sur le projet. Tu vas avoir ton projet à toi seule maintenant, j'en suis heureuse pour toi. Et surtout, tu vas enfin avoir ton nom dans les publications après des années de loyauté ! Désolée pour cette infidélité que je t'aie faite pour le multiplex... Je te souhaite tout le bonheur du monde et à bientôt sur Lyon.

A Claudie,

Une arrivée dans l'équipe tel le messie. A trois dans une équipe et une Marine qui jonglait entre les patients et les HuMoSC, ton arrivée a été vécue comme une bouffée d'air frais. Ta gentillesse et ta conscience professionnelle sont essentielles pour cette équipe. Tu as participé à ce grand projet que sont les HuMoSC avec ce fameux multiplex qui m'a valu des nuits agitées, un stress bien palpable (mais mon pipettage était assuré !) et finalement la délivrance une fois la plaque dans le Bioplex et surtout des résultats (ben oui, j'avais peur qu'il n'y ait rien à doser ou que ça n'aille pas dans le bon sens) ! Je savais que ça ne pouvait que bien se passer si tu m'aidais sur ce coup-là, encore merci. Je te souhaite beaucoup de réussite tant sur le plan professionnel (un

M2 ?) que personnel (bonne installation dans ton nouvel appart, j'exige des photos !) et j'espère que l'équipe te gardera encore longtemps !

Aux autres doctorants,

Hélène, Séthi, Thibault, Coraline, presque que des médecins ! Bon courage pour les expérimentations, les rédactions et la soutenance. Hélène, merci pour ta bonne humeur, ton soutien et puis finalement, grâce à toi, j'ai appris à cultiver des BAT dans du matrigel ! Coraline, bon courage avec les HuMoSC, tu vas très bien t'en sortir. Séthi, mes neutrophiles, mes globules rouges et moi-même te remercie pour ses discussions plus que variées et espérons que tu nous choisiras comme figure de ton futur papier. Bon courage pour la thèse de médecine également. Thibault, dernière ligne droite, bonne rédaction !

A Maxime,

Je retiendrai ton entrain et tes 1000 idées à la minute ! A ton retour de Barcelone j'ai accepté de m'occuper des BAT, et bien, ça n'a pas été de tout repos ! Heureusement qu'il y avait un peu d'HuMoSC au début. Entre l'anapath, le bloc, les étiquettes, les BAT à 18h le vendredi quand il y a 1h30 de manip ou les J5 les dimanches/jours fériés, je n'ai pas senti le traquenard dès le début. Merci pour tes remarques pertinentes sur le projet, de m'avoir fait participer au projet BAT/HuMoSC et ta bonne humeur. Bon courage pour tes 1000 projets, tu auras 1000 publications (il s'agirait de ne pas perdre le rythme !) !

Aux autres membres de l'équipe que j'ai pu côtoyer pendant ses 3 ans et demi,

To Andrea, thank you so much for teaching me how to handle a pipet, how to go to cytometry and how to interpret datas. We worked together for only 4 months but you teach me basis to go on my own. I know you enjoy your new life in Prague, I hope it will last a long time. Marion, merci pour ton aide. André, la place est libre, il y a des DC dans les BAT, go go go !

A la plateforme de cytométrie,

Annabelle, merci pour ton sourire et ton accent chantant qui me fait voyager à chaque fois. Merci pour ton aide et ton soutien pour ces derniers mois (c'est re-Claire !). Serge, plus d'appels de ma part pour une 1000^e question pour mon multiplex, tes conseils ont été essentiels pour la réussite de cette ultime manip'. Nico, merci pour ton aide, ta gentillesse, ton soutien et les petits papotages quand j'avais 3h de cytométrie. Au BD LSRII, merci d'avoir tenu le coup jusqu'à la fin malgré ton grand âge.

A la plateforme CLIPP,

Merci à Pauline, Franck et David pour votre gentillesse. Franck, tu m'as grandement aidé pour l'interprétation de ces datas de protéomique qui relevaient du chinois pour moi. Bon courage pour vos futures carrières.

A l'UMR PAM,

Merci à toute l'équipe pour votre gentillesse, votre soutien et nos petites discussions. Tracy, bon courage pour la rédaction, c'est la dernière ligne droite ! Merci à Hervé pour ton aide. Amandine profite bien de ton adorable choupette. Louise, merci pour ton aide et tes conseils. Pr. Dalle, merci pour vos encouragements et à bientôt sur les courts !

A mes co-internes IPR,

Merci pour nos repas, nos discussions et le soutien qu'on a pu trouver au sein de notre groupe. Bon courage pour les prochains, pour les rédactions et les soutenances !

Au personnel de l'EFS de Dijon et Besançon,

Merci pour votre gentillesse et votre sourire au moment de venir récupérer les buffy.

Aux donateurs,

Merci d'avoir donné votre sang et de m'avoir permis de mener cette thèse.

A ma famille,

La der des der, finito, ciao les études ! Merci de m'avoir soutenu jusqu'au bout, d'avoir cru en moi et de m'avoir remotivée quand je n'y croyais plus. Je vais m'arrêter là maintenant, promis.

A Mathieu,

Ça y'est, c'est vraiment la fin de mes études, on va pouvoir acheter notre 100m² avec terrasse en dernier étage place Saint-Louis ! J'ai hâte de recommencer notre vie à deux, d'avoir des projets de vie à long terme et de planifier notre prochain voyage. Merci de ton soutien indéfectible, ton humour, ta cuisine, ton amour, je t'aime.

RESUME

Mots-clés : cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes, lymphocytes T, lymphocyte T régulateur, inflammation, GvHD, immunorégulation

Résumé :

Notre équipe a développé une thérapie cellulaire originale dérivant de la lignée monocyttaire. Cette sous-population de cellules humaines suppressives d'origine myéloïde, appelée Human Monocyte-derived Suppressor Cells (HuMoSC, cellules CD33+), est capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T effecteurs et d'induire des CD4 et CD8 Treg. De plus, les HuMoSC préviennent l'apparition de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

Dans un premier temps, nous avons montré qu'un environnement inflammatoire ou la présence d'immunosuppresseurs ne diminuaient pas la capacité des HuMoSC à inhiber la prolifération lymphocytaire et à favoriser l'induction de CD4 et CD8 Treg. Enfin, nous avons montré que l'effet graft-versus-leukemia (GvL) est préservé en présence des HuMoSC. Toutes ces données confirment l'intérêt des HuMoSC dans la prévention de la GvHD.

Cependant, en raison d'un faible rendement de génération des HuMoSC et d'un problème de disponibilité de billes de tri CD33+ GMP, nous avons aussi modifié notre protocole pour isoler les cellules CD14+, appelées CD14-HuMoSC. Ainsi, dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux propriétés des surnageants des HuMoSC et des CD14-HuMoSC. Ces modifications du protocole ont permis d'obtenir un grand nombre de cellules CD14-HuMoSC et de grandes quantités de surnageant produit en conditions GMP. Nous avons montré que les deux surnageants diminuaient l'activation et la prolifération des LT, diminuaient la réponse Th1 au profit de la réponse Th2, favorisaient l'induction des Treg et diminuaient la capacité des cellules dendritiques à induire la prolifération des LT. *In vivo*, les surnageants préviennent le développement de la GvHD dans un modèle murin de GvHD xénogénique. Enfin, pour montrer que ces deux surnageants seront efficaces chez les patients, nous avons montré qu'un environnement inflammatoire ou que la présence d'immunosuppresseurs n'altéraient pas l'effet immunosuppresseur des surnageants. Ces résultats confirment donc leur intérêt thérapeutique. L'étude protéomique de ces deux surnageants a permis d'identifier des protéines immunosuppressives qui pourraient être responsables de leurs capacités immunosuppressives.

En conclusion, les HuMoSC et les surnageants des cellules dérivées des HuMoSC représentent un arsenal thérapeutique prometteur dans la prévention de la GvHD mais aussi dans les maladies inflammatoires.

Key words : myeloid derived suppressor cells, T lymphocytes, regulatory T cells, inflammation, GvHD, immunoregulation

Abstract :

Our team has developed an original cell therapy derived from monocytes. This sub-population of human suppressor cells of myeloid origin, called Human Monocyte-Derived Suppressor Cells (HuMoSC, CD33⁺ cells) is able to inhibit effector T cell proliferation and to induce CD4 and CD8 Treg. It has also been demonstrated that HuMoSC prevent from graft-*versus*-host disease (GvHD) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

In a first time, we showed that an inflammatory environment or the presence of immunosuppressive drugs did not decrease HuMoSC abilities to inhibit T cell proliferation and to promote CD4 and CD8 Treg induction. Finally, we showed that graft-*versus*-leukemia (GvL) effect is preserved in presence of HuMoSC. Taken together, those data confirm the interest of HuMoSC in GvHD prevention.

Nevertheless, due to a low yield of HuMoSC generation with this protocol and problem with availability of CD33 GMP beads, we also modified our protocol to isolate CD14⁺ cells, called CD14-HuMoSC. This is why in a second time, we took interest in HuMoSC and CD14-HuMoSC supernatant properties. These protocol modifications allow us to obtain large number of CD14-HuMoSC cells and large quantities of supernatant produced under GMP conditions. We showed that both supernatants decrease T cell activation and proliferation, decrease Th1 response in favor of Th2 response, promote Treg induction and decrease capacity of dendritic cells to induce T cell proliferation. *In vivo*, supernatants prevent from GvHD in a murine model of xenogenic GvHD. Finally, in order to assess that these supernatants will be efficient in patient, we showed that an inflammatory environment or presence of immunosuppressive drugs did not alter both supernatant immunosuppressive effects. These results confirm their therapeutic interest. Proteomic analysis allowed us to identify immunosuppressive proteins which could be responsible for supernatants immunosuppressive capacities.

In conclusion, HuMoSC and supernatant derived from HuMoSC represent a promising therapeutic arsenal for GvHD prevention but also in inflammatory diseases.

SOMMAIRE

Listes des figures

Figure 1 : Evolution de la répartition des indications d'allogreffe en France. D'après ⁹	24
Figure 2 : Répartition des allogreffes de CSH selon le type de donneur en 2017. D'après ⁹ ...	26
Figure 3 : Evolution de la répartition des sources de greffon de CSH allogéniques ⁹	28
Figure 4 : Mécanismes cytotoxique des NK vis-à-vis des cellules leucémiques dans la greffe de CSH.	32
Figure 5 : Effet GvL.	33
Figure 6 : Distinction entre la GvHD aigüe et chronique selon les signes cliniques et leur moment d'apparition	34
Figure 7 : Physiopathologie de la GvHD aigüe.....	39
Figure 8 : Mécanismes immunosuppresseifs des Treg.	44
Figure 9 : Mécanisme d'action des CSM.	52
Figure 10 : Les iNKT préviennent la survenue de la GvHD tout en conservant l'effet GvL après conditionnement non-myéloablatif.	60
Figure 11 : Mécanismes immunosuppresseifs des MDSC affectant les différents acteurs de la réponse immunitaire.	65
Figure 12 : Protocole de génération des HuMoSC.....	68
Figure 13 : Phénotype des HuMoSC déterminé par cytométrie en flux..	69
Figure 14 : Analyse multiplex du milieu de culture cellulaire des HuMoSC après 48h.	70
Figure 15 : Les HuMoSC inhibent la prolifération des lymphocytes T.	71
Figure 16 : Les HuMoSC inhibent l'activation des LT.....	71
Figure 17 : Les HuMoSC induisent des Treg <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	72
Figure 18 : Mécanismes immunosuppresseifs des HuMoSC.....	73
Figure 19 : L'inhibition de la prolifération des LT par les HuMoSC dépend de STAT3.....	74
Figure 20 : L'injection d'HuMoSC permet de prévenir la survenue de la GvHD aigüe dans un modèle xénogénique.....	75
Figure 21 : Détermination des paramètres optimaux pour produire un surnageant immunosuppresseif issu des HuMoSC (Surnageant d'HuMoSC).	152
Figure 22 : Détermination des paramètres optimaux pour produire un surnageant immunosuppresseif issu des HuMoSC (Surnageant d'HuMoSC).	153
Figure 23 : Evaluation de l'inhibition de la prolifération des LT CD4 ⁺ et LT CD8 ⁺ par le surnageant d'HuMoSC.	154
Figure 24 : Effet du surnageant d'HuMoSC sur l'activation des LT.	155
Figure 25 : Effet sur surnageant sur la polarisation des lymphocytes T CD4 ⁺ par le surnageant d'HuMoSC. indépendantes sont montrés. Les données sont montrées avec la moyenne ± SEM des expériences représentatives. (ns = non significatif, *: p ≤ 0,05, **: p ≤ 0,01)	158
Figure 26 : Effet sur surnageant sur la polarisation des lymphocytes T CD8 ⁺ par le surnageant d'HuMoSC.	159
Figure 27 : Effet du surnageant d'HuMoSC sur la cytotoxicité des lymphocytes T CD8 ⁺	160
Figure 28 : Effet du surnageant d'HuMoSC sur la cytotoxicité des lymphocytes T CD8 ⁺	161
Figure 29 : Induction des Treg par le surnageant d'HuMoSC.	162
Figure 30 : Effet du surnageant d'HuMoSC sur la viabilité des lymphocytes T. 0,01)	163

Figure 31 : Effet du surnageant d’HuMoSC sur la fonction et le phénotype des cellules dendritiques à J5.....	164
Figure 32 : Effet du surnageant d’HuMoSC sur la fonction et le phénotype des cellules dendritiques à J7.....	165
Figure 33 : Etude de l’efficacité du surnageant d’HuMoSC en conditions cliniques.	166
Figure 34 : Impact d’un milieu inflammatoire sur la fonction immunosuppressive des HuMoSC.....	168
Figure 35 : Analyse protéomique comparative des surnageants d’HuMoSC (HuMoSC sup) et de monocytes (mono sup).	172
Figure 36 : Effet du surnageant d’HuMoSC dans la prévention de la GvHD.....	173
Figure 37 : Congélation et filtration stérilisante du surnageant d’HuMoSC.....	174
Figure 38 : Phénotype comparatif des HuMoSC et des CD14-HuMoSC.....	176
Figure 39 : Analyse par multiplex des surnageants d’HuMoSC et de CD14-HuMoSC..	179

Liste des tableaux

Tableau 1 : Stadification de la GvHD aigüe selon Glucksberg.	36
Tableau 2 : Les différents grades de la GvHD aigüe selon Glucksberg.	37

Liste des abréviations

ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
α-GalCer	Alpha-galactosylceramide
AMM	Autorisation de mise sur le marché
Arg1	Arginase 1
ATP	Adénosine tri-phosphate
ATRA	Acide tout-trans-rétinoïque
BPF/GMP	Bonnes Pratiques de Fabrication/Good manufacturing practice
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX2	Cyclooxygenase 2
CPA	Cellules présentatrices d'antigène
CsA	Ciclosporine A
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CSM	Cellules souches/stromales mésenchymateuses
CSP	Cellules souches du sang périphérique
CTL	LT cytotoxique
CTV	Cell Trace Violet
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DC	Cellules dendritiques
DLI	Donor lymphocyte infusion
EFS	Etablissement français du sang
FasL	Fas ligand
FDA	Food and drug administration
FoxP3	Forkhead box P3
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GO	Gene ontology
GVHD	Graft versus host disease
GvL	Graft versus leukemia
HGF	Hepatocyte growth factor
HLA	Human Leukocyte antigen
HuMoSC	Human monocyte-derived suppressor cells
IDO	Indoleamine 2.3-dioxygenase
IFNγ	Interféron γ
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IL1-RA	Antagoniste du récepteur à l'IL-1
iNOS	Nitric oxide synthase inductible
iNKT	Lymphocytes invariants natural killer T
ISCT	L'International Society of Cellular Therapy
KIR	Killer cell immunoglobulin receptors
LB	Lymphocyte B

LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
M2	Macrophage M2
MAPC	Cellules progénitrices adultes multipotentes
MDSC	Myeloid derived suppressor cells
miHA	Antigène mineur d'histocompatibilité
MMF	Mycophénolate mofétil
MP	Méthylprednisolone
MO	Moelle osseuse
MTI	Médicament de thérapie innovante
MTX	Méthotrexate
NK	Natural killer
NOX2	NADPH oxidase 2
nTreg	Treg naturels
NSG	NOD/SCID/IL-2R γ_c ^{-/-}
PAMP	Pattern-associated molecular pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PD	Population doubling
PGE2	Prostaglandine E2
RNS	Espèces réactives à l'azote
ROS	Espèces réactives à l'oxygène
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SAL	Sérum anti-lymphocytaire
SPA	Evaluation spéciale de protocole
STAT3	Signal transducer and activator of transcription
SVF	Sérum de veau fœtal
TCR	T cell receptor
TGFβ	Transforming growth factor-beta
Th1	LT helper type 1
Th2	LT helper type 2
Th17	LT helper type 17
TLI/ATG	Total lymphoid irradiation/ anti-thymoglobuline
TLR	Toll-like receptor
TNFα	Tumor necrosis factor α
Treg	LT régulateur
TSG6	Tnf α -stimulated gene protein

RESUME.....	8
Listes des figures.....	13
Liste des tableaux	15
Liste des abréviations.....	16
INTRODUCTION GENERALE	21
PARTIE I : GENERALITES SUR LA GREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏËTIQUES.....	23
1. La greffe de cellules souches hématopoïétiques	23
1.1. Historique.....	23
1.2. La greffe de cellules souches hématopoïétiques en pratique	23
2. La greffe de cellules souches hématopoïétiques : l'effet greffe contre leucémie ou tumeur.....	29
2.1. Les antigènes et protéines cibles.....	29
2.2. Les acteurs cellulaires de l'effet GvL	30
3. La maladie du greffon contre l'hôte	34
3.1. Epidémiologie	34
3.2. Manifestations cliniques de GvHD aiguë	35
3.3. Physiopathologie.....	37
3.4. Stratégies thérapeutiques dans la prévention de la GvHD aiguë	39
3.5. La GvHD chronique.....	40
PARTIE II : LES CELLULES IMMUNOSUPPRESSIVES, DES NOUVEAUX ALLIES THERAPEUTIQUES DANS LA PREVENTION DE LA GVHD	43
1. Les lymphocytes T régulateurs	43
1.1. Mécanismes d'action	43
1.2. Production des Treg	44
1.3. Prévention de la GvHD par les Treg.....	46
2. Les cellules souches/stromales mésenchymateuses	49
2.1. Mécanismes d'action	49
2.2. Génération des CSM	53
2.3. Les CSM dans la prévention de la GvHD aiguë	53
3. Les cellules progénitrices adultes multipotentes	56
3.1. Isolation et expansion des MAPC.....	56
3.2. Mécanismes d'action dans la GvHD.....	57

3.3. Prévention de la GvHD	58
4. Les lymphocytes invariants Natural Killer T	59
4.1. Isolation ou expansion des iNKT	60
4.2. Intérêt des cellules iNKT dans la GvHD	61
5. Les cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes	63
5.1. Mécanismes d'action	63
5.2. Génération des MDSC	66
5.3. Les MDSC dans le traitement de la GvHD	66
6. Les HuMoSC, une thérapie cellulaire immunosuppressive dans la GvHD	67
6.1. La génération des HuMoSC	68
6.2. Phénotype des HuMoSC et expression cytokinique	68
6.3. Propriétés immunosuppressives	70
6.4. Intérêt des HuMoSC dans un modèle xénogénique de GvHD aigüe	74
OBJECTIFS DE LA THESE	76
RESULTATS	79
Article 1: “Efficiency of human monocyte-derived suppressor cell-based treatment in graft-versus-host disease prevention while preserving graft-versus-leukemia effect”	79
Article 2 : “Therapeutic interest of an immunosuppressive myeloid cell supernatant in GvHD prevention”	111
Résultats complémentaires	152
DISCUSSION	181
CONCLUSION.....	191
BIBLIOGRAPHIE	193
ANNEXES.....	206

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

A ce jour, la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est le seul traitement qui permet de guérir des patients atteints d'hémopathies malignes. Avant la greffe, le patient subit un conditionnement associant une chimiothérapie à fortes doses combinée ou non à de la radiothérapie, permettant d'éliminer les cellules leucémiques et les cellules immunitaires. Ensuite, le patient reçoit une perfusion de cellules hématopoïétiques d'un donneur sain (principalement issues de cellules souches périphériques (CSP) ou de la moëlle osseuse (MO) contenant de façon majoritaire des précurseurs hématopoïétiques mais également des populations cellulaires immunocompétentes en faible quantité comme les lymphocytes T (LT), B (LB), les cellules natural killer (NK) ou encore des cellules dendritiques (DC). Ces cellules vont alors coloniser la MO et ainsi rétablir un système hématopoïétique sain. L'effet bénéfique recherché d'une telle greffe est appelé effet *Graft-versus-leukemia* (GvL), ou effet du greffon contre la leucémie. En effet, les cellules ainsi greffées vont reconnaître les cellules leucémiques résiduelles allogéniques non détruites par le conditionnement pré-greffe et ainsi les éliminer. Cependant, un tel traitement est limité par la survenue d'une complication majeure, la maladie du greffon contre l'hôte ou *Graft-versus-host disease* (GvHD) qui survient dans 40% des cas, responsable d'une augmentation de la morbidité et la mortalité. Les différences au niveau du système HLA (Human Leukocyte Antigène) entre le donneur et le receveur sont responsables de la survenue de la GvHD excepté pour les greffes géno-identiques et phéno-identiques. De nombreux traitements préventifs et curatifs ont été développés mais ils sont responsables de nombreux effets indésirables comme la survenue d'une immunodépression générale rendant le patient encore plus vulnérable à la survenue d'infections opportunistes. Aussi il serait souhaitable de limiter leur utilisation. Ainsi, il paraît nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques comme alternatives à ces traitements. Plusieurs alternatives sont en cours de développement, notamment l'utilisation de cellules immunosuppressives permettant une immuno-modulation post-greffe diminuant ainsi la survenue de GvHD^{1,2}. Ces nouvelles thérapies montrent des résultats encourageants aussi bien chez l'animal que chez l'Homme. Par exemple, l'utilisation de lymphocytes T régulateurs (Treg) est apparue comme une solution prometteuse pour lutter contre la GvHD. Cependant, leur utilisation en clinique est limitée par le taux très faible de Treg chez l'homme et la difficulté d'expandre *ex-vivo* ces cellules. Egalement, des thérapies cellulaires basées sur les cellules souches mésenchymateuses (CSM) dérivées de la MO ont montré des effets immunorégulateurs sur la GvHD mais les résultats obtenus entre les différents laboratoires sont discordants, leurs potentiels

immunosuppresseurs restent encore à être explorés. En effet, les résultats d'essais cliniques de grande envergure ne montrent pas un effet certain dans la prévention et le traitement de la GvHD aigüe ³. De plus, il pourrait y avoir plus de récurrence tumorale ou d'infections dans le cadre d'un traitement par CSM même si la corrélation n'a pas été montrée de façon formelle ⁴.

Au sein de notre équipe de recherche, nous avons développé une thérapie cellulaire qui pourrait à terme être utilisée pour inhiber ou diminuer la survenue de la GvHD⁵. En effet, la sous-population de cellules humaines suppressives d'origine monocytique, générée par l'équipe, appelée Human Monocyte-derived Suppressor Cells (HuMoSC, cellules CD33⁺), est capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T effecteurs (Teff) mais aussi d'induire l'expansion d'une population particulière de Treg. Ainsi, grâce à un modèle cliniquement pertinent de GvHD, il a été montré que les HuMoSC permettent de prévenir l'apparition de la GvHD.

Après avoir brièvement introduit le principe de la greffe de CSH ainsi que la physiopathologie de la GvHD aigüe au cours de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, nous décrirons les autres thérapies cellulaires en cours d'étude puis expliciterons en détails cette nouvelle thérapie cellulaire. L'objectif de ce travail est de montrer l'intérêt des HuMoSC mais aussi de ses dérivés dans la prévention de la GvHD en explicitant leurs mécanismes d'action et en évaluant la faisabilité d'une production industrielle.

PARTIE I : GENERALITES SUR LA GREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES

1. La greffe de cellules souches hématopoïétiques

1.1. Historique

En 1912, Alexis Carrel reçoit le prix Nobel de médecine pour ses travaux sur la suture des vaisseaux mais aussi la transplantation d'organes et de cellules sanguines, après avoir réussi la première auto-transplantation rénale sur une chienne ainsi que d'autres organes. Ce sont les prémices de la greffe d'organes. En 1940, l'équipe de Medawar démontre que le rejet de greffe a des causes immunologiques. En 1957, E. Donnall Thomas effectue les premières transplantations de moelle osseuse chez l'Homme. Ces greffes aboutissent au décès des 6 receveurs en moins de 3 mois alors que la notion d'histocompatibilité est alors inconnue. En France, c'est Georges Mathé qui, en 1958, réalise les premières greffes réussies de moelle osseuse (MO) sur 5 physiciens yougoslaves ayant été accidentellement irradiés dans un réacteur nucléaire⁶. Seuls quatre patients ont survécu à leur greffe, le greffon provenant d'un donneur ayant un phénotype le plus proche du receveur. Ce succès lui permettra de déterminer la dose d'irradiation nécessaire à une greffe réussie. Quelques années plus tard, il greffera avec succès un patient leucémique après irradiation corporelle totale, le patient ayant été en rémission complète pendant 20 mois⁷. Il est probablement décédé des complications de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD). Ces complications liées à la greffe ont incité les scientifiques à s'interroger sur des notions d'histocompatibilité et à l'exposition aux radiations. Ainsi, Jean Dausset découvrira le système de l'Human Leukocyte Antigen (HLA) en 1958 et permettra aux cliniciens d'apparier donneur et receveur selon le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)⁸. Les molécules de CMH permettent la présentation de l'antigène au récepteur des lymphocytes T et engendrent une réaction immunitaire, expliquant dans le cas de la greffe, les mécanismes de la GvHD et du rejet.

1.2. La greffe de cellules souches hématopoïétiques en pratique

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est à ce jour le seul traitement curatif dans les maladies hématologiques et notamment les leucémies. Dans la majorité des cas, la greffe est de type allogénique, c'est-à-dire que le donneur et le receveur sont deux individus

différents d'une même espèce, en recherchant une identité totale du CMH entre le donneur et le receveur. La greffe est dite autologue lorsque le patient est son propre receveur. Le CMH est un système de reconnaissance du soi qui est divisé en deux classes, le CMH de classe I exprimé à la surface de toutes cellules nucléées, et le CMH de classe II exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA) permettant l'activation des lymphocytes T (LT).

1.2.1. L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

En 2017, d'après la base ProMISe de l'Agence de Biomédecine, l'allogreffe de CSH a été principalement réalisée dans les leucémies aiguës myéloblastiques (41.3%), les leucémies aiguës lymphoïdes (14.5%), les myélodysplasies (10%)⁹ (Figure 1). Les autres indications concernent des hémopathies lymphoïdes et myéloïdes mais aussi des hémoglobinopathies (drépanocytose, β -thalassémie), déficits immunitaires combinés sévères et certaines maladies métaboliques.

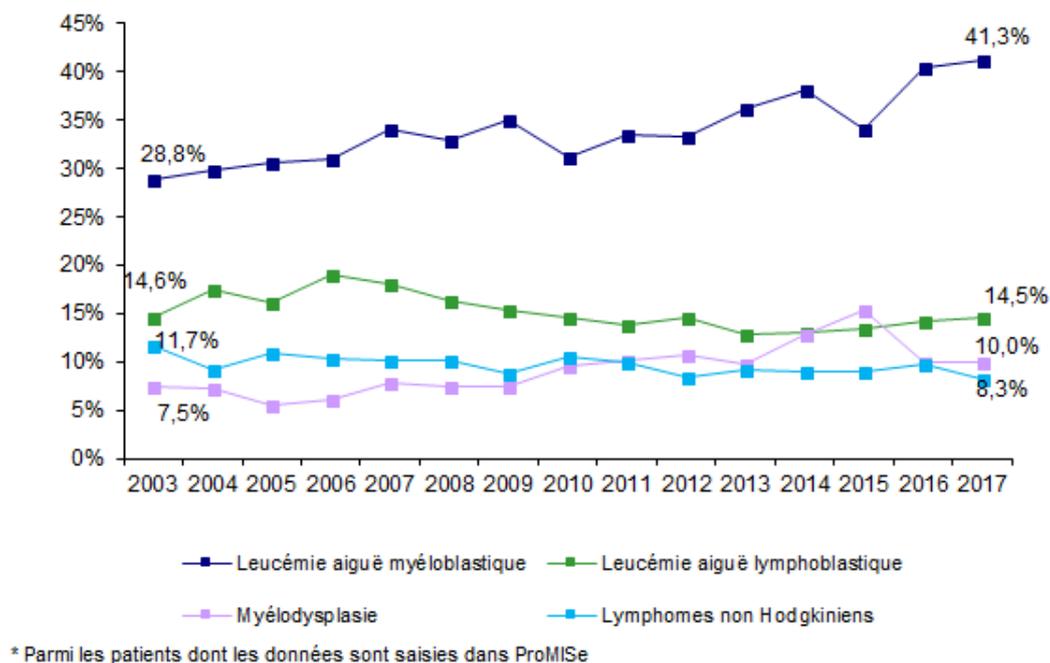


Figure 1 : Evolution de la répartition des indications d'allogreffe en France. D'après⁹

1.2.1.1. Choix du donneur

L'incompatibilité du CMH également appelé Human Leukocyte Antigen (ou système HLA chez l'Homme) entre le donneur et le receveur constitue la cause principale de survenue de la

GvHD lors de greffes non géno-identiques ou phéno-identiques. Lors de la greffe, des cellules immunocompétentes comme les LT sont capables de reconnaître les antigènes mineurs et majeurs du système HLA et sont responsables du développement de la GvHD. Il faut donc rechercher une histocompatibilité parfaite entre donneur et receveur afin d'éviter ou de limiter la survenue de la GvHD. En revanche, une compatibilité du système ABO, antigènes déterminant les groupes sanguins, n'est pas nécessaire car les hématies du greffon sont détruites.

- Frère ou sœur géno-identique : on parle ici de donneur géno-identique, les antigènes HLA sont les mêmes mais des différences existent sur d'autres antigènes n'appartenant pas au système HLA.

- Donneur non apparenté phéno-identique : ce sont des donneurs volontaires non apparentés inscrits sur les registres de donneurs nationaux. Pour les allogreffes de donneurs non apparentés, on effectue un typage allélique 4-digits pour lequel on recherche une compatibilité de 10/10 en HLA-A, B, C (CMH classe I) et DRB1, DQB1 (CMH classe II) car ce sont les gènes les plus polymorphes.

- Donneur HLA non phéno-identique : On parle alors de greffe haplo-identique car la compatibilité diffère sur 1, 2 ou 3 antigènes HLA. L'Endoxan® (cyclophosphamide) post-greffe dans le cadre de greffe haplo-identique permet de diminuer les réactions de GvHD par déplétion des LT *in vivo*.

Plus de la moitié des allogreffes de CSH étaient de donneurs non apparentés, alors que les greffes apparentées HLA identiques représentaient 27% des allogreffes d'après le rapport d'activité nationale de greffe de CSH de l'Agence de Biomédecine (Figure 2).

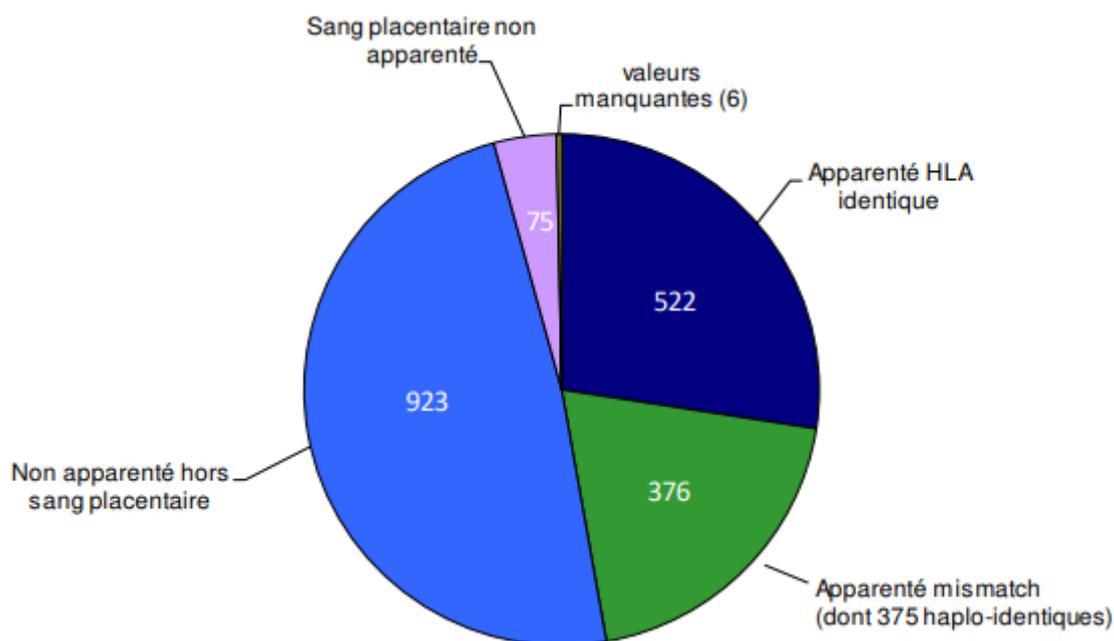


Figure 2 : Répartition des allogreffes de CSH selon le type de donneur en 2017. D'après⁹

Le choix du donneur dépend de la disponibilité d'un donneur HLA géno- ou phéno-identique. En cas d'absence de ces deux types de donneur, le choix peut se porter vers une greffe haplo-identique ou bien une greffe de sang placentaire. La décision finale dépend aussi des pratiques des centres de transplantation.

1.2.1.2. Les sources de cellules souches hématopoïétiques

Il existe plusieurs sources de CSH. Historiquement, la première source de CSH est la MO. La MO est une substance grasseuse et semi-liquide ayant une activité hématopoïétique prenant place dans tous les os du corps humains jusqu'à l'âge de 4 ans. A l'âge adulte, l'activité hématopoïétique se concentre principalement dans les os courts et plats tels que le sternum, les os iliaques, les vertèbres et les côtes. Lors d'une greffe de MO, les CSH sont majoritairement issus des os iliaques car elles comportent le plus grand nombre de cellules. L'obtention de CSH issues de la MO se fait par ponction au niveau des os iliaques du bassin. Le volume prélevé dépend du poids du donneur et du receveur et permet de ponctionner à la fois les CSH mais aussi leur milieu environnant.

De nos jours, avec le développement de facteurs de croissance synthétiques, il est possible d'effectuer des greffes de CSH issues de sang périphérique (CSP). Par mobilisation par

lénograstim (G-CSF fabriqué par la technique de l'ADN recombinant) des CSH de la MO vers le sang périphérique des patients ou de donneurs sains, une cytophérèse permet de récupérer 3×10^6 CD34⁺/kg poids du receveur et ainsi obtenir une quantité plus importante de cellules CD34⁺ qu'un greffon de MO. Ce facteur de croissance de la lignée granulocytaire peut être associé avec le plérixaflo (Mozobil®) dans le cadre d'une autogreffe chez les patients adultes atteints de myélome multiple ou de lymphome pour lesquels la mobilisation des CSH est difficile (âge >60 ans et/ou chimiothérapie intensive antérieure et/ou chimiothérapie myélosuppressive antérieure et/ou taux de CSH circulant inférieur à 20 CSH/ μ L). Le plérixaflo est un antagoniste sélectif et réversible du récepteur de chimiokine CXCR4, bloquant sa liaison avec son ligand la chémokine CXCL12. Par cette inhibition, les CSH ne se lient plus à la matrice extracellulaire du stroma médullaire, et donc leur rétention au niveau de la MO est diminuée, permettant par un effet synergique avec le G-CSF le passage des CSH dans le sang périphérique. Afin de comprendre comment les CSH sont capables de migrer dans le sang périphérique, il est important de comprendre les changements physiologiques des niches médullaires des CSH pendant l'administration de G-CSF. A l'état homéostatique, les CSH sont retenues dans la MO par des chémokines et des molécules d'adhésion (CXCL12, SCF et VCAM-1) exprimées par les cellules progénitrices stromales mésenchymateuses et les cellules endothéliales¹⁰. L'administration de G-CSF entraîne la prolifération des polynucléaires neutrophiles au niveau de la MO qui vont libérer des enzymes protéolytiques clivant et inactivant ces molécules d'adhésion et cytokines. De même, le G-CSF diminue les populations macrophagiques et ostéoblastiques, cette déplétion va agir en synergie avec les neutrophiles en diminuant l'expression de CXCL12, SCF et VCAM-1 dans la MO. Tout ceci concourt à la mobilisation des CSH dans le sang. Les CSH sont ensuite collectées par cytophérèse.

En 1988, le Pr Eliane Gluckman effectua la première greffe en France de CSH issues de sang de cordon chez un enfant atteint d'une anémie de Fanconi¹¹. En comparaison aux autres sources de CSH, les cellules souches issues du sang de cordon sont immatures, diminuant le risque de conflit immunologique comme le rejet de greffe ou la GvHD et permettant ainsi une compatibilité HLA moins drastique¹². Malgré le fait que ce soit une source de CSH facilement accessibles et sans danger, le faible nombre de cellules reste l'inconvénient principal. Il reste cependant possible de pooler les CSH de différents cordons pour permettre des greffes chez des receveurs adultes. La greffe de sang de cordon reste une alternative thérapeutique pour des patients atteints de pathologies hématologiques pour lesquelles il n'existe pas de donneur HLA compatible.

En 2017, les CSH issues de sang périphérique constituent la principale source de CSH utilisée tandis que l'utilisation de sang placentaire diminue depuis plusieurs années (Figure 3).

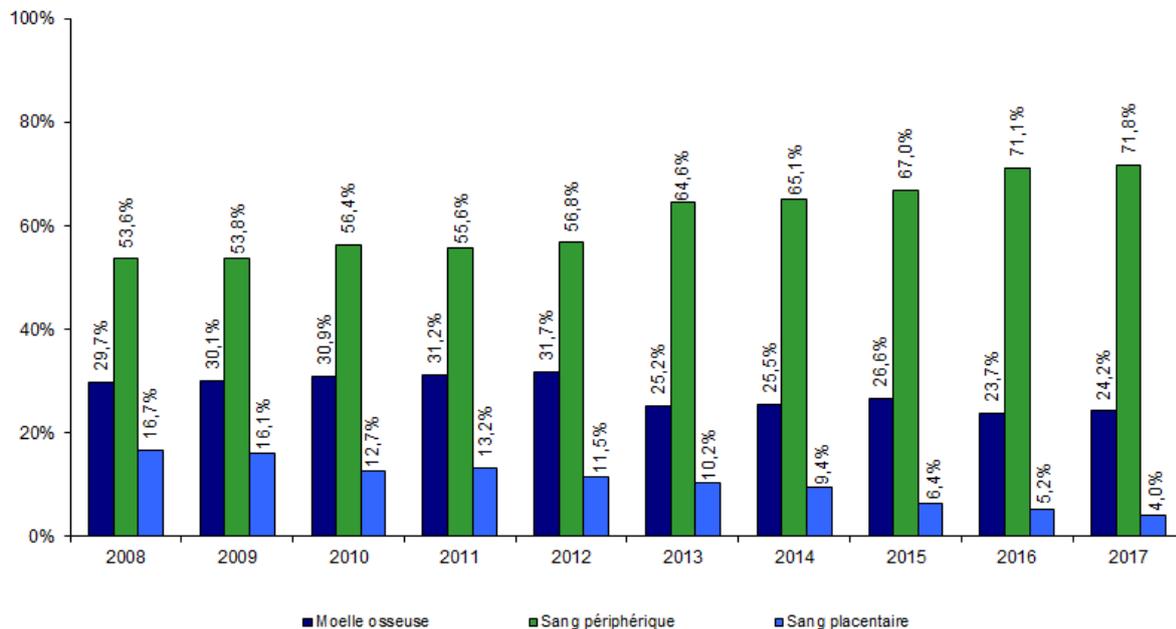


Figure 3 : Evolution de la répartition des sources de greffon de CSH allogéniques⁹.

1.2.1.3. Déroulement de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Avant la greffe allogénique, le patient subit un conditionnement associant une chimiothérapie à fortes doses combinée ou non à de la radiothérapie, permettant d'éliminer les cellules leucémiques mais malheureusement aussi les cellules immatures saines et par voie de conséquence les cellules immunitaires. Il existe deux types de protocole de conditionnement :

- myélo-ablatif : il permet l'élimination des cellules tumorales mais aussi une immunosuppression afin d'éviter le rejet de greffe. Dû à sa toxicité, ce conditionnement sera réservé aux patients jeunes, sans comorbidités.

- non myélo-ablatif : il permet, grâce à de faibles doses, une immunosuppression suffisante pour induire une tolérance chez le receveur vis-à-vis de la greffe. Les cellules tumorales seront éliminées par les cellules immunitaires présentes dans le greffon, l'effet *Graft-versus-leukemia* (GvL) est donc privilégié. Il sera utilisé chez des patients âgés ou présentant des comorbidités.

Ensuite, le patient reçoit une perfusion intraveineuse de CSH contenant de façon majoritaire des précurseurs hématopoïétiques mais également des populations cellulaires immunocompétentes en faible quantité comme les LT, les lymphocytes B (LB), les cellules natural killer (NK) ou encore des cellules dendritiques (DC). Ces cellules vont alors coloniser la MO et ainsi rétablir un système hématopoïétique sain. L'effet bénéfique recherché ici est l'effet GvL.

2. La greffe de cellules souches hématopoïétiques : l'effet greffe contre leucémie ou tumeur

L'effet bénéfique recherché par la greffe de cellules souches hématopoïétiques est l'effet GvL ou GvT. Le transfert des cellules immunocompétentes du donneur au receveur va permettre de détruire les cellules malignes résiduelles, reconstituer le système immunitaire du receveur qui a été détruit pendant le conditionnement et enfin de prévenir le rejet de greffe par l'immunosuppression du receveur.

2.1. Les antigènes et protéines cibles

Plusieurs types d'antigènes sont reconnus :

- Les antigènes de différenciation hématopoïétique (protéinase 3, myéloperoxydase) surexprimés par les cellules leucémiques
- Les protéines associées à la leucémie (translocation BCR/ABL dans la leucémie myéloïde chronique, LMC)
- Les antigènes mineurs d'histocompatibilité (miHA) qui permettraient une activation des LT du donneur et donc l'effet GvL¹³
- Les ligands activateurs des cellules NK comme des protéines de stress (MIC-A et MIC-B)

Les miHA peuvent avoir une action ambivalente. Les miHA exprimés par les cellules hématopoïétiques sont responsables de l'effet GvL. Malheureusement, les miHA peuvent avoir une expression ubiquitaire (au niveau épithélial notamment) et sont donc responsables de la GvHD.

2.2. Les acteurs cellulaires de l'effet GvL

2.2.1. Les cellules présentatrices d'antigènes

Les CPA du donneur présentent aux LT du donneur des protéines et antigènes tumoraux grâce à leur CMH. Elles peuvent être des DC ou des macrophages. Cette présentation antigénique et la présence de signaux de co-stimulation vont permettre l'activation des LT vis-à-vis de cet antigène. L'environnement inflammatoire présent après la greffe va augmenter l'expression des molécules de stimulation et donc entraîner un effet GvHD malgré le co-développement d'un effet GvL.

2.2.2. Les lymphocytes T

L'efficacité de l'injection de lymphocytes du donneur à distance de la greffe (DLI, donor lymphocyte infusion) lors de rejet de greffe prouve l'implication des LT dans l'effet anti-leucémique. Les CPA vont stimuler les LT CD8+ grâce au CMH de classe I et ainsi permettre l'effet GvL médiée par les LT CD8+. Les LT CD8+ sont également capables de reconnaître les miHA présents sur les cellules hématopoïétiques du receveur et les cellules leucémiques et ainsi médier l'effet GvL, via leur cytotoxicité. Les cellules tumorales du receveur présentent via leur CMH de classe I des antigènes non polymorphiques ce qui va contribuer également à l'effet GvL¹⁴.

Via le CMH de classe II, les CPA vont présenter les miHA et induire l'activation et la prolifération des LT CD4+. Ces LT vont présenter des fonctions helper mais également cytolytiques vis-à-vis des cellules leucémiques. Les LT CD4+ permettraient l'induction et le maintien de la réponse anti-tumorale médiée par les LT CD8+ tout en ayant une cytotoxicité^{15,16}. En effet, lorsque le greffon ou encore le DLI sont déplétés en LT CD8+, on observe une diminution voire une abrogation de la survenue de GvHD sans impact sur l'effet GvL. Les LT CD4+ produisent notamment de l'IL-12 et de l'IL-2 qui vont recruter et activer les cellules NK et les LT CD8+. La sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α va également inhiber la croissance tumorale mais aussi induire la surexpression par les LT CD8 de ligands de mort¹⁷.

2.2.3. Les cellules Natural Killer

Les cellules NK représentent la population prédominante parmi les cellules lymphoïdes pendant les premiers mois suivant la greffe. Il existe deux populations de cellules NK, les cellules CD16^{bright} CD56^{dim} qui représente 90% des NK circulants et les 10% restants sont des cellules NK CD56^{bright} CD16^{dim}. Les cellules NK CD56^{dim} sont caractérisées par une forte activité cytotoxique contre les cellules tumorales via une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)¹⁸. Les killer cell immunoglobulin receptors (KIR) sont capables de reconnaître les HLA-A, HLA-B et HLA-C. Ils peuvent être à la fois activateurs et inhibiteurs. Un autre récepteur inhibiteur a montré son importance dans le domaine de la greffe, l'hétérodimère NKG2A/CD94 qui lie le HLA-E.

Les cellules NK vont provoquer la lyse des cellules tumorales selon trois voies¹⁹ :

- Mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity) : les anticorps fixés à la surface de la cellule tumorale vont être reconnus via leur Fc par le CD16 qui est un récepteur FcγR. Les cellules NK vont alors phagocyter la cellule puis devenir cytotoxique pour la cellule tumorale
- Le « missing self » : le receveur ne présente pas un ou plusieurs allèles du HLA de classe I présent chez le donneur. Dans un état autologue, les NK reçoivent un signal négatif quand le récepteur inhibiteur (KIR ou NKG2A/CD94) se lie au HLA-I (cellules du soi) et un signal positif lorsque le récepteur activateur interagit avec un ligand activateur (soi modifié ou non soi). Ces deux signaux vont alors se contrebalancer et la cellule NK restera non activée. Cependant, en situation de mismatch HLA, le récepteur inhibiteur ne reconnaîtra pas le HLA de classe I et le récepteur activateur va alors activer la cellule NK et cette dernière va lyser la cellule tumorale (Figure 4.A).
- Le soi peut être modifié par la surexpression de protéines (MIC-A, MIC-B) à la surface des cellules leucémiques. La cellule NK va alors être activée et devenir cytotoxique (Figure 4. B).

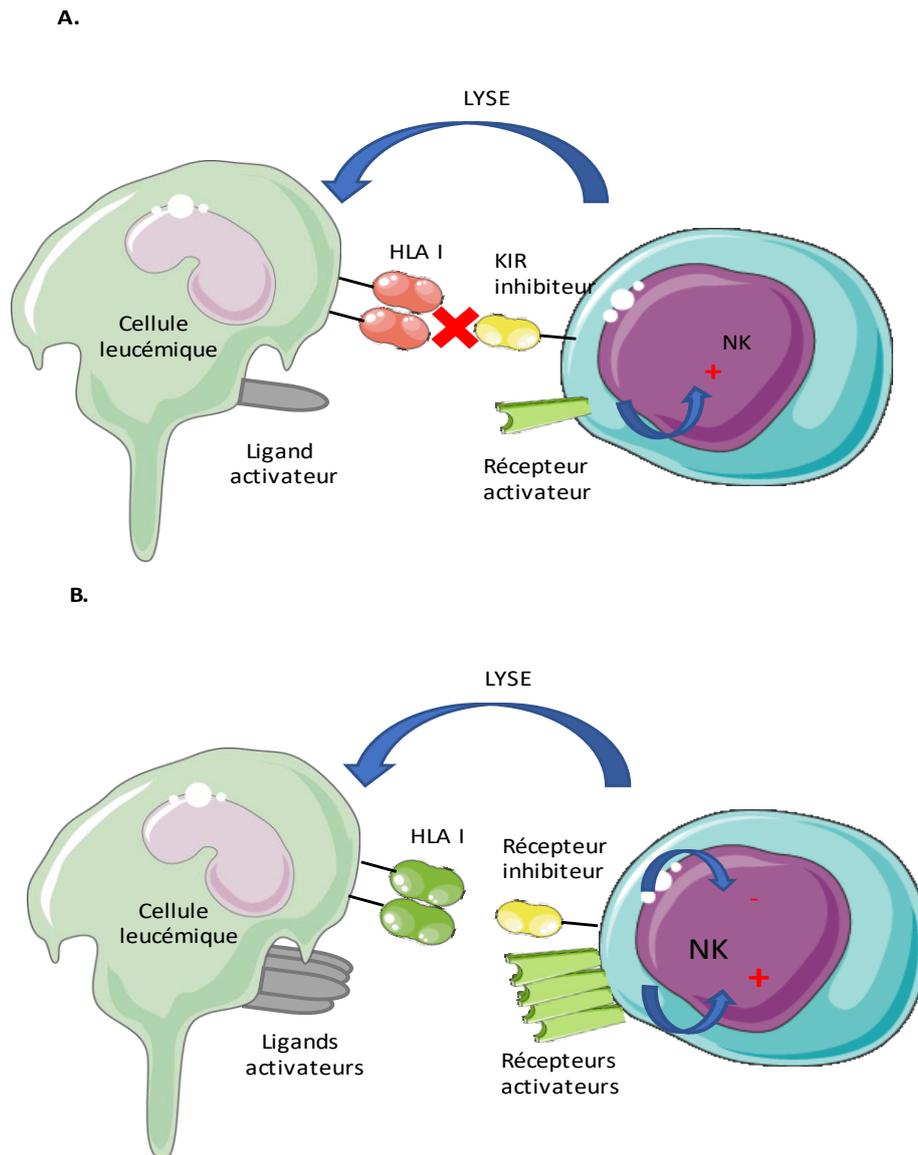


Figure 4 : Mécanismes cytotoxique des NK vis-à-vis des cellules leucémiques dans la greffe de CSH. A. la non-reconnaissance du soi ou « missing-self ». Lors d’une greffe allogénique, le récepteur inhibiteur ne reconnaît plus le HLA de classe I, le signal inhibiteur n’est alors pas transmis et la balance entre signal inhibiteur et activateur bascule en faveur d’un signal activateur pour la cellule. La cellule NK va alors lyser la cellule cible. B. La surexpression de ligands activateurs à la surface de la cellule leucémique va activer la cellule NK par déséquilibre avec le signal inhibiteur. D’après¹⁹

Au final, plusieurs types cellulaires sont impliqués dans l’effet GvL avec comme résultat une cytotoxicité vis-à-vis des cellules tumorales (Figure 5). Elle peut être divisée en 3 phases : initiation de la réponse allogénique, expansion clonale puis phase effectrice¹⁴. Ces phases sont celles d’une réponse immunitaire classique.

Initiation de la réponse allogénique
 Activation des LT par les CPA

Expansion clonale

Phase effectrice
 Cytotoxicité directe des
 cellules effectrices et leurs
 cytokines

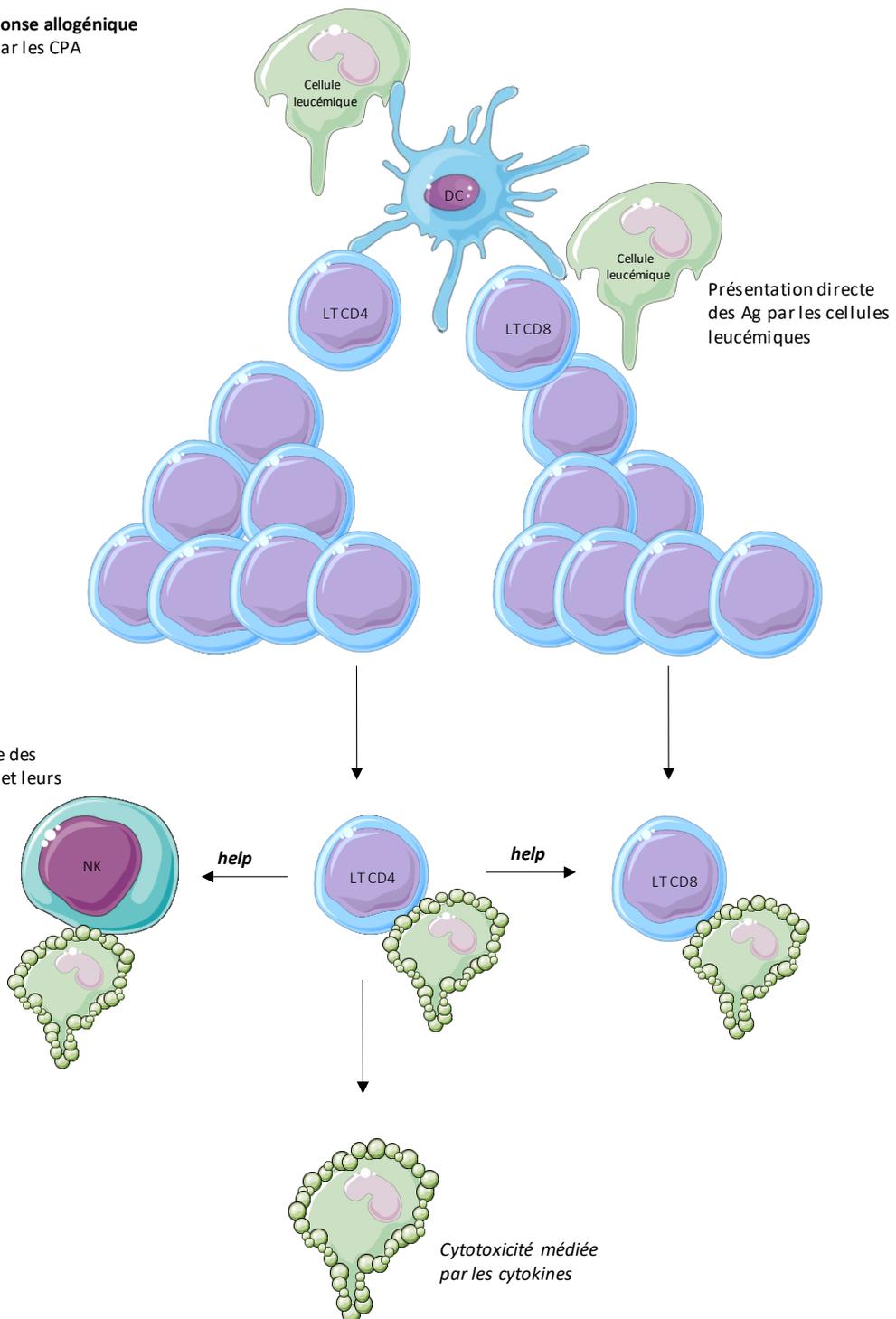


Figure 5 : Effet GvL. Pendant la phase d'initiation, les CPA présentent aux LT CD4+ (via le CMH II) et aux LT CD8+ (via le CMH I) les antigènes tumoraux. Les cellules tumorales peuvent également présenter aux LT. Les LT ainsi activés vont s'expanser (phase d'expansion). Les LT CD4+ peuvent avoir une cytotoxicité directe, elles vont également activer les cellules NK et les LT CD8+ qui vont alors exercer leur effet cytotoxique sur les cellules leucémiques. Les NKT, LT CD4+ et LT CD8+ ont une cytotoxicité directe sur les cellules leucémiques via la granzyme, la perforine et aussi la voie Fas/FasL. D'après¹⁴

3. La maladie du greffon contre l'hôte

La GvHD est la complication majeure qui limite l'efficacité optimale de la greffe allogénique de CSH. On va distinguer la GvHD aigüe de la GvHD chronique, caractérisées par leur délai de survenue mais aussi leur expression clinique différente. La GvHD aigüe peut toucher 40 à 60% des patients allogreffés malgré un traitement prophylactique. La GvHD chronique atteint 30 à 70% des patients allogreffés. La GvHD aigüe représente la première cause de mortalité toxique de la greffe. Le National Institute of Health (NIH) a défini les critères de diagnostic de la GvHD en fonction du moment de l'apparition et des signes cliniques²⁰ (Figure 6).

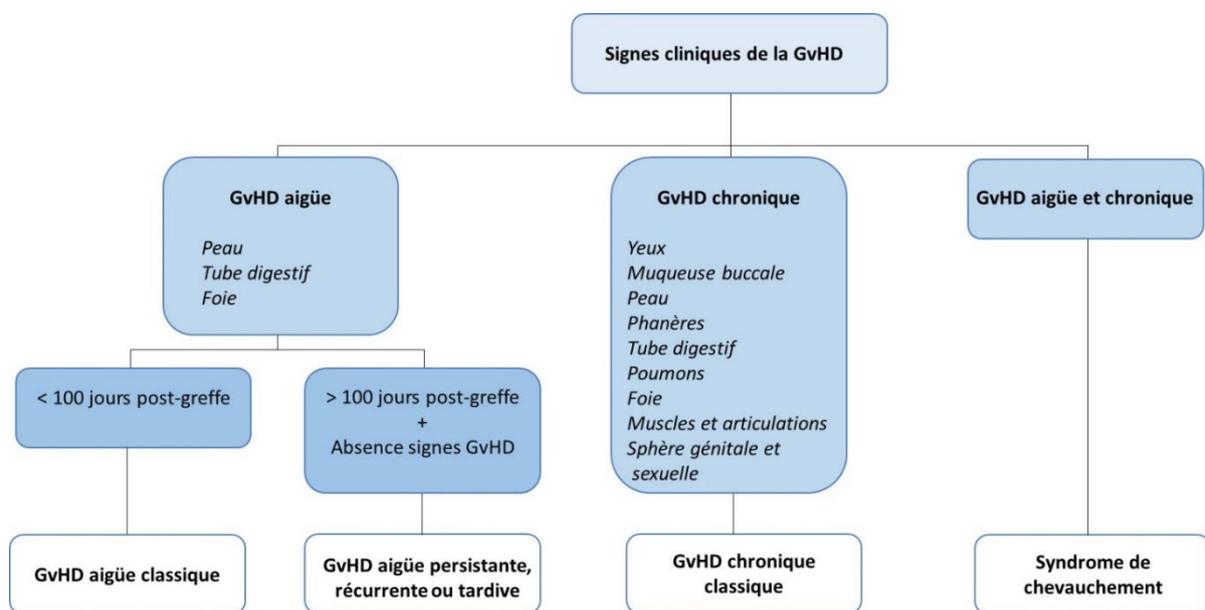


Figure 6 : Distinction entre la GvHD aigüe et chronique selon les signes cliniques et leur moment d'apparition²⁰

La GvHD aigüe qui touche la peau, le tube digestif et le foie, est dite classique quand elle survient dans les 100 jours post-greffe. Après 100 jours, elle est qualifiée de GvHD aigüe persistante, récurrente ou tardive.

La GvHD chronique classique a des manifestations cliniques étendues à plusieurs organes sans limite de temps. On parlera de syndrome de chevauchement lorsque le patient aura une clinique évoquant à la fois la GvHD chronique et la GvHD aigüe.

3.1. Epidémiologie

Les facteurs de risque de survenue de GvHD sont autant liés au receveur qu'au donneur :

- L'âge avancé du receveur et du donneur pour la GvHD chronique
- Le sexe : une donneuse féminine. Dans une étude multicentrique, il a été démontré que la présence d'anticorps HY chez des patients mâles 3 mois après transplantation peut être prédictif de survenue de GvHD chronique²¹. De même, la présence de variants de peptides codés par Y chez des patients mâles ayant reçu une greffe mismatch sur le chromosome X est associée à la survenue de GvHD aigüe²².
- L'absence de lien de parenté entre donneur et receveur ou bien l'incompatibilité HLA. Une équipe japonaise a identifié les positions et les substitutions d'acide aminé au niveau des gènes HLA responsables de la survenue de GvHD aigüe²³. Cependant, la GvH peut survenir lors de greffe intra-familiale et HLA compatible due à la présence de miHA²⁴.
- Le type de conditionnement reçu. La destruction des muqueuses du tube digestif ou encore des épithéliums engendre le relargage de signaux de dangers et cytokines à la genèse de la GvHD aigüe²⁵.
- La source de CSH : dans une méta-analyse de 10 essais cliniques randomisés contrôlés, les auteurs ont montré une augmentation de la survenue de GvHD chez les patients ayant reçu des CSH périphériques comparés aux patients ayant reçu des CSH de MO²⁶. Cependant, la comparaison des incidences de GvHD entre deux groupes ayant reçu deux sources de CSH différentes est difficile du fait des différences de régime de conditionnement utilisé par les différentes équipes médicales.
- Des antécédents de GvHD aigüe de grade II à IV sont un facteur de risque de développer une GvHD chronique²⁷.

3.2. Manifestations cliniques de GvHD aigüe

La GvHD aigüe se manifeste par plusieurs symptômes caractéristiques

Atteinte cutanée

La peau peut être le seul organe atteint au cours de la maladie. On retrouve des lésions érythémateuses plus ou moins prurigineuses avec une atteinte préférentielle des paumes des mains et plantes de pieds. Dans les cas de GvHD sévère, on peut observer un décollement cutané superficiel spontané (épidermolyse) ou provoqué (signe de Nikolsky). Une toxidermie ou bien une atteinte cutanée virale seront des diagnostics à éliminer.

Atteinte digestive

Le principal signe clinique de la GvHD aigüe digestive est la diarrhée aqueuse ou hémorragique avec vomissements et nausées entraînant une perte de poids. Plusieurs complications sont à craindre en cas de formes sévères comme l'occlusion digestive, des hémorragies ou bien encore des sepsis secondaires à une translocation bactérienne.

Atteinte hépatique

Au niveau du foie, on observe une perturbation du bilan hépatique avec augmentation de la bilirubine et élévation possible des transaminases. D'un point de vue histopathologique, on observe une altération des conduits biliaires.

En 1974, Glucksberg *et al.* ont établi une classification de la GvHD aigüe dont les critères sont définis par le degré d'atteinte des organes cibles²⁸ (Tableau 1) :

Tableau 1 : Stadification de la GvHD aigüe selon Glucksberg²⁸.

Stade	Atteinte cutanée	Atteinte hépatique	Atteinte digestive
0	Pas d'atteinte cutanée Eruption maculopapuleuse	Bilirubine < 2mg/dl	Pas de diarrhées
1	représentant moins de 25% de la surface corporelle Eruption maculopapuleuse	Bilirubine 2-3mg/dL	Diarrhée > 500ml par jour
2	représentant 25-50% de la surface corporelle	Bilirubine 3-5,9mg/dL	Diarrhée >1000ml par jour
3	Erythrodermie généralisée	Bilirubine 6-14,9mg/dL	Diarrhée > 1500ml par jour
4	Erythrodermie généralisée avec formations bulleuses et desquamation fréquente	Bilirubine > 15mg/dL	Diarrhée >2000ml par jour avec douleurs abdominales +/- iléus

Selon le stade de la maladie au niveau de chaque organe, on peut déterminer le grade de la maladie et prédire le pronostic du patient, tout en tenant compte de l'état général du patient (Tableau 2).

Tableau 2 : Les différents grades de la GvHD aigüe selon Glucksberg²⁸.

Grade	Stade cutanée	Stade hépatique	Stade digestif	Etat général
I	1 à 2	0	0	Pas d'altération
II	1 à 3	1	1	Altération mineure
III	2 à 3	2 à 3	2 à 3	Altération modérée
IV	2 à 4	2 à 4	2 à 4	Altération sévère

3.3. Physiopathologie

Billingham *et al.* ont décrit la GvHD dans un modèle murin et ont permis d'établir trois conditions indispensables menant au développement de la GvHD²⁹ :

- La présence de cellules immunocompétentes dans le greffon,
- L'impossibilité pour le receveur de développer une réponse immunitaire suffisante pour éliminer les cellules transplantées
- La présence d'antigènes au niveau tissulaire qui ne sont pas présents dans le greffon.

Ferrara *et al.* ont pour la première fois décrit les mécanismes physiopathologiques de la GvHD aigüe dans la transplantation de moelle osseuse^{25,30}. Le mécanisme de survenue de la GvHD peut être décrit en trois phases successives^{30,31} (Figure 7) :

Première phase

Le conditionnement provoque des lésions tissulaires au niveau de l'épithélium et de l'endothélium activant les cellules immunitaires de l'hôte qui vont alors sécréter des cytokines inflammatoires comme le Tumor Necrosis Factor (TNF- α) et des interleukines (IL-1, IL-6, etc). Plus précisément, le régime de conditionnement entraîne la libération de signaux de dangers, les damage-associated molecular pattern (DAMP), comme les protéines de choc thermique (HSP), l'acide urique ou bien l'adénosine triphosphate (ATP) et les pattern-associated

molecular pattern (PAMP), comme le lipopolysaccharide (LPS), libérées par le microbiote intestinal. Ce sont les liaisons des DAMPs et PAMPs aux récepteurs Toll-like (TLR) exprimés par les CPA résiduelles du receveur qui vont induire leur différenciation. Ces CPA vont à leur tour activer les LT du greffon et permettre la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ou l'IL-1 et l'IL-6. Le fort contexte inflammatoire est ensuite entretenu par la libération des DAMPs et des PAMPs secondaires aux lésions tissulaires mais aussi par la production de cytokines. Ces cytokines provoquent la surexpression de molécules d'adhésion ainsi que du CMH.

Deuxième phase

Elle est caractérisée par l'activation des LT du donneur par les CPA via leur CMH. Les LT CD4⁺ vont interagir avec le CMH de classe II et les LT CD8⁺ avec le CMH de classe I (signal 1). Au niveau des organes lymphoïdes, les LT du donneur vont reconnaître les allo-antigènes à la surface des CPA de l'hôte (présentation directe) ou des CPA du donneur (présentation indirecte). Cependant, la liaison TCR/peptide est insuffisante pour activer les LT et des molécules de co-stimulation (second signal) sont nécessaires. L'interaction entre molécules de co-stimulation (LT) et leurs ligands (CPA) est augmentée par les signaux de danger générés lors de la phase 1. Quand le donneur et le receveur n'ont pas le même HLA, les LT du donneur vont reconnaître les molécules de HLA comme étrangères. C'est donc l'incompatibilité HLA qui est responsable de l'activation des LT par les CPA. En cas d'allogreffe HLA-identique, les LT du donneur vont reconnaître des antigènes mineurs d'histocompatibilité (miHA). Ce sont des peptides issus de la dégradation de protéines intracellulaires dont les gènes codants sont polymorphiques mais qui n'appartiennent pas au CMH. Les LT ainsi activés vont se différencier principalement en T helper type 1 (Th1) et 17 (Th17) et sécréter des cytokines spécifiques des Th1 comme l'Interféron (IFN γ), le TNF- α et l'IL-2 ou bien des Th17 comme l'IL-17 qui ont montré leur implication dans la physiopathologie de la GvHD^{32,33}. Ces cytokines vont entretenir la réponse lymphocytaire T mais également activer les phagocytes du donneur et du receveur. De plus, lorsque que les LT sont activés, l'expression de leurs récepteurs aux chémokines augmente, ce qui les rend capables de migrer dans les tissus cibles que sont le foie, la peau et le tractus digestif.

Troisième phase

La phase effectrice est responsable d'une l'altération des organes cibles mettant en jeu différentes cellules effectrices et cytokines inflammatoires. Les cellules T cytotoxiques (CTL)

et les NK sont les principales cellules effectrices de la GvHD grâce à plusieurs mécanismes cytotoxiques comme la voie Fas/FasL (Fas ligand) ou perforine/granzyme notamment.

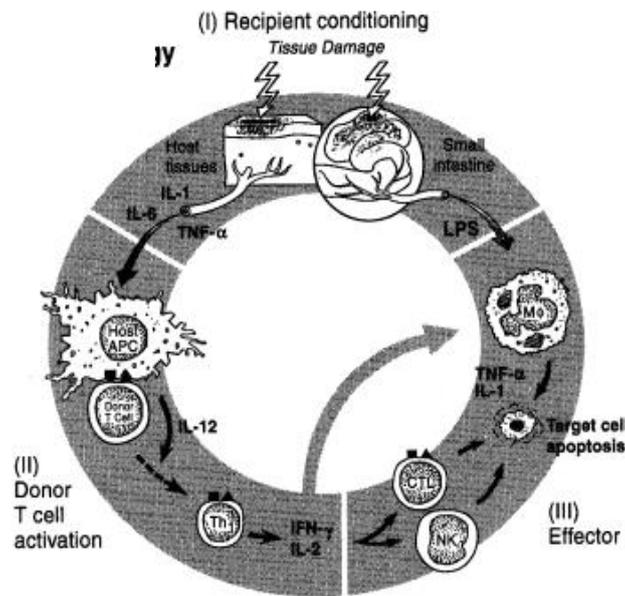


Figure 7 : Physiopathologie de la GvHD aiguë. La phase I, déclenchée par le conditionnement est caractérisée par une dégradation de l'épithélium intestinal qui va relarguer massivement entre autres des lipopolysaccharides (LPS) mais aussi des cytokines inflammatoires, des DAMPs et PAMPs par les tissus endommagés. La phase II correspond à l'activation des LT du donneur par les CPA du donneur et du receveur. La phase III est une phase effectrice qui mène à l'altération des organes cibles de la GvHD via des effecteurs cellulaires (CTL, NK) et les effecteurs inflammatoires (cytokines). D'après³⁰

3.4. Stratégies thérapeutiques dans la prévention de la GvHD aiguë

3.4.1. Traitements préventifs

En post-greffe, la chimioprophylaxie de la GvHD dépend du type de conditionnement³⁴ :

- greffes à conditionnement myéloablatif : association ciclosporine A (CsA, inhibiteur de la calcineurine) et méthotrexate (anti-folique)
- greffes à conditionnement non myéloablatif ou réduit : association CsA et mycophénolate mofétil (MMF, inhibiteur de synthèse des bases puriques)

Il est également possible d'administrer au patient un sérum anti-lymphocytaire (SAL) lors du conditionnement. Ce dernier contient des anticorps dirigés contre les LT et va donc provoquer leur déplétion par lyse cellulaire. Le SAL va permettre d'améliorer la prise du greffon mais

aussi de prévenir la survenue de la GvHD. Le traitement par immunosuppresseurs est associé à une corticothérapie et une prévention anti-infectieuse. L'Alemtuzumab, un anticorps monoclonal anti-CD52, pourrait être utilisé pour dépléter les LT mais hors indication prévue par l'autorisation de mise sur le marché (AMM).

Plusieurs essais thérapeutiques sont en cours afin d'évaluer de nouvelles approches thérapeutiques utilisant des traitements déjà disponibles comme le Cyclophosphamide en post-greffe qui va cibler les LT activés notamment. D'autres stratégies utilisant la biologie moléculaire, des thérapies cellulaires et géniques comme la technique du gène suicide³⁵ ou l'injection de LT régulateurs (Treg) sont à l'étude dans des études cliniques. Les inhibiteurs de janus kinase (JAK) constituent une nouvelle classe thérapeutique efficace dans la GvHD aigüe. Le ruxolitinib, un anti-JAK1 et 2 serait efficace dans le traitement dans la GvHD aigüe corticorésistante³⁶. Son AMM est en attente. Une autre étude récente a montré l'efficacité d'un anti-JAK1, l'itacitinib, chez les patients atteints de GvHD aigüe réfractaire ou non aux stéroïdes³⁷.

3.4.2. Traitements curatifs

Seule la GvHD aigüe de grade supérieur à I est traitée. Le traitement de référence est la corticothérapie à fortes doses. En cas d'échec, on parle alors de GvHD réfractaire aux stéroïdes, et alors plusieurs traitements peuvent être utilisés comme le SAL, le sirolimus ou encore les anti-TNF et anticorps monoclonaux (tocilizumab, alemtuzumab, etc) et plus récemment les anti-JAK2, en hors AMM pour l'instant. L'absence de consensus a favorisé le développement de nombreux essais cliniques dans le traitement de la GvHD cortico-résistante.

3.5. La GvHD chronique

La GvHD chronique représente la principale complication à moyen et long terme suite à une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques et survient en principe au-delà du 100^e jour post-greffe. La GvHD chronique a une clinique plus polymorphe que la GvHD aigüe, avec dans la majorité des cas des atteintes cutanéomuqueuse mais aussi l'atteinte simultanée de plusieurs organes comme le foie, les reins, les poumons, les articulations entre autres pouvant mimer des maladies auto-immunes.

3.5.1. Manifestations cliniques

Dans la majorité des cas, le patient présente une atteinte cutanée de type lichénoïde et/ou sclérodermiforme. La biopsie montre notamment un infiltrat lymphocytaire. Au niveau des muqueuses, elle concerne principalement la sphère buccale mais touche aussi les parties génitales avec la possibilité d'apparition d'un syndrome sec au cours de la GvHD chronique. Le bilan hépatique est souvent perturbé avec la présence d'une cholestase. Il existe une atteinte gastro-intestinale pouvant engendrer des douleurs abdominales, nausées et vomissements responsable d'un amaigrissement, en particulier si présence d'atteinte de la muqueuse buccale. Contrairement à la GvHD aigüe, il est classiquement décrit une atteinte pulmonaire à type de bronchiolite oblitérante. Plus rarement il est rapporté des atteintes musculaires et articulaires. Avant de confirmer le lien de ces différentes manifestations cliniques avec la GvHD chronique, il faut toujours éliminer les autres diagnostics différentiels tels un effet secondaire médicamenteux ou un épisode infectieux.

3.5.2. Physiopathologie

La GvHD chronique peut survenir quelque temps après une GvHD aigüe ou survenir associée à une GvHD aigüe. La physiopathologie est encore mal décrite et complexe car les modèles expérimentaux sont peu représentatifs de la GvHD humaine. Cependant, l'équipe de Blazar a réussi à créer un modèle murin capable de mimer une GvHD chronique agressive multiorganes³⁸. Ils ont ainsi pu montrer une infiltration de LT CD4⁺ et LB dans les poumons et le foie ainsi qu'un dépôt d'auto-anticorps en lien avec la fibrose. De même, de fortes réponses au niveau des centres germinaux ont été mises en évidence à l'initiation de la GvHD chronique, le blocage de la formation de ces centres germinaux permettant d'inhiber le développement de la maladie. Depuis quelques années, les avancées scientifiques ont permis de mettre en évidence l'implication des LB du donneur et des LT notamment ainsi que d'autres cellules immunitaires dans la survenue de la GvHD chronique³⁹. Tout d'abord la présence d'anticorps réactifs vis-à-vis du donneur démontre l'implication des LB. Il existe des anticorps dirigés uniquement contre les antigènes du receveur (les Ac-anti-HY par exemple) et des anticorps dirigés contre des antigènes non polymorphiques (les Ac-anti-PDGFR). L'étude des lymphocytes T follicular helper (TFH) circulants chez les patients atteints de GvHD chronique a permis de suggérer une augmentation de leur homing ou de leur séquestration au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Il a aussi été montré une augmentation de la capacité de ces TFH à induire la sécrétion d'Ac par les LB mais aussi la maturation des LB en plasmablastes, conduisant à une augmentation de la quantité d'Ac produits⁴⁰. De plus, il existe une altération de l'homéostasie

des LB normaux, par modification du microenvironnement médullaire, avec l'augmentation de la survie de LB autoréactifs et alloréactifs.

Enfin, l'implication des LT dans la physiopathologie de la GvHD chronique est mise en évidence par la diminution de l'incidence de la maladie suite à la déplétion en LT des greffons. Il est décrit une sévère altération de la production thymique de LT matures, menant à une diminution de la fréquence des Treg sans altération de leur fonction suppressive³⁹. Les cellules épithéliales thymiques sont altérées par les LT allogéniques et entraînent alors une diminution de la génération de Treg naturels mais aussi la production de LT auto-réactifs. Lors de la GvHD cutanée, la polarisation des LT CD4⁺ est en faveur d'une réponse Th1/ Th17 avec l'augmentation des CD8⁺IL17⁺³⁹.

3.5.3. Traitements de la GvHD chronique

3.5.3.1. Traitement préventif

Le premier traitement préventif reste la prévention de la survenue d'une GvHD aiguë.

3.5.3.2. Traitement curatif

Le traitement va dépendre du grade de la maladie⁴¹,

- Grade léger : topiques locaux si besoin
- Grade modéré : traitement systématique, quand les critères diagnostiques sont réunis, prednisolone par voie orale à 1mg/kg/j
- Grade sévère : prednisone par voie orale associé ou non un inhibiteur de la calcineurine.

L'utilisation de Rituximab a montré une efficacité dans la GvHD chronique réfractaire, de même pour la photothérapie extracorporelle, le ruxolitinib, l'imatinib ou bien le bortézomib⁴².

PARTIE II : LES CELLULES IMMUNOSUPPRESSIVES, DES NOUVEAUX ALLIES THERAPEUTIQUES DANS LA PREVENTION DE LA GVHD

Les traitements classiques actuels utilisent principalement des molécules chimiques induisant une forte immunosuppression qui rend le patient vulnérable à la survenue d'infections de type opportuniste mais également à un risque de rechute. De plus, tenant compte de leurs effets indésirables, leur efficacité dans la prévention de la GvHD n'est pas optimale. C'est pourquoi de nombreuses équipes de recherche dont celle du Pr Bonnotte ce sont intéressées à l'utilisation de cellules immunitaires immunosuppressives comme traitement préventif de la GvHD^{2,43}.

1. Les lymphocytes T régulateurs

Les Treg sont une population de lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ exprimant le marqueur CD25 (IL-2 α -chain receptor) et le facteur de transcription forkhead box P3 (FoxP3).

1.1. Mécanismes d'action

Les Treg ont la capacité de réguler les fonctions effectrices des LT par quatre mécanismes (Figure 8)⁴⁴ :

- La production de cytokines immunosuppressives comme le TGF β , l'IL-10 et l'IL-35
- La lyse de LT/LB par la production de granzyme A, B et perforine
- Des perturbations métaboliques : privation d'IL-2 via l'expression de son récepteur le CD25, production d'adénosine par les Treg via l'expression des ectonucléotidases CD39/CD73 qui inhibent la fonction des LT par l'activation du récepteur à l'adénosine A2A, ou encore le transfert par les jonctions lacunaires de l'AMP cyclique qui est un signal inhibiteur au sein des LT effecteurs
- Une action sur les CPA par la liaison du CTLA-4 au CD80/86 inhibant leur maturation et permettant la production d'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) responsable de la diminution de la prolifération des LT. En effet, l'IDO va catalyser le tryptophane nécessaire à la prolifération des LT. De plus, la liaison de LAG3, exprimé à la surface des Treg, au CMH de classe II exprimés par les DC inhibe leur maturation.

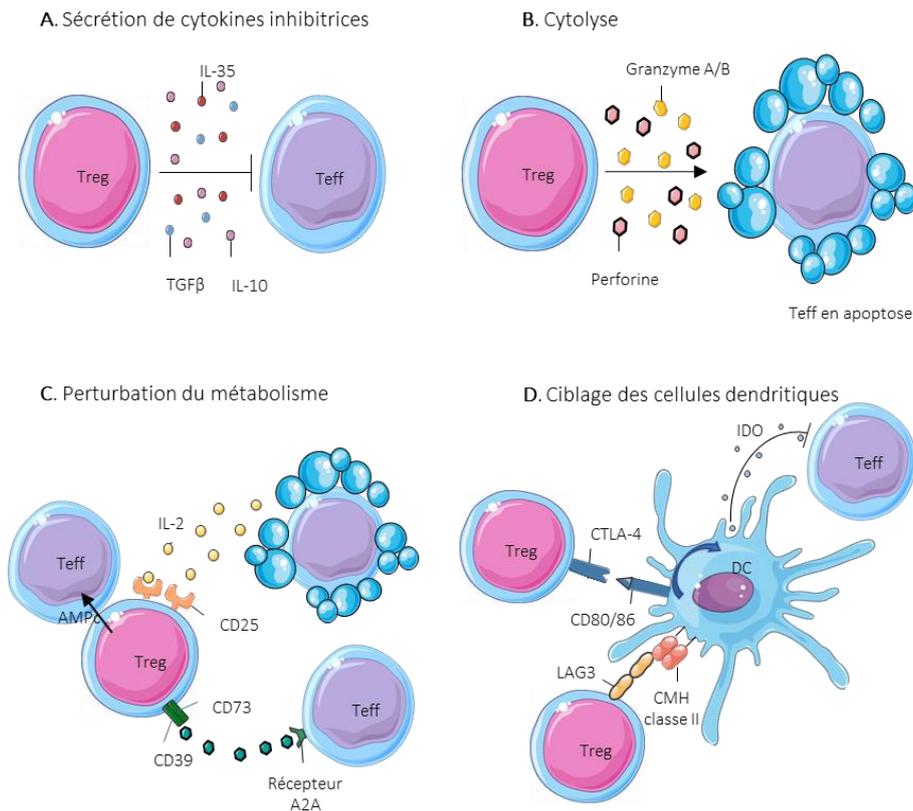


Figure 8 : Mécanismes immunosuppresseurs des Treg. A. Les Treg sécrètent des cytokines inhibitrices telles que l'IL-10, le TGFβ et l'IL-35. B. Par la sécrétion de perforine, granzyme A et B, les Treg induisent la cytolyse des Teff. C. Les Treg perturbent le métabolisme des Teff par déprivation en IL-2 nécessaire à l'activation et à la prolifération des Teff par captation via le CD25 et aussi par sécrétion d'adénosine via la voie ectonucléosidique CD39/CD73 se liant au récepteur A2A présent à la surface des Teff et inhibant leur activation. Les Treg inhibent les Teff par transfert d'AMP cyclique aux Teff par des jonctions lacunaires. D. Les Treg sont capables d'inhiber la maturation et la fonction des DC par liaison de CTLA-4 aux récepteurs CD80/86 qui va permettre la production d'IDO capable de cataboliser le tryptophane nécessaire à la prolifération des Teff. La liaison de LAG3 au CMH de classe II va inhiber la maturation des DC. (DC : cellule dendritiques, Treg : T régulateur, Teff : T effecteur). D'après⁴⁴

Les LT régulateurs CD4⁺CD25⁺ présentent un intérêt certain pour contrôler les LT alloréactifs responsables de la GvHD. En effet, dans un modèle de greffe de peau chez la souris, l'équipe de Sakaguchi a montré que l'absence de LT CD4⁺CD25⁺ entraînait un rejet plus rapide de la greffe⁴⁵.

1.2. Production des Treg

1.2.1. Isolation des Treg

Dans les modèles précliniques, la majorité des Treg proviennent de sang périphérique ou de sang de cordon. L'équipe de Hoffman *et al.* a publié en 2006 une étude décrivant un processus respectant les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) afin d'isoler les LT régulateurs CD4⁺CD25⁺ à partir de produits issus de leukaphérèse en utilisant deux tris magnétiques avec le CliniMACSplus (CliniMACS™ Instruments, Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Germany)⁴⁶. La première étape permet de dépléter les cellules CD8⁺ et CD19⁺ ou CD8⁺ seules qui est suivie d'une seconde étape d'enrichissement en cellules exprimant le CD25. La proportion de cellules CD4⁺CD25^{high} isolées et présentant des propriétés immunosuppressives est d'environ 50%.

Deux études ont montré une autre approche pour générer des LT régulateurs CD4⁺CD25⁺ à partir de sang périphérique de patients hémodialysés ou atteints de cirrhose alcoolique^{47,48}.

Cependant, l'isolation de Treg grâce au CliniMACS (tri cellulaire magnétique) n'est pas idéale en raison de la présence de LT CD25^{low}, c'est pourquoi une autre méthode utilise le tri par cytométrie en flux utilisant plusieurs marqueurs comme le CD25 ou le CD127^{49,50}. L'utilisation du tri cellulaire par cytométrie en flux a permis d'isoler une population CD4⁺CD25⁺CD127^{low}CD45RA⁺ à partir de PBMC (peripheral blood mononuclear cells) de patients atteints de la maladie de Crohn, qui une fois expansés ne se convertissent pas en Th17 en conditions inflammatoires et montre une expression de FoxP3 stable⁵¹.

1.2.2. L'expansion des Treg

Une fois isolés, il faut ensuite induire l'expansion des Treg afin de générer un nombre suffisant de cellules nécessaire à l'injection. En effet, les Treg représentent 5 à 10% des LT CD4⁺ circulant dans le sang périphérique. Ce taux est plus élevé dans le sang de cordon ou bien au niveau du thymus mais ne permet pas d'atteindre les quantités nécessaires à une utilisation clinique.

Le protocole d'expansion classiquement utilisé dans la littérature utilise les billes coatées avec des anticorps anti-CD3/CD28 en présence d'IL-2 à taux faible. Le principal inconvénient de cette technique est la perte de FoxP3 par les Treg proliférants leur donnant alors un phénotype de Teff de par leur grande plasticité, ceux-ci pouvant alors participer à l'aggravation de l'inflammation^{52,53}. Ce protocole a été amélioré avec l'ajout de rapamycine ou d'acide tout-

trans-rétinoïque (ATRA). La rapamycine permet d'augmenter la stabilité des Treg mais également leur fonction immunosuppressive et prévient leur différenciation en T_{eff}^{54,55}. L'ATRA seul ajouté à la culture de Treg isolés induit l'expansion des Treg ayant la capacité à sécréter de l'IL-17 et possédant une capacité immunosuppressive plus faible que des Treg traités avec de la rapamycine⁵⁶. En outre, la combinaison de ces deux médicaments permet l'expansion de Treg à fort pouvoir immunosuppressif et ne sécrétant pas d'IL-17.

Une autre approche développée par l'équipe d'Anasetti met en culture des Treg purifiés issus du donneur et des DC issues du receveur en présence d'IL-2, d'IL-15 et rapamycine⁵⁰. Ce protocole permet de générer des Treg immunosuppressifs spécifiques de miHA et conservant l'expression de FoxP3 et de TGFβ. Un premier essai clinique de phase I testant l'injection de LT régulateurs CD4⁺CD25⁺ issus de sang de cordon a été mené⁵⁷. Après un tri CD25⁺, la proportion de LT régulateurs CD4⁺CD25⁺ était de 65% puis de 86% après expansion. Leur protocole a été revu afin d'obtenir un plus grand nombre de LT régulateurs en utilisant des CPA artificiels (cellules K562 transduites pour exprimer le CD64 et CD28) afin de re-stimuler les Treg⁵⁸. Cette nouvelle approche respectant les BPF a montré son efficacité à accroître la quantité de Treg générés tout en conservant leurs capacités immunosuppressives *in vitro* et *in vivo*.

Une équipe parisienne a montré que les Treg obtenus après stimulation par les CPA du receveur et donc spécifiques des antigènes du receveur, étaient plus efficaces pour prévenir la GvHD aiguë que des Treg obtenus par expansion polyclonale et induisaient une meilleure reconstitution immunitaire post-allogreffe⁵⁹⁻⁶¹.

1.3. Prévention de la GvHD par les Treg

Les Treg naturels (nTreg) sont des lymphocytes sélectionnés pour leur grande affinité dans le thymus tandis que les Treg induits (iTreg) se développent en dehors du thymus après stimulation antigénique immunogène à partir de LT conventionnels.

Etant donné leur présence naturelle au sein de l'organisme, les nTreg ont été les premiers à être explorés pour une potentielle utilisation en thérapie cellulaire. Cependant, les nTreg sont instables en conditions inflammatoires et peuvent transiter vers un phénotype Th17 sous l'influence de l'IL-6⁶²⁻⁶⁴. Les premiers essais pré-cliniques ont montré que les Treg

CD4⁺CD25⁺ isolés de la rate ou de la MO de souris C57BL/6 ont prévenu la survenue de GvHD aigüe induite chez la souris BALB/c⁶⁵. En revanche, un ratio Treg:Teff de 1:1 était nécessaire pour avoir un effet *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis de la GvHD. Sachant que les Treg ne représentent que 5 à 10% des LT CD4⁺, il est nécessaire de les expandre. Comme décrit plus haut, en tenant compte de l'efficacité en pré-clinique de l'expansion de Treg immunosuppresseurs en présence d'une CPA artificiellement chargée d'un anti-CD3⁶⁶, les premiers essais cliniques utilisant les nTreg ont pu être initiés. Chez la souris, deux études font référence et ont permis d'apporter des preuves de l'efficacité des Treg dans la prévention de la GvHD et d'accélérer la mise en place d'essais chez l'Homme. La première étude menée par Edinger *et al.* ont montré que les Treg ne diminuaient pas l'activation et la prolifération des Treg mais leur prolifération et l'accumulation de cytokines pro-inflammatoires⁶⁷. L'effet GvL était préservé en présence de Treg car ces derniers ne diminuaient pas la cytotoxicité des LT CD8⁺ mais ; il fallait toutefois un nombre de Tconv suffisant pour éviter une rechute tumorale puisque leur prolifération était inhibée par les Treg. La seconde étude a également étudié la prévention de la GvHD tout en préservant l'effet GvL⁶⁰. Là encore les auteurs montrent qu'un ratio Treg/TCD8+ 1:1 est nécessaire à la prévention de la GvHD ; de plus ils s'intéressent à la reconstitution immunitaire. Les Treg spécifiques d'un allo-Ag du receveur permettent une meilleure reconstitution immunitaire et par conséquent une meilleure prévention de la GvHD par rapport à des Treg issus d'un 3^e donneur. Cependant, les auteurs montrent dans un second modèle de GvT une perte de cet effet, les raisons évoquées étaient que soit les Treg inhibent l'effet GvT tout en prévenant la survenue de la GvHD car ces deux effets sont médiés par les mêmes voies, soit l'élimination des cellules tumorales dépend principalement de l'alloréactivité des LT du donneur qui est au final diminuée par les Treg.

Le premier essai chez l'Homme a été fait par une équipe polonaise en 2009 chez deux patients irradiés accidentellement pour qui le traitement immunosuppresseur standard n'a pas été efficace⁵⁰. Les Treg ont été purifiés à partir de Buffy coat de deux donneurs familiaux, les LT CD4⁺ ont été triés magnétiquement puis par tri cellulaire par cytométrie en flux, les cellules CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ ont été isolées puis mises en culture en présence d'IL-2 et de billes coâtées anti-CD3/anti-CD28 pendant 3 semaines. Si un seul patient atteint de GvHD aigüe a été traité avec trois injections d'une dose de 3 x 10⁶ cellules/kg, les auteurs ont mis en évidence une perte de l'expression de FoxP3 à chacune des 3 injections (l'autre patient a été traité dans le cadre d'une GvHD chronique). Le patient, malgré une amélioration clinique, est décédé d'une

défaillance multiviscérale sans lien établi avec l'injection des Treg, la source de Treg ayant été épuisée pour ce patient au cours de l'essai.

D'autres essais cliniques ont été menés, dont un qui a permis de déterminer des doses de Treg à partir de sang de cordon⁵⁷. Dans un essai de phase I en escalade de doses, les Treg étaient isolés à partir de sang de cordon matchant pour le HLA et triés positivement pour l'expression de CD25 puis expansés par des billes coatées anti-CD3/anti-CD28 et IL-2. Ils étaient ensuite injectés à des doses croissantes de 1, 3, 10 ou 30 x 10⁵ cellules/kg chez 23 patients. Deux cohortes ont été définies, une recevant une seule injection de Treg à J1 et la seconde recevant une 2e injection à J15 après la transplantation de 30 x 10⁵ cellules/kg. 26% des patients n'avaient pas reçu les doses prescrites à cause d'une expansion *ex vivo* insuffisante. Quelle que soit la dose, aucune toxicité n'était à déplorer. L'injection de Treg avait permis de diminuer l'incidence de GvHD aigüe de grade II-IV, quelle que soit la dose, sans effets néfastes en comparaison à une cohorte historique de 108 patients mais la survie sans maladie ne différait pas entre les groupes traités par Treg et la cohorte historique.

Un autre essai a permis de montrer que les Treg peuvent être utilisés en prophylaxie dans la GvHD chez des patients ayant subi une greffe HLA-haploidentique sans recevoir d'immunosuppresseurs en post-transplantation⁶⁸. Les Treg ont été isolés par déplétion des cellules CD19+ et CD8+ puis enrichissement de la fraction CD25+. Les Treg ainsi générés exprimaient les marqueurs CD4+CD25+ à plus de 90% et le marqueur FoxP3+ à plus de 50%. Les 28 patients inclus, après conditionnement, ont reçu une dose de Treg à J-4, puis à J0 une dose de cellules CD34+ et de Tconv isolés de PBMC. Seuls 26 patients ont été évaluables à l'issue de la greffe. Un premier groupe de 4 patients a reçu une dose de 0.5 x 10⁶ Tconv/kg et 2 x 10⁶ Treg/kg. Une augmentation de dose de Tconv à 1 x 10⁶ Tconv/kg a été décidée pour le second groupe de 17 patients car le premier groupe ne montrait pas de signe de GvHD aigüe, puis une dernière escalade de dose pour le dernier groupe de 5 patients qui a reçu 4 x 10⁶ Tconv/kg. La seule prophylaxie reçue en post-transplantation était une prophylaxie anti-infectieuse. 93% des patients présentaient un bon chimérisme et seulement 2 patients ont développé une GvHD aigüe de grade \geq II, ces patients appartenant au groupe traité avec les fortes doses de Tconv. Au final, 13 patients sont décédés de complications infectieuses, viscérales et de GvHD, 12 patients étaient en vie et ne montraient pas de signes de maladie après un suivi médian de 12 mois.

Néanmoins, plusieurs problèmes persistent comme l'expansion des Treg et le fort ratio de 1:1 voire 2:1 (Treg :Teff) nécessaire à la prévention de la GvHD. Il existe actuellement trois essais cliniques en cours utilisant les Treg dans la prévention de la GvHD aigüe (clinicaltrial.gouv.fr consulté le 10/09/20)⁶⁹. L'équipe d'Anasetti mène actuellement un essai clinique évaluant l'injection de Treg expansés grâce aux DC du receveur dans la prévention de la GvHD aigüe. L'administration étant faite 2 jours avant l'allogreffe avec une dose standard de sirolimus ou tacrolimus (NCT01795573). La majorité des essais évalue l'intérêt des Treg dans la GvHD chronique.

Le principal inconvénient de cette thérapie adoptive de Treg est la quantité insuffisante de Treg générés après expansion *ex vivo*, pouvant limiter son utilisation en clinique, mais aussi une faible expression voire une perte de FoxP3+.

2. Les cellules souches/stromales mésenchymateuses

Les cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM) sont des cellules multipotentes capables de se différencier en plusieurs types cellulaires. Il a été montré que les CSM atteignaient les sites inflammatoires où elles exerceraient des effets immunorégulateurs en permettant la réparation tissulaire. La première utilisation chez l'Homme a été décrite par Le Blanc *et al.* en 2004. Ils décrivent l'utilisation fructueuse de CSM de la mère injectées chez son enfant de 9 ans avec une GvHD aigüe de grade IV, un an après le patient était cliniquement stable⁷⁰.

Les CSM, n'exprimant pas à leur surface le CMH de classe II, le CD80, CD86, CD40 et CD40 ligand, ne peuvent donc pas initier une réponse allogénique.

2.1. Mécanismes d'action

Les CSM sont capables d'interagir avec plusieurs types cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire, expliquant ainsi leur intérêt dans la prévention de la GvHD ou bien de maladies auto-immunes⁷¹⁻⁷³ (Figure 9). Les fonctions immunomodulatrices des CSM sont exacerbées en présence d'un environnement inflammatoire, notamment en présence d'IFN- γ en combinaison avec d'autres cytokines pro-inflammatoires.

- Interaction avec les LT

La coculture avec des CSM induit une diminution de la prolifération et des fonctions effectrices des Th1 et Th17 et une augmentation de la production d'IL-4 par les lymphocytes T helper de type 2 (Th2). De plus, les CSM empêcheraient physiquement l'interaction LT/ APC, indépendamment du fait que le LT soit naïf ou spécifique d'un antigène⁷⁴. Les CSM inhibent également l'expansion des LT CD8+ mais aussi leur cytotoxicité⁷⁵.

Les CSM induiraient l'anergie des LT, avec un arrêt du cycle à la phase G0/G1 du cycle cellulaire des LT stimulés^{76,77}.

Aussi, il a été mis en évidence dans un modèle murin de maladies auto-immunes que les CSM via la voie Fas/FasL induisent l'apoptose des LT⁷⁸. En effet, la sécrétion de MCP-1 par les CSM régulée par Fas permet le recrutement de LT, l'apoptose des LT étant médiée par FasL. Ces LT apoptotiques vont ensuite être phagocytés par les macrophages qui vont produire de forts taux de TGF- β et permettre un accroissement de la population de Treg.

La stimulation des CSM par le TLR-2 augmente la production d'IDO et donc la dégradation du tryptophane nécessaire à la prolifération des LT⁷⁹. D'autres médiateurs solubles produits par les CSM sont responsables de l'immunosuppression engendrée comme la prostaglandine E2 (PGE2), le TGF- β 1, l'hépatocyte growth factor (HGF)⁷¹. La sécrétion de PGE2 est notamment augmentée lorsque les CSM sont incubées avec du TNF- α et de l'IFN- γ . Une équipe française a montré que l'expression de HLA-G à la surface des CSM entraînait une immunosuppression vis-à-vis des LT⁸⁰. De même, les CSM sécrètent une forme soluble de HLA-G, l'isoforme HLA-G5, de façon dépendante de l'IL-10 et impliquant un contact cellulaire CSM/LT qui inhiberait la prolifération des LT allogéniques et permettrait l'expansion des Treg⁸¹. De plus, HLA-G5 abroge la cytotoxicité des cellules NK et la sécrétion d'IFN- γ .

Les CSM expriment PD-L1 dont la liaison avec PD-1 à la surface des LT va inhiber leur prolifération et leur fonction effectrice. Il a été aussi montré que les CSM sont capables de sécréter la forme soluble des ligands de PD-1 qui va entraîner une diminution de la réponse T⁸². De plus, la galectine-1 et la galectine-3 sécrétées par les CSM sont aussi impliquées dans leurs mécanismes immunorégulateurs^{83,84}.

Les CSM induisent également une augmentation de la différenciation de Treg à partir de LT naïfs. La sécrétion de TGF β par les CSM serait responsable de l'expansion des Treg⁸⁵. De plus, il a été montré que les Treg incubés avec les CSM auraient une capacité immunosuppressive accrue via l'interaction PD-1/PD-L1 et l'IL-10⁸⁶.

- Interaction avec les DC

L'ajout de CSM au cours de la différenciation des DC induit l'inhibition de l'expression de CD1a, CD80, CD86, CD40 et HLA-DR et prévient l'augmentation de l'expression des marqueurs de co-stimulation CD40, CD86, CD83 au moment de leur maturation⁸⁷. Au niveau sécrétoire, les CSM induisent une baisse de la production de TNF- α par les cellules immatures ainsi qu'une augmentation de l'IL-10 par les DC matures⁷¹. Le PEG2 jouerait aussi un rôle dans l'inhibition de la maturation et de la fonction de DC dérivant de monocytes par les CSM⁸⁸. Enfin, il a été montré *in vitro* et *in vivo* une diminution de l'expression des marqueurs de homing CCR7 et CD49d par les DC cocultivés en présence de CSM, empêchant leur migration au niveau des nœuds lymphatiques et donc le priming des LT⁸⁹. Au final, les CSM interfèrent dans la génération de DC matures d'origine monocyttaire ou dérivant de cellules progénitrices CD34+, pouvant impliquer des facteurs solubles ou bien encore un contact cellulaire⁸⁷.

- Interaction avec les LB

Les CSM inhibent la prolifération des LB à la phase G0/G1 du cycle cellulaire et également l'expression des chémorécepteurs CXCR4, CXCR5, CCR7 ainsi que des ligands de CXCR4, CXCR5 et les chémokines CXCL12 et CXCL13 affectant donc leurs propriétés chimiotactiques⁹⁰. On note également une baisse de la sécrétion d'immunoglobulines (Ig) IgM, IgA et IgG témoignant d'une inhibition de la différenciation des LB en plasmocytes. De plus, la réponse B étant principalement cellule T-dépendante, l'inhibition des LT entraîne l'inhibition des LB.

- Interaction avec les NK

Les CSM diminuent la production d'IFN- γ par les cellules NK activées en réponse à la sécrétion de PGE2, IDO et HLA-G5 par altération de leur phénotype⁹¹. Les CSM inhibent aussi la prolifération des NK induites par l'IL-12 de façon importante mais elles restent sensibles à la cytotoxicité des NK en cas de faible expression de HLA-I à leur surface⁹².

- Interaction avec les macrophages et les polynucléaires neutrophiles

Les CSM induisent la différenciation des macrophages en macrophages de type 2 (M2) sécrétant de l'IL-10 via la sécrétion d'IL1-RA⁹³ mais aussi par la sécrétion d'IDO⁹⁴. De même, les CSM sécrètent de l'IL-6 qui serait responsable de la différenciation des monocytes en cellules myéloïdes apparentées à des macrophages M2⁹⁵. Il a également été montré *in vivo* et *in*

in vitro que le TNF α -stimulated gene protein (TSG6) sécrété par les CSM inhibait l'activité NF κ B des macrophages, des DC et des LT helper via le récepteur CD44. De plus, le PGE₂ sécrété par les CSM après activation par le LPS et le TNF α entrainerait la sécrétion d'IL-10 par les macrophages.

Les CSM sont aussi capables d'inhiber le burst oxydatif des polynucléaires neutrophiles via la production d'IL-6 mais aussi de s'opposer à leur apoptose⁹⁶.

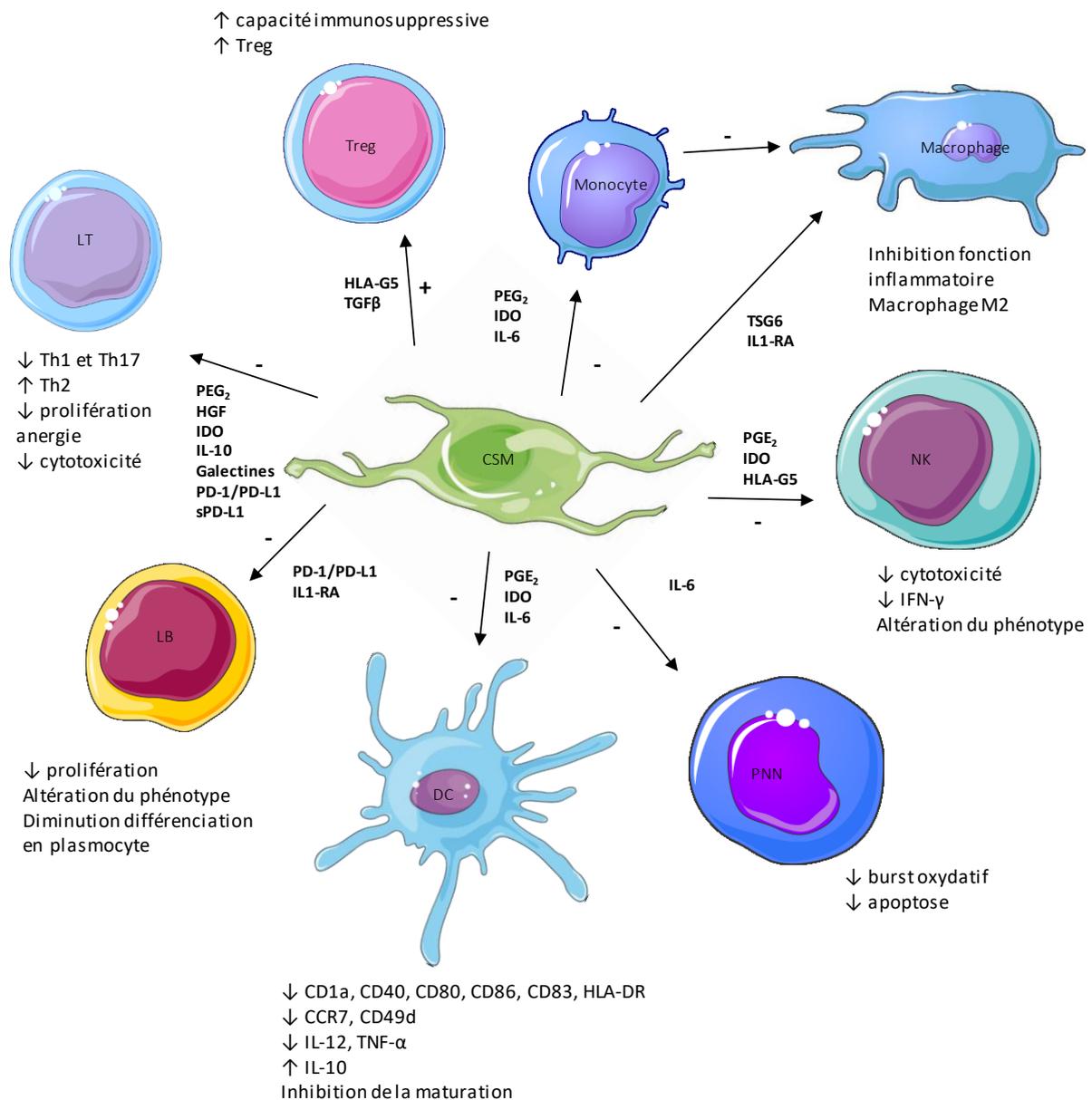


Figure 9 : Mécanisme d'action des CSM. Les CSM agissent sur les acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative via des médiateurs solubles mais également un contact cellulaire.

Les CSM sont ainsi capables d'agir sur la totalité des effecteurs de la réponse immunitaire et apparaissent comme une thérapie cellulaire prometteuse.

2.2. Génération des CSM

Les sources de CSM sont diverses, MO, tissu adipeux, sang de cordon, placenta ou encore gelée de Wharton (tissu conjonctif présent au niveau du cordon ombilical). Les CSM issues de MO sont majoritairement utilisées en clinique dans le traitement de la GvHD. A cause de leur faible présence au sein de l'organisme, il est nécessaire de les expandre *ex vivo* par culture dans du sérum de veau fœtal (SVF). Cependant, afin d'utiliser cette thérapie en clinique, l'utilisation de lysat plaquettaire humain a été testée et a montré de bons résultats⁹⁷. L'International Society of Cellular Therapy (ISCT) a défini des critères de standardisation concernant la culture et la caractérisation des CSM⁹⁸ :

- Adhérence au plastique dans les conditions standard de culture
- Expression des marqueurs CD105, CD73, CD90 positifs ($\geq 95\%$) et absence des marqueurs suivants : CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19, HLA-DR ($\leq 2\%$)
- Différenciation *in vitro* en ostéoblastes, adipocytes, chondroblastes

Les CSM sont généralement collectées après 1 ou 2 passages car elles perdent leurs propriétés après plusieurs passages.

2.3. Les CSM dans la prévention de la GvHD aigüe

Le premier patient traité par injection de CSM était un enfant de 9ans atteint de leucémie aigüe lymphoblastique et présentant une GvHD aigüe de grade IV au niveau du tube digestif et du foie, résistante à plusieurs lignes de traitement, suite à une greffe allogénique de CSH⁷⁰. Après une première injection de CSM issues de la MO de la mère, les signes digestifs ainsi que la bilirubine ont drastiquement diminué mais la diminution de la CsA s'est accompagnée de la réapparition de diarrhée ; aussi une seconde injection a été effectuée. Les troubles digestifs ont de nouveau diminué de façon importante mais des lésions de GvHD chronique ont été détectées au niveau du foie. La même équipe, dans un essai multicentrique de phase II, a évalué sur 55 patients atteints de GvHD aigüe de grade III ou IV réfractaire aux corticoïdes l'intérêt d'une

dose unique de CSM de $1,4 \times 10^6/\text{kg}$ (médiane) en association avec une prophylaxie comprenant de la CsA en association avec des injections intraveineuses de méthotrexate (MTX, inhibiteur de la dihydrofolate réductase) ou MMF⁹⁹. Trente patients ont eu une réponse complète au traitement et 52% d'entre eux étaient vivants à 2ans, 9 patients avaient une réponse partielle. Les auteurs ne décrivent pas de toxicité à l'injection. D'autres essais pilotes ont été menés dans le traitement de la GvHD aigüe réfractaire aux corticoïdes avec des résultats plutôt encourageants en terme de diminution, voire de résolution complète de la GvHD aigüe, de survie et d'amélioration rapide des signes cliniques et biologiques¹⁰⁰⁻¹⁰⁵. Une équipe japonaise a montré dans un essai de phase I/ II puis de phase II/III l'efficacité de CSM dans le traitement de la GvHD aigüe réfractaire aux corticoïdes^{106,107}. Ces résultats ont permis d'autoriser les CSM pour le traitement de la GvHD aigüe au Japon.

L'intérêt de l'injection de CSM dans la prévention de la GvHD aigüe a également été largement étudié. Une première étude a évalué l'intérêt d'une greffe de CSM issues du même donneur HLA-identique de CSH (MO ou CSP) chez 46 patients adultes¹⁰⁸. La dose était de 1, 2.5 ou 5×10^6 CSM/kg. Les auteurs ont montré que la co-transplantation était sûre, sans toxicité au moment de l'injection de CSM. La survie globale à 2 ans était de 78% tandis que la survie sans progression était de 53%.

En 2007, Ball *et al.* ont publié les résultats d'un essai multicentrique de phase I-II dans la prévention de la survenue de GvHD par les CSM après une greffe de CSH issues de donneurs non apparentés chez 14 enfants atteints de cancers hématologiques ou non¹⁰⁹. Les CSM étaient issues de la MO du même donneur et les doses injectées étaient comprises entre $1-5 \times 10^6$ CSM/kg avec une dose moyenne injectée de 1.6×10^6 CSM//kg, sans signe de toxicité au moment de l'injection. Les auteurs ont comparé les résultats avec une cohorte historique comparable de 47 patients, ne trouvant pas de différence significative en termes de rejet de greffe et de reconstitution immunitaire. Cependant, la reconstitution de la population de NK a été plus rapide dans le groupe traité par CSM ($p=0.02$) mais le temps de suivi étant différent, les deux groupes n'étaient pas comparables pour la survie. Une nouvelle fois, les auteurs concluent que la co-transplantation est sans risque et avec un possible effet sur reconstitution hématologique et la diminution du risque de rejet.

Un essai randomisé a inclus 30 patients de 17 à 52 ans atteints de cancers hématologiques traités par greffe de CSH issues de donneurs apparentés, 15 patients dans le groupe traité par CSM et 15 patients dans le groupe non traité¹¹⁰. La dose de CSM, issue de la MO du donneur de CSH,

prévue était de $1-2 \times 10^6$ CSM/kg mais à cause de problème d'expansion, seuls 2 patients ont reçu la dose requise et seuls 10 patients sur les 15 ont été traités car les CSM n'ont pas pu être produites à partir de 5 donneurs. Seulement 11.1% des patients dans le groupe traité ont développé une GvHD aigüe de grade II contre 53.3% dans le groupe non traité, il n'y avait pas de patients atteints de GvHD de grade III ou IV dans les deux groupes. Il n'y avait pas de différence au niveau de la survie globale entre les groupes, en revanche il a été noté un taux de rechute plus important dans le groupe traité (60% versus 20% à 3 ans, $p=0.02$), en particulier dans les 6 mois post-transplantation et une plus faible survie sans maladie (30% versus 66.7%, $p=0.035$). Ces résultats amènent à une grande prudence quant à l'utilisation des CSM. D'autres essais pilotes ont été menés et amènent à la conclusion que l'injection de CSM n'engendrait pas de toxicité et une plus faible incidence de la GvHD aigüe¹¹¹⁻¹¹³. Une étude rétrospective propose d'évaluer la réponse au traitement à 1 semaine pour prédire la réponse clinique contre 28 jours habituellement qui permettrait d'obtenir des informations importantes pour la suite de la prise en charge¹¹⁴. Dans cette étude, la dose injectée ainsi que l'organe touché étaient de forts facteurs prédictifs de réponse au traitement.

Ces résultats sont à prendre avec précaution, les résultats nécessitant d'être vérifiés dans des essais cliniques randomisés de grande envergure. A noter que le problème d'expansion des CSM apparait dans plusieurs études^{103,110,111}. Dans une revue publiée en 2019, Fisher *et al.* évaluent les preuves d'efficacité et de sécurité de l'injection de CSM en post-transplantation de CSH de 12 essais cliniques randomisés terminés³. Les auteurs montrent que l'injection de CSM n'a pas prouvé de façon certaine son efficacité dans la prévention et le traitement de la GvHD aigüe. Les preuves sont faibles quant à leur efficacité à diminuer le risque de GvHD chronique et aigüe. Cela pourrait être dû à la diversité des protocoles entre les centres, que ce soit au niveau de la source de CSM, des critères requis pour la libération des lots de CSM ainsi que l'hétérogénéité des spécifications du produit ce qui peut rendre les résultats des études difficilement comparables entre eux et donc la conclusion de l'efficacité des CSM dans la GvHD¹¹⁵. Les CSM ne montrent que peu ou pas de différence en termes de risque de mortalité en prophylaxie ou en traitement comparé aux groupes non traités. Dans une revue, Cheung *et al* s'interroge sur la possibilité d'avoir des biomarqueurs pour prédire la réponse au traitement pas CSM¹¹⁶. L'étude de la variation d'expression des biomarqueurs classiquement utilisés pour le diagnostic de la GvHD (IL-2R α , TNFR1, IL-8, HGF, etc) aigüe ne permet pas de conclure à leur intérêt car les études sont discordantes. De même pour l'utilisation des molécules ou voies cellulaires connues pour être responsable de l'activité immunosuppressive des CSM *in vitro* et

en pré-clinique (proportion de Treg, IL-6 ou HLA-G sériques). En revanche, les auteurs questionnent l'intérêt de mesurer la réponse cytotoxique chez le receveur car il a été montré que les CD8 et NK sont responsables de l'apoptose des CSM libérant alors de l'IDO et du PGE2, par efferocytose, responsables de l'effet immunosuppresseur des CSM chez l'Homme. Des essais de cytotoxicité pourraient être standardisés et permettre de standardiser la sélection des « meilleurs lots » de CSM, une stratification des patients capables de répondre au traitement mais également de les monitorer par le dosage de la PGE2 sérique.

Il y a actuellement 13 essais cliniques enregistrés dans le monde (clinicaltrials.gov, consulté le 10/09/2020) évaluant la transplantation de CSM dans la GvHD. Un premier produit de thérapie cellulaire avait même été développé par Osiris Therapeutics, le Prochymal® mais dont l'efficacité dans le traitement de la GvHD réfractaire aux stéroïdes a été mise en cause après l'échec d'un essai de phase III aux Etats-Unis, le critère de jugement principal (réponse complète durable, i.e. ≥ 28 jours) ne montrant pas de différence significative entre le groupe traité et le groupe placebo¹¹⁷. Les résultats de cet essai américain diffèrent de ceux obtenus en Europe, l'explication principale étant la production industrielle du Prochymal® alors que les essais européens utilisent des CSM produites institutionnellement. Dans une revue publiée en 2013, l'auteur propose de s'intéresser à d'autres paramètres de génération des CSM comme l'analyse des cellules à différents passages ou bien encore sur leur fonctionnalité qui ne font pas partie des critères définis par l'ISCT¹¹⁸.

3. Les cellules progénitrices adultes multipotentes

Les cellules progénitrices adultes multipotentes (MAPC) sont des cellules non-immunogènes qui sont dérivées de cellules souches adultes issues de MO. C'est-à-dire qu'elles peuvent être injectées chez un individu de façon allogénique sans induire de réponse immunitaire. Elles ont des capacités immunomodulatrices, immunosuppresseuses mais aussi de régénération tissulaire. Elles sont différentes des MSC par le phénotype et leur fonction¹¹⁹. De plus, les MAPC peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires et non pas seulement en cellules mésenchymateuses comme les MSC. Les MAPC présentent donc des propriétés intéressantes pour la prévention de la GvHD.

3.1. Isolation et expansion des MAPC

Les MAPC de grade-clinique sont isolées de MO de donneurs sains après consentement puis mises en culture dans des flasques coatées avec de la fibronectine sous 5% de CO₂ et 37°C. Les cellules sont en culture dans un milieu riche en facteurs de croissance puis passées tous les 3 à 4 jours. Les cellules sont comptées à chaque passage et il est possible de calculer le doublement (population doubling, PD) de la population peut être calculé. Le PD est le nombre de fois que la population a doublé depuis la première isolation. Il est calculé par la formule suivante :

$$PDh = PDi + \log_2 \frac{Ch}{Ci}$$

PD_i : PD initial ; Ch : nombre de cellules collectées après passage ; Ci : nombre de cellules mises en culture initialement

Il a été montré que lorsque le PD atteint les 40, il n'y a pas d'altération du phénotype et de la vitesse de croissance cellulaire¹²⁰. C'est une caractéristique importante des MAPC, notamment pour une production à grande échelle.

Le phénotype des cellules est ensuite contrôlé. Les cellules doivent être positives (>90%) pour le CD90, CD44 et négatives pour le CMH II et le CD45¹¹⁹⁻¹²². Les MAPC peuvent être congelées pour une utilisation ultérieure.

3.2. Mécanismes d'action dans la GvHD

Les premières études pré-cliniques ont été menées chez la souris et le rat^{121,123}. Dans une étude chez le rat, il a été testé deux schémas d'injection¹²¹. Une unique injection à J1 ou une injection à J1 puis J5, J0 étant le moment de l'injection de MO et LT. La dose de MAPC injectée était de 10 x10⁶/kg. La survie était significativement améliorée dans le groupe traité avec deux injections. D'un point de vue immunologique, les MAPC montrent un fort pouvoir immunomodulateur. Elles inhibent la prolifération de LT allogéniques et sont capables d'inhiber la prolifération des LT quand elles sont ajoutées 3 jours après le début d'une réaction lymphocytaire mixte. Contrairement aux CSM, les MAPCS n'agissent pas sur l'inhibition de la prolifération des LT via les Treg. Il semblerait que ces fonctions immunosuppressives seraient dues à des facteurs solubles et plus précisément l'IDO. Cependant, l'effet de l'IDO dans les capacités immunosuppressives n'est pas retrouvé lorsque les MAPC sont d'origine murine¹²³. En revanche, les MAPC murines sécrètent de la PGE2 qui a un effet sur la prolifération lymphocytaire. Cette observation *in vitro* a été confirmée *in vivo*. Ici, les MAPC

ont été injectées directement dans la rate des souris et il a été montré que le traitement par MAPC améliorait significativement la survie des souris. Lorsque les MAPC sont dérivées de MO humaine, il a été montré qu'une stimulation par l'IFN- γ augmentait l'expression des CMH I et II mais sans effet sur les molécules de co-stimulation CD80, CD86, CD40 tout en conservant leur propriétés immunosuppressives¹¹⁹. Quant à l'identification des facteurs solubles impliqués dans ces propriétés elle semble être difficile puisque les MAPC sécrètent peu ou pas d'IL-10, et que l'inhibition de la PGE2 et de l'IL-10 n'a pas d'effet sur la restauration de la prolifération lymphocytaire. Cependant, l'IDO semble être en partie responsable de l'activité inhibitrice des MAPC.

3.3. Prévention de la GvHD

Un premier essai de phase I a permis à définir le schéma thérapeutique de MAPC produit de façon industrielle¹²⁴. Multistem® (Athersys) est obtenue à partir de MAPC issues de MO d'adultes sains et expandues *ex vivo*. Multistem® est injectée par voie intraveineuse 6h après sa décongélation. Deux bras ont été définis, le premier bras consiste en une injection unique à J2 de 1, 5 ou 10 millions de MAPC/kg. Le second bras consiste en une injection hebdomadaire de 1 ou 5 millions de MAPC/kg à J2, J9 et J16 ou bien une injection hebdomadaire de 5 millions de MAPC/kg à J2, J9, J16, J23 et J30. Le critère d'évaluation principal était la toxicité à J30. Les critères secondaires étaient l'incidence de GvHD aigüe, l'incidence des infections et la survie à 100 jours. Les patients suivaient une prophylaxie par MTX + CsA ou MTX + tacrolimus.

Seulement 3 patients ont eu une toxicité dans les 30 jours après traitement, les doses maximales tolérées ont été définies comme étant une dose unique de 10 millions de MAPC/kg ou bien une dose hebdomadaire de 5 millions de MAPC/kg pendant 5 semaines. Parmi les 36 patients, 24 ont eu une infection avec un total de 62 infections dans l'étude, elles étaient principalement d'origine bactérienne et virale. Dans l'étude, 39% des patients ont eu 2 infections ou plus, 40 infections ont été définies comme modérées et 22 comme sévères (dont 1 infection ayant entraîné la mort). Le nombre d'infections était de 30 dans le bras à dose unique et de 32 dans le bras à doses répétées. Quant à la rechute, 3 patients ont subi une rechute due à une interruption de leur traitement immunosuppresseur afin d'accroître l'effet GvL. La survie globale à J100 pour tous les patients était de 91.1% et la survie sans maladie de 81%. L'incidence de la GvHD aigüe dans les 100 jours pour tous les patients était de 37% pour les grades II à IV et de 14% pour les grades III à IV. Au final, cet essai de phase I a montré que l'injection de MAPC était

prometteuse car elle était bien tolérée, sans danger et que l'incidence de GvHD aigüe n'était pas accrue par le traitement. Les auteurs ont conclu que la dose unique de 10 millions de MAPC/kg injectée à J2 après la transplantation serait efficace et sans danger en prophylaxie dans la GvHD.

Multistem® (Arthersys) a reçu le statut de médicament orphelin par la Food and Drug Administration (FDA) et de l'European Medicine Agency (EMA). Un essai de phase III est en cours d'évaluation spéciale de protocole (Special Protocol Assessment, SPA) par la FDA. Le SPA est un processus qui permet à une industrie d'avoir l'accord de la FDA sur le design de l'étude clinique, les critères d'évaluation principaux et aussi l'analyse statistique. Ceci permet de mener une étude clinique sans crainte d'avoir un rejet de l'étude par la FDA remettant en cause le design de l'essai.

4. Les lymphocytes invariants Natural Killer T

Les lymphocytes invariants natural killer T (iNKT) sont des LT exprimant un TCR semi-invariant. Ces LT représentent moins de 1% des LT circulants. Ces cellules de l'immunité innée reconnaissent des Ag lipidiques bactériens présentés par le CD1d. Il existe 2 sous-types de cellules iNKT :

- les CD4+ qui expriment entre autres FasL
- les CD4- exprimant le récepteur NKG2A et sécrétant de la perforine

Les cellules iNKT peuvent inhiber la réponse immunitaire et induire une tolérance ou bien favoriser la réponse anti-tumorale ou anti-infectieuse selon le contexte et les cytokines produites dans l'environnement. Une première étude dans deux modèles murins de transplantation de CSH chez la souris C57BL/1 et BALB/c avec un mismatch HLA a montré, après un conditionnement non myéloablatif, une prédominance de cellules NK1.1⁺TCR $\alpha\beta$ dans la population des LT, qui auraient des propriétés immunosuppressives et donc un intérêt dans la prévention de la GvHD¹²⁵. Ces cellules seront plus tard identifiées comme des iNKT. L'augmentation de cette population régulatrice est corrélée à l'augmentation de la production d'IL-4, via la liaison de (l'alpha-galactosylcéramide) (α -GalCer) exprimé par la CPA et le CD1d à la surface des iNKT. Les iNKT de l'hôte vont polariser les LT du donneur selon un

type Th2 et inhibent la sécrétion d'IFN- γ et TNF- α par les LT, leur prolifération et l'infiltration des organes cibles de la GvHD (Figure 10). Ces effets sont entretenus par l'expansion des myeloid-derived suppressor cells (MDSC) et Treg. De plus, les iNKT sont capables de tuer de façon directe ou indirecte les cellules leucémiques.

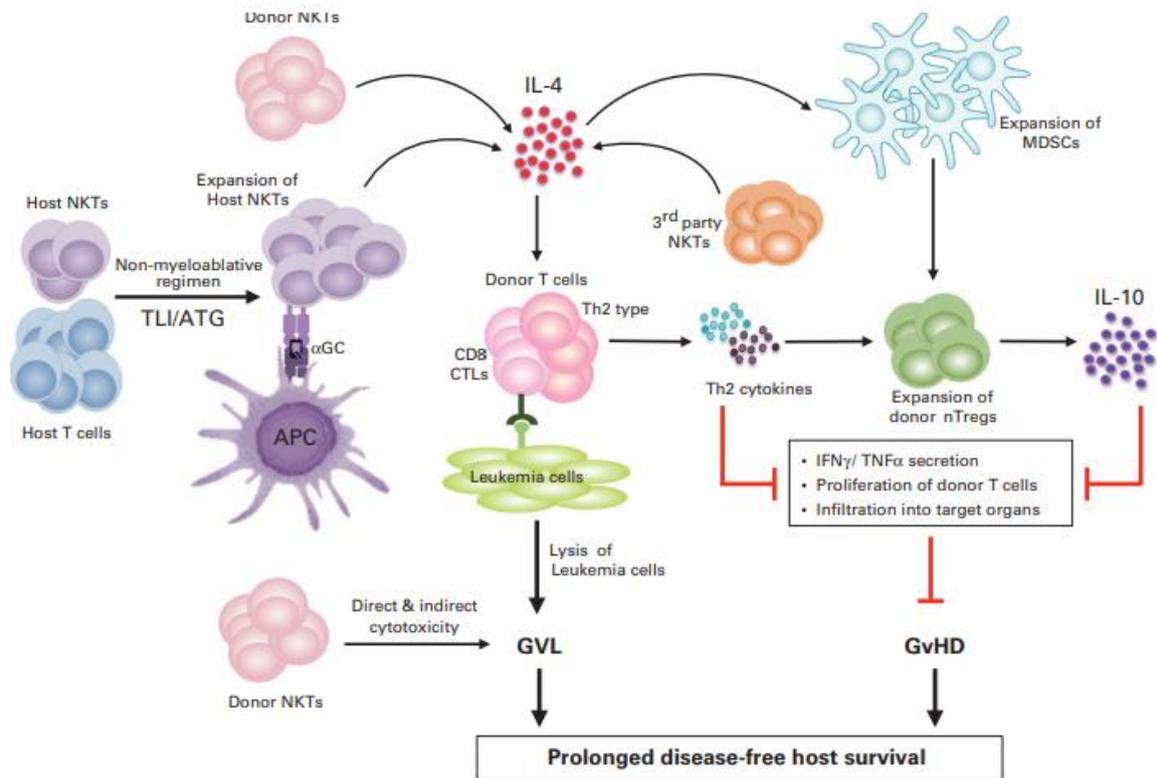


Figure 10 : Les iNKT préviennent la survenue de la GvHD tout en conservant l'effet GvL après conditionnement non-myéloblatif. L'expansion des iNKT de l'hôte est assurée par le conditionnement. Via l'interaction avec les CPA grâce au CD1d, les iNKT du donneur et du receveur se multiplient, produisent de l'IL-4 qui va permettre la polarisation des LT du donneur en Th2 et l'expansion des MDSC. On observe une diminution de la prolifération des LT du donneur, une diminution de leur production d'IFN- γ et TNF- α mais également une baisse de l'infiltration des organes cibles par les LT. On observe aussi l'expansion de nTreg via la production d'IL-4 et la présence des MDSC. Les iNKT sont capables de cytotoxicité directe vis-à-vis des cellules leucémiques mais aussi de cytotoxicité indirecte par la stimulation de la production de LT CD8+ et cellules NK après activation par les DC¹²⁶.

4.1. Isolation ou expansion des iNKT

Dans les modèles murins de GvHD, les iNKT sont isolés par FACS (fluorescent-activated cell sorter) à partir de splénocytes murins¹²⁷⁻¹²⁹. Une approche d'expansion *ex vivo* consiste en l'expansion des iNKT à partir de PBMC isolés de sang de patients sains. Les PBMC humains

ou bien les splénocytes murins sont mis en culture avec de l' α -GalCer et de l'IL-2 recombinante humaine pendant 4 à 15 jours selon les protocoles¹³⁰⁻¹³³. Un produit pharmacologique, le RGI-2001, qui est une formulation liposomale de l' α -GalCer a obtenu en 2012 aux Etats-Unis le statut d'Orphan Drug Designation par la FDA. Il a été montré que la forme liposomale induirait la production d'IL-10 par les iNKT et LB et donc l'expansion de DC tolérogènes et de Treg¹²⁶. En 2017, les résultats d'un essai de phase IIa ont été publiés, montrant une prévention de la survenue de la GvHD aigüe lors du traitement par RGI-2001 associé au sirolimus, par expansion des Treg, agissant probablement en synergie¹³⁴. Cet essai multicentrique a évalué deux doses de RGI-2001, 14 patients ont reçu 1.0 μ g/kg et 15 patients ont reçu 100 μ g/kg en dose unique, injectés 30 minutes après la transplantation de CSH de donneur non apparenté. Chez les patients répondeurs, définis comme des patients ayant plus de 12% de cellules CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} parmi les CD4⁺ LT, il a été observé un plus grand pourcentage de cellules FoxP3⁺ (p=0.012), Helios⁺ (p=0.0002). Les patients répondeurs développaient moins de GvHD de grade II à IV (12.5% versus 52.4%) et de GvHD de grade III-IV (0% versus 9.5%). L'injection de RGI-2001 a donc montré des résultats encourageants, palliant les potentiels problèmes liés à l'expansion *ex vivo* des iNKT avant leur injection.

4.2. Intérêt des cellules iNKT dans la GvHD

Plusieurs équipes ont montré, dans des modèles murins de GvHD, la capacité des cellules iNKT du receveur ou du donneur à contrôler la GvHD sans perturber l'effet GvL^{127,130,131,135,136}. Une première approche a été d'évaluer l'intérêt des iNKT présents chez l'hôte. En effet, il a été montré que les iNKT ont un effet anti-tumoral tout en protégeant de la GvHD aigüe¹³⁷. De plus, une des explications de l'effet protecteur des iNKT de l'hôte serait l'expansion de Treg à partir des Treg du donneur dans un modèle de conditionnement d'intensité réduite, cette expansion étant dépendante de la production d'IL-4 par les iNKT¹³⁸. L'injection d' α -GalCer au moment de la transplantation est efficace pour prolonger la survie et diminuer la sévérité de la GvHD. Ce traitement n'impacte pas la prise de greffe des cellules hématopoïétiques du donneur¹³⁹. Une autre étude a mis en évidence l'effet de l' α -GalCer dans la polarisation des LT. Dans un modèle murin knock-out (KO) pour CD1d, IL4 ou STAT6, l'injection du glycolipide au moment de la greffe ne permettait pas de prévenir la survenue de la GvHD. Ces résultats montrent l'importance des iNKT du donneur et de la production d'IL-4 par celles-ci dans l'induction d'une tolérance immunitaire. La polarisation des LT en Th2 est dépendante de STAT6, la polarisation Th2 étant nécessaire à la prévention de la GvHD¹⁴⁰.

L' α -GalCer a également un impact sur une population cellulaire impliquée dans la tolérance immunitaire que sont les Treg. Une étude japonaise a permis de montrer que la forme liposomale de l' α -GalCer entraînait une expansion de CD4⁺Treg notamment au niveau de la rate à partir de nTreg permettant la prévention de la GvHD¹⁴¹.

Une autre approche a été d'injecter des iNKT isolées du même donneur que le donneur de CSH ou bien d'un 3^e donneur. Il existe plusieurs études qui ont montré avec succès l'intérêt de l'injection d'iNKT dans la prévention de la GvHD aigüe tout en conservant l'effet GvL^{127-129,137}. Des doses très faibles d'iNKT ont permis d'améliorer la survie et ce dès 1×10^4 et jusqu'à 5×10^4 de NKT, ceci même quand la source d'iNKT et de MO diffèrent^{127,128}. Dans ces études, il a été également montré que les iNKT protégeaient contre la GvHD aigüe par l'expansion de Treg et la production d'IL-4^{127,128}.

Mavers *et al.* ont montré l'intérêt des iNKT chez l'Homme¹⁴². Après greffe, la persistance et la rapide reprise des iNKT sont nécessaires pour prévenir la survenue de la GvHD. Le conditionnement du patient a un effet important sur la préservation des iNKT, en effet, les données précliniques ont montré qu'un conditionnement TLI/ATG¹³⁸ (total lymphoid irradiation/ anti-thymoglobuline) permettait l'expansion des iNKT de l'hôte tout en conservant l'effet GvL. Ces résultats ont été vérifiés chez 37 patients, et seulement deux patients ont développé une GvHD aigüe¹⁴³. La population de CD4⁺ sécrétant de l'IL-4 était augmentée chez les patients ayant reçu un conditionnement TLI/ATG et ces cellules diminuaient la prolifération lymphocytaire comparées au groupe non traité ou avec irradiation corporelle totale (ICT). De plus, la quantité d'iNKT présents dans le greffon influe sur la survenue de la GvHD aigüe. Une équipe nantaise a montré chez 80 patients que si le nombre d'iNKT présents dans le greffon était inférieur à la médiane ($0.11 \times 10^6/\text{kg}$), la survie sans progression et sans GvHD était de 22% comparée à un greffon contenant plus d'iNKT que la médiane et chez qui les patients ont une survie de 49%¹⁴⁴.

Moins étudié, le sous-type de cellules iNKT CD4⁻ a montré un potentiel effet dans l'immunorégulation lors d'une réponse allogénique avec notamment une inhibition de la prolifération des LT et de la sécrétion d'IFN- γ ^{145,146}. Plus récemment, l'équipe du Pr. Rubio a montré dans un modèle xénogénique de GvHD chez la souris NOD/SCID/IL-2R γ ^{-/-} (NSG) une amélioration de la survie et une diminution du score de GvHD après administration de CD4⁻iNKT en comparaison avec l'injection de CD4⁺ iNKT¹³³. Ces cellules immunomodulatrices sont capables de diminuer l'activation des LT mais également leur polarisation en Th1 et Th17

in vivo, mais n'impactent par leur prolifération. De même, les CD4⁻ iNKT induiraient une diminution du nombre de DC spléniques sans changement de leur phénotype à la maturation. Cependant, d'autres études chez la souris ont montré un intérêt des CD4⁺ iNKT dans la prévention de la survenue de la GvHD via l'expansion de Treg tout en préservant l'effet GvT¹²⁸.

5. Les cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes

Les MDSC sont une population hétérogène d'origine myéloïde, composée de cellules progénitrices myéloïdes et de cellules myéloïdes immatures. Il existe trois sous-types de MDSC basées sur leur phénotype¹⁴⁷ :

- Les MDSC polymorphonucléaires (PMN-MDSC) : CD11b⁺ CD14⁻ CD15⁺
- Les MDSC monocytiques (M-MDSC) : CD11b⁺ CD14⁺ HLA-DR^{-/lo} CD15⁻
- Les MDSC de stade précoce (e-MDSC) : Lin⁻ (CD3/14/15/19/56) HLA-DR⁻ CD33⁺

La principale caractéristique des MDSC est leur fort pouvoir immunosuppresseur.

5.1. Mécanismes d'action

Les MDSC sont capables de perturber à la fois la réponse immunitaire innée et adaptative selon plusieurs mécanismes¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ (Figure 11).

- La déplétion en acides aminés nécessaire à la prolifération des LT

La forte expression de l'arginase 1 (Arg1) par les MDSC entraîne le catabolisme de la L-arginine, un acide-aminé non-essentiel, et aboutissant à la production d'urée et L-ornithine. De même, par séquestration de la cystéine et sa consommation, celle-ci n'est plus disponible pour les LT. Tout ceci concourt à la sous-expression de la chaîne ζ du CD3 et donc du TCR et un arrêt de la prolifération des LT par abolition du signal 3.

- La mise en place d'un stress oxydatif par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) par les MDSC

Les MDSC produisent des ROS, notamment via la NADPH oxydase 2 (NOX2) et vont également inhiber l'expression de CD3 ζ et bloquer la prolifération lymphocytaire. Il s'agit de la caractéristique principale des PMN-MDSC^{151,152}. Les RNS, et en particulier le peroxy-nitrite qui est le produit de l'interaction entre le NO et l'ion superoxyde, retrouvés dans le milieu

extracellulaire vont quant à eux provoquer la nitration de la tyrosine au niveau du TCR des LT CD8+, provoquer une rigidité du TCR et empêcher la liaison peptide/CMH et donc l'activation et la prolifération des LT. La phosphorylation de STAT3 fortement exprimé par les MDSC est responsable de l'augmentation de deux sous-unités de NOX2 qui sont la gp47 et la gp91 et de la diminution de l'activation et la prolifération des LT¹⁵³.

- La surexpression de l'arginase 1 et d'iNOS

Les MDSC expriment fortement deux enzymes responsables du catabolisme de la L-arginine, l'Arg1 et la nitric oxide synthase inductible (iNOS). Plusieurs mécanismes sont invoqués, la diminution de l'expression de CD3 ζ , l'inhibition de la cycline D3 et de la cyclin-dépendant kinase 4 (CDK4). La génération de NO via iNOS est le mécanisme d'action principal utilisé par les Mo-MDSC^{151,152}.

- Impact des MDSC sur la mobilité et la viabilité des lymphocytes

Les MDSC diminuent le homing des LT pour les organes lymphoïdes secondaires. En effet, l'expression d'ADAM 17 par les MDSC va cliver la L-sélectine (CD62L) nécessaire aux LT pour atteindre les organes lymphoïdes secondaires et les sites inflammatoires¹⁵⁴. De plus, le peroxy-nitrite serait responsable d'une nitration de la chémokine CCL2, qui la rendrait inefficace et empêcherait la migration des LT CD8+ sur les sites tumoraux. Enfin, via l'expression du TGF- β membranaire, les MDSC entraînent une anergie des NK, menant à l'inhibition de l'expression de NKG2D et de la production d'IFN- γ . Chez des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules, le TGF- β présent au niveau tumoral serait responsable de la stimulation de l'expression de CD39 et CD73 à la surface des MDSC, via activation de l'hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α). Ces deux ectonucléotidases sont capables d'hydrolyser l'ATP ou l'ADP en AMP, produisant in fine de l'adénosine immunosuppressive qui inhibe alors l'activité des LT et des NK¹⁵⁵.

- L'induction de Treg

L'Arg1 permettrait l'expansion de Treg naturels tandis que le TGF- β et l'IL-10 induiraient la production de Treg induits à partir de CD4+ naïfs. Il a été montré que des M-MDSC étaient capables, par la sécrétion de TGF- β et d'acide rétinoïque d'induire la différenciation des Th17 en Treg exprimant FoxP3+.

- Impact des MDSC sur les cellules myéloïdes

Les MDSC induisent la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 via la sécrétion d'IL-10 et le contact cellulaire ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'IL-12 par les macrophages. Les MDSC diminueraient la fonction activatrice des DC vis-à-vis des LT par la production d'IL-10 qui inhiberait la production d'IL-12 par les DC.

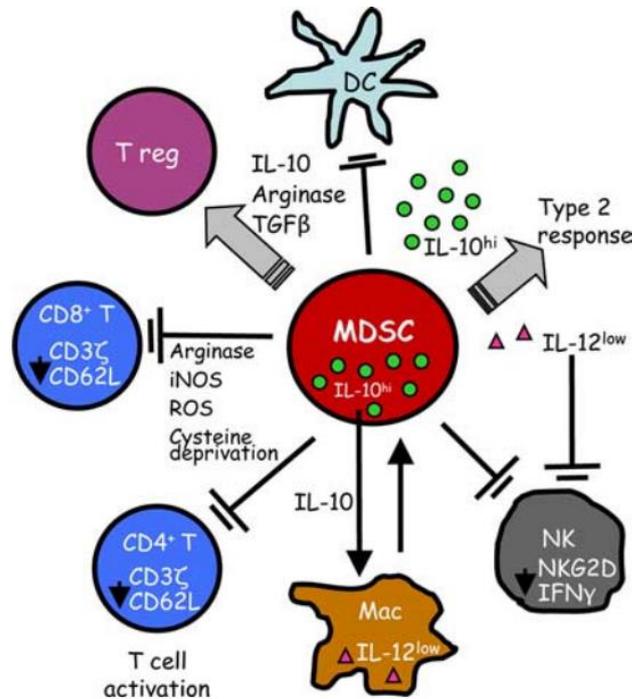


Figure 11 : Mécanismes immunosuppresseurs des MDSC affectant les différents acteurs de la réponse immunitaire. L'activation des LT est inhibée par la production de ROS et d'arginase, une diminution de la cystéine et la nitration du TCR par le peroxy-nitrite. Les MDSC orientent également vers une polarisation en Th2. Le TGFβ, l'IL-10 et l'arginase entraîne l'expansion de Treg. Les MDSC diminuent l'activité des DC et qui via l'IL-10 vont aussi polariser les macrophages en macrophage de type 2. Enfin, les MDSC diminuent la cytotoxicité des NK. D'après¹⁴⁸

En 2017, Ballbach *et al.* ont montré que des MDSC générées à partir de Buffy coat exprimaient des checkpoint inhibiteurs comme PD-L1 et que l'utilisation d'un anticorps bloquant ce marqueur était capable de restaurer environ 20% de la prolifération des LT cultivés en présence de MDSC¹⁵⁶. De plus, chez des patients atteints d'hépatite B chronique, il a été montré que les MDSC CD14+HLA-DR-/lowPD-1+ sécrétaient de l'IL-10 après activation de la voie PD-1/PD-L1, responsable de l'activité immunosuppressive vis-à-vis des LT CD8+¹⁵⁷.

Les MDSC sont retrouvées au niveau du microenvironnement tumoral mais aussi lors d'une réponse à une infection bactérienne, parasitaire ou bien virale.

5.2. Génération des MDSC

La génération *ex-vivo* des MDSC murines a le plus souvent comme point de départ la MO de souris avec plusieurs combinaisons de cytokines possibles. L'association GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) et G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) reste la plus décrite^{123,158,159}. L'équipe du Pr. Blazar a mis au point un protocole supplémentant le milieu de culture à J3 en IL-13 afin d'induire l'arginase 1^{123,158}. Une autre approche repose sur l'utilisation d'une combinaison de GM-CSF et d'IL-6 pendant 5 jours¹⁶⁰.

Des protocoles de génération de MDSC utilisant des cellules humaines ont également été décrits. L'utilisation de progéniteurs hématopoïétiques issus de sang de cordon après isolation des cellules CD34+ puis mis en culture en présence de GM-CSF et SCF (stem cell factor) pendant 6 semaines est une technique utilisée par une équipe sud-coréenne et qui a montré son efficacité dans la GvHD aigue et chronique^{161,162}. Une équipe espagnole a étudié deux techniques de production de MDSC. Une première étude décrit l'utilisation de progéniteurs hématopoïétiques issus d'aphérèse après mobilisation par GM-CSF et isolés par CliniMACS puis cultivés dans un milieu sans sérum supplémenté en cytokines permettant de générer des M-MDSC et G-MDSC. La seconde montre l'intérêt de l'isolation des monocytes à partir de Buffy coat puis une culture pendant 6 jours en présence de GM-CSF et d'IL-6¹⁶³. Enfin, certaines équipes utilisent des techniques de co-culture de PBMC ou MO avec des cellules étoilées hépatiques ou bien des cellules tumorales afin d'induire les MDSC^{164,165}.

5.3. Les MDSC dans le traitement de la GvHD

Il n'existe pour le moment pas d'essais cliniques d'injection de MDSC chez l'Homme mais plusieurs études pré-cliniques chez la souris démontrent l'intérêt des MDSC dans la prévention de la GvHD sans impact sur l'effet GvL^{123,159-161,166}.

Dans un modèle de transplantation de MO avec mismatch du CMH de classe I, Messman *et al.* ont montré que la co-injection de MDSC issues de MO de souris C57BL/6, de MO et cellules spléniques chez la souris B6.bm1 recevant une dose létale d'irradiation (14Gy en deux doses à 4h d'intervalle) permettait de prévenir la survenue de la GvHD¹⁵⁹. L'injection de 1×10^7 MDSC permettait également une diminution du score histologique de GvHD dans les intestins,

le foie et la peau. Ces MDSC exprimaient les marqueurs F4/80, CD115, CD124, CD80, CD86, LFA-1 et CD62L mais exprimaient peu le CMH de classe II. Concernant les propriétés immunosuppressives des MDSC, l'Arg-1 et iNOS étaient les deux voies régulées positivement, cependant, seule l'iNOS était responsable de l'inhibition de la prolifération des LT. Une unique injection prophylactique de MDSC a été capable de prévenir la survenue de la GvHD alors qu'une injection de MDSC à J7 après la transplantation de MO ne montrait pas d'amélioration significative de la survie. L'effet GvL était préservé dans 2 modèles murins différents de transplantation de MO avec traitement par injection de MDSC¹⁵⁹. Dans ce modèle, il a été noté une polarisation des LT en Th2 avec une diminution de la production d'IFN- γ et de TNF- α dans le groupe traité par MDSC. L'équipe de Blazar *et al.* qui a développé une technique de génération de MDSC supplémentées en IL-13 à J3, a également montré l'intérêt de cette thérapie dans l'inhibition de la GvHD via un mécanisme dépendant de l'arginase-1, régulé positivement par l'IL-13¹²³. Dans un modèle murin de lymphome A20, l'effet GvL était également préservé en présence de MDSC-IL-13. Des MDSC CD115- générées à partir de cellules souches embryonnaires ont également montré leur efficacité à prévenir la survenue de la GvHD¹⁶⁶. Enfin, des MDSC d'origine humaine sont capables de diminuer le développement de la GvHD chronique grâce à la préservation de la fonction thymique¹⁶¹. Dans un modèle xénogénique de GvHD chez la souris NSG, l'administration de MDSC issues de sang de cordon humain inhibait la survenue de la GvHD via l'induction de Treg et une diminution des populations Th1 et Th17¹⁶². Une autre population de cellules myéloïdes apparentées à des MDSC monocytiques induites par le G-CSF a montré son intérêt dans la prévention de la GvHD dans un modèle xénogénique, les MDSC monocytaires régulateurs CD34⁺¹⁶⁷. Ces cellules immunosuppressives, d'origine humaine ou murine, ont des propriétés similaires aux MDSC car elles inhibent la prolifération des LT via la production de NO et induisent l'expansion de Treg de façon NO dépendante.

Récemment, un article dans *Leukemia* explicite la mécanistique des MDSC dans la prévention de la GvHD tout en préservant l'effet GvL¹⁶⁰. Dans plusieurs modèles murins, les auteurs ont montré que l'injection de MDSC augmentait l'expression du marqueur NKG2D à la surface des LT CD8⁺ et LT CD4⁺. L'expression de ce marqueur de co-stimulation impliqué dans l'immunité anti-tumorale des LT CD8⁺ était nécessaire pour conférer une activité cytotoxique aux LT CD8⁺ et donc pour conserver l'effet GvL après injection de MDSC.

6. Les HuMoSC, une thérapie cellulaire immunosuppressive dans la GvHD

6.1. La génération des HuMoSC

Notre équipe a mis au point une technique brevetée (FR1452286, WO2015140077-A1) de génération de cellules myéloïdes suppressives CD33+, appelées HuMoSC (Human Monocyte-derived Suppressor Cells), générées à partir de monocytes humains circulants issus de Buffy coat fournis par l'Établissement Français du Sang (EFS). Plus précisément, les PBMC sont isolées de concentrés leuco-plaquettaires (Buffy coat) par gradient de Ficoll¹⁶⁸. Les monocytes sont ensuite récupérés après gradient de Percoll puis mis en culture pendant 7 jours en présence d'IL-6 (10 ng/ml) et de GM-CSF (10 ng/ml) dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) complétementé avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2% de pénicilline, amphotéricine B et streptomycine (RPMI complet). Le milieu est changé à J4 et J6. A J7, un tri magnétique positif CD33 permet d'obtenir les HuMoSC (Figure 12).

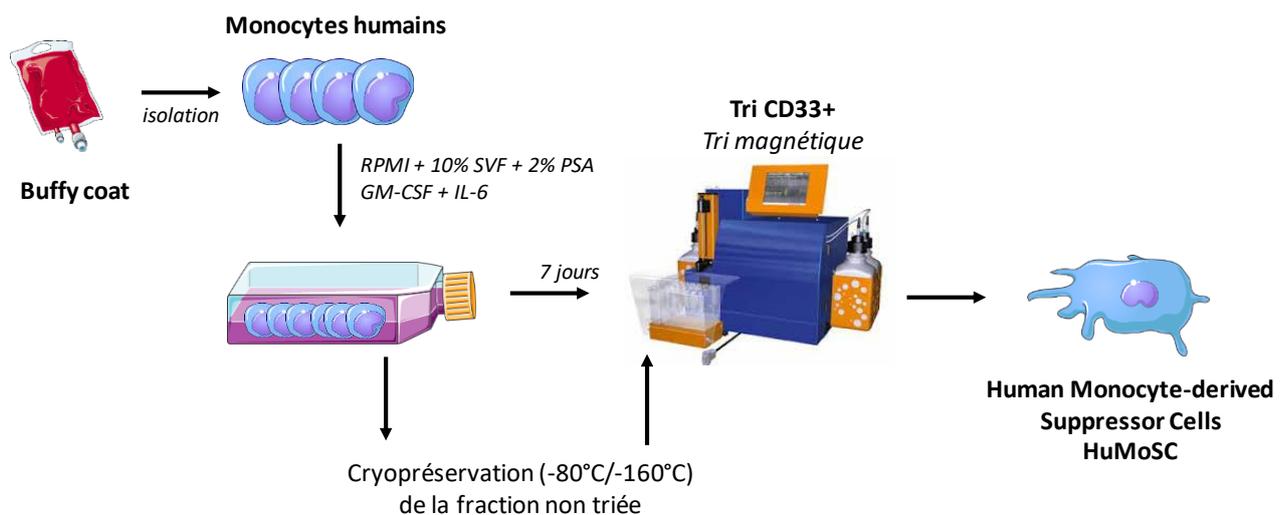


Figure 12 : Protocole de génération des HuMoSC. Des monocytes de patients ou de donneurs sains isolés après gradient de Ficoll puis de Percoll sont mis en culture pendant 7 jours en présence d'IL-6 et GM-CSF (10 ng/ml) afin d'obtenir un pool de cellules différenciées et indifférenciées appelés HuMoSC non triés. Après un tri magnétique positif CD33, on obtient les HuMoSC. D'après¹⁶⁸.

Ce protocole est rapide et facile à mettre en place.

6.2. Phénotype des HuMoSC et expression cytokinique

Un phénotype extensif des HuMoSC a été réalisé, porté sur des marqueurs d'identification de populations immunitaires (Figure 13) :

- Cellules myéloïdes : CD33, CD11c, CD11b, CD14, CD206, CD163, CD123, CD1a
- Cellules natural killer : CD16, CD56
- Cellules lymphocytaires : CD3, CD19

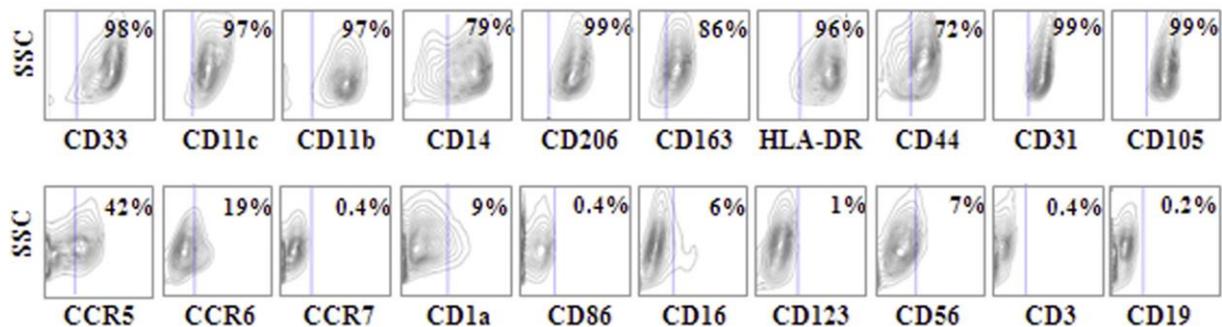


Figure 13 : Phénotype des HuMoSC déterminé par cytométrie en flux. Représentation des résultats de 10 expériences indépendantes. SSC, side scatter. D'après¹⁶⁸.

Les marqueurs myéloïdes sont fortement positifs, nous permettant par la suite de définir les HuMoSC comme des cellules CD33+ CD11b+. De même, le HLA-DR est fortement exprimé à la surface des HuMoSC en opposition aux MDSC qui sont CD33+ CD11b+ HLA-DR-/low 133. On peut alors émettre l'hypothèse que les HuMoSC seraient capables d'effectuer la présentation antigénique. Cependant, on note une faible expression du marqueur de co-stimulation CD86. Les HuMoSC expriment fortement le CD105 (endogline) et le CD31 qui sont des marqueurs endothéliaux ainsi que le chémorécepteur CCR5 permettant la migration des cellules myéloïdes.

De même, l'analyse du milieu de culture cellulaire après 48h a permis d'identifier trois cytokines sécrétées en grande quantité par les HuMoSC (Figure 14) :

- Le CCL-2 (ou MCP-1) : chémokine sécrétée par les cellules endothéliales, les macrophages et les myocytes entre autres. Elle permet l'attraction des monocytes ou des lymphocytes et est impliquée dans l'inflammation. Via la liaison avec le

récepteur CCR2 et CCR5, elle permet le recrutement des cellules immunitaires au niveau des sites inflammatoires¹⁶⁹. L'expression de CCR5 à la surface des HuMoSC pourrait représenter une boucle autocrine d'accumulation des HuMoSC.

- L'IL-6 : cytokine pro-inflammatoire, elle stimule la sécrétion des protéines de la phase aigüe de l'inflammation.
- L'IL-10 : cytokine immunosuppressive. La production d'IL-10 est un mécanisme immunosuppressif décrit chez les MDSC.

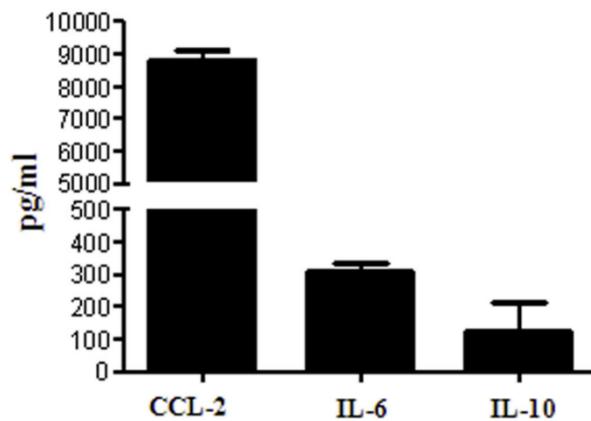


Figure 14 : Analyse multiplex du milieu de culture cellulaire des HuMoSC après 48h. D'après¹⁶⁸.

Les HuMoSC ne produisent pas ou très peu de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-5, IL12p70, CCL20, granzyme B, FasL soluble ou de TGF- β .

6.3. Propriétés immunosuppressives

6.3.1. Inhibition des lymphocytes T

Les HuMoSC sont également définies fonctionnellement par leur capacité à inhiber la prolifération des LT (Figure 15).

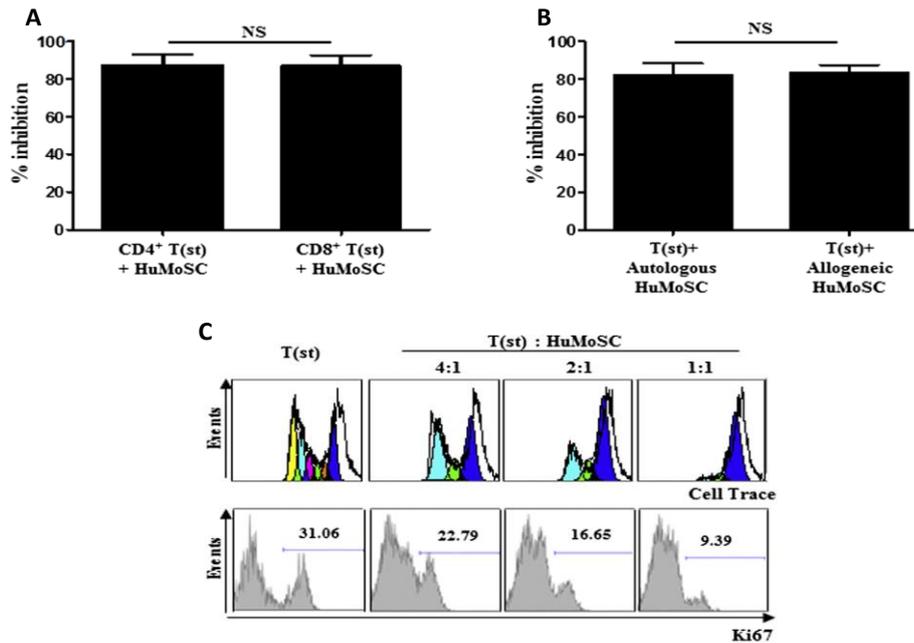


Figure 15 : Les HuMoSC inhibent la prolifération des lymphocytes T. A. Inhibition de la prolifération des CD4+ et CD8+. B. Inhibition de la prolifération des LT autologues et allogéniques. C. La capacité immunosuppressive des HuMoSC dépend du ratio LT/HuMoSC. D'après¹⁶⁸.

Les HuMoSC inhibent la prolifération des LT CD4+ et des LT CD8+ (Figure 15.A) et aussi la prolifération des LT allogéniques et autologues (Figure 15.B), comme il serait requis pour prévenir la survenue de GvHD après une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Il est à noter que la capacité immunosuppressive des HuMoSC dépend du ratio LT/HuMoSC (Figure 15.C).

Les HuMoSC inhibent la prolifération des LT mais aussi leur activation. L'expression de CD25 par les LT est diminuée quand ils sont mis en présence d'HuMoSC (Figure 16.A). De plus, leur production d'IFN- γ et de TNF- α est aussi fortement diminuée en présence d'HuMoSC (Figure 16.B).

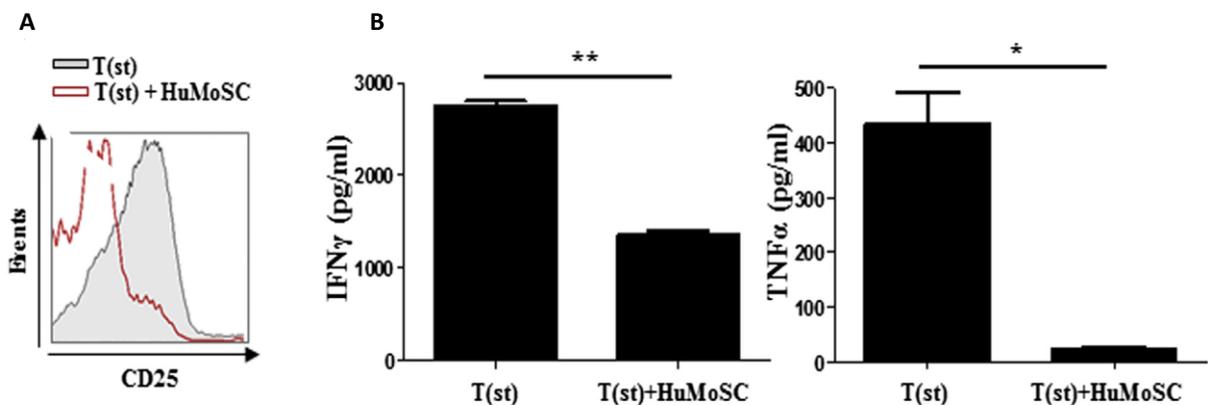


Figure 16 : Les HuMoSC inhibent l'activation des LT. A. Diminution de l'expression du marqueur CD25 par Les HuMoSC. B. Diminution de la production d'IFN- γ et TNF- α par les LT après incubation avec les HuMoSC. D'après¹⁶⁸.

6.3.2. Induction de lymphocytes T CD8+ régulateurs

L'induction et l'expansion de Treg est un mécanisme immunosuppresseur bien décrit chez les MDSC afin d'induire une immunosuppression au niveau du micro-environnement tumoral. Notre équipe a montré que les HuMoSC sont capables d'induire des Treg et plus particulièrement des CD8+ Treg *in vitro* et *in vivo* (Figure 17).

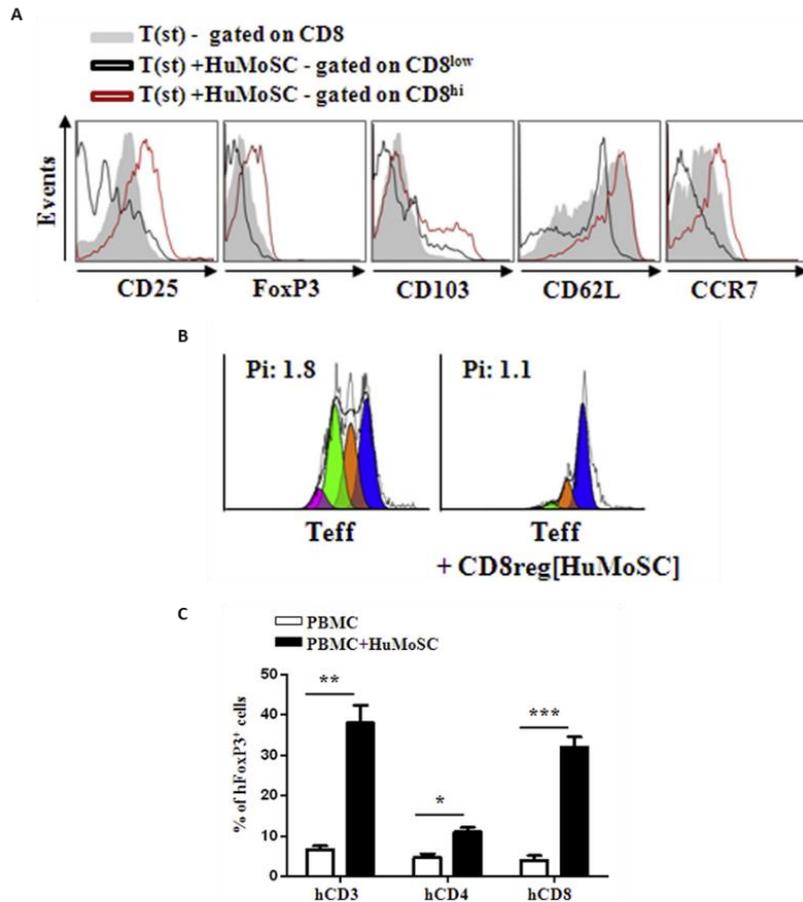


Figure 17 : Les HuMoSC induisent des Treg *in vitro* et *in vivo*. A. Expression de CD25, FoxP3, CD103, CD62L et CCR7 parmi les LT CD8^{low} et CD8^{high}. B. Les cellules CD8^{high}CD103⁺ ont été triées puis mis en culture avec des LT effecteur (Teff). C. Pourcentages des cellules sanguines FoxP3⁺ parmi les CD3⁺, CD4⁺ et CD8⁺ à J30 après l'injection de PBMC et/ou HuMoSC chez des souris NSG. D'après¹⁶⁸.

In vitro, la culture des LT en présence d'HuMoSC induit l'apparition d'une population de LT exprimant fortement le marqueur CD8, appelée CD8^{high} Treg. En effet, cette population exprime aussi fortement le CD25, FoxP3 et CD103 (Figure 17.A). De plus, ces LT CD8^{high} Treg expriment aussi le marqueur de homing CD62L ainsi que le récepteur aux chémokines CCR7. De façon intéressante, la population CD8^{high}CD103⁺ induite par les HuMoSC montre de fortes

capacités immunosuppressives (Figure 17.B). Enfin, *in vivo*, les HuMoSC induisent fortement une population CD8⁺FoxP3⁺ et plus faiblement une population CD4⁺FoxP3⁺ (Figure 17.C). Ces cellules ont de très fortes propriétés immunosuppressives. Il De façon intéressante, d'autres auteurs ont aussi rapporté une efficacité des CD8⁺ Treg dans la prévention de la GvHD ¹⁵³⁻¹⁵⁵

D'un point de vue mécanistique, l'activité immunosuppressive des HuMoSC dépend de facteurs solubles et ne nécessite donc pas un contact cellulaire direct (Figure 18.A). Les mécanismes immunosuppressifs principalement décrits comme l'Arg-1, l'iNOS, COX2 (cyclooxygénase 2), hème oxygénase 11,IDO ne sont pas utilisés par les HuMoSC car l'inhibition de ces voies ne modifie pas la capacité immunosuppressive des HuMoSC pour inhiber la prolifération des LT (Figure 18.B).

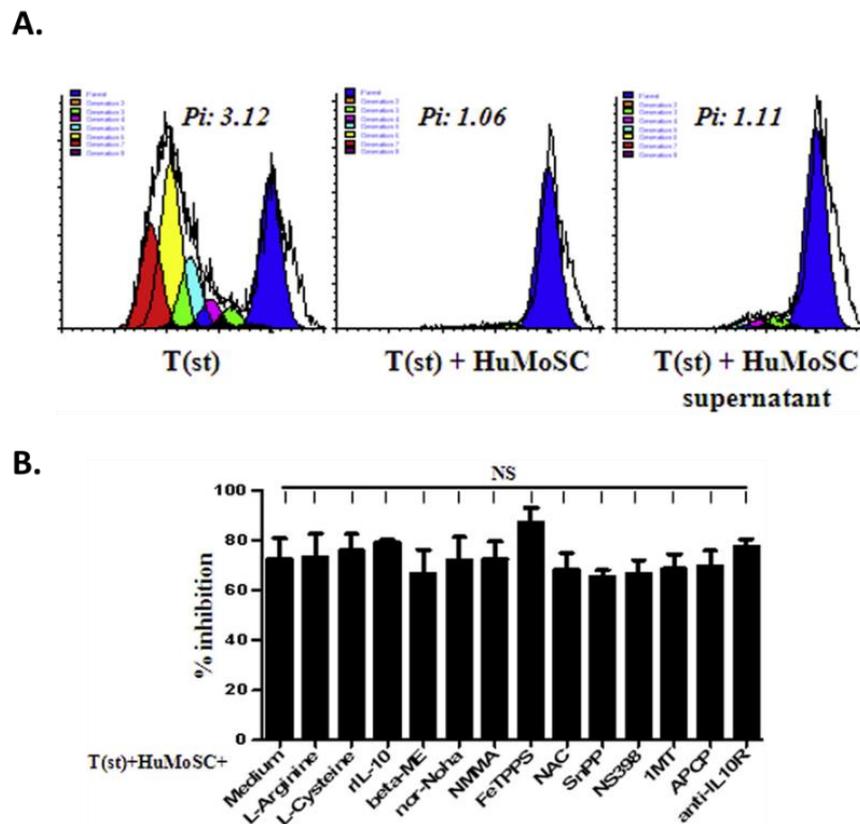


Figure 18 : Mécanismes immunosuppressifs des HuMoSC. A. La capacité des HuMoSC à inhiber la prolifération des LT ne nécessite pas de contact cellulaire. B. L'inhibition des voies immunosuppressives décrites dans la littérature n'impacte pas les capacités immunosuppressives des HuMoSC. Beta-ME (β -mercaptoéthanol) : prévention de l'oxydation de la cystéine ; nor-NOHA : inhibiteur de l'arginase 1 ; NMMA : inhibiteur de iNOS ; FeTPPS : accélérateur du catabolisme du peroxy-nitrite ; NAC : inhibiteur de ROS ; SnPP : inhibiteur de l'hème oxygénase ; NS398 : inhibiteur de COX2 ; 1MT : inhibiteur de IDO ; APCP : antagoniste de CD73. D'après¹⁶⁸.

En revanche, l'inhibition de l'expression du facteur de transcription STAT3 abroge totalement les capacités immunosuppressives des HuMoSC (Figure 19.A).

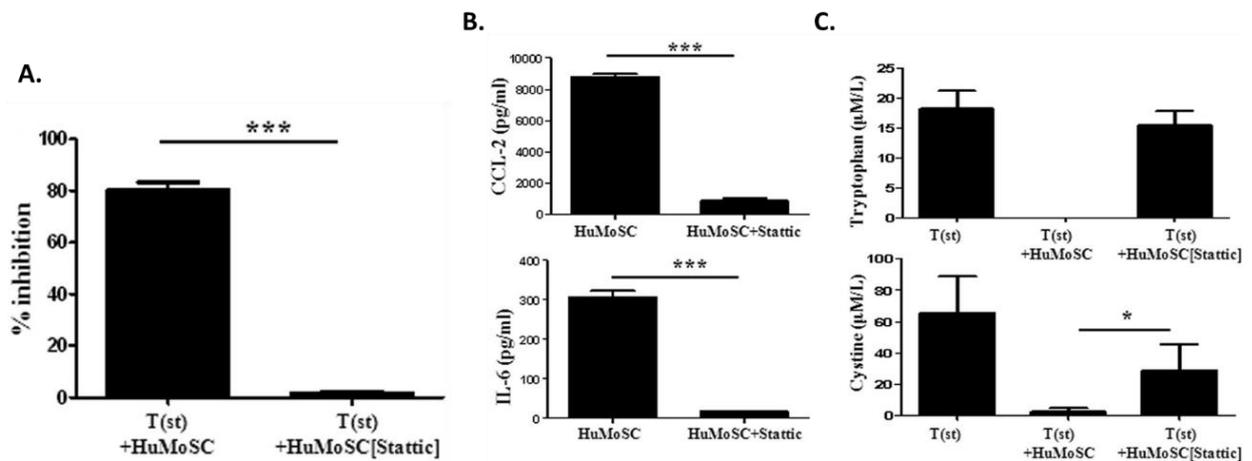


Figure 19 : L'inhibition de la prolifération des LT par les HuMoSC dépend de STAT3. A. Le traitement des HuMoSC par Stattic, inhibiteur de STAT3, rétabli la prolifération des LT. B. Le traitement des HuMoSC par Stattic diminue la production de CCL-2 et IL-6 par les HuMoSC. C. Le traitement des HuMoSC par Stattic augmente la production de cystéine dans le milieu de culture. D'après¹⁶⁸.

L'utilisation de l'inhibiteur Stattic diminue fortement l'expression d'IL-6 et CCL-2 et augmente la présence de cystéine dans le milieu de culture (Figure 19.B et 19.C). Ainsi, les fonctions immunosuppressives des HuMoSC dépendent de STAT3 avec une diminution de l'acide aminé essentiel, la cystéine.

6.4. Intérêt des HuMoSC dans un modèle xénogénique de GvHD aigüe

Dans un modèle xénogénique de GvHD aigüe chez la souris NSG, les HuMoSC ont montré leur efficacité dans la prévention de la survenue de la maladie. L'injection de 20×10^6 PBMC humains associées ou non à l'injection de 5×10^6 d'HuMoSC allogéniques chez des souris NSG a permis d'améliorer leur survie et le score de la GvHD (Figure 20).

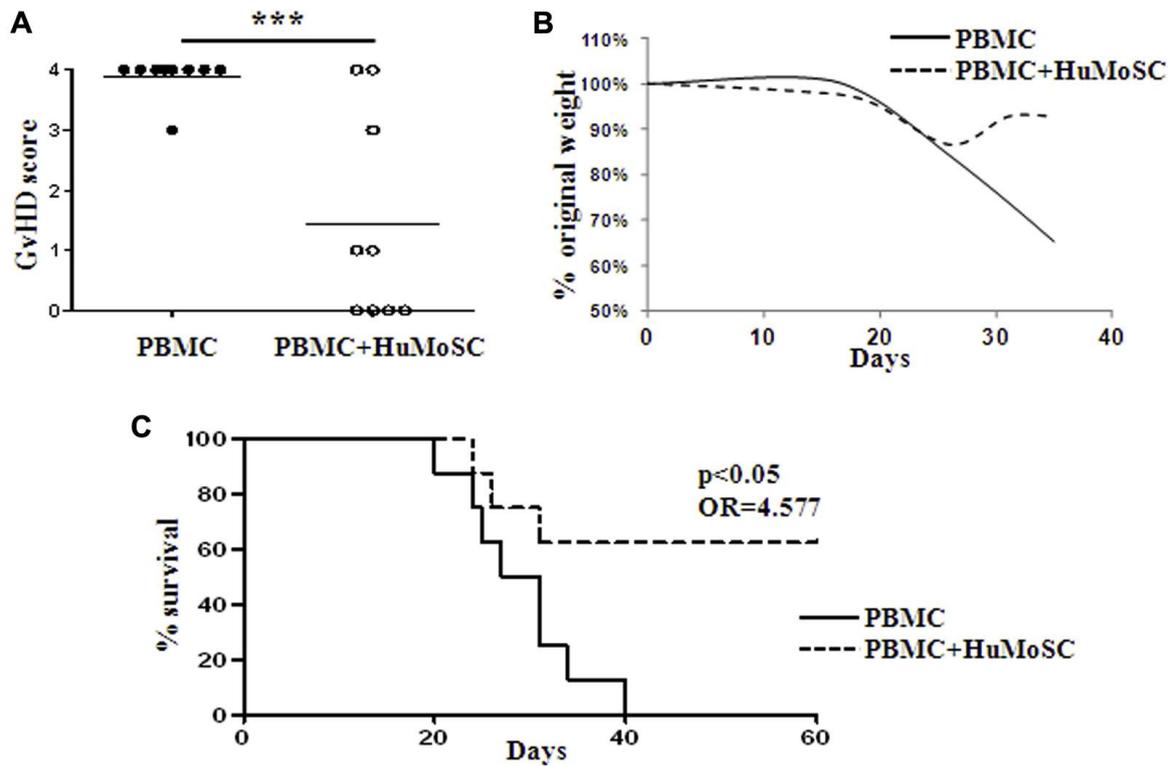


Figure 20 : L'injection d'HuMoSC permet de prévenir la survenue de la GvHD aigüe dans un modèle xénogénique. A. Score de GvHD à J50 après la greffe. B. Suivi du poids. C. Survie des souris dans le groupe traité et non traité. D'après¹⁵⁵.

D'un point de vue histologique, le traitement par les HuMoSC diminue l'infiltration des cellules immunitaires au niveau du foie avec également une baisse de la présence de corps apoptotiques comparé au groupe non traité. Enfin, l'induction de CD8⁺ Treg a été confirmée *in vivo* dans ce modèle, corroborant les résultats obtenus *in vitro*.

OBJECTIFS DE LA THESE

Mon travail de thèse s'est déroulé au sein de l'UMR 1098, dans l'équipe du Pr. Bonnotte. L'équipe travaille depuis de nombreuses années sur une nouvelle thérapie cellulaire immunosuppressive, les HuMoSC. Il s'inscrit dans la suite des travaux réalisés par les Dr. Janikashvili et Dr. Brazdova.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la fois aux cellules, les HuMoSC, mais aussi à des produits dérivés de ces cellules, le surnageant d'HuMoSC et de CD14-HuMoSC. En effet, le surnageant d'HuMoSC avait montré des résultats préliminaires prometteurs dans l'inhibition de la prolifération lymphocytaire. L'ensemble de ce travail permet de confirmer l'intérêt des HuMoSC dans la prévention de la GvHD mais aussi d'expliquer leurs mécanismes d'action via l'étude du surnageant qui s'est avéré être aussi un produit thérapeutique potentiel dans la résolution de l'inflammation.

Notre équipe avait montré l'efficacité des HuMoSC dans la prévention de la GvHD dans des expériences *in vitro* et dans un modèle murin xénogénique. Cependant, avant de prévoir une utilisation thérapeutique de ces cellules chez l'Homme, il était important d'évaluer si les HuMoSC gardaient leurs propriétés immunomodulatrices dans un environnement inflammatoire mais également en présence d'immunosuppresseurs classiquement utilisés dans la prévention de la GvHD. De plus, il était indispensable d'évaluer si cette thérapie cellulaire n'affectait pas l'effet GvL, effet positif recherché par la greffe de CSH. Le premier objectif de cette thèse a donc été d'évaluer l'intérêt thérapeutique des HuMoSC dans des conditions cliniques mais aussi d'évaluer les bénéfices de cette thérapie sur l'effet GvL (Article 1).

Nous nous sommes ensuite heurtés à un problème de rendement cellulaire trop faible de notre protocole de génération des HuMoSC et un problème de manque d'anticorps anti-CD33 de grade GMP pour produire un produit thérapeutique entièrement GMP. Nous avons alors modifié notre protocole et sélectionné toutes les cellules CD14+ après la culture au lieu de ne prendre que les CD33+. Cette modification nous a permis de disposer d'un nombre de cellules beaucoup plus important en utilisant un protocole de génération entièrement GMP. De plus afin de disposer d'un produit plus facile à utiliser qu'une thérapie cellulaire, nous nous sommes intéressés aux surnageants des HuMoSC et des CD14-HuMoSC. Le second objectif a été d'étudier les propriétés immunosuppressives des surnageants de CD14-HuMoSC (Article 2) et d'HuMoSC (résultats complémentaires) sur les LT et sur les DC, puis d'évaluer leur intérêt

dans la prévention de la GvHD dans un modèle murin xénogénique de GvHD. Parallèlement, afin d'élucider les mécanismes immunosuppresseurs de ces surnageants, une étude protéomique complétée par une étude multiplex a été réalisée.

RESULTATS

RESULTATS

Article 1: “Efficiency of human monocyte-derived suppressor cell-based treatment in graft-versus-host disease prevention while preserving graft-versus-leukemia effect”

Article accepté pour publication dans *Oncoimmunology*

Résumé article 1

La thérapie cellulaire basée sur les cellules immunosuppressives est une thérapeutique alternative récente pour la prévention de la GvHD. De nombreux travaux ont montré la plasticité des cellules suppressives utilisées dans des conditions inflammatoires. Ces cellules peuvent alors perdre leurs propriétés suppressives, voire se différencier en cellules effectrices pro-inflammatoires. Or, l'allogreffe s'accompagne d'une réaction inflammatoire systémique. Afin de compléter les connaissances sur les HuMoSC, il était indispensable d'étudier si les HuMoSC conservaient leurs capacités suppressives dans des conditions inflammatoires et en présence d'immunosuppresseurs couramment utilisés en prophylaxie de la GvHD dans la transplantation de CSH. De plus, il était nécessaire de montrer que les HuMoSC n'altéraient pas l'effet bénéfique de la greffe qui est l'effet GvL. En outre, il fallait aussi s'assurer sur le plan pharmaceutique qu'il était possible de produire les HuMoSC dans le respect des BPF et de les conserver pendant un temps relativement long.

Afin de mimer les conditions inflammatoires, nous avons donc créé un environnement inflammatoire *in vitro* constitué soit de cytokines pro-inflammatoires (IL2, IL1 β , TNF- α , IFN- γ), soit de ligands de TLR (LPS, PAM3CSK4, Poly I:C, flagelline). Nous avons évalué les propriétés immunosuppressives des HuMoSC à savoir, l'inhibition de la prolifération des PBMC mais aussi leur capacité à induire des CD4 et CD8 Treg dans ces différentes conditions. En présence d'immunosuppresseurs (MTX, CsA, MP) nous avons étudié les mêmes paramètres. Ensuite, nous avons étudié si le cyclophosphamide (CTX) en prévention n'altérait pas l'effet des HuMoSC dans un modèle de murin xénogénique de GvHD. Dans un second temps nous avons injecté des cellules leucémiques, cellules Cal-1 (lignée humaine de cellules dendritiques plasmacytoïdes néoplasiques) à des souris NSG puis nous les avons irradiées et les souris ont reçu comme xéngreffe des PBMC humains. Ce modèle artificiel a été réalisé pour étudier si les HuMoSC permettaient de conserver l'effet GvL tout en protégeant de la survenue de la GvHD. Enfin, il était important d'établir les conditions de conservation et de production des HuMoSC dans des conditions GMP afin de pouvoir ensuite les administrer au patient.

Nous avons montré que les HuMoSC inhibaient la prolifération des PBMC en présence de plusieurs cocktails pro-inflammatoires. De même, l'induction des CD4 et CD8 Treg par les HuMoSC a été conservée dans des conditions inflammatoires. Ces résultats sont encourageants car il a été montré pour d'autres thérapies cellulaires utilisant des cellules suppressives, qu'un

environnement inflammatoire altérerait leur fonction immunosuppressive. Ces données *in vitro* confirment les résultats obtenus *in vivo* dans notre modèle de GvHD qui montraient une induction de CD4 et CD8 Treg conservée¹⁶⁸. De même, les immunosuppresseurs, et notamment la CsA, ne diminuent ni la capacité des HuMoSC à inhiber la prolifération des PBMC ni leur aptitude à induire des CD4 et CD8 Treg. Nous faisons l'hypothèse que les HuMoSC pourraient permettre une diminution de la dose d'immunosuppresseurs administrés au patient, il faudra réaliser des expériences complémentaires pour le démontrer. Nous avons montré *in vivo* en utilisant ce modèle xénogénique de GvHD utilisant la souris NSG que les souris traitées par HuMoSC + CTX 10mg/kg et le groupe traité par CTX seul avaient une amélioration significative de leur survie. En revanche, à J100, environ 60% des souris traitées avec des HuMoSC + CTX 10mg/kg étaient vivantes alors que seulement environ 20% des souris traitées par CTX 10mg/kg seul étaient vivantes. Le CTX seul ne permet donc pas une survie à long-terme. On observe également une amélioration significative du score de GvHD. Ainsi, le CTX n'inhibe pas l'effet protecteur des HuMoSC et grâce aux HuMoSC, il serait possible de diminuer la dose de CTX et conserver les effets bénéfiques du traitement. Enfin, notre équipe a également montré que les HuMoSC n'altèrent pas l'effet GvL car elles permettaient une amélioration significative de la survie ($p=0.0002$) sans rechute de la leucémie. Enfin, les HuMoSC peuvent être générées et conservées en grade et qualité clinique.

La conclusion de cette première partie est que les HuMoSC sont une thérapie cellulaire efficace dans des contextes inflammatoires car elles conservent leurs fonctions immunomodulatrices. De plus, un traitement immunosuppresseur n'impacte pas leurs capacités et de façon intéressante, les HuMoSC semblent avoir un effet synergique avec les immunosuppresseurs, ce qui permettrait de diminuer leur dose. Enfin, l'effet GvL n'est pas inhibé par cette thérapie et la prévention de la GvHD est conservée, sans rechute de la leucémie. La production et la conservation compatible avec une utilisation en clinique confortent l'hypothèse que les HuMoSC sont une thérapie prometteuse dans la prévention de la GvHD mais aussi pour toutes les maladies inflammatoires.

Title: Efficiency of human monocyte-derived suppressor cell-based treatment in graft-versus-host disease prevention while preserving graft-versus-leukemia effect

Nona Janikashvili^{1,2*}, Claire Gérard^{1,3*}, Marine Thébault¹, Andrea Brazdova^{1,4}, Clovis Boibessot^{1,5}, Claudie Cladière¹, Marion Ciudad¹, Hélène Greigert¹, Séthi Ouandji¹, Thibault Ghesquière^{1,3}, Maxime Samson^{1,3}, Sylvain Audia^{1,3}, Philippe Saas⁶ and Bernard Bonnotte^{1,3}

¹Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, RIGHT Interactions Greffon-Hôte-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-21000 Dijon, France

²Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tbilisi State Medical University (TSMU), Tbilisi, Georgia

³University Hospital, Department of Internal Medicine, F-21000 Dijon, France

⁴Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

⁵University Hospital of Québec – Laval University, Experimental uro-oncology Laboratory, Québec, Canada

⁶Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, RIGHT Interactions Greffon-Hôte-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France

*NJ and CG contributed equally to this work.

Corresponding author: Bernard Bonnotte, MD/PhD

INSERM UMR 1098, Faculty of Medicine, University of Bourgogne Franche-Comté;

15 bd du mal de Lattre de Tassigny, 21070 Dijon, France;

E-mail: Bernard.Bonnotte@u-bourgogne.fr

Telephone: +33(0)3 80 39 33 55

Fundings

This study was supported by SATT Sayens to N.J and B.B, the Agence Nationale de la Recherche (Labex LipSTIC, ANR-11-LABX-0021), the Ligue contre le cancer (Comité Grand-Est) and the Conseil Régional de Franche-Comté (“soutien au LabEX LipSTIC”) to P.S.

Abstract

Background: Immunosuppressive cell-based therapy is a recent strategy for controlling Graft-*versus*Host Disease (GvHD). Such cells ought to maintain their suppressive function in inflammatory conditions and in the presence of immunosuppressive agents currently used in allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT). Moreover, these therapies should not diminish the benefits of allo-HCT, the Graft-*versus*-Leukemia (GvL) effect. We have previously reported on a novel subset of human monocyte-derived suppressor cells (HuMoSC) as a prospective approach for controlling GvHD.

Objective: The objective of this study was to explore the therapeutic relevance of the HuMoSC in clinical conditions.

Methods: Immune regulatory functions of HuMoSC were assessed in inflammatory conditions and in the presence of immunosuppressants. The therapeutic efficiency of the association of HuMoSC with immunosuppressants was evaluated in an experimental model of GvHD induced by human PBMC in NOD/SCID/IL2-R $\gamma_c^{-/-}$ (NSG) mice.

Results: Interestingly, the inhibitory functions of HuMoSC against T lymphocytes and their ability to polarize Treg are preserved, *in vitro*, in inflammatory environments and are not affected by immunosuppressive agents. *In vivo*, the association of HuMoSC-based treatment with an immunosuppressive drug showed a synergistic effect for controlling GvHD. Furthermore, HuMoSC control GvHD while preserving GvL effect in a xeno-GvHD conditioned mouse model with cell neoplasm (CAL-1). HuMoSC are generated according to good manufacturing practices (GMP) and we demonstrated that these cells tolerate long-term preservation with unaltered phenotype and function.

Conclusion: HuMoSC-based therapy represents a promising approach for controlling GvHD and could be quickly implemented in clinical practice.

Key messages

HuMoSC keep their regulatory functions in inflammatory conditions and in the presence of immunosuppressants *in vitro* and *in vivo*.

HuMoSC do not impair GvL effect.

HuMoSC tolerate long-term cryopreservation with unaltered viability, phenotype and function and could be quickly implemented in clinical practice.

Capsule summary

HuMoSC cell-based therapy can be used to prevent GvHD because HuMoSC do not lose their immune regulatory properties in clinical settings of allograft patients and preserve GvL effect.

HuMoSC can be long-term preserved without alterations.

Key words

Human monocyte-derived suppressor cells, T lymphocytes, regulatory T cells, graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia effect, inflammation, immunosuppressive drugs

Abbreviations

GvHD: Graft-versus-host disease

GvL: Graft-versus-leukemia

HuMoSC: Human monocyte-derived suppressor cell

NSG mice: NOD/SCID/IL2-R $\gamma_c^{-/-}$ mice

Allo-HCT: allogeneic hematopoietic cell transplantation

GMP: Good manufacturing product

CTX: Cyclophosphamide

CsA: Cyclosporine A

MP: Methylprednisolone

MTX: Methotrexate

MSC: Mesenchymal stromal cells

Treg: Regulatory T cells

ATMP: Advanced Therapy Medicinal Product

Introduction

Clinical applications of allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT) are severely limited due to the extremely toxic and often lethal side effect known as graft-*versus*-host-disease (GvHD), which occurs in up to 50% of patients receiving allo-HCT. Donor T cells are the major effectors of the allogeneic response responsible for both the GvHD and the graft-*versus*-leukemia (GvL) effect. To prevent the deleterious expansion of pathogenic T cells, steroids and immunosuppressive drugs are generally used in current clinical practice. These commonly cause general immune suppression, resulting in severe infections or patient relapse by limiting the effectiveness of allo-HCT. Therefore, a strategy to induce a sustained state of tolerance with preservation or minimal attenuation of the GvL effect remains the main challenge for allo-HCT.

Immunosuppressive/regulatory immune cell-based therapy is a relatively recent approach for treating inflammatory disorders ^{1,2}. The main mechanisms of action of such cells are directed towards the restoration of dysregulated immune balance rather than the induction of conventional immunodepression, which is an unavoidable problem when using immunosuppressive drugs. However, the implementation of immunosuppressive cell therapy in clinical contexts has been limited by their low frequency in humans ³. The possibility of generating or clonally expanding such cells *ex vivo* has become a major focus in the field. Moreover, the inflammatory environment with high concentrations of pro-inflammatory cytokines could change the fate of these suppressive cells, and convert them into inflammatory cells, such as Treg into pathogenic T cells ⁴ or myeloid cells into iNOS-producing DC ⁵. This plasticity of immunosuppressive cells in inflammatory conditions, such as GvHD, could explain the low efficacy of immunosuppressive cell therapies in these contexts ^{3,6,7}.

We have previously reported on an original approach to obtain *ex vivo* large numbers of human myeloid suppressor cells generated from circulating monocytes, and referred to them as human monocyte-derived suppressor cells (HuMoSC) ⁸. HuMoSC are highly potent at inhibiting the proliferation and activation of autologous and allogeneic effector T lymphocytes in a STAT3-dependent manner. HuMoSC induce long-lasting memory FoxP3⁺CD8⁺ regulatory T lymphocytes, and significantly reduce GvHD induced by human PBMC in NOD/SCID/IL2-R $\gamma_c^{-/-}$ (NSG) mice. Therefore, HuMoSC can be considered an efficient therapeutic tool to prevent GvHD during allotransplantation.

In this work, we demonstrate that HuMoSC maintain their immunosuppressive properties in inflammatory settings and in the presence of anti-inflammatory and immunosuppressive agents, such as methylprednisolone, methotrexate and cyclosporine, currently used in clinical practice in alloHCT patients. *In vivo*, the association of HuMoSC-based treatment with an immunosuppressive drug showed a synergistic effect for controlling GvHD. Moreover, HuMoSC preserve the GvL effect *in vivo*. Of clinical relevance, HuMoSC tolerate long-term preservation with unaltered viability and inhibitory functions. Furthermore, the process has been improved and HuMoSC are now generated according to good manufacturing practices (GMP). These results provide a rationale for the application of HuMoSC to prevent GvHD in future clinical trials.

Methods

Generation of HuMoSC

Peripheral blood cell samples from healthy donors were collected at the French Blood Center (EFS BFC, Besançon, France) after obtaining written informed consent in compliance with the Declaration of Helsinki. Sample collection was approved by the French Ministry of Higher Education and Research (agreement number #AC-2015-2408 of May 22th 2015). HuMoSC were generated as described previously⁸. Briefly, PBMC were isolated from buffy coats of healthy donors by Ficoll density gradient centrifugation. Monocytes were purified from PBMC by Percoll density gradient centrifugation. HuMoSC were generated by incubating monocytes (1×10^6 cells/ml) in RPMI 1640 (BioWhittaker, Basel, Switzerland) supplemented with 10% FBS and recombinant human GM-CSF (10 ng/ml) and IL-6 (10 ng/ml) (both from Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) for 7 days. GMP grade cytokines were used in the indicated experiments. Finally, the cultured cells were harvested and cryopreserved in complete medium supplemented with 10% DMSO.

Magnetic cell isolation and sorting

HuMoSC were purified by magnetic cell sorting using human CD33⁺ isolation kits and an autoMACS-ProTM separator according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec).

Antibodies and flow cytometry analysis

Flow cytometry analyses were performed as previously reported³⁶ using monoclonal antibodies against CD33, CD11b, CD3, CD4, CD8, CD25, CD39, CD103. Treg were stained with anti-Foxp3 (Alexa 488) (Human Treg FlowTM Kit, Biolegend). Cells were analyzed using an LSRII cytometer (BD Biosciences) and FlowJo[®] software (version 10.0.7r2) was used for data analysis.

T cell proliferation and suppression assays

PBMC were stained using Cell Trace Violet according to the manufacturer's procedure (Cell TraceTM, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Labeled cells were cultured with anti-CD3/CD28coated T cell expander beads (Dynabeads, Invitrogen) with or without HuMoSC (T

cell to HuMoSC ratio = 4:1). T cell division was detected after 5 days by Flow Cytometry using an LSRII cytometer (BD Biosciences) and analyzed using ModFit[®] software (version 5.0). The suppressive activity of HuMoSC against responder cells was evaluated in the presence or absence of pro-inflammatory cytokines or TLR ligands, at the indicated concentrations: human recombinant IL-2 (20 UI/ml), IFN γ (25 ng/ml), TNF- α (25 ng/ml), IL-1 β (25 ng/ml), and LPS (50 ng/ml, TLR4 ligand), Pam₃Cys-SK4 (50 ng/ml, TLR2 ligand), Poly I:C (50 μ g/ml, TLR3 ligand), Flagellin (50 ng/ml, TLR5 ligand). In the separate experiments, anti-inflammatory and immunosuppressive agents, such as methylprednisolone (MP, 25 ng/ml), methotrexate (MTX, 2.5 ng/ml) and cyclosporine (CsA, 5 ng/ml) were added to stimulated PBMC only or PBMC+HuMoSC co-cultures. Responder cell division was evaluated as described above.

Leukemia model

Mice were bred and maintained according to both the Federation of Laboratory Animal Science Associations and the Animal Experimental Ethics Committee guidelines (University of Burgundy, Dijon, France). NOD/SCID/IL-2R $\gamma_c^{-/-}$ (NSG) male mice were purchased from the Jackson Laboratory and housed in specific pathogen-free conditions and were used at 6 weeks of age. To establish the leukemia model, different numbers, ranging from 1 to 10×10^6 plasmacytoid dendritic cell (pDC) neoplasm, CAL-1 cells (kindly provided by Prof. T. Maeda [Nagasaki University, Japan] via Prof. P. Saas) per mouse were inoculated intraperitoneally. Mice were scored every day for two weeks for clinical signs of leukemia (reduced mobility, red spots on the skin, paralysis). Once the tumor established, the mice were given low-dose irradiation (2 Gy) and engrafted with human PBMC as described below.

Xenogeneic mouse model of GvL/GvHD

For xeno-GvHD induction, mice were irradiated (2Gy) six hours before the injection of 10×10^6 human PBMC with or without 2.5×10^6 HuMoSC followed or not by one intraperitoneal injection of cyclophosphamide (CTX) at the notified dose. PBMC were mixed with HuMoSC before the injections. Each mice were scored twice a week in a blinded fashion for clinical signs of GvHD (weight loss, general appearance of the fur and mobility). Mice were euthanized when the clinical endpoints were reached (>15% weight loss, hunched posture, ruffled fur, reduced mobility, tachypnea). Animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Burgundy.

Statistical analysis

GraphPad Prism[®] 7 (GraphPad Software) was used for the analyses. Student's *t*-test was used, when appropriate. One-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test were used when comparing more than two groups. Overall survival was calculated as the time from the day of injection of PBMC or tumor cells to death. Kaplan-Meier curves were plotted and differences were evaluated using the log-rank test. For all statistical analyses, a 2-tailed p-value of less than 0.05 was considered significant.

Results

HuMoSC maintain suppressive potential in different inflammatory environments.

We have previously reported on a novel procedure for producing *ex vivo* clinically applicable suppressor cells of monocytic origin, referred to as HuMoSC. HuMoSC exhibit features of immunosuppressive/regulatory CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD163⁺CD206⁺HLA-DR⁺ cells. Our recent data also indicate that HuMoSC are able to inhibit the proliferation of responder T lymphocytes and to regulate inflammatory responses. Before using these cells as therapy for controlling flares of autoimmune diseases or GvHD, the ability of these cells to maintain their immunosuppressive properties, such as inhibition of T cell proliferation and induction of Treg differentiation, in inflammatory environments had to be demonstrated. To identify HuMoSC suppressive potential in these situations, HuMoSC co-cultured with stimulated PMBC were exposed to several proinflammatory cytokines or different TLR ligands to mimic inflammatory conditions. The addition of pro-inflammatory cytokines, such as IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1 (Figure 1A) or TLR ligands, such as LPS, Pam₃Cys-SK4, Poly I:C, Flagellin, used at high doses solely or as a mixture (Figure 1B), did not impair the ability of HuMoSC to inhibit T cell proliferation. Furthermore, the ability of HuMoSC to induce Treg differentiation, either CD4 Treg or CD8 Treg, was not diminished when inflammatory cytokines (Figure 1C, E) or TLR ligands (Figure 1D, F) were added to the culture. Moreover, CD103 and CD39 expression by CD8 Treg induced by co-culture with HuMoSC was not decreased in inflammatory environments, for example, in the presence of inflammatory cytokines or TLR ligands (data not shown).

HuMoSC treatment allows dose reduction of immunosuppressive drugs currently used to control GvHD.

Patients suffering from autoimmune or inflammatory diseases and patients undergoing alloHCT are usually treated with immunosuppressants. Before using HuMoSC therapy for GvHD prevention or treating flares of autoimmune diseases, it is essential to check that these drugs do not affect the therapeutic potential of HuMoSC. HuMoSC co-cultured with PBMC

were exposed to clinically relevant doses of anti-inflammatory and immunosuppressive agents, such as methylprednisolone, methotrexate and cyclosporine, currently used for GvHD prevention and treatment in allo-HCT in leukemia patients. As these treatments themselves show certain levels of suppression against proliferating PBMC, the chosen dose was the highest dose of each drug which does not strongly inhibit T cell proliferation when stimulated with anti-CD3/CD28 microbeads. Of therapeutic relevance, our data demonstrate that the inhibitory function of HuMoSC against T cell proliferation was not affected by anti-inflammatory and immunosuppressive agents, such as methylprednisolone, methotrexate and cyclosporine, which are currently used in clinical practice (Figure 2A). Moreover, the ability of HuMoSC to induce Treg differentiation, particularly CD8 Treg, which express CD39 and CD103 (data not shown), was preserved in the presence of immunosuppressants used to prevent GvHD (Figure 2 B-C). Furthermore, immunosuppressive treatments used for GvHD prevention did not impair the suppressive properties of HuMoSC *in vivo* (Figure 2D). The dose of 10 mg/Kg of cyclophosphamide (CTX) was chosen because this dose protected mice against GvHD with 80% of survival at day 60 whereas all the control mice were dead at the same time. However, CTX 10 mg/Kg did not induce a long-time protection of NSG (NOD/SCID/IL2-R $\gamma_c^{-/-}$) mice against xenogenic GvHD for a long time, because only approximately 20% of the mice were still alive at day 100. Interestingly, the addition of HuMoSC to CTX 10 mg/Kg significantly delayed GvHD occurrence and increased survival, with 65% of mice still alive at day 100 (Figure 3A). Therefore, we demonstrated that CTX did not inhibit the protective effect of HuMoSC and interestingly, the addition of HuMoSC with CTX showed a synergistic effect for controlling GvHD.

HuMoSC control acute xeno-GvHD while preserving the GvL effect

We have previously reported that HuMoSC reduce GvHD symptoms *in vivo*, resulting in prolonged animal survival⁸. To further determine whether the HuMoSC-based treatment influences GvL activity of the adoptively transferred PBMC, HuMoSC were applied in a clinically relevant model of GvL. We therefore first established the model of leukemia using the human pDC leukemia cell line, CAL-1. CAL-1 cells acquire the pDC phenotype co-expressing BDCA4 and CD123 (data not shown) and are easily detectable in the spleen and bone marrow of NSG mice 15 days after intravenous inoculation at a dose of 5×10^6 cells (data not shown). In our tumor model, four groups of NSG mice were inoculated intravenously with

different numbers of CAL-1 cells (from 1 to 10×10^6 per mouse) (Figure 3A). Tumor signs and survival were followed for 21 days. Mice injected with 1 and 2×10^6 leukemic cells showed mild disease symptoms while the groups injected with higher numbers of cells became paralyzed in a shorter period of time. Based on this observation, we chose to inject 5×10^6 leukemic cells per mouse, which, in the progressive tumor development, gives a large enough window for therapeutic intervention (Figure 3A-3B). Next, in the tumor-bearing mice, we optimized the irradiation dose (2 Gy) and the PBMC count (10×10^6 per mouse) to achieve successful engraftment (Figure 3C). Following the optimization steps, we carried out the complete experiment according to the timeline depicted in Figure 3D. Briefly, mice were inoculated with 5×10^6 of CAL-1 leukemic cells at day 0 and given low dose (2 Gy) irradiation at day 7 followed by the engraftment of 10×10^6 PBMC with or without HuMoSC co-administration at day 8. A group without PBMC engraftment was used as the control for leukemia recurrence post-irradiation. Tumor growth, GvHD symptoms and survival were followed in all groups for 40 days.

All mice receiving CAL-1 leukemic cells alone died from leukemia, whereas mice receiving PBMCs without HuMoSC also died quickly but from GvHD. Interestingly, PBMC injection efficiently provided a GvL effect, which significantly increased survival ($p=0.0305$). At day 25, 90% of the mice receiving CAL-1 cells alone had died as had 60% of mice receiving CAL-1 cells + PBMC, whereas 80% of mice receiving CAL-1 cells + PBMC + HuMoSC showed long-term disease-free survival. Interestingly, none of the mice receiving PBMCs + HuMoSC died from leukemia, thus demonstrating that HuMoSC do not impair the GvL effect in this model. Altogether, we demonstrated that the co-administration of HuMoSC with PBMC efficiently delayed the development of GvHD in NSG mice without increasing the recurrence of leukemia, resulting in significantly improved overall survival (leukemic cells *versus* leukemic cells + PBMC + HuMoSC, $p=0.0002$) (Figure 3E). These results also showed that HuMoSC maintain their GvHD-prevention effect in an *in vivo* model mimicking allo-HCT conditions.

Clinical grade HuMoSC can be generated

HuMoSC tolerate long-term cryopreservation with unaltered viability, phenotype and function (Figure 4A-4B). The same qualities are preserved when the cell culture medium is replaced by clinically used albumin solution in cell transfusion procedures. Moreover, HuMoSC

remain stable at room temperature or at 4°C for a long period of time, long enough for clinical transfusions (Figure 4C-4D). Of great clinical importance, HuMoSC can be generated in GMP conditions with a comparable CD33⁺CD11b⁺ phenotype (Figure 6E) and strong suppressive function (> 75% of inhibition of proliferation) against stimulated CD4 and CD8 T lymphocytes (Figure 4F).

Discussion

Immunosuppressive cell-based therapy may make it possible to reduce doses of immunosuppressive drugs being administered to patients with auto-immune diseases and/or to patients who have undergone allogeneic transplantation. We have already developed a clinically relevant and feasible approach to generate *ex vivo* a subpopulation of HuMoSC that can be used as an efficient therapeutic tool to prevent inflammatory disorders. The therapeutic efficacy of HuMoSC was determined in the xenogeneic GvHD mouse model in which the disease was induced by injecting human PBMC. In the present report, we further investigated the practical potential of this HuMoSC therapy. It is evident that the overwhelming positive results of suppressive cell therapies reported from *in vitro* and preclinical animal studies have for the most part not yet translated into full clinical efficacy. Clearly, there is still much to be learned with regard to the *in vivo* interactions of cell therapies in human pathological states. The preservation of the suppressive capacity of cell therapies after injection into patients is crucial. Unlike other cell therapies, such as those with Treg, which converted into different types of ex-Treg cells under inflammatory conditions⁶ or autoimmune diseases^{4,7,9}, HuMoSC maintain their suppressive properties under inflammatory conditions. The suppressive properties of HuMoSC, such as the ability of HuMoSC to inhibit T cell proliferation, are not affected by LPS and other TLR ligands or inflammatory cytokines^{10,11}, whereas those of mesenchymal stromal cells (MSC) are. However, the effect of *in situ* inflammation on MSC activation status varies depending on the level and type of inflammation¹². Moreover, Treg induction by HuMoSC is not affected by TLR ligands.

Methotrexate, cyclosporine and methylprednisolone are widely used immunosuppressive drugs to prevent/treat GvHD after alloHCT. The general immunosuppression following their administration may lead to the development of opportunistic infections and patient relapse. In this study, we demonstrated that HuMoSC can be used in the presence of these drugs and, more importantly, we showed synergistic effect that would allow to lower the doses of immunosuppressive drugs administered to patients. It has been shown that mouse MDSC cultured in the presence of cyclosporine are increased with no alteration of their phenotype and, moreover, these MDSC exhibited enhanced immunosuppression via the iNOS pathway¹³. In our study, we showed *in vitro* that HuMoSC retained their suppressive effect against T cell proliferation and promoted Treg induction in the presence of cyclosporine. This result could be surprising because it has been demonstrated that

cyclosporine inhibits induction of Ag-specific CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs *in vivo*¹⁴⁻¹⁶, as the survival and suppressive activity of Treg depend on exogenous IL-2¹⁷. This result suggests that as HuMoSC do not produce IL-2, they promote Treg expansion through another pathway. For instance, Ruppert *et al* showed that regulatory T cells were able to resist cyclosporine-induced cell death *via* CD44 cross-linking by hyaluronan, which promoted IL-2 independent FoxP3 expression¹⁸. The impact of associating immunosuppressive cells and immunosuppressive drugs has also been evaluated in Treg therapy. In a GMP generation protocol of Treg, the presence of immunosuppressive drugs, *i.e.* tacrolimus, mycophenolic acid (active metabolite of mycophenolate mofetil) and methylprednisolone, affected the viability and proliferation of expanded Treg *in vitro* and *in vivo*²⁰. Here, we showed that HuMoSC do not lose their suppressive activity when exposed to these immunosuppressive drugs, which are routinely used in patients treated for GvHD or autoimmune diseases. We found similar data to that obtained with MSC^{21,22}, namely that the coadministration of HuMoSC with classically used immunosuppressive drugs increased their protective effects and, thus, made it possible to reduce the dose of immunosuppressants without jeopardizing GvHD prevention. This result opens a new therapeutic era in which doses of immunosuppressant, and thus their iatrogenic damage, will be reduced thanks to HuMoSC therapy.

We have already shown that HuMoSC can induce FoxP3⁺CD8⁺ and FoxP3⁺CD4⁺ Treg subpopulations *in vitro* and *in vivo*⁸. Treg induction is already a well-known immunosuppressive pathway used by MDSC to alter the tumoral environment²³⁻²⁶, and may involve immunosuppressive cytokines, such as IL-10, which is actually secreted by HuMoSC⁸. It has also been suggested that TGF- β is involved in this Treg induction^{23,24}; however, HuMoSC do not produce TGF- β and do not induce Treg proliferation, but rather induce Treg differentiation from naïve T cells, which may exclude the role of TGF- β . HuMoSC not only induce Treg but also increase their suppressive ability. Although the Treg induction mechanism has not yet been deciphered, this peculiar property of HuMoSC makes them a promising therapy in inflammatory diseases.

The GvL / GvHD balance is critical in allo-HCT. Immunosuppressive therapy should not inhibit the GvL effect, which is an expected goal of allo-HCT. We established a model mimicking allo-HCT in NSG mice, in which leukemia or GvHD do not kill the mice too quickly so as to leave time for a therapeutic intervention. Our experimental model tackles important limitations of mouse models of GvL/ GvHD, since human cells were used to induce both xenogenic GvHD and allogenic GvL. Even though this model enabled us to demonstrate that the injection of HuMoSC did not increase the percentage of leukemia recurrence or relapse in

mice undergoing allo-HCT while delaying the onset of GvHD. These results allowed us to conclude that HuMoSC do not diminish the GvL effect. Every step of the clinical manufacturing process needs to respect local legislation, such as Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP) legislation in all EU countries, and to comply with GMP requirements specific to the field. HuMoSC are expected to be generated from third-party healthy donors and administered in a completely HLA-mismatched allogeneic setting.

HuMoSC have been shown to inhibit both autologous and allogeneic T lymphocytes⁸. Moreover, the cryopreservation step in the manufacturing process allowing the use of cell therapy in clinical assays is necessary since cryopreservation enables rapid access to this cell therapy in acute conditions, such as the onset of GvHD. Large-scale manufacturing and banking of batches of HuMoSC are already validated. Unlike HuMoSC, MSC lose their suppressive properties after cryopreservation^{27,28}, which explains the unresponsiveness of some patients with severe acute GvHD to MSC infusion^{29,30}. Cryopreservation does not alter the HuMoSC phenotype or impair their functional suppressive properties. In this study, we demonstrated the stability of clinical grade HuMoSC. Our current manufacturing protocol contains only one freezing step and the frozen HuMoSC are thawed before CD33 sorting and infusion into the patient. HuMoSC remain viable and maintain their suppressive functions for at least 6 hours after thawing, which is sufficiently long to infuse the cells into patients; this has also been validated. Moreover, all of our *in vivo* experiments were carried out with freeze-thawed HuMoSC.

Even though more robust clinical data showing the efficacy of HuMoSC in controlling GvHD in leukemia patients undergoing allo-HCT are needed, HuMoSC-based cell therapy represents a promising targeted approach in the prevention of human acute GvHD and in the treatment of autoimmune diseases.

Authors' contributions

NJ, CG, MT, AB, CB, CC and MC conducted the experiments; NJ, CG, MT, AB and CB analyzed data; NJ, CG and AB performed statistical analysis; NJ, CG, MT and AB assisted with *in vivo* experiments. NJ, CG and BB wrote the manuscript, and HG, SO, TG, MS, SA and PS commented on the manuscript. NJ and BB supervised the research. All authors provided input and edited and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the animal technicians for their expertise in animal care and management, the Plateforme de Cytométrie for technical help and Philip Bastable for his help in editing.

References

1. Esensten JH, Muller YD, Bluestone JA, Tang Q. Regulatory T-cell therapy for autoimmune and autoinflammatory diseases: The next frontier. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142(6):1710–1718.
2. Blazar BR, MacDonald KPA, Hill GR. Immune regulatory cell infusion for graft-versus-host disease prevention and therapy. *Blood.* 2018;131(24):2651–2660.
3. Elias S, Rudensky AY. Therapeutic use of regulatory T cells for graft-versus-host disease. *Br J Haematol.* 2019;187(1):25–38.
4. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, et al. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med.* 2014;20(1):62–68.
5. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection. *Immunity.* 2003;19(1):59–70.
6. Hwang S-M, Sharma G, Verma R, Byun S, Rudra D, Im S-H. Inflammation-induced Id2 promotes plasticity in regulatory T cells. *Nat Commun.* 2018;9(1):4736–4749.
7. Massoud AH, Charbonnier L-M, Lopez D, Pellegrini M, Phipatanakul W, Chatila TA. An asthma-associated IL4R variant exacerbates airway inflammation by promoting conversion of regulatory T cells to TH17-like cells. *Nat Med.* 2016;22(9):1013–1022.
8. Janikashvili N, Trad M, Gautheron A, et al. Human monocyte-derived suppressor cells control graft-versus-host disease by inducing regulatory forkhead box protein 3-positive CD8+ T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(6):1614–1624.e4.
9. Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol.* 2013;25(4):305–312.
10. Romieu-Mourez R, François M, Boivin M-N, Bouchentouf M, Spaner DE, Galipeau J. Cytokine Modulation of TLR Expression and Activation in Mesenchymal Stromal Cells Leads to a Proinflammatory Phenotype. *J Immunol.* 2009;182(12):7963–7973.

11. Durand N, Russell A, Zubair AC. Effect of Comedications and Endotoxins on Mesenchymal Stem Cell Secretomes, Migratory and Immunomodulatory Capacity. *J Clin Med*. 2019;8(4):497–510.
12. Shi Y, Wang Y, Li Q, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nat Rev Nephrol* 2018;14(8):493–507.
13. Han C, Wu T, Na N, Zhao Y, Li W, Zhao Y. The effect of immunosuppressive drug cyclosporine A on myeloid-derived suppressor cells in transplanted mice. *Inflamm Res*. 2016;65(9):679–688.
14. Wu T, Zhang L, Xu K, et al. Immunosuppressive drugs on inducing Ag-specific CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells during immune response in vivo. *Transpl Immunol*. 2012;27(1):30–38.
15. Lion J, Burbach M, Cross A, et al. Endothelial Cell Amplification of Regulatory T Cells Is Differentially Modified by Immunosuppressors and Intravenous Immunoglobulin. *Front Immunol*. 2017;8:1761.
16. Bonnefoy F, Masson E, Perruche S, et al. Sirolimus enhances the effect of apoptotic cell infusion on hematopoietic engraftment and tolerance induction. *Leukemia*. 2008;22(7):1430–1434.
17. Furtado GC, de Lafaille MAC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 Signaling Is Required for CD4⁺ Regulatory T Cell Function. *J Exp Med*. 2002;196(6):851–857.
18. Ruppert SM, Falk BA, Long SA, Bollyky PL. Regulatory T Cells Resist Cyclosporine-Induced Cell Death via CD44-Mediated Signaling Pathways. *Int J Cell Biol*. 2015;2015:1–10.
19. Robb RJ, Lineburg KE, Kuns RD, et al. Identification and expansion of highly suppressive CD8⁽⁺⁾FoxP3⁽⁺⁾ regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2012;119(24):5898–5908.
20. Scottà C, Fanelli G, Hoong SJ, et al. Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells. *Haematologica*. 2016;101(1):91–100.

21. Hajkova M, Hermankova B, Javorkova E, et al. Mesenchymal Stem Cells Attenuate the Adverse Effects of Immunosuppressive Drugs on Distinct T Cell Subpopulations. *Stem Cell Rev Rep*. 2017;13(1):104–115.
22. Hajkova M, Jaburek F, Porubska B, Bohacova P, Holan V, Krulova M. Cyclosporine A promotes the therapeutic effect of mesenchymal stem cells on transplantation reaction. *Clin Sci Lond Engl*. 1979 2019;133(21):2143–2157.
23. Huang B, Pan PY, Li Q, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res*. 2006;66(2):1123–31.
24. Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-derived suppressor cells promote crosstolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res*. 2008;68(13):5439–49.
25. Pan P-Y, Ma G, Weber KJ, et al. Immune Stimulatory Receptor CD40 Is Required for T-Cell Suppression and T Regulatory Cell Activation Mediated by Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer. *Cancer Res*. 2010;70(1):99–108.
26. Luan Y, Mosheir E, Menon MC, et al. Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Renal Transplant Patients and Mediate CD4+Foxp3+ Treg Expansion. *Am J Transplant*. 2013;13(12):3123–3131.
27. Moll G, Alm JJ, Davies LC, et al. Do Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Display Impaired Immunomodulatory and Therapeutic Properties? *Stem Cells*. 2014;32(9):2430–2442.
28. Chinnadurai R, Copland IB, Garcia MA, et al. Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Are Susceptible to T-Cell Mediated Apoptosis Which Is Partly Rescued by IFN γ Licensing. *Stem Cells*. 2016;34(9):2429–2442.
29. Salmenniemi U, Itälä-Remes M, Nystedt J, et al. Good responses but high TRM in adult patients after MSC therapy for GvHD. *Bone Marrow Transplant* 2017;52(4):606–608.

30. Keto J, Kaartinen T, Salmenniemi U, et al. Immunomonitoring of MSC-Treated GvHD Patients Reveals Only Moderate Potential for Response Prediction but Indicates Treatment Safety. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;9:109–118.

Figure legends

Figure 1: HuMoSC properties (inhibition of PBMC proliferation and Treg induction) are not impaired by an inflammatory environment.

Cell-Trace Violet stained PBMC stimulated with anti-CD3/CD28 microbeads were co-cultured with or without HuMoSC (ratio 4:1) in an inflammatory environment and assessed for their proliferation index. At day 5, PBMC were stained with anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD103, anti-CD39 and anti-FoxP3 antibodies. A. HuMoSC inhibitory effect on T cell proliferation in the presence or not of different doses of the following pro-inflammatory cytokines: IL-2 (20IU/ml), IFN γ (20ng/ml), TNF- α (20ng/ml) and IL-1 β (20ng/ml) or a mix at the respective doses for 5 days. B. HuMoSC inhibitory effect on T cell proliferation in the presence or not of different doses of the following TLR ligands: LPS (50 ng/ml), PAM (50 ng/ml), Poly I:C (50 μ g/ml) and flagellin (50 ng/ml) for 5 days. C. HuMoSC-induced CD4 Treg in the presence of inflammatory cytokines. D. HuMoSC-induced CD4 Treg in the presence of TLR ligands. E. HuMoSC-induced CD8 Treg in the presence of inflammatory cytokines. F. HuMoSC-induced CD8 Treg in the presence of TLR ligands. Data are shown as means \pm SEM of 6 representative experiments. *P* value are the result of Student *t* test: ns = non-significant, * \leq 0.05, ** \leq 0.01, *** \leq 0.001, **** \leq 0.0001

Figure 2: HuMoSC properties (inhibition of T cell proliferation and Treg induction) are not impaired by currently used immunosuppressive treatments in GvHD.

Cell-Trace Violet stained PBMC stimulated with anti-CD3/CD28 microbeads were co-cultured with or without HuMoSC (ratio 4:1) and methylprednisolone (MP) 25ng/ml, methotrexate (MTX) 2.5ng/ml, cyclosporine A (CsA) 5ng/ml or a mix for 5 days and assessed for their proliferation index. At day 5, PBMC were stained with anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD103, antiCD39 and anti-FoxP3 antibodies. A. HuMoSC inhibitory effect on T cell proliferation in the presence of immunosuppressive drugs B. HuMoSC-induced CD4 Treg in the presence of immunosuppressive drugs. C. HuMoSC-induced CD8 Treg in the presence of immunosuppressive drugs. Data are shown as means \pm SEM of 6 representative experiments. *P* value are the result of Student *t* test. D. Synergistic effect of the association HuMoSC + CTX

for controlling GvHD. NSG mice underwent total body irradiation of 2Gy 6h before the injection of 10×10^6 human PBMC (Group 1, control, n=11), with 2.5×10^6 HuMoSC (co-injection with PBMC) injected on D0 and D7 (Groupe 2, n=6), cyclophosphamide (CTX) at a dose of 10 mg/kg on D3 (Group 3, n=12) or with 2.5×10^6 HuMoSC (co-injection with PBMC) and 10mg/kg of CTX on D3 (Group 4, n=12). Mouse survival was censored at day 100 after injection. Results of two independent experiments (except for HuMoSC alone treated group). *P* value are the result of log-rank test: ns = non-significant, * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001 , **** $<0,0001$

Figure 3: HuMoSC increase the survival of tumor bearing mice by protecting them from GvHD and leukemia.

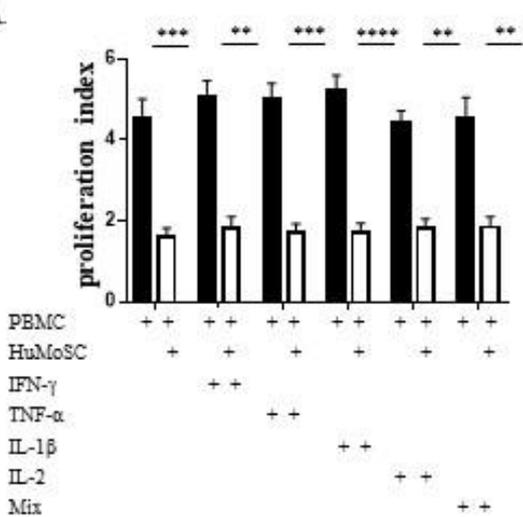
Different models of leukemia using Cal-1 were tested in order to determine the best model. Model using 5×10^6 Cal-1 by I.V. on D0 cells was finally chosen. B. Survival of NSG mice with different doses of Cal-1 (1, 2, 5 and 10×10^6 Cal-1). C. Optimization of irradiation doses (2 and 4 Gy) and PBMC count (10 or 20×10^6 per mouse). D. Chosen timeline for experiment and evaluated parameters. E. Survival was assessed for tumor group (n=15), tumor + PBMC group (n=15) and tumor+PBMC+HuMoSC group (n=15) Mice received intravenous injection of 5×10^6 Cal-1 cells followed by low-dose irradiation (2Gy) at day 7 and an intraperitoneal injection of either 10×10^6 PBMC alone or PBMC+ 2.5×10^6 HuMoSC at day 8. Data were censored after 40 days of follow-up. *P* value are the result of log-rank test: ns = non-significant, * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001 .

Figure 4: HuMoSC phenotype and function are not impaired by long-term cryopreservation or room temperature

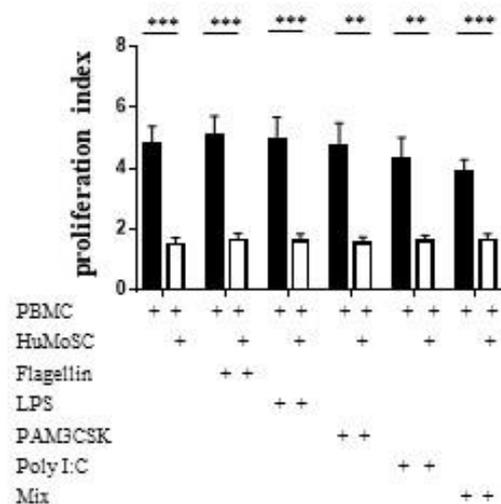
HuMoSC phenotype and immunosuppressive function estimated by the inhibition of proliferation of Cell-Trace Violet stained PBMC stimulated with anti-CD3/CD28 microbeads. A. Phenotype after cryopreservation at -80°C for 0, 7, 30, 60 or 100 days. B. Function after cryopreservation at -80°C for 0, 7, 30, 60 or 100 days. C. Phenotype after preservation at room temperature (RT) or at 4°C for 6 hours. D. Function after preservation at RT or at 4°C for 6 hours. Data are shown as means \pm SEM of 3 representative experiments. *P* values are the result of Student *t* test: ns = non-significant. E. Phenotype of two different batches after 2 months of

cryopreservation. F. Function of two different batches after 2 months of cryopreservation. Results are shown by dot plot and histogram of representative experiments.

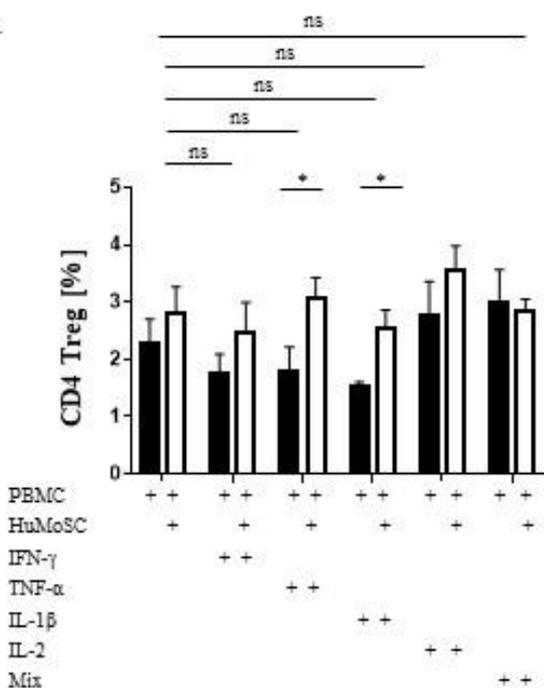
Figure 1 A



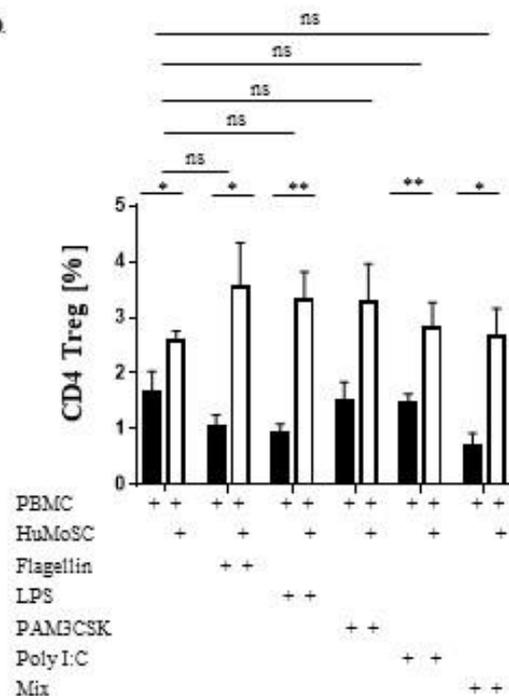
B.



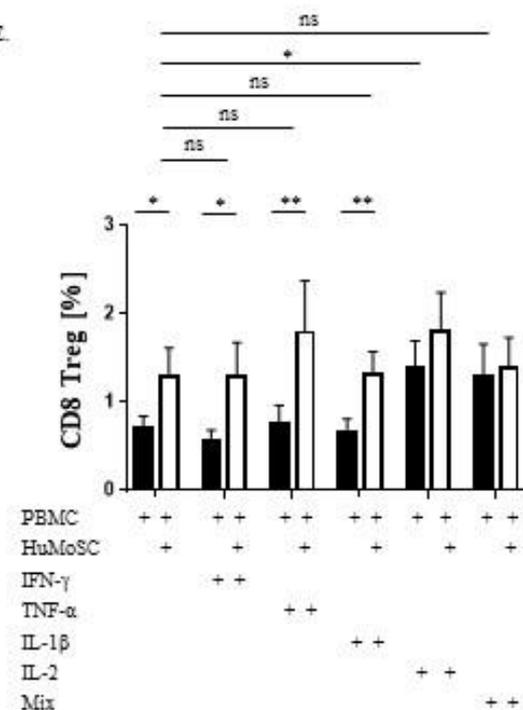
C.



D.



E.



F.

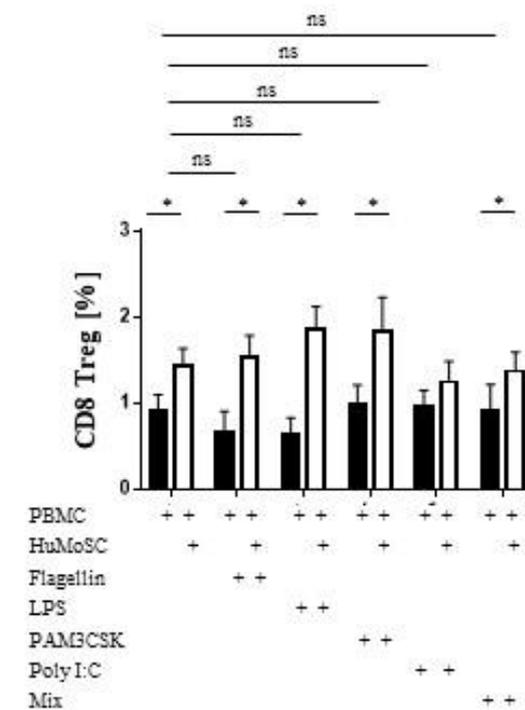
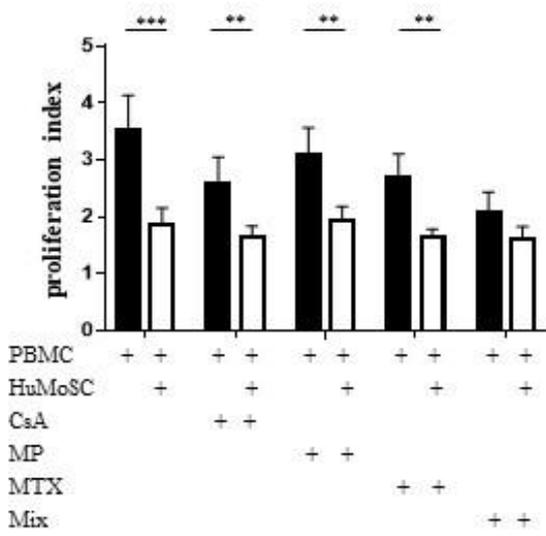
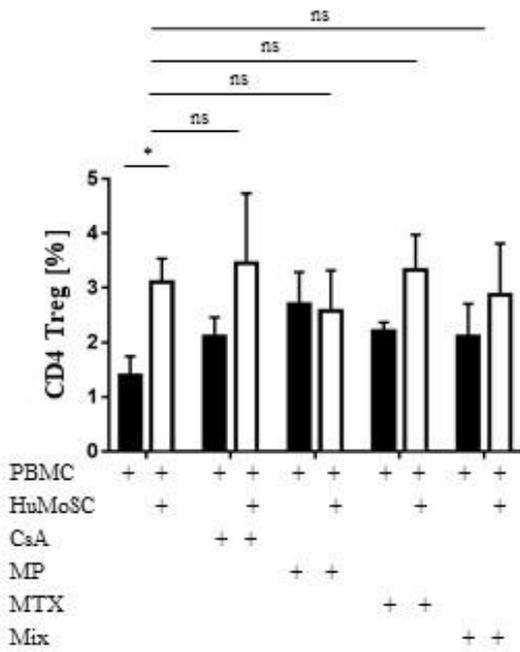


Figure 2

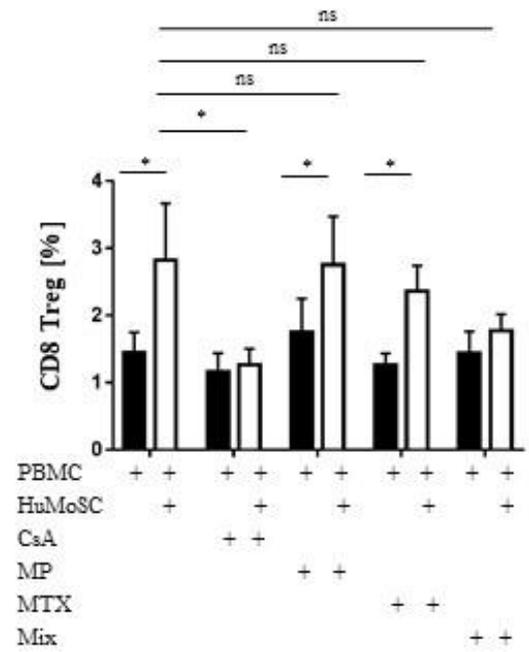
A.



B.



C.



D.

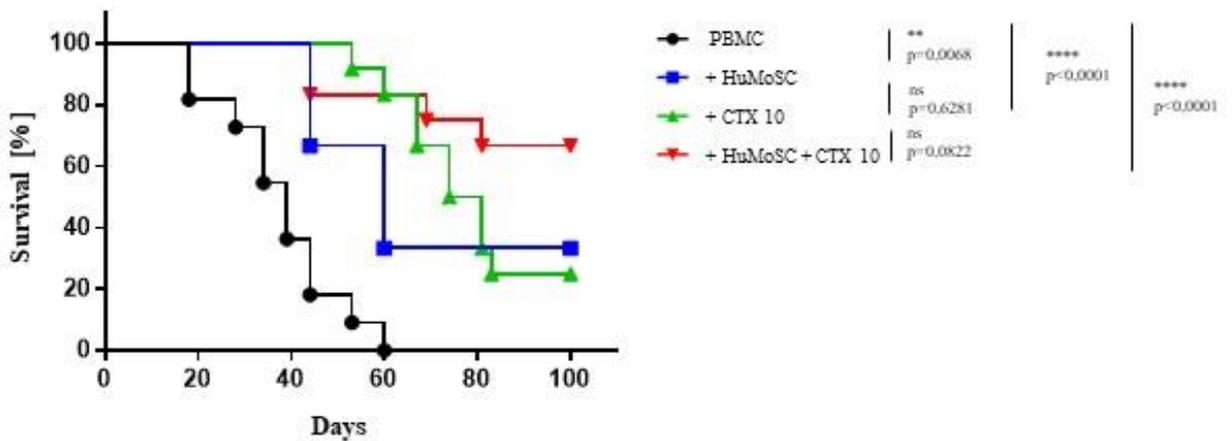


Figure 3

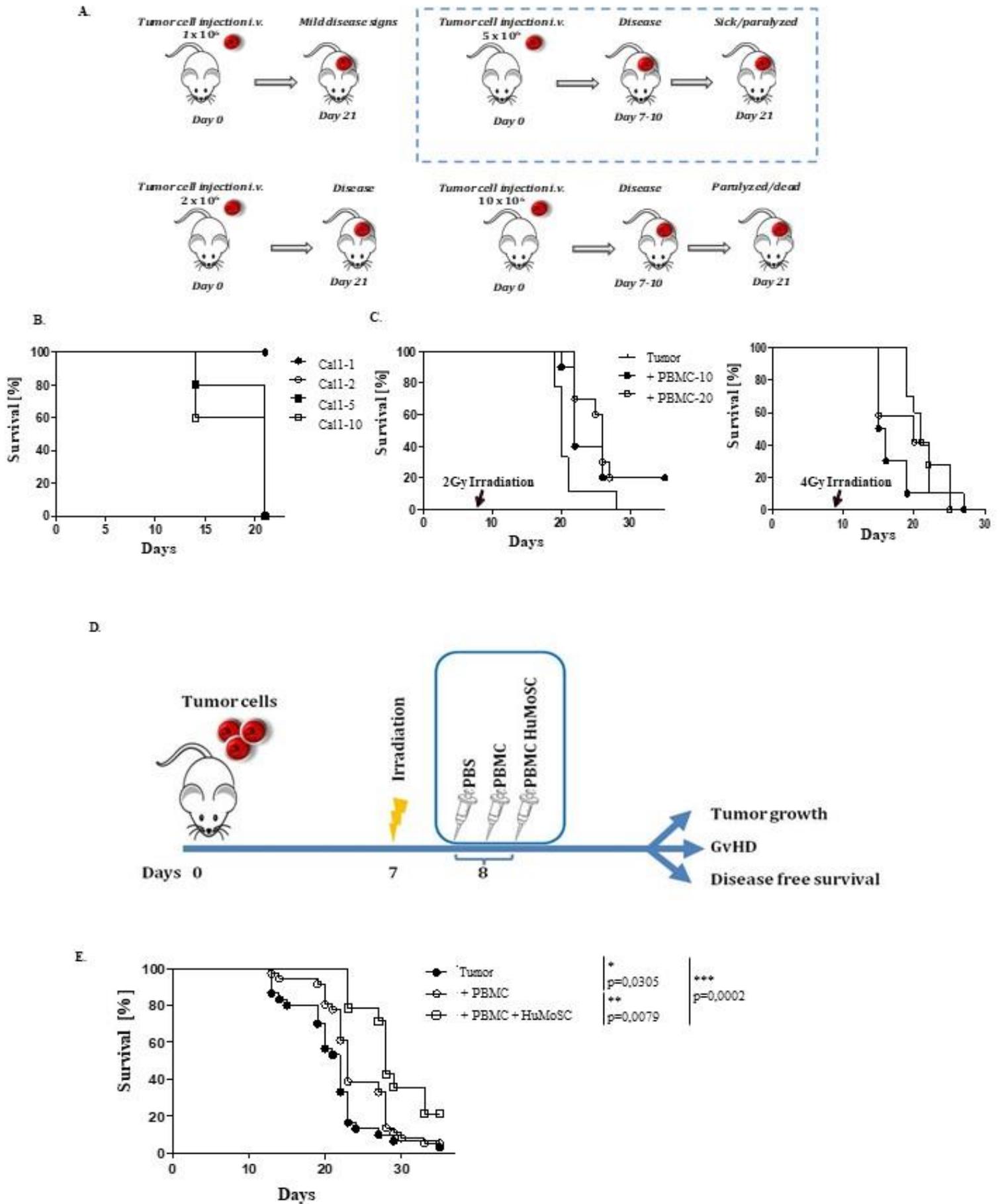
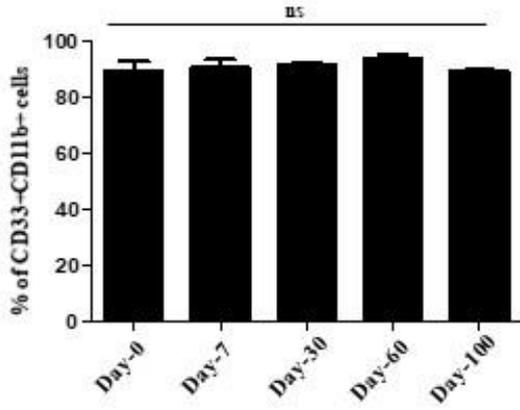
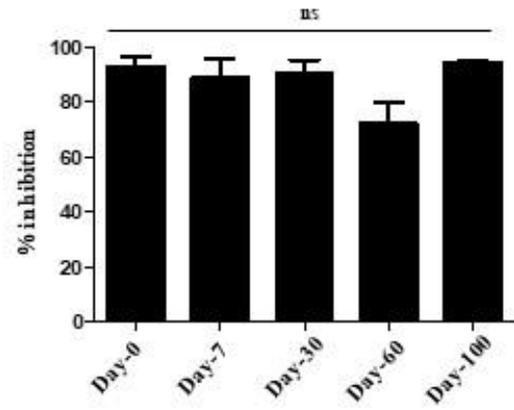


Figure 4

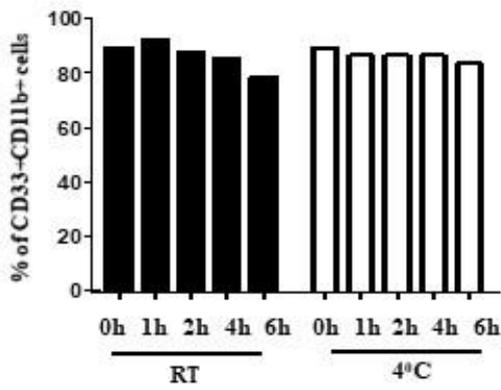
A.



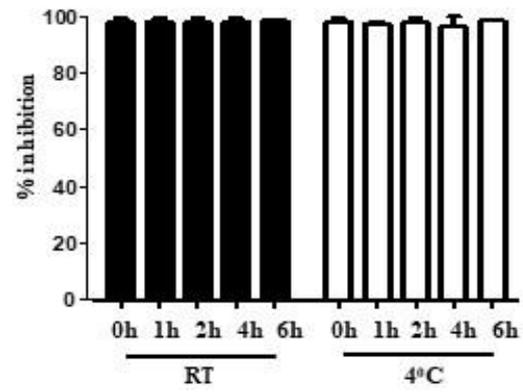
B.



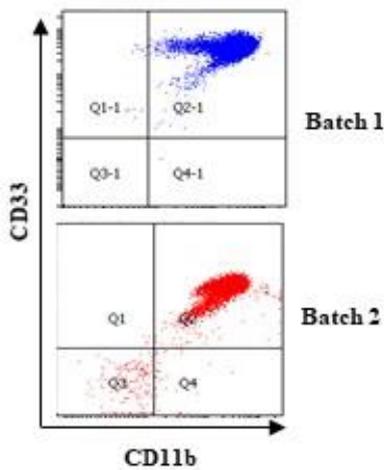
C.



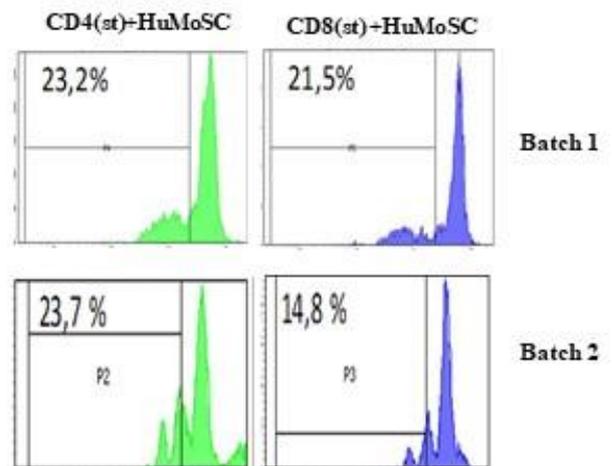
D.



E.



F.



Article 2 : “Therapeutic interest of an immunosuppressive myeloid cell supernatant in GvHD prevention”

Article en cours de soumission

Résumé de l'article 2

Le passage de la paillasse au lit du malade des HuMoSC s'est heurté à 2 problèmes insolubles au sein de l'unité. Tout d'abord, le nombre de monocytes nécessaire pour générer un nombre suffisant d'HuMoSC pour traiter un patient est trop important pour être acceptable dans un protocole de recherche clinique. De plus, les billes de tri magnétique CD33+ ne sont pas disponibles au grade GMP. Nous avons alors modifié notre protocole pour isoler les cellules CD14+ au lieu des CD33+ à la fin de la culture, ce qui nous a permis d'obtenir un nombre de cellules beaucoup plus important et avec un protocole totalement en conditions BPF. Les cellules ainsi générées ont été appelées CD14-HuMoSC, leurs propriétés immunosuppressives sont faibles en comparaison de celles des HuMoSC (données non montrées). Nous avons alors choisi d'étudier les propriétés immunosuppressives du surnageant des CD14-HuMoSC.

Nous avons tout d'abord mis en place un protocole de génération simple, rapide, facilement reproductible et respectant les BPF. Le surnageant est produit en mettant en culture 1 million de CD14-HuMoSC dans un 1ml de sérum physiologique pendant 24h à 37°C et sous 5% de CO₂. Le surnageant produit respecte les BPF et est hautement immunosuppressif puisqu'il inhibe 100% de la prolifération des LT. Dans un premier temps, l'étude sur les LT a mis en évidence un effet immunosuppressif à la fois sur la prolifération des LT CD4+ et CD8+ mais aussi une diminution de l'activation lymphocytaire. L'effet immunosuppressif n'est pas dû à l'apoptose ou à la nécrose des LT. Le surnageant de CD14-HuMoSC diminue la réponse Th1 en faveur d'une réponse Th2 par inversion du ratio Th1/Th2. L'analyse du contenu cytokinique montre une diminution de la production d'IFN- γ mais aussi d'IL-17A. Le surnageant de CD14-HuMoSC diminue aussi la cytotoxicité des LT CD8+ par diminution de leur dégranulation et de la production de granzyme B. De plus, comme il avait été montré avec les HuMoSC, on observe une induction de CD4 et CD8 Treg par le surnageant de CD14-HuMoSC laissant penser que l'induction de Treg par les cellules n'est pas contact dépendante. Ensuite, nous avons évalué l'impact du surnageant de CD14-HuMoSC sur une autre population cellulaire impliquée dans la réponse immunitaire, les DC. Nous avons montré que les DC traitées par le surnageant de CD14-HuMoSC à J5, au moment de la maturation, ou à J7, lorsque les DC sont matures, avaient une capacité altérée à induire la prolifération lymphocytaire. Nous n'avons pas mis en évidence de modifications significatives de l'expression des marqueurs de co-stimulation ni de la sécrétion de cytokines. Nous avons également montré que ni un environnement inflammatoire ni la présence d'immunosuppresseurs n'altéraient la fonction immunosuppressive du surnageant de CD14-HuMoSC. *In vivo*, nous avons établi qu'une injection hebdomadaire de

surnageant prévenait de façon efficace la survenue de la GvHD, améliorant à la fois la survie et le score. Enfin, la congélation et la filtration stérilisante ne modifient pas les propriétés immunomodulatrices du surnageant de CD14-HuMoSC, ouvrant la voie à une possible production du surnageant respectant les BPF. Toutes ces propriétés font du surnageant des CD14-HuMoSC un excellent candidat thérapeutique pour le traitement de la GvHD ou pour d'autres maladies inflammatoires. Afin de mieux comprendre les mécanismes immunosuppresseurs du surnageant, nous avons étudié son contenu protéique et cytokinique. La protéomique a montré un profil distinct entre le surnageant de CD14-HuMoSC et le surnageant de monocytes utilisé comme contrôle. L'analyse a mis en évidence la présence de 3 protéines immunosuppressives, l'ostéoactivine, la galectine-3 et l'IL-1RA dans le surnageant des CD14-HuMoSC alors que ces protéines étaient quasi-inexistantes dans le surnageant des monocytes. Le multiplex a confirmé ces résultats et a montré également une différence quantitative significativement différente entre le surnageant de CD14-HuMoSC et de monocytes. Même si le mécanisme immunosuppresseur n'est pas encore complètement élucidé, notre équipe a généré un nouveau produit immunosuppresseur qui pourra être utilisé comme prévention de la GvHD mais aussi dans toutes les maladies inflammatoires.

Therapeutic interest of an immunosuppressive myeloid cell supernatant in GvHD prevention

Claire Gérard^{1,2}, Marine Thébault¹, Andréa Brazdova^{1,3}, Nona Janikashvili^{1,4}, Franck Hyvrier⁵, Pauline Maes⁵, Coraline Genet¹, Claudie Cladière¹, Marion Ciudad¹, Séthi Ouandji¹, Thibault Ghesquière^{1,2}, Hélène Greigert¹, Philippe Saas⁶, Maxime Samson^{1,2}, Sylvain Audia^{1,2}, Bernard Bonnotte^{1,2}

¹Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, RIGHT Interactions Greffon-Hôte-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-21000 Dijon, France

²University Hospital, Department of Internal Medicine, F-21000 Dijon, France

³Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

⁴Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tbilisi State Medical University (TSMU), Tbilisi, Georgia

⁵Clinical Innovation Proteomic Platform, UBFC, Dijon, France

⁶Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, RIGHT Interactions Greffon-Hôte-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France

Corresponding author: Bernard Bonnotte, MD/PhD

INSERM UMR 1098, Faculty of Medicine, University of Bourgogne Franche-Comté;

15 bd du mal de Lattre de Tassigny, 21070 Dijon, France;

E-mail: Bernard.Bonnotte@u-bourgogne.fr

Telephone: +33(0)3 80 39 33 55

Abstract

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is currently used as a curative approach for hematologic malignancies but is limited by mortality and morbidity secondary to graft-versus-host disease (GvHD). Interestingly, new cellular-based therapies have shown promising results for the control of GvHD. Our team has successfully generated a subpopulation of suppressor cells of monocytic origin, named HuMoSC (CD33⁺ cells: Human Monocyte-derived Suppressor Cells), which inhibit T cell activation, proliferation and interestingly reduce GvHD severity in a xenogeneic model. In order to increase the number of immunosuppressive cells recovered with this protocol, we isolated not only the CD33⁺ but all the CD14⁺ cells and named this population CD14-HuMoSC. The aim of this work was to study the immunoregulatory properties of the CD14-HuMoSC supernatant that can be easily generated in large amounts.

We demonstrated that CD14-HuMoSC supernatant inhibited both CD4 and CD8 T cell proliferation, induced Th2 response and decreased CD8 cytotoxicity. Furthermore, CD14-HuMoSC supernatant added during dendritic cell generation decreases their ability to induce T cell proliferation. *In vivo*, CD14-HuMoSC supernatant prevented from GvHD in a clinically relevant model of GvHD using NOD/SCID/IL-2R γ c^{-/-} (NSG). Furthermore, CD14-HuMoSC supernatant did not lose its immunoregulatory properties in inflammatory environment and can be produced according to good manufacturing practices (GMP). Proteomic and Multiplex analyses of CD14-HuMoSC supernatant revealed the presence of immunosuppressive proteins such as osteoactivin, galectin-3 and IL-1RA.

We demonstrated that CD14-HuMoSC supernatant is endowed with immunosuppressive properties *in vitro* and *in vivo*. These results make CD14-HuMoSC supernatant a promising therapy for preventing GvHD and treating inflammatory diseases.

Introduction

Allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT) is the only curative treatment for hematologic malignancies but is limited by mortality and morbidity secondary to graft-versus-host disease (GvHD). The most common treatment of GvHD is the use of immunosuppressive drugs to prevent expansion of pathogenic T cells. The main inconvenient of such administration consists in general immunosuppression, which makes the patient vulnerable to infections. This immunosuppressive state increases the risk of relapses and opportunistic infections. Therefore, there is an unmet need to develop novel therapies. Development of cell therapy from immunosuppressive cells has appeared in recent years as a solution to prevent GvHD^{1,2}. The use of regulatory T cells (Treg) was a promising therapy in GvHD prevention. However, many limitations have been raised for their clinical use, such as the very low level of Treg in humans and the difficulty of *ex-vivo* expansion of these cells⁵⁷ while retaining their suppressive properties. Also, cell therapies based on mesenchymal stem cells (MSC) derived from bone marrow (BM) have shown promising effects on GvHD but the results obtained between different laboratories are discordant³ and expansion troubles have been highlighted^{103,110,111}, their immunosuppressive potential still remains to be explored. In this context, our team has previously reported on an original approach to obtain human myeloid suppressor cells derived from circulating monocytes. Those immunosuppressive cells were named human monocyte-derived suppressor cells (HuMoSC)¹⁶⁸. We have shown that HuMoSC are efficient to inhibit T cell proliferation in a STAT3-dependent manner but also induce Treg population and significantly prevent GvHD in a xenogeneic murine model. Moreover, our team has shown that supernatant generated from HuMoSC was highly immunosuppressive. The use of the supernatant as a therapeutic product would circumvent the problems linked to cell therapy and allow having a safer product with constant immunosuppressive properties. Indeed,

immunosuppressive cells can lose their immunosuppressive properties *in vivo* in an inflammatory environment¹⁷⁰⁻¹⁷⁴. However, the number of HuMoSC is relatively limited. In order to increase the number of immunosuppressive cells recovered from our protocol, we isolated not only the CD33+ but all the CD14+ cells named as CD14-HuMoSC. The number of CD14-HuMoSC obtained after magnetic sorting was 3 to 4 times greater than the number of HuMoSC but CD14-HuMoSC had slightly less immunosuppressive capacities compared to HuMoSC. Thanks to this increased number of suppressive cells, large amounts of CD14-HuMoSC supernatant were collected and its immunoregulatory properties were analysed. We assessed the effect of this supernatant on two major cell populations involved in physiopathology of GvHD, T cells and dendritic cells (DC). Efficiency of CD14-HuMoSC supernatant on GvHD prevention was evaluated in a clinically relevant model of GvHD using NOD/SCID/IL-2R $\gamma_c^{-/-}$ (NSG). Regarding its future therapeutic use, we demonstrated that CD14-HuMoSC supernatant can be used in inflammatory environment and can be produced according to good manufacturing practices (GMP). Furthermore proteomic and multiplex analyses of CD14-HuMoSC supernatant revealed the presence of immunosuppressive proteins such as osteoactivin, galectin-3 and IL-1RA.

Material and Methods

Generation of CD14-HuMoSC

Human study was approved by the Etablissement Français du Sang (EFS: ENR-B1-051, Besançon, France), with informed consent in compliance with the Declaration of Helsinki. HuMoSC generation has been described previously. Briefly, PBMC were isolated from buffy coats of healthy donors by Ficoll density gradient centrifugation. Monocytes were purified from PBMC by Percoll density gradient centrifugation. HuMoSC were generated by incubating monocytes (2×10^6 cells/ml) in X-vivo 15™ (Lonza, Suisse) supplemented with recombinant human GM-CSF (10 ng/ml) and IL-6 (10 ng/ml) (both from Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) for 7 days with twice changed medium. The cultured cells were harvested and cryopreserved in X-vivo 15™ supplemented with 10% DMSO (controlled rate freezing of 1 °C/min) at -80 °C. CD14-HuMoSC were obtained after CD14⁺ selection from fresh or cryopreserved cells.

Magnetic cell isolation and sorting

CD14-HuMoSC and T cells were purified by magnetic cell sorting using human CD14⁺ and Pan T cells isolation kits respectively and an autoMACS-Pro™ separator according to the manufacturers' instructions (Miltenyi Biotec).

T cell proliferation and suppression assays

PBMC and T cells were stained using Cell Trace Violet according to the manufacturer's procedure (Cell Trace™, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Labeled cells were cultured with Human T-activator CD3/CD28 beads (Dynabeads, Invitrogen) in 24-wells plate with or without CD14-HuMoSC (T cell to CD14-HuMoSC ratio = 4:1) or with or without CD14-HuMoSC supernatant (500µl of CD14-HuMoSC supernatant for 500 000 labeled cells at 1million

cells/ml). T cell division was detected after 5 days by flow cytometry using a LSRII cytometer (BD Biosciences) and analyzed using the ModFit[®] software (version 5.0). CD14-HuMoSC supernatant suppressive activity against PBMC was evaluated in presence or absence of following pro-inflammatory cytokines (human recombinant IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β and mix) (Miltenyi Biotec) at the concentration of 100 μ g/ml and TLR ligands (LPS, Pam₃Cys-SK4, Poly I:C, Flagellin) (either, Invivogen, Miltenyi or Fisher Scientific) at the at the concentration of 50 ng/ml. In the separate experiments, anti-inflammatory and immunosuppressive agents, such as methylprednisolone (MP, 25 ng/ml), methotrexate (MTX, 2,5 ng/ml) and ciclosporine (CsA, 5 ng/ml) were added to stimulated PBMC only or PBMC+CD14-HuMoSC supernatant co-cultures. Drugs concentrations have been previously determined to not fully inhibit PBMC proliferation, allowing to measure the immunosuppressive effect of the tested product. Responder cell division was evaluated as described above.

Antibodies and flow cytometry analysis

Flow cytometry analyses were performed as previously reported using monoclonal antibodies against CD3, CD4, CD8, CD25, IL-4, IL-17A, IFN γ , Granzyme B and Perforin from either Ozyme (Ozyme, Saint-Cyr-l'Ecole, France) or eBioscience (eBioscience, Paris, France). Treg were stained with anti-Foxp3 (Alexa 488) (Human Treg Flow[™] Kit, Biolegend). For discrimination of viable cells, early apoptotic cells and necrotic cells, cells were stained with Annexin V antibody (eBioscience, Paris, France) and Fixable Viability Stain (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) following manufacturer instructions. Cells were analyzed using a LSRII cytometer (BD Biosciences) and data analysis was performed with the FlowJo[®] software (version 10.0.7r2).

Xenogeneic model of GvHD

NSG mice received total body irradiation of 2 Gy at day 0 and were transplanted intraperitoneally with human PBMCs (10×10^6 per mouse) 6 hours after with or without CD14-HuMoSC supernatant (2ml per mouse). The mix of PBMC with both supernatant was made before injections, total volume of injection was 2ml per mouse.

Mice were scored twice a week until the end of experiment in a blinded fashion for clinical signs of GvHD (weight loss, general appearance of the fur and mobility). Incidence of GvHD, clinical score, weight and survival was noted for each mouse. Mice were euthanized when the clinical endpoints were reached (>15% weight loss, hunched posture, ruffled fur, reduced mobility, tachypnea). Blood analysis were performed from 150-200 μ L of heparinized blood withdraw from mandibular or tail vein. Animal protocols were approved by Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Burgundy.

Proteomic analysis

CD14-HuMoSC supernatant were compared to monocyte supernatant produced following the same protocole. Samples were sent frozen at -20°C to the Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest (PAPPSO). Samples were concentrated on mass filter of 3 kDa and then put down a gel. The gel bands were then digested to be analyzed by nano-HPLC coupling on a Q-exact Plus spectrometer (ThermoFisher Scientific). Only proteins free from contamination by bovine serum albumin were kept for analysis. In order to highlight proteins with significant variations, an analysis of variance using a linear model was used as well as a post-hoc Tukey analysis.

Multiplex analysis

Concentrations of CCL2 (monocyte chemotactic protein 1 [MCP-1]), IFN- γ , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-10, IL12p70, osteoactivin (GPNMB), TNF- α , Gal-3, PD-L1, IL-1 β , Granzyme B, IL-4, IL-17A were determined in cell-culture supernatant by using Multiplex kit according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

Statistical analyses

To analyze statistical significance between two groups, a Student's *t*-test was used. Overall survival was calculated as the time from the day of injection of PBMC until death. Data were censored after 104 days of follow-up. Kaplan-Meier curves were plotted and differences were evaluated using the log-rank test. For all statistical analyses, Prism 5 software was used (GraphPad Software) and a 2-tailed $p \leq 0.05$ was considered significant.

Results

CD14-HuMoSC produce an immunosuppressive supernatant

Change in the HuMoSC generation protocol allowed us to generate higher number of suppressive CD14-HuMoSC which produced large amounts of supernatant. All the supernatants collected after either 6h, 12h or 24h of plating CD14-HuMoSC in physiological serum produced a highly immunosuppressive supernatant (Figure 1A). We chose to collect the supernatant after 24h of plating in all the further experiments. The capabilities of different concentrations of the CD14-HuMoSC supernatant to inhibit T cell proliferation were studied and the concentration of 50% was chosen in all the further experiments (Figure 1B et 1C). CD14-HuMoSC supernatant inhibited proliferation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 1D). Moreover, inhibitory function did not seem to be related to PBMC cell concentration as CD14-HuMoSC supernatant inhibited equally from 500 000 to 4 million PBMC (Figure 1E). Concerning T cell activation, CD14-HuMoSC decreased both CD4 and CD8 T cell activation as shown by the decrease in IL-2 secretion but also CD25 expression (Figure 1F et 1G). Moreover, we assessed that decrease of T cell proliferation was not due to T cell death (Supplemental figure 1). Taken together, these experiments showed that CD14-HuMoSC supernatant is highly immunosuppressive and can be quickly and easily produced.

CD14-HuMoSC supernatant switches T cell polarization toward a Th2 phenotype, impairs CD8 cytotoxicity and induces both CD4 and CD8 Treg

CD14-HuMoSC supernatant can impact on T cells in multiple ways. Interestingly, CD14-HuMoSC supernatant switched T cell polarization. Th1 phenotype was diminished in favour of acquiring Th2 phenotype (Figure 2A et 2B). During T cell differentiation, the addition of CD14-HuMoSC supernatant in the culture decreased the percentage of CD4⁺ IFN γ ⁺ T cells and increased the percentage of CD4⁺ IL-4⁺ T cells (Supplemental figure 2A). Indeed, Th1/Th2

ratio was profoundly decreased in the presence of CD14-HuMoSC supernatant. However, CD14-HuMoSC supernatant did not modify Th17 population (data not shown). The analysis was also done on CD8⁺ T cell polarization and showed similar results. CD14-HuMoSC supernatant significantly increased Tc2 population leading to a significant decrease of Tc1/Tc2 ratio (Supplemental figure 2B). Cytokine assessment in the culture supernatant confirmed the phenotypic analysis (Figure 2C). Cytotoxic T lymphocytes (CTL) is a major cell population involved in the effector phase of acute GvHD, so we further investigate the CD14-HuMoSC supernatant impact on CD8⁺ T cell cytotoxicity. After incubation of isolated T cells with supernatant for 4 days, we showed that CD14-HuMoSC supernatant decreased CD63 expression on CD8⁺ T cells, suggesting an impaired capacity of CTL to degranulate when treated with CD14-HuMoSC supernatant (Figure 2D). Moreover, granzyme B secretion by T cells was decreased in the presence of CD14-HuMoSC supernatant in favor of a dysfunction of cytotoxic T cells after culture with this supernatant (Figure 2D). Thus, our team has reported that HuMoSC induced both CD4 and CD8 Treg population¹⁶⁸. Mechanisms of this induction are still under investigation. We therefore questioned if CD14-HuMoSC supernatant has the capability to induce CD4 and CD8 Treg. Indeed, CD14-HuMoSC supernatant induced CD4 Treg and CD8 Treg differentiation. The number of Treg has more than doubled after culture with CD14-HuMoSC supernatant (Figure 2E).

Taken together, these experiments demonstrated that CD14-HuMoSC supernatant is highly immunosuppressive and regulates immune responses to immune tolerance as it switched toward T cell response to a Th2 response and decreased Th1 response, decreased CD8 cytotoxicity and also induced CD4 and CD8 Treg.

CD14-HuMoSC supernatant impairs DC functions

As DC play a key role in GvHD, we evaluated whether CD14-HuMoSC supernatant have the capabilities to modify DC differentiation and DC functions. To evaluate the effects of CD14-HuMoSC supernatant on DC maturation and function, CD14-HuMoSC supernatant or physiologic serum were added to the culture at different times of the differentiation (Day5 or Day7). The treatment with CD14-HuMoSC supernatant did not modify DC phenotype or DC cytokine secretion whatever the day (Day5 or 7) (Figure 3B, 3C and 3E). CD14-HuMoSC supernatant significantly decreased the DC property to strongly stimulate allogeneic PBMC at different ratio at day 5 or 7 (Figure 3A and 3D).

Taken together, our data suggested that CD14-HuMoSC impaired the DC capability to induce T cell proliferation.

CD14-HuMoSC supernatant prevents from GvHD

In order to determine the therapeutic potential of CD14-HuMoSC supernatant, we used a xenogeneic model of GvHD using NSG mice. Human PBMC were administered to induce GvHD (weight loss, hunched posture, ruffled fur, reduced mobility, skin integrity and diarrhea). We demonstrated that a weekly administration of CD14-HuMoSC supernatant significantly prevented the development of GvHD in NSG mice ($p=0.0451$) (Figure 4A). The CD14-HuMoSC supernatant tended to ameliorate GvHD score and weight with significant result only on D57 ($p=0.0247$) (Figure 4B and 4C). Engraftment and percentage of T cells showed no differences between groups (Supplemental figure 3).

CD14-HuMoSC supernatant keeps its immunosuppressive function in clinical conditions

As the aim of this study was to use this supernatant as a therapy in patients undergoing allo-HCT, we had to assess the immunosuppressive function of CD14-HuMoSC supernatant in an

inflammatory environment and in the presence of immunosuppressive drugs usually used in clinic for GvHD prevention such as methotrexate, ciclosporine A and methylprednisolone. As shown in the figure 5A, the immunosuppressive properties of CD14-HuMoSC supernatant were not abrogated in the presence of these immunosuppressive drugs alone or a mix either. Thus, TLR ligands or proinflammatory cytokines did not affect CD14-HuMoSC supernatant immunoregulatory properties (Figure 5B and 5C).

All these data demonstrated that CD14-HuMoSC supernatant kept their immunoregulatory properties in inflammatory conditions and in the presence of immunosuppressive drugs.

CD14-HuMoSC supernatant can be produced in GMP conditions

The generation protocol is fully GMP, especially for CD14-HuMoSC isolation thanks to the CD14 microbeads with GMP grade. CD14-HuMoSC supernatants are produced in physiologic solution, a clinically relevant medium, usually used for drug administration. We have shown that freezing for 2 months and sterile filtration 0.22 μ m did not modify the CD14-HuMoSC supernatant immunosuppressive functions (Figure 6A and 6B). CD14-HuMoSC supernatant can be produced on a large scale and in a GMP manner.

CD14-HuMoSC supernatant display relevant immunosuppressive pathways compared to monocytes

In order to study if the monocytic origin plays a key role in the immunosuppressive properties of CD14-HuMoSC supernatant, we compared immunosuppressive properties of monocyte supernatant with CD14-HuMoSC supernatant. Six samples from 3 different CD14-HuMoSC and 3 monocyte supernatants were analyzed regarding their immunosuppressive properties.

Contrary to CD14-HuMoSC supernatants, none of the monocyte supernatants showed immunosuppressive properties. Proteomic analysis of monocytes and CD14-HuMoSC supernatants was performed in order to identify proteins involved in these immunosuppressive properties. Analyses identified 912 subgroups of proteins in a total of 2508 proteins. Principal component analysis (PCA) showed great differences between the two types of supernatants (Figure 7A). Supernatants were homogeneous except one sample of CD14-HuMoSC that was apart. Interestingly, this sample demonstrated less immunosuppressive capacity (data not shown) and its proteomic analysis showed some similarities with the monocyte supernatant rather than the CD14-HuMoSC supernatant (Figure 7B). Based on Gene Ontology terms « t cell activation », « response to stimulus » and « immune system process », we highlighted a differential expression of proteins responsible for immunosuppression (Figure 7B). We observed a high modification of protein profile expressed in CD14-HuMoSC supernatant compared to monocyte supernatant. Variance analyses identified 416 proteins differentially expressed and three proteins known to have immunosuppressive properties were identified, galectin-3, osteoactivin (GPNMB) and IL-1RA (Figure 7C). The multiplex analysis confirmed that CD14-HuMoSC secrete high levels of galectin 3, IL-1RA and osteoactivin (Figure 7D) and that concentrations of IL-1RA and galectin 3 were significantly higher in CD14-HuMoSC supernatants than in monocyte supernatant ; osteoactivin is not secreted by monocytes. None of the already known immunosuppressive factors expressed by MDSC, chemokines and cytokines such as CCL-2, IL-10 PD-L1, IL-2, IFN- α or IL-6 were detected at high concentration in the CD14-HuMoSC supernatant and could explain its immunosuppressive properties.

Altogether, we identified 3 immunosuppressive proteins, IL-1RA, osteoactivin and galectin-3 in the CD14-HuMoSC supernatant which were not present in the monocyte supernatant.

Discussion

Our team has previously reported on an original approach to obtain human myeloid suppressor cells derived from circulating monocytes, named HuMoSC (patent N°WO2015140077A1). This population inhibits T cell activation and proliferation, induces Treg and interestingly reduces GvHD severity in a xenogeneic model. However, to go from bench to bed side was hampered by the low yield of generated HuMoSC; using our protocol, large amounts of monocytes were needed to treat one patient. This protocol was modified in order to recover all the CD14 positive cells at the end of the culture instead of only the CD33+ cells. This modification allowed getting 3 to 4 more times of cells that were named CD14-HuMoSC. These cells were immunosuppressive but significantly less than the HuMoSC (data not shown). However, the properties of the supernatant of these cells were studied and we showed that CD14-HuMoSC supernatant had strong immunosuppressive capacities. In this work, we clearly demonstrated that CD14-HuMoSC supernatant, contrary to the supernatant of their monocytic cell counterpart, modulate immune response at several levels, acting mainly on T cells but also on DC. Indeed, CD14-HuMoSC supernatant inhibits T cell activation and proliferation, induces Treg differentiation, modulates DC properties and prevents from GvHD. The proteomic analysis identified a few immunosuppressive proteins overexpressed in CD14-HuMoSC supernatant, such as galectin-3, osteoactivin and IL-1RA that were absent in the monocytic supernatant. These results were confirmed by multiplex analysis. The presence of these immunosuppressive can explain all the immunoregulatory properties of the CD14-HuMoSC supernatant but further experiments are needed to confirm this hypothesis.

Galectin-3, an immunoregulatory protein secreted by MSC^{83,84}, can affect both T cells and DC. Indeed, it has been shown that galectin-3 immunoregulatory function's mainly resides in the alteration of the formation of the immunological synapse between DC and LT¹⁷⁵. Galectin-3 binds the α subunit of TCR and decreases mobility of many molecules on T lymphocyte cell

surface and, in pellicular, their clustering at the LT/APC interface. Galectin-3 decreases the co-localization of TCR with CD4 and CD8, alters recruitment of LFA-1 and binds CD45 which leads to a decrease in intracellular LT signaling and therefore in its activation^{176,177}. The inhibition of the DC-induced T cell proliferation by CD14-HuMoSC supernatant was shown with both immature and mature DC which allowed us to hypothesize that galectin-3 exerts a steric effect at the level of the immunological synapse rather than a direct effect on DC maturation. Moreover, it has been reported that galectin-3 induces LT apoptosis which was not the case with CD14-HuMoSC supernatant^{178,179}. Likewise, galectin-3 can influence intracellular cytokines secretion by CD8 T cells^{177,180}. Indeed, galectin-3 does not directly impair IFN- γ or granzyme B production by CD8 T cells but this molecule could impair LFA-1-mediated synapse completion, that results in the inhibition of the degranulation¹⁸¹. It is in concordance with our data which showed no significant difference in intracellular staining of IFN- γ and granzyme B in T cells but a decrease in their secretion in medium induced after treatment with CD14-HuMoSC supernatant. Moreover, galectin-3 has also been described in a mouse model of asthma to be responsible for increasing the Th2 response and decreasing the Th1 response¹⁸². In accordance with this effect, CD14-HuMoSC supernatant induced a decrease in the Th1 response and an increase in Th2 response confirmed by cytokine analyses. Interestingly, Th1/Th2 ratio decrease would help to control GvHD^{32,133,183}.

The second immunosuppressive protein identified in the CD14-HuMoSC supernatant was osteoactivin, a transmembrane glycoprotein expressed on the surface of several cell types such as DCs, macrophages, melanocytes, osteoblasts and Mo-MDSCs^{184,185}. This protein binds syndecan-IV expressed on T cells cell surface and inhibits their proliferation. Expression of osteoactivin on MDSC has been reported particularly in cancer patients and blocking osteoactivin function could be a potentially useful treatment for restimulate the anti-tumor immune response^{185,186}. Interestingly, osteoactivin has been found in the extracellular

environment. It has been shown that osteoactivin can be secreted by IFN- γ /LPS-activated macrophages and plays a role of negative feedback of inflammation¹⁸⁷. Osteoactivin could also be secreted in exosomes. Indeed, it has been reported that murine melanoma cells exert an immunosuppressive effect on LT via secretion of exosomes containing osteoactivin¹⁸⁸. In this work, we identified osteoactivin in the CD14-HuMoSC supernatant and we could hypothesize that CD14-HuMoSC produce extracellular vesicles containing osteoactivin.

Finally, proteomic analysis and multiplex analysis showed that CD14-HuMoSC supernatant contains large amounts of IL-1RA. IL-1RA is the IL-1 receptor antagonist which binds to the receptor and competitively inhibits the binding of IL-1 β and so preventing it from exerting its inflammatory effects. This natural molecule, IL1-RA, is commonly used in the treatment of certain autoinflammatory diseases. However, it should be noted that its effect is weak and that very large doses of IL-1RA are necessary to successfully block the effects of IL-1, probably due to the large number of IL-1 receptors present on cell surfaces.

Involvement of those 3 different proteins in the CD14-HuMoSC supernatant immunomodulatory properties need to be assessed by blocking experiments.

Furthermore, we demonstrated that a weekly injection of CD14-HuMoSC supernatant prevent NSG mice from GvHD by both improving survival and GvHD Score. To our knowledge, this is the first time that an immunosuppressive supernatant from myeloid cells was shown to demonstrate to prevent from GvHD. Furthermore, patient undergoing allo-HCT used immunosuppressive drugs and present inflammatory conditions which can inhibit the suppressive cell therapies. Interestingly, neither immunosuppressive drugs nor inflammatory environment alter the CD14-HuMoSC supernatant immunosuppressive functions. Thus, this new therapeutic product the CD14-HuMoSC supernatant, efficient for GvHD prevention or inflammatory diseases can be easily produced according to GMP.

In conclusion, we reported for the first time the clinical interest of a highly immunosuppressive supernatant derived from myeloid cells. Even though, the precise mechanisms were not totally deciphered, we showed that CD14-HuMoSC supernatant inhibits CD4 and CD8 T cell activation, proliferation and cytotoxicity and also decreases the functional DC properties. Furthermore, CD14-HuMoSC supernatant prevents NSG mice from GvHD and keeps its immunosuppressive properties in the presence of immunosuppressant and in inflammatory environment. Altogether, we demonstrated that CD14-HuMoSC supernatant can be used as an efficient therapeutic tool to prevent GvHD.

References

1. Blazar BR, MacDonald KPA, Hill GR. Immune regulatory cell infusion for graft-versus-host disease prevention and therapy. *Blood*. 2018;131(24):2651–2660.
2. Zahid MF, Lazarus HM, Ringdén O, et al. Can we prevent or treat graft-versus-host disease with cellular-therapy? *Blood Rev*. 2020;100669.
3. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2011;117(3):1061–1070.
4. Fisher SA, Cutler A, Doree C, et al. Mesenchymal stromal cells as treatment or prophylaxis for acute or chronic graft-versus-host disease in haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients with a haematological condition. *Cochrane Database Syst. Rev*. 2019;1:CD009768.
5. Ning H, Yang F, Jiang M, et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia*. 2008;22(3):593–599.
6. MacMillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I–II clinical trial. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43(6):447–454.
7. Weng JY, Du X, Geng SX, et al. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(12):1732–1740.

8. Janikashvili N, Trad M, Gautheron A, et al. Human monocyte-derived suppressor cells control graft-versus-host disease by inducing regulatory forkhead box protein 3-positive CD8+ T lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015;135(6):1614-1624.e4.
9. Romieu-Mourez R, François M, Boivin M-N, et al. Cytokine Modulation of TLR Expression and Activation in Mesenchymal Stromal Cells Leads to a Proinflammatory Phenotype. *J. Immunol.* 2009;182(12):7963–7973.
10. Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin. Immunol.* 2013;25(4):305–312.
11. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, et al. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat. Med.* 2014;20(1):62–68.
12. Massoud AH, Charbonnier L-M, Lopez D, et al. An asthma-associated IL4R variant exacerbates airway inflammation by promoting conversion of regulatory T cells to TH17-like cells. *Nat. Med.* 2016;22(9):1013–1022.
13. Hwang S-M, Sharma G, Verma R, et al. Inflammation-induced Id2 promotes plasticity in regulatory T cells. *Nat. Commun.* 2018;9:4736–4749.
14. Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Fløisand Y. Evidence for the Involvement of Galectin-3 in Mesenchymal Stem Cell Suppression of Allogeneic T-Cell Proliferation. *Scand. J. Immunol.* 2010;71(4):267–274.
15. Sioud. Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. *Int. J. Oncol.* 2011;38(2):395–90.
16. Gilson RC, Gunasinghe SD, Johannes L, Gaus K. Galectin-3 modulation of T-cell activation: mechanisms of membrane remodelling. *Prog. Lipid Res.* 2019;76:101010.

17. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*. 2001;409(6821):733–739.
18. Petit A-E, Demotte N, Scheid B, et al. A major secretory defect of tumour-infiltrating T lymphocytes due to galectin impairing LFA-1-mediated synapse completion. *Nat. Commun*. 2016;7(1):12242–57.
19. Stillman BN, Hsu DK, Pang M, et al. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2006;176(2):778–789.
20. Chen I-J, Chen H-L, Demetriou M. Lateral compartmentalization of T cell receptor versus CD45 by galectin-N-glycan binding and microfilaments coordinate basal and activation signaling. *J. Biol. Chem*. 2007;282(48):35361–35372.
21. Kouo T, Huang L, Pucsek AB, et al. Galectin-3 shapes antitumor immune responses by suppressing CD8⁺ T cells via LAG-3 and inhibiting expansion of plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunol. Res*. 2015;3(4):412–423.
22. Demotte N, Wieers G, Van Der Smissen P, et al. A Galectin-3 Ligand Corrects the Impaired Function of Human CD4 and CD8 Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Favors Tumor Rejection in Mice. *Cancer Res*. 2010;70(19):7476–7488.
23. Zuberi RI, Hsu DK, Kalayci O, et al. Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am. J. Pathol*. 2004;165(6):2045–2053.
24. Carlson MJ, West ML, Coghill JM, et al. In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood*. 2009;113(6):1365–1374.

25. Coman T, Rossignol J, D'Aveni M, et al. Human CD4- invariant NKT lymphocytes regulate graft versus host disease. *Oncoimmunology*. 2018;7(11):e1470735-10.
26. Gutiérrez-Hoya A, López-Santiago R, Vela-Ojeda J, et al. Role of CD8 Regulatory T Cells versus Tc1 and Tc17 Cells in the Development of Human Graft-versus-Host Disease. *J. Immunol. Res.* 2017;2017:1–11.
27. Heine A, Held SAE, Schulte-Schrepping J, et al. Generation and functional characterization of MDSC-like cells. *Oncoimmunology*. 2017;6(4):e1295203-12.
28. Colombo MP. Is GPNMB the Achilles' Heel of Mo-MDSC While Marking Their Suppressive Activity? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2019;25(2):453–454.
29. Kobayashi M, Chung J-S, Beg M, et al. Blocking Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell Function via Anti-DC-HIL/GPNMB Antibody Restores the In Vitro Integrity of T Cells from Cancer Patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2019;25(2):828–838.
30. Ripoll VM, Irvine KM, Ravasi T, Sweet MJ, Hume DA. GpnmB Is Induced in Macrophages by IFN- γ and Lipopolysaccharide and Acts as a Feedback Regulator of Proinflammatory Responses. *J. Immunol.* 2007;178(10):6557–6566.
31. Tomihari M, Chung J-S, Akiyoshi H, Cruz PD, Ariizumi K. DC-HIL/Glycoprotein Nmb Promotes Growth of Melanoma in Mice by Inhibiting the Activation of Tumor-Reactive T Cells. *Cancer Res.* 2010;70(14):5778–5787.

Figure 1

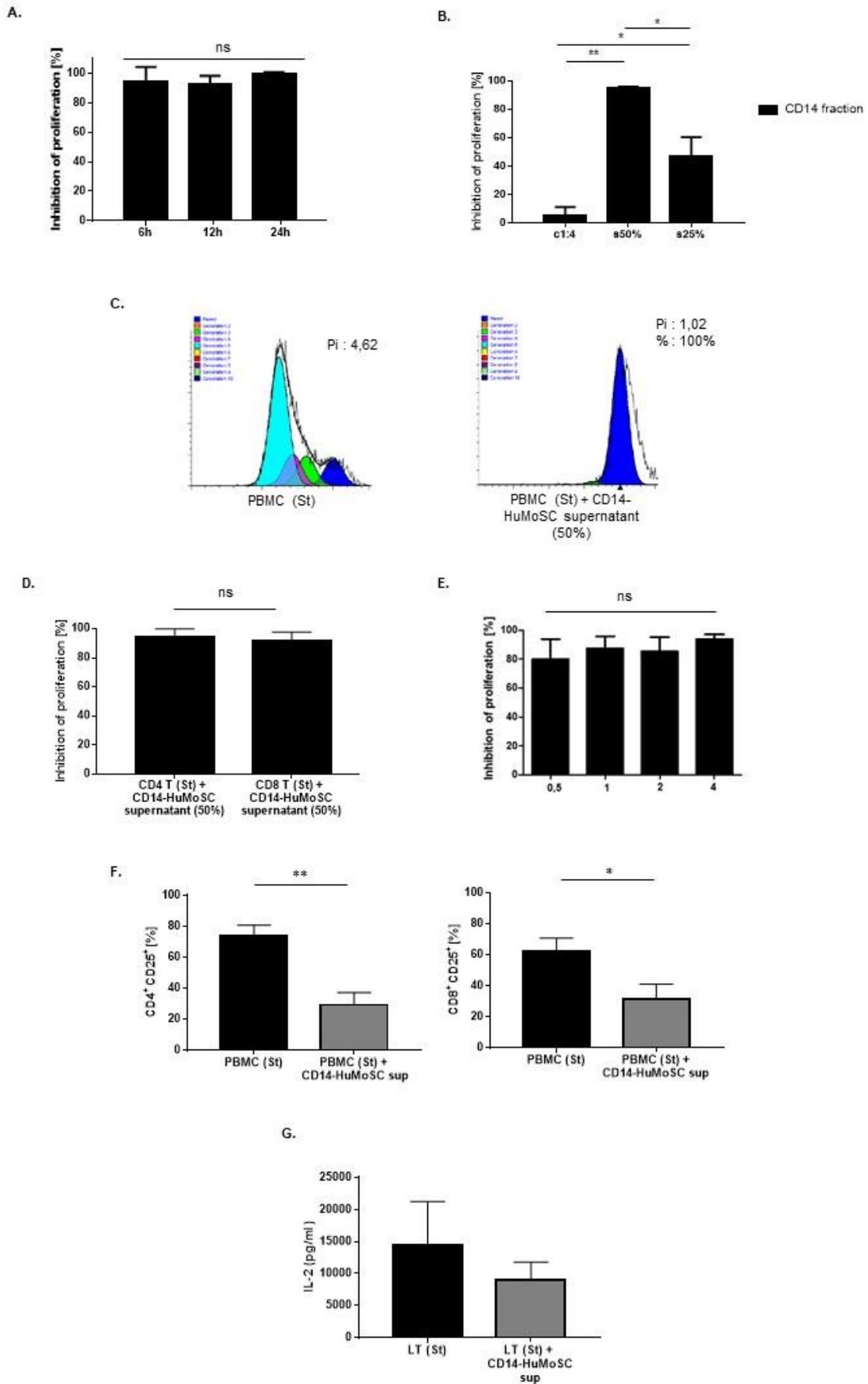


Figure 2

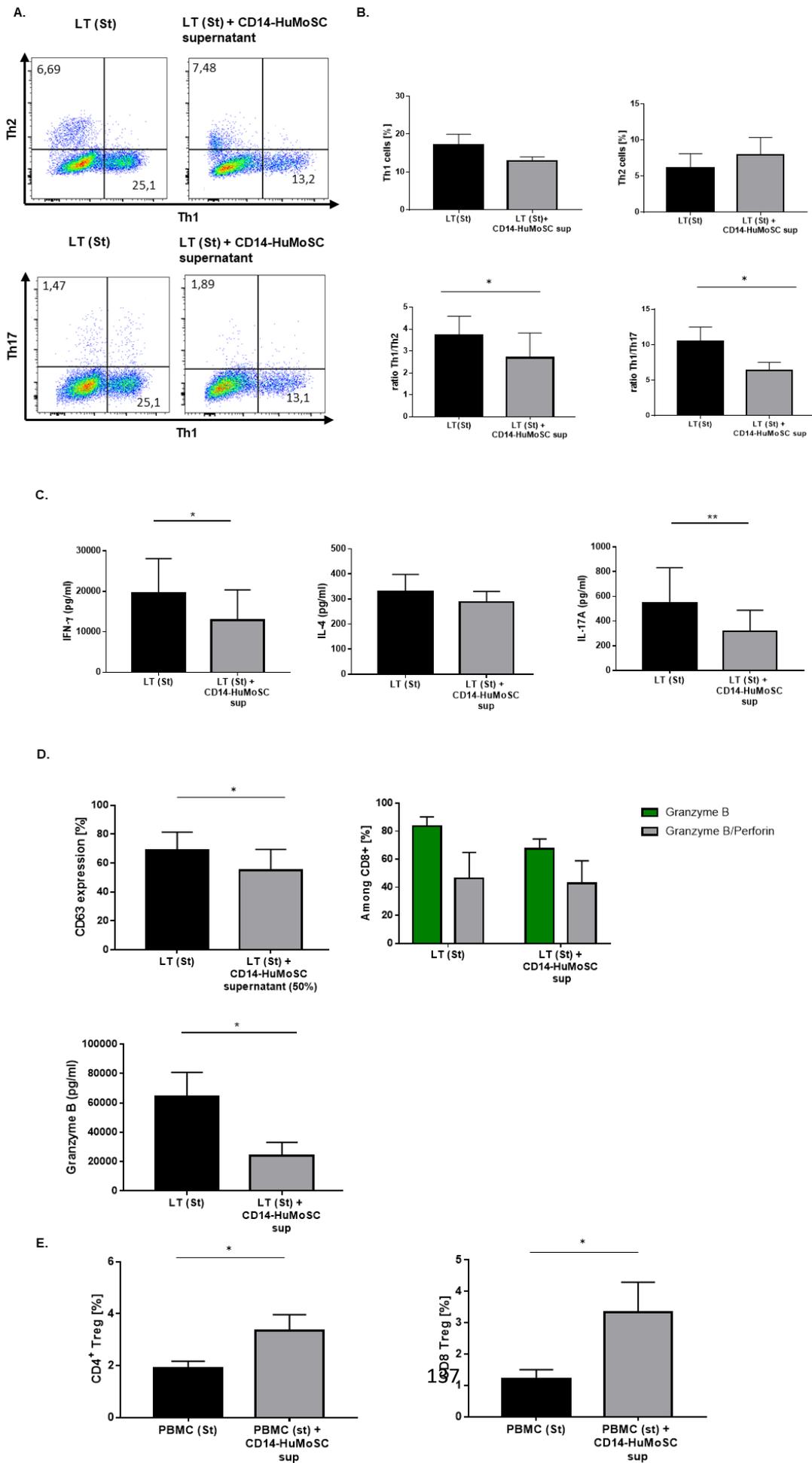


Figure 3

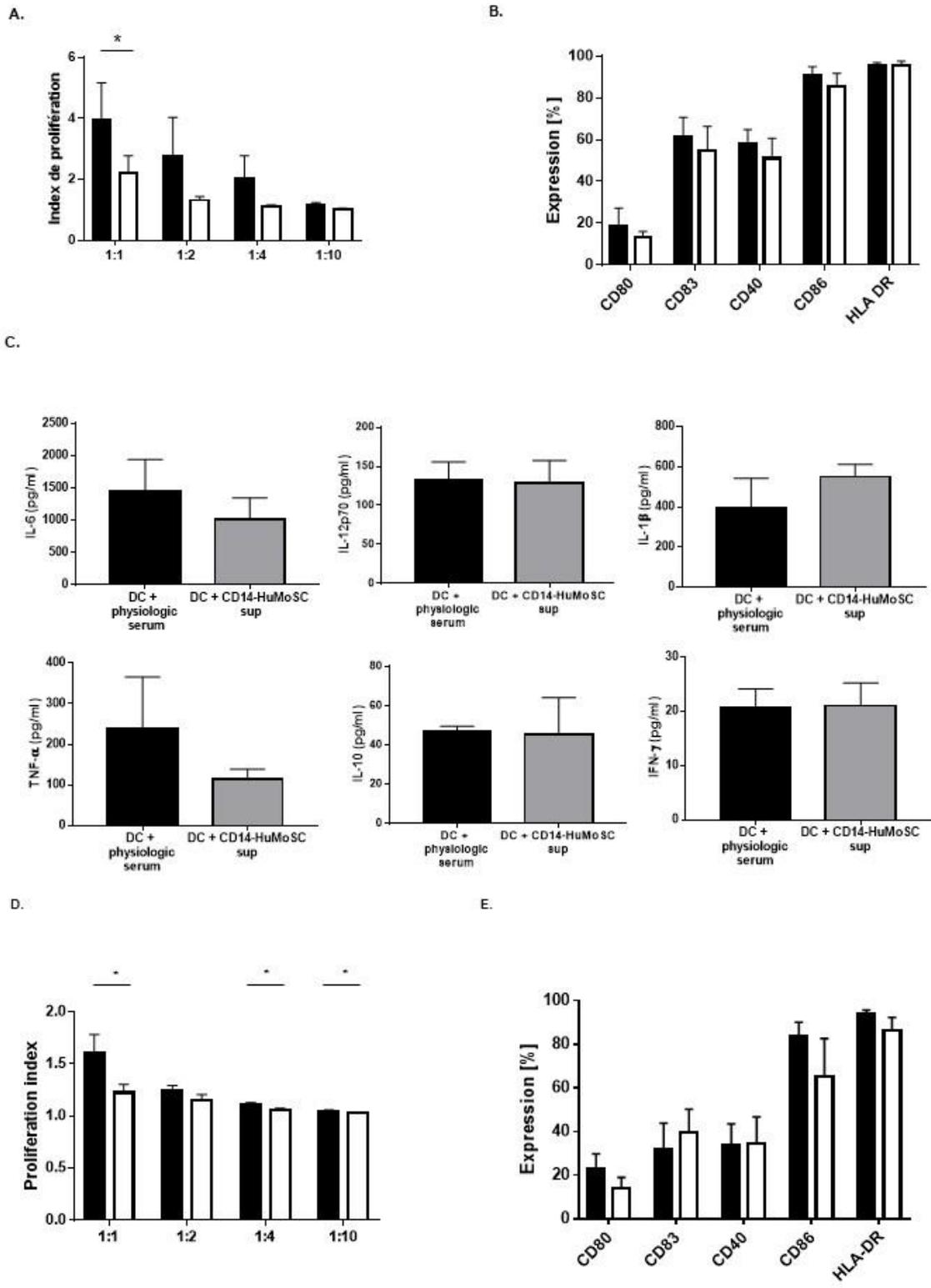


Figure 4

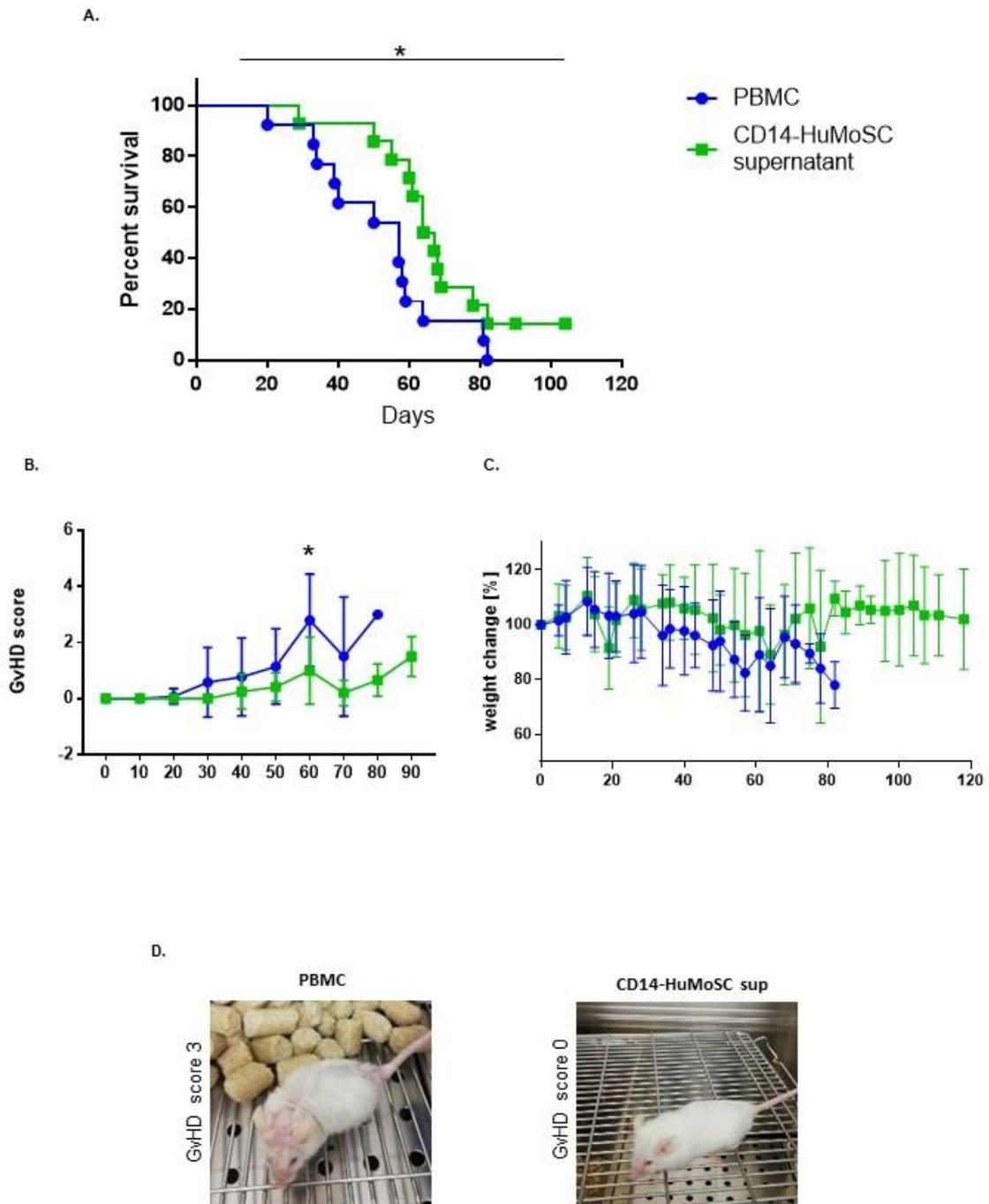


Figure 5

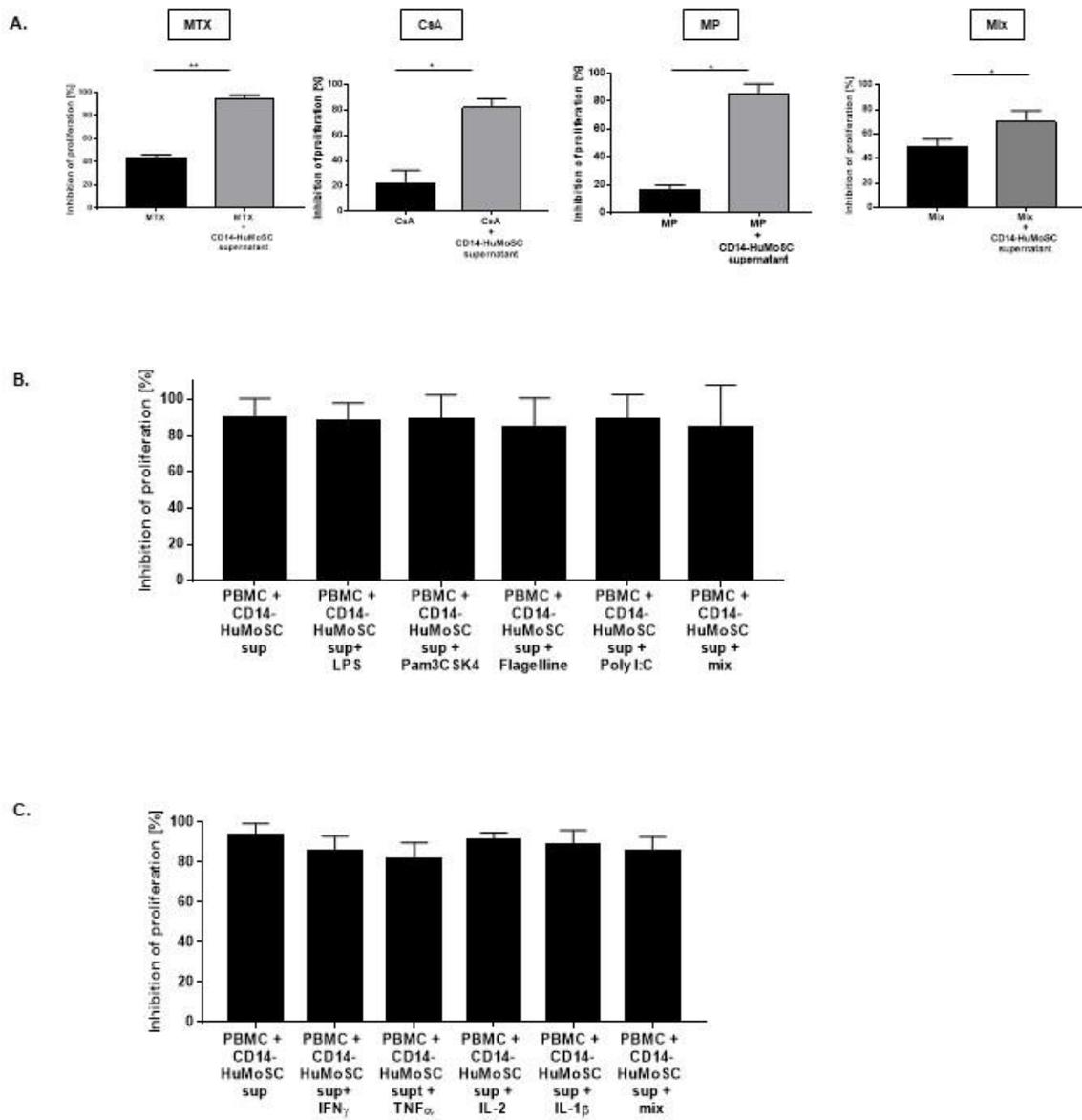


Figure 6

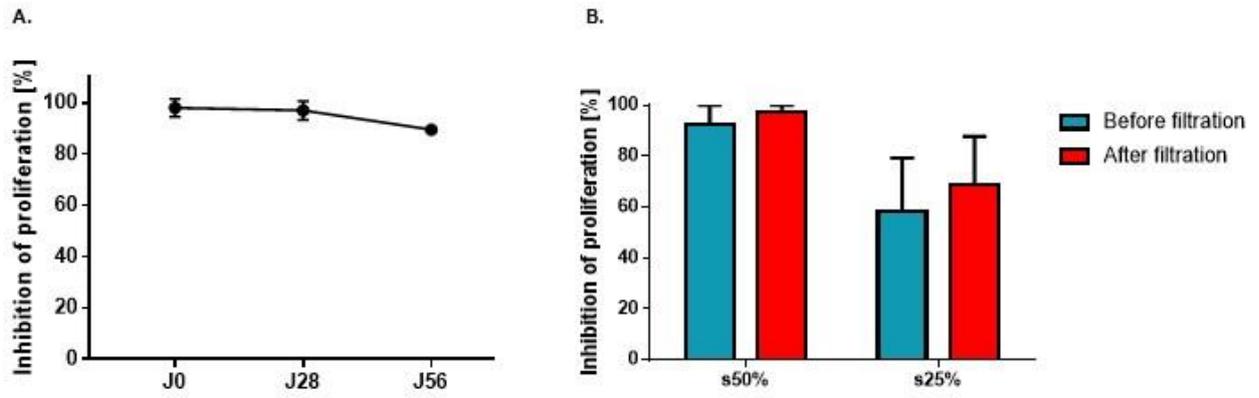
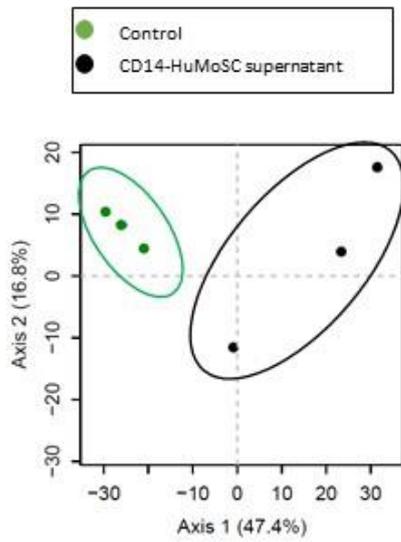
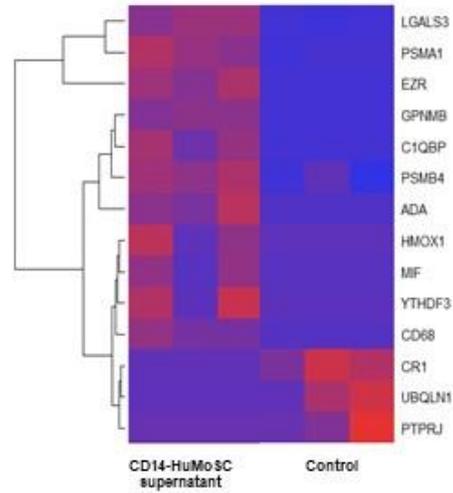


Figure 7

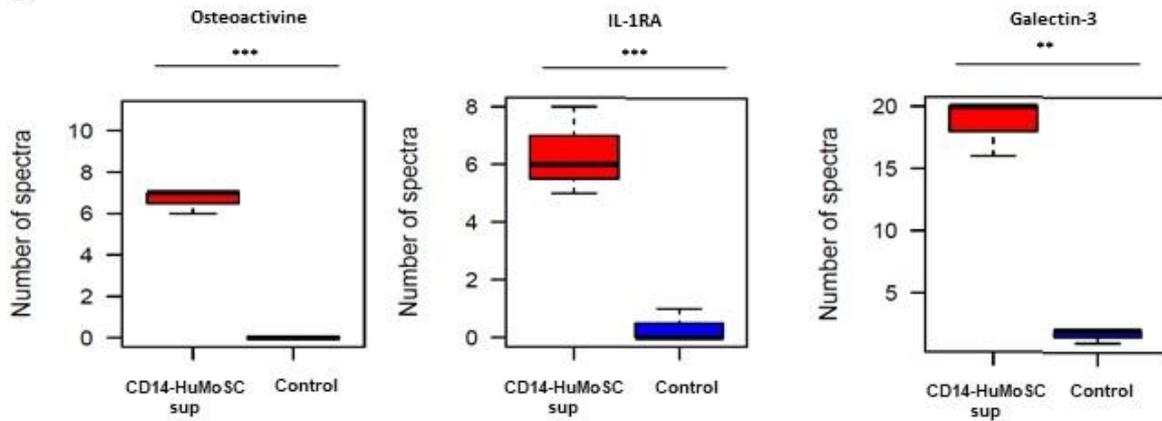
A.



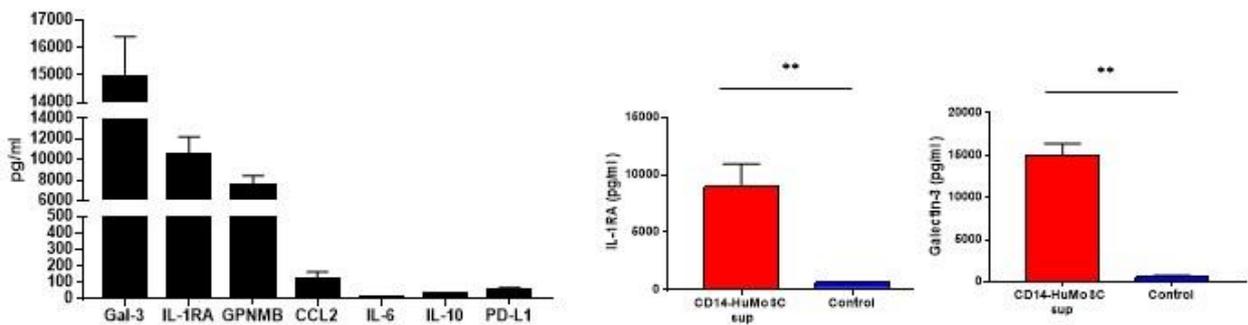
B.



C.



D.



Figures legends

Figure 1: Determination of optimal parameters to produce an immunosuppressive supernatant by CD14-HuMoSC (CD14-HuMoSC sup).

A. Time point: CD14-HuMoSC were plated for 6h, 12h and 24h at concentration of 1 million cell/ml in physiologic serum. At each time point, Cell-Trace Violet labeled PBMC stimulated with anti-CD3/CD28 microbeads were cocultured in presence of 500 μ L of CD14-HuMoSC supernatant (50%). The proliferation index was determined after 4 days and the percentage of proliferation inhibition was calculated. Results of 3 independent experiments are shown. B. Concentration: two different concentrations of supernatant were assessed, s25% and s50%. The proliferation index was determined after 4 days and the percentage of proliferation inhibition was calculated. Results of 3 independent experiments are shown. C. Stimulated PBMC were cocultured with CD14-HuMoSC supernatant (50%) and proliferation of PBMC was assessed after 4 days. Representative Modfit analysis is shown. Pi, proliferation index; % : inhibition of proliferation. D. Percentage of T-cell proliferation inhibition was determined separately for CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Results of 4 independent experiments are shown. E. 500 000, 1 million, 2 millions, 4 millions PBMC were treated with CD14-HuMoSC supernatant. Results of 3 independent experiment. F. CD25 expression on CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes after treatment with CD14-HuMoSC supernatant. Results of 6 independent experiments. G. IL-2 secretion by T lymphocytes treated by CD14-HuMoSC supernatant. Result of 4 independent

experiments. Data are shown as mean \pm SEM of representative experiments. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$

Figure 2: Effect of CD14-HuMoSC supernatant on T lymphocytes.

After 4 days of stimulation with anti-CD3/CD28 stimulation beads, LT were stimulated for 4h with PMA+ionomycine and brefeldin A and then stained for IFN- γ , IL-4 and IL-17A detection among CD4⁺ cells and analyzed by flow cytometry with BD LSR II and FlowJo software. A. Dot plot from one representative experiment. B. Percentage of Th1, Th2, Th17 were calculated. Results of 5 independent experiments are shown. C. IFN- γ , IL-4 and IL-17A concentrations were measured in the culture from stimulated T cells treated with CD14-HuMoSC supernatant. Results of 3 independent experiments are shown. D. T lymphocytes were stained for CD63 expression and intracellular granzyme B and perforin expression after 4 days of culture with CD14-HuMoSC supernatant (50%) and then analyzed by flow cytometry. Results of 5 independent experiments are shown. E. Granzyme B concentration was measured in the culture supernatant from stimulated T cells treated with CD14-HuMoSC supernatant. Results of 4 independent experiments. E. Induction of CD4 and CD8 Treg with CD14-HuMoSC supernatant. Results of 6 independent experiments are shown. Data are shown as mean \pm SEM of representative experiments. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$)

Figure 3: Effect of CD14-HuMoSC supernatant on dendritic cell functions.

A. CD14-HuMoSC supernatant or physiologic serum was added at D5 with LPS to induce DC maturation, at D7, DC were collected and coculture for 4 days with non-stimulated PBMC stained with Cell-Trace Violet and analyzed by flow cytometry with BD LSR II and Modfit software. Different ratios DC:PBMC were studied. Results of 5 independent experiments are shown. B. Expression of CD83, CD40, CD86 et HLA-DR was assessed on D7 after treatment with CD14-HuMoSC or physiologic serum at D5. Analysis by flow cytometry and FlowJo software. Results of 5 independent experiments are shown. C IL-4, IL12p70, IL-1 β , TNF- α , IL-10 and IFN- γ concentrations were measured by Multiplex in DC cell cultured medium. Results of 4 independent experiments. D. CD14-HuMoSC supernatant or physiologic serum was added at D7 for 24h and then at D8 cocultured for 4 days with non-stimulated PBMC stained with Cell-Trace Violet and analyzed by flow cytometry with BD LSR II and FlowJo software, Results of 6 independent experiments are shown. D. DC were stained for CD86, CD40, CD83 and CD80 after incubation for 24h with CD14-HuMoSC supernatant or physiologic serum. Results of 5 independent experiments are shown, Data are shown as mean \pm SEM of representative experiments. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$

Figure 4: CD14-HuMoSC supernatant controls the development of xeno-GvHD in NSG.

NSG mice aged of 8 weeks were irradiated with 2 Gy and received intraperitoneously 10×10^6 huPBMC with 2 ml of physiologic serum (PBMC group, control group, n=15) or 2 mL of CD14-HuMoSC supernatant (CD14-HuMoSC supernatant group, n=15). A. Mice survival was assessed twice a week. The survival curves were compared by using log-rank test. B. GvHD score of the 2 groups was assessed twice a week. C. Mean percentage of weight variations from original weight was assessed twice a week. D. Mice at day 68, mice from PBMC group mice has a score at 3, mice from CD14-HuMoSC has a score at 0. Results of 2 independent experiments are shown. *: $p \leq 0,05$

Figure 5: Impact of inflammatory environment on CD14-HuMoSC supernatant immunosuppressive functions.

A. 500 000 Cell-Trace Violet labeled PBMC stimulated with anti-CD3/CD28 microbeads were cocultured in presence of methotrexate (MTX, 2,5ng/ml), ciclosporin A (CsA, 5ng/ml), methylprednisolone (MP, 25ng/ml) or a mix of them and CD14-HuMoSC supernatant. Results of 3 independent experiments are shown. B. 500 000 Cell-Trace Violet labeled PBMC stimulated with anti-CD3/CD28 microbeads were cocultured in presence of LPS (50ng/ml), PAM3CSK4 (50ng/ml), flagellin (50ng/ml), Poly I:C (50 μ g/ml) or mix of them and CD14-HuMoSC supernatant. Results of 3 independent experiments are shown. C. 500 000 Cell-Trace Violet labeled PBMC stimulated with anti-CD3/CD28 microbeads were cocultured in presence of IL-2 (20IU/ml), IFN- γ (25ng/ml), TNF- α (25ng/ml), IL-1 β (25ng/ml) or a ix of them and

CD14-HuMoSC supernatant. Results of 3 independent experiments are shown. Data are shown as mean \pm SEM of representative experiments. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$

Figure 6: Production of CD14-HuMoSC supernatant for clinical use.

A. PBMC were stimulated with anti-CD3/CD28 activation beads and were cocultured with fresh or thawed HuMoSC/CD14-HuMoSC supernatant (50%) at J26 or J56 for 4 days and analyzed by flow cytometry with BD LSR II and FlowJo software Freezing of HuMoSC/CD14-HuMoSC supernatant at -20°C for 2 months. B. PBMC were stimulated with anti-CD3/CD28 activation beads and were cocultured with HuMoSC/CD14-HuMoSC supernatant (50%) before and after their filtration for 4 days and analyzed by flow cytometry with BD LSR II and FlowJo software Impact of sterilizing filtration on HuMoSC/CD14-HuMoSC supernatant immunosuppressive function. Datas of 3 independent experiments are shown. Data are shown as mean \pm SEM of representative experiments

Figure 7: Analysis of CD14-HuMoSC supernatant content compared with monocyte supernatant (control).

Proteomic analysis was performed with Hybrid Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer (LTQ Orbitrap XL) in collaboration with INRA genetic platform in Evry (PAPPSO, Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest) and analysis was done with the help of Clinical

Innovation Proteomic Platform. A. Principal Component Analysis. B. Heatmap of immunosuppressive proteins, sorted by GO annotations “immune system process”. C. Three immunosuppressive proteins identified with significant variation. D. Content of CD14-HuMoSC supernatant was analyzed by using Multiplex. Comparison of CD14-HuMoSC and monocyte (control) supernatants for IL-1RA and Osteoactivin (GPNMB) secretions. Data of 3 independent experiments are shown. Data are shown as means \pm SEM. , * < 0,05, ** < 0,01, ***<0,001

Supplemental Figure 1

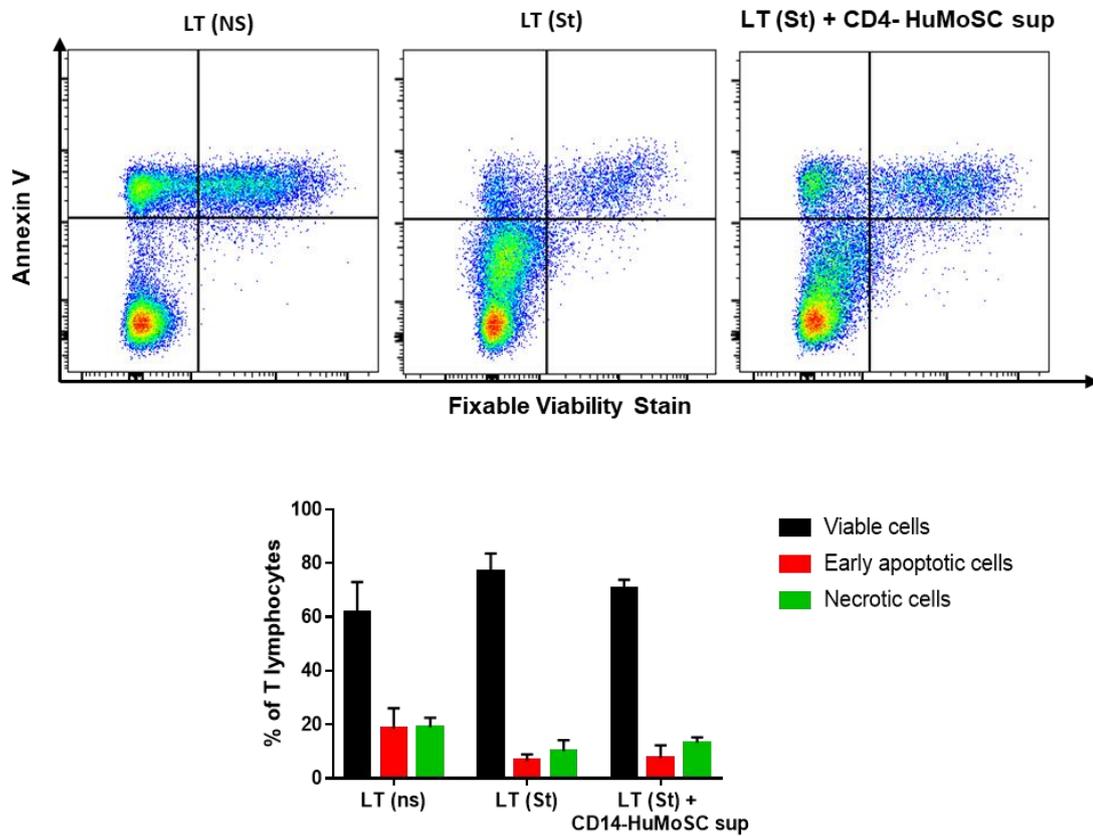


Figure 1: Effect of CD14-HuMoSC supernatant on T lymphocyte viability. Cell-Trace Violet labeled LT were stimulated with anti-CD3/CD28 stimulation beads for 4 days with CD14-HuMoSC supernatant (50%). LT were stained with annexin V and fixable viability stain and then analyzed by flow cytometry with BD LSR II and FlowJo software. A: Dot plot representative of one experiment with CD14-HuMoSC supernatant and B: results of 3 independent experiments are shown. Data are shown as mean \pm SEM of representative experiments

Supplemental Figure 2

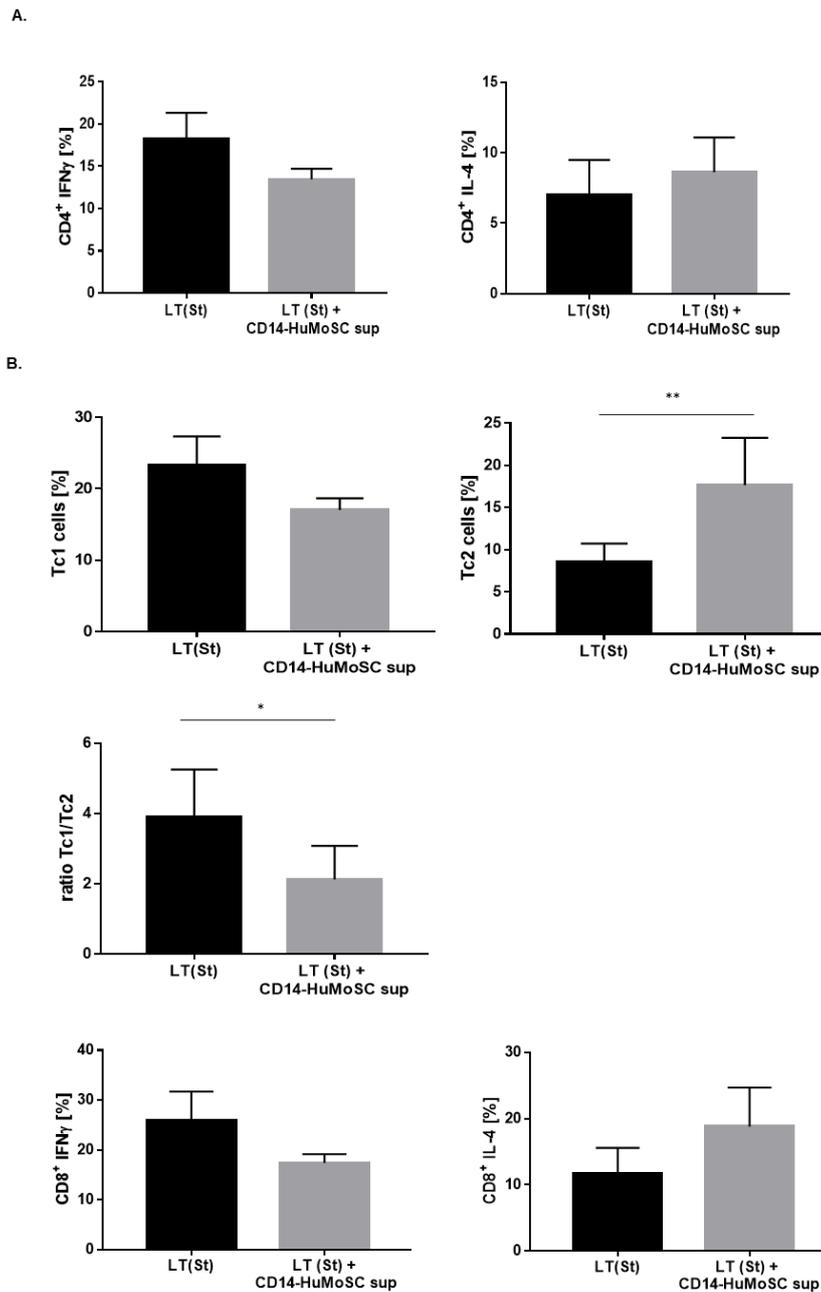


Figure 2: Effect of CD14-HuMoSC supernatant on T lymphocytes. After 4 days of stimulation with anti-CD3/CD28 stimulation beads, LT were stimulated for 4h with PMA+ionomycin and brefeldin A and then stained with CD3, CD4, CD8, IL-4, IL-17A and IFN- γ . A. Percentage of CD4⁺IFN- γ and CD4⁺IL-4 were calculated. Results of 5 independent experiments are shown. B. Percentage of Th1, Th2, Th17, CD8⁺ IFN- γ and CD8⁺ IL-4 were calculated. Results of 5 independent experiments are shown. Data are shown as means \pm SEM. * < 0,05, ** < 0,01

Supplemental Figure 3

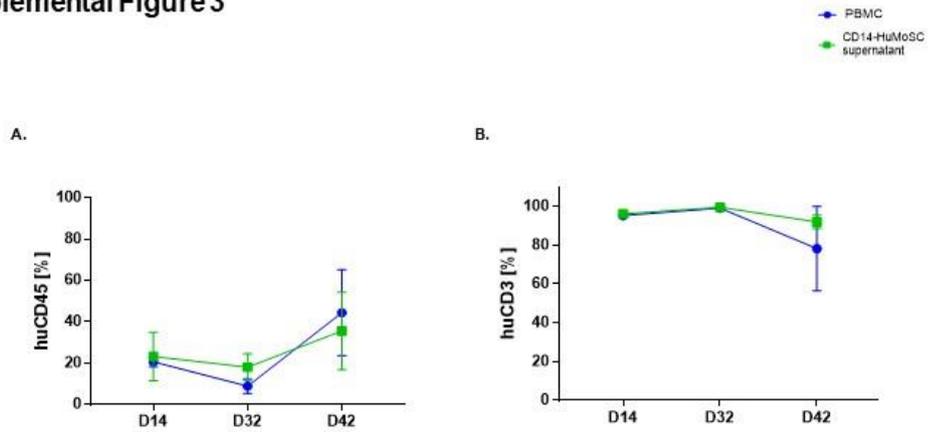


Figure 3: Evaluation of human PBMC engraftment. Mice blood was collected from mandibular or tail vein of three mice of each group. A. Percentage of human CD45+ cells in mice blood (n=3). B. Percentage of human CD3+ cells in mice blood at D14, D32 and D42 or at D32. D. CD4/CD8 ratio in mice blood at D32 (n=3). Data are shown as mean \pm SEM of representative experiments

Résultats complémentaires

Les expériences menées avec le surnageant de CD14-HuMoSC ont été menées en parallèle avec le surnageant d'HuMoSC. Les résultats obtenus ont été quasi identiques sauf pour la partie *in vivo*. Ces résultats sont présentés dans cette partie en attendant de nouvelles expérimentations *in vivo* avec un nouveau schéma thérapeutique adapté.

Les HuMoSC produisent un surnageant hautement immunosuppresseur, généré dans un milieu compatible avec la clinique

Il a été montré dans une précédente publication que le surnageant d'HuMoSC généré sur 48h dans du milieu RPMI complet est hautement immunosuppresseur⁵. Brièvement, les HuMoSC ont été incubés pendant 48h à la concentration de 1 million de cellules/ml dans du RPMI complet pendant 48h, sous 37°C et 5% de CO₂. Nous nous sommes interrogés sur le potentiel thérapeutique de ce surnageant dans la prévention de la GvHD et des maladies auto-immunes. Nous avons produit ce surnageant en incubant les HuMoSC pendant différents temps dans du sérum physiologique, qui est un solvant utilisé en clinique et sans produit animal comme le SVF. Nous avons montré que le surnageant produit en incubant les HuMoSC dans du sérum physiologique pendant 6h, 12h et 24h, conservait ses fonctions immunosuppressives (Figure 21).

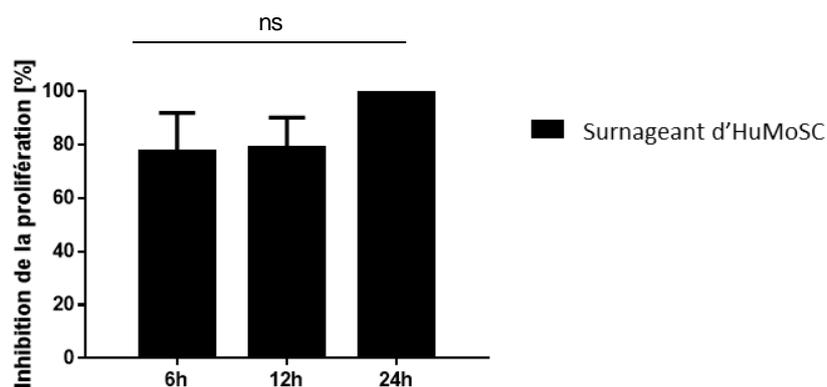


Figure 21 : Détermination des paramètres optimaux pour produire un surnageant immunosuppresseur issu des HuMoSC (Surnageant d'HuMoSC). Les HuMoSC sont incubées pendant 6h, 12h ou 24h à la concentration de 1 million cellules/ml dans du sérum physiologique. A chaque temps, des PBMC marquées au CTV et stimulées avec des billes d'activation anti-CD3/CD28 ont été mises en culture en présence de 500µL de surnageant d'HuMoSC (Surnageant d'HuMoSC, 50%) ou de sérum physiologique. L'index de prolifération est déterminé après 4 jours et

le pourcentage d'inhibition de la prolifération est alors calculé. Les résultats de 3 expériences indépendantes sont montrés. Les données sont montrées avec la moyenne \pm SEM des expériences représentatives. (ns = non significatif).

Ensuite, nous avons comparé la capacité d'inhiber la prolifération des PBMC par les HuMoSC et le surnageant d'HuMoSC produit dans ces nouvelles conditions, à différentes concentrations (s50% pour 500 μ L, s25% pour 250 μ L de surnageant d'HuMoSC dans une plaque 24 puits, puit de 1ml au total) après 24h d'incubation. Les HuMoSC perdent leur capacité immunosuppressive après 24h mais le surnageant reste hautement immunosuppresseur avec une inhibition de 70% (s25%) à 100% (s50%) de la prolifération des PBMC. Le surnageant d'HuMoSC après 24h conserve la capacité d'inhiber presque à 100% la prolifération des PBMC (Figure 22A et 22B)

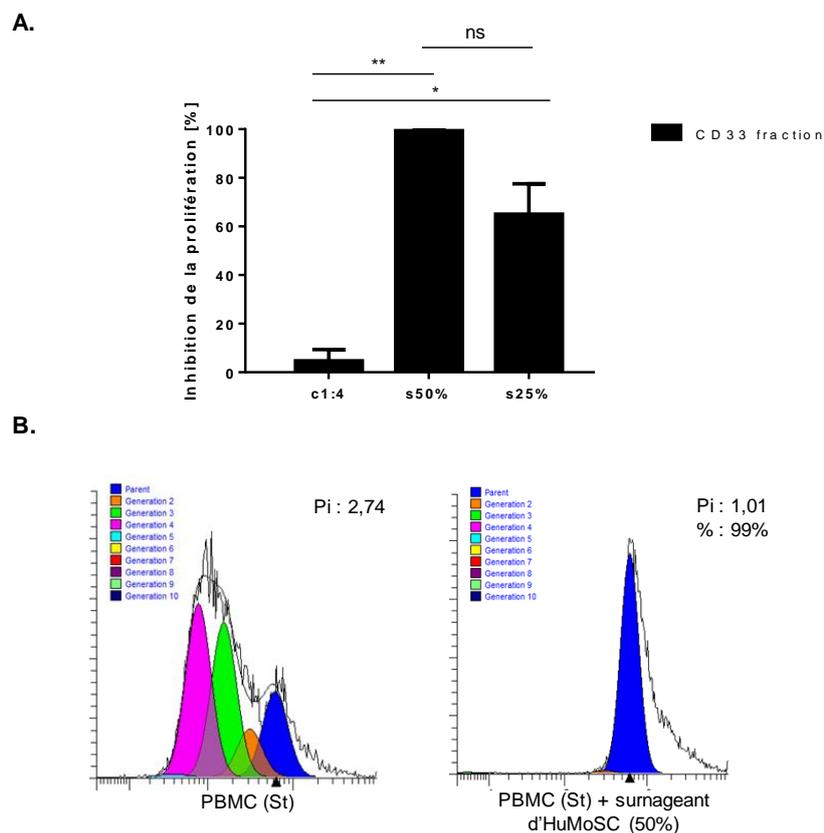


Figure 22: Détermination des paramètres optimaux pour produire un surnageant immunosuppresseur issu des HuMoSC (Surnageant d'HuMoSC). A. Des PBMC marquées au CTV et stimulées avec des billes d'activation anti-CD3/CD28 sont mis en culture en présence d'HuMoSC ou surnageant d'HuMoSC (s25% pour 250 μ l, s50% pour 500 μ l) produit après 24h d'incubation. L'indice de prolifération sera déterminé après 4 jours et le pourcentage d'inhibition de prolifération est calculé. Les résultats de 3 expériences indépendantes sont montrés. B. Des PBMC marquées au Cell-Trace Violet et stimulées avec des billes d'activation anti-CD3/CD28 ont été mises en culture

avec du surnageant d’HuMoSC (50%) et la prolifération des PBMC a été analysée après 4 jours. Une analyse sur ModFit est montrée. Pi, index de prolifération, %, inhibition de la prolifération. Les données sont montrées avec la moyenne \pm SEM des expériences représentatives. (ns = non significatif, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$)

Nous avons également déterminé si le surnageant d’HuMoSC impactait de façon similaire les LT CD4⁺ et LT CD8⁺. Le surnageant d’HuMoSC montre une efficacité comparable sur l’inhibition de la prolifération des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ ($p > 0.9999$) (Figure 23).

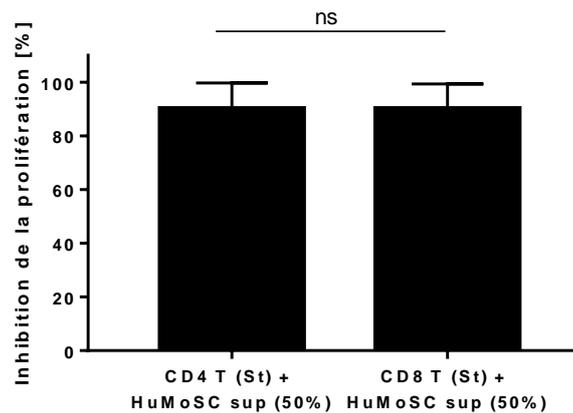


Figure 23 : Evaluation de l’inhibition de la prolifération des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ par le surnageant d’HuMoSC. Les PBMC sont stimulées avec des billes d’activation anti-CD3/CD28 et mis en culture avec du surnageant d’HuMoSC (50%) pendant 4 jours. Les PBMC ont été marquées avec des anticorps anti-CD3, anti-CD4 et anti-CD8 puis analysées par cytométrie en flux sur BD LSR II et sur le logiciel FlowJo. Le pourcentage d’inhibition de la prolifération des LT a été déterminé séparément pour les LT CD4⁺ et LT CD8⁺. Les résultats de 4 expériences indépendantes sont montrés. Les données sont montrées avec la moyenne \pm SEM des expériences représentatives. (ns = non significatif)

Les HuMoSC ont la capacité d’inhiber la prolifération mais aussi l’activation des LT. Nous avons étudié si le surnageant avait aussi cette propriété. Nous avons mesuré l’impact du surnageant d’HuMoSC sur l’expression des marqueurs d’activation lymphocytaire, notamment l’expression du CD25 à la surface des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ (Figure 24A).

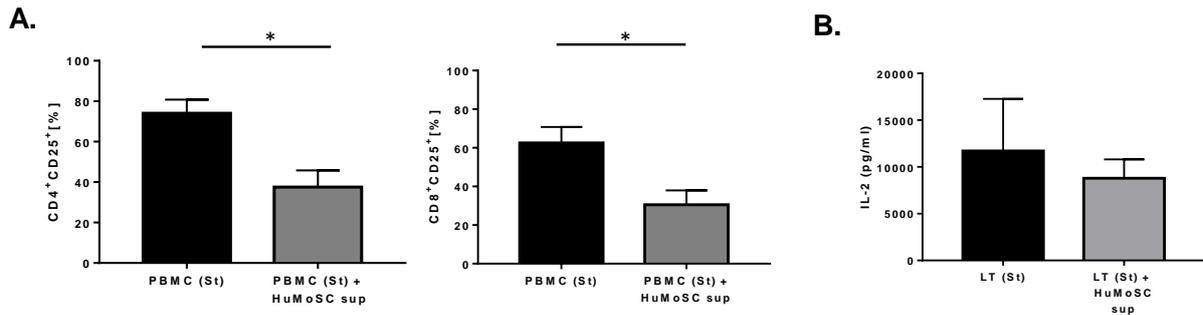


Figure 24 : Effet du surnageant d'HuMoSC sur l'activation des LT. Les PBMC sont stimulées avec des billes d'activation anti-CD3/CD28 et mis en culture avec du surnageant d'HuMoSC (50%) pendant 4 jours. A. Les PBMC ont été marquées avec des anticorps anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 et anti-CD25 puis analysées par cytométrie en flux sur BD LSR II et sur le logiciel FlowJo. Les résultats de 6 expériences indépendantes sont montrés. B. L'IL-2 a été dosé dans le surnageant de coculture par multiplex. Les résultats de 4 expériences indépendantes sont montrés. Les données sont montrées avec la moyenne \pm SEM des expériences représentatives. (ns = non significatif, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$)

Comme le montre la figure 24, l'expression de ce marqueur d'activation est diminuée à la fois sur les LT CD4⁺ ($p=0.0036$) et LT CD8⁺ ($p=0.0288$). Au niveau de la sécrétion d'IL-2, on note une légère diminution de sa sécrétion par les LT traités avec le surnageant d'HuMoSC (Figure 24B)

Tous ces résultats montrent que les HuMoSC produisent un surnageant immunosuppresseur qui pourrait être un des mécanismes par lequel les HuMoSC exercent leur action immunosuppressive. Pour la suite des expériences, le surnageant a été produit en incubant les HuMoSC pendant 24h dans du sérum physiologique. Ce protocole de génération du surnageant des HuMoSC est rapide, facile à réaliser et reproductible.

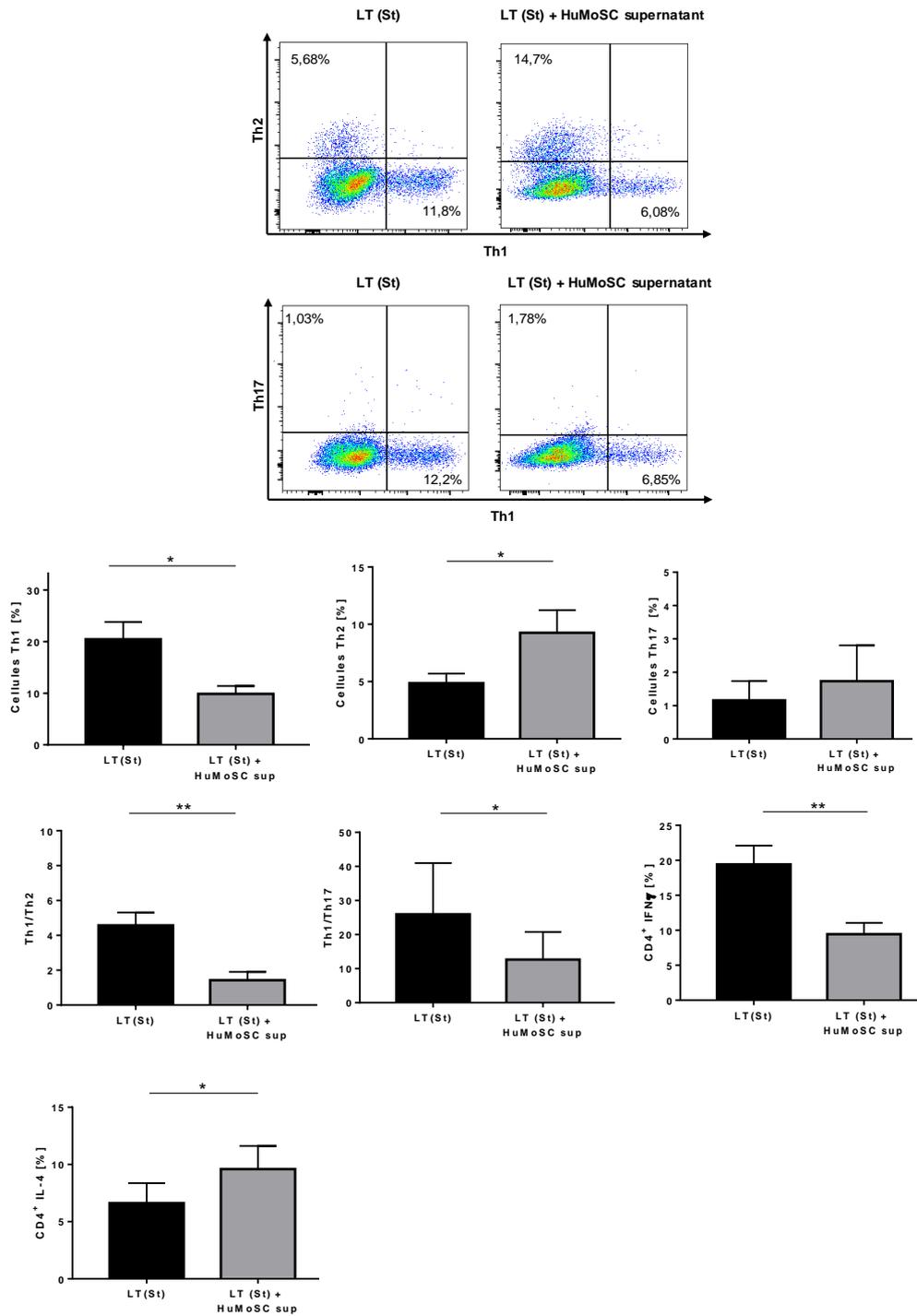
Le surnageant d'HuMoSC diminue la réponse Th1 en faveur d'une réponse Th2

Les thérapies immunosuppressives peuvent directement inhiber la prolifération des LT mais aussi orienter leur différenciation vers des LT auxiliaires, type Treg ou Th2. Aussi, pour compléter nos connaissances sur les effets de ce surnageant, nous avons évalué son impact sur la polarisation des LT afin de mieux expliciter leurs effets immunosuppresseurs et éventuellement de prédire un potentiel intérêt dans la prévention de la GvHD. Les LT ont été isolés de PBMC de patients sains et stimulés pendant 4 jours avec des billes d'activation anti-

CD3/CD28 en présence ou non de surnageant d' HuMoSC. Avant de les étudier en cytométrie en flux, ces LT ont été stimulés à nouveau pendant 4h avec de la PMA + ionomycine (pour permettre une stimulation intracellulaire importante) en présence de brefeldin A (bloquant l'appareil de Golgi et donc l'excrétion extracellulaire des cytokines) afin de permettre le marquage intracellulaire.

Au niveau de la population LT CD4⁺, le pourcentage de la population Th1 est diminué par 2 avec une augmentation de la population Th2 (p=0,042). Aussi le ratio Th1/Th2 est fortement abaissé après traitement par le surnageant d' HuMoSC (p=0,002). De même, une diminution de la population CD4⁺ IFN γ ⁺ (p=0,028) est notée et une tendance à l'augmentation de la population CD4⁺ IL-4⁺ (p=0,064). Concernant les Th17, le surnageant d' HuMoSC n'a pas d'effet sur leur polarisation (Figure 25A). Au niveau cytokinique, on observe une baisse de la sécrétion d' IFN- γ et d' IL-17A (Figure 25B)

A.



B.

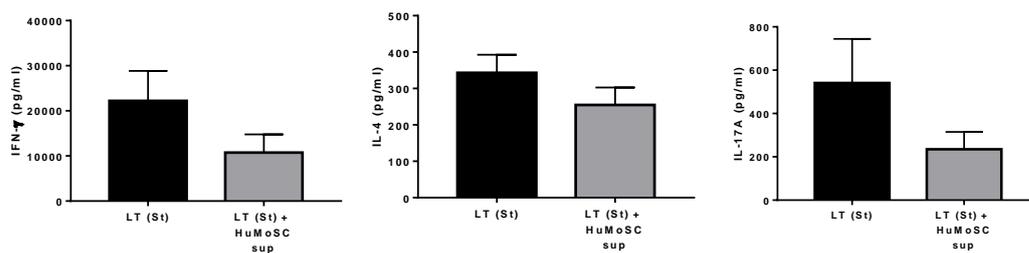
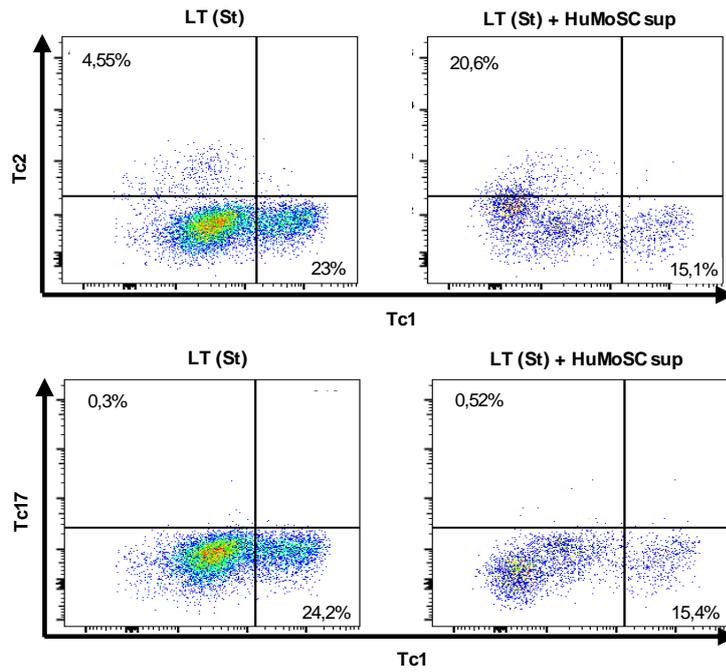


Figure 25 : Effet sur surnageant sur la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ par le surnageant d’HuMoSC. Après 4 jours de stimulation par des billes d’activation anti-CD3/CD28, les LT ont été stimulés pendant 4h avec de la PMA+ionomycine et de la brefeldin. Les LT ont ensuite été marqués pour la détection de l’IFN- γ , IL-4 and IL-17A parmi les LT CD4, analysés par cytométrie en flux sur BD LSR II puis sur le logiciel FlowJo. A. Dot plot d’une expérience représentative. Pourcentages de Th1, Th2, CD4⁺ IFN- γ ⁺ et CD4⁺ IL-4⁺. Les résultats de 5 expériences indépendantes sont montrés. B. L’IFN- γ , l’IL-4 et l’IL-17A ont été dosés dans le surnageant de coculture par multiplex. Les résultats de 4 expériences indépendantes sont montrés. Les données sont montrées avec la moyenne \pm SEM des expériences représentatives. (ns = non significatif, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$)

Au niveau des LT CD8⁺, le pourcentage de LT polarisé en Tc1 est diminué ($n=0,048$) tandis que la population Tc2 augmente de 10% à 20% après traitement par le surnageant d’HuMoSC, avec un ratio Tc1/Tc2 également abaissé ($p=0,02$). La population CD8⁺IFN γ ⁺ ($n=0,046$) diminue et la population CD8⁺IL4⁺ augmente ($p=0,02$). De façon identique aux LT CD4⁺, il n’est pas noté de changement au niveau de l’effet du surnageant d’HuMoSC sur la polarisation des Tc17 (Figure 26A et 26B).

A.



B.

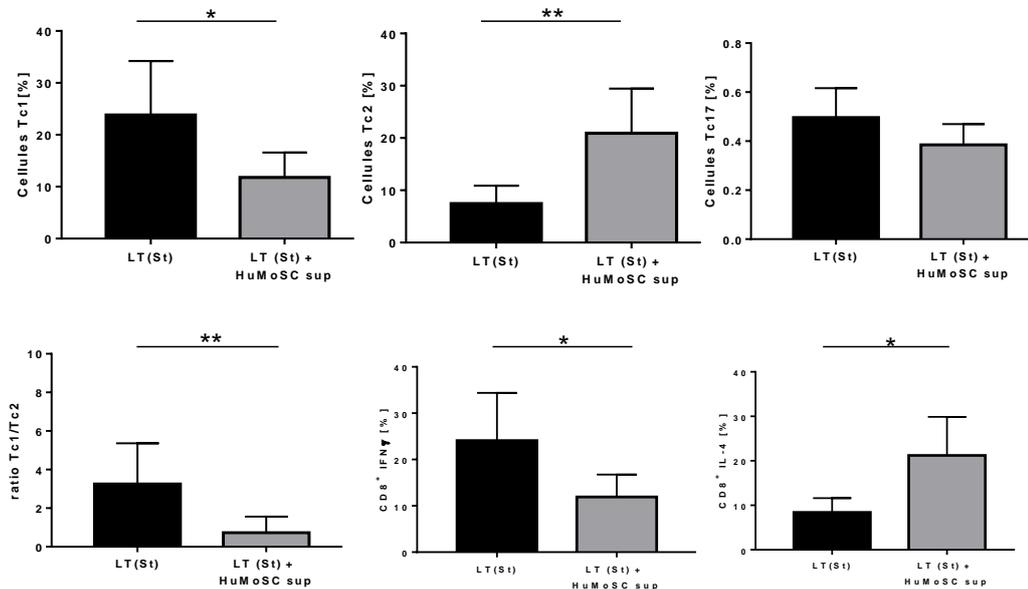


Figure 26 : Effet sur surnageant sur la polarisation des lymphocytes T CD8⁺ par le surnageant d’HuMoSC. Après 4 jours de stimulation par des billes d’activation anti-CD3/CD28, les LT ont été stimulés pendant 4h avec de la PMA+ionomycine et de la brefeldin A. Les LT ont ensuite été marqués pour la détection de l’IFN-γ, IL-4 and IL-17A parmi les LT CD8⁺, analysés par cytométrie en flux sur BD LSR II puis sur le logiciel FlowJo A. Dot plot d’une expérience représentative. B. Pourcentages de Tc1, Tc2, CD8⁺ IFN-γ⁺ et CD8⁺ IL-4⁺. Les résultats de 5 expériences indépendantes sont montrés. Les données sont montrées avec la moyenne ± SEM des expériences représentatives. (ns = non significatif, *: p ≤ 0,05, **: p ≤ 0,01)

Au final, le surnageant diminue les réponses Th1 et Tc1 en faveur des réponses Th2 et Tc2.

Le surnageant d’HuMoSC diminue la cytotoxicité des LT CD8⁺

Les CTL représentent une population majeure impliquée dans la phase effectrice de la GvHD aigüe, il était donc important d’évaluer l’impact du surnageant d’HuMoSC sur la cytotoxicité des LT CD8⁺. Après incubation pendant 4 jours de LT isolés de PBMC de patients sains, nous avons montré de façon intéressante que les LT CD8⁺ perdaient leur capacité à dégranuler en présence de surnageant d’HuMoSC, attestée par la diminution de l’expression de CD63 qui est exprimé une fois que les LT CD8⁺ ont libéré le contenu des granules cytotoxiques (p=0.0002) (Figure 27).

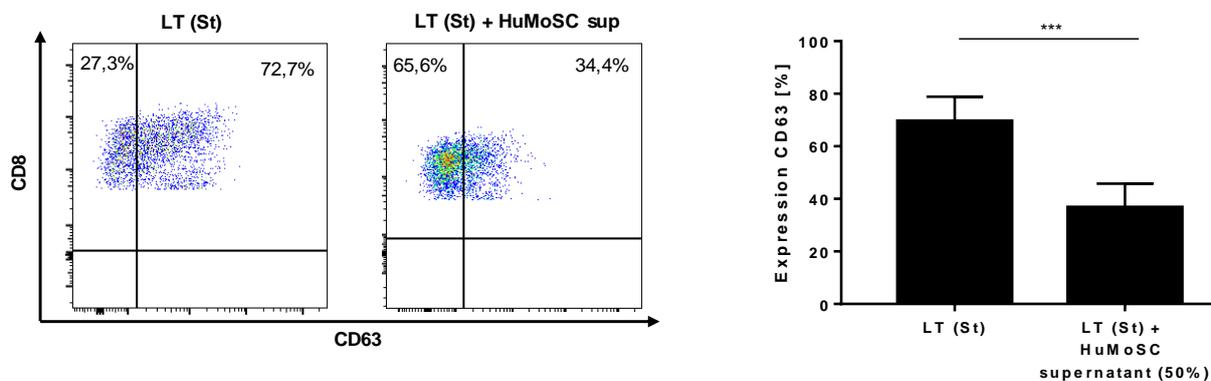


Figure 27 : Effet du surnageant d’HuMoSC sur la cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺. Les LT sont stimulés avec des billes d’activation anti-CD3/CD28 et mis en culture avec du surnageant d’HuMoSC ou du sérum physiologique (50%) pendant 4 jours et marqués par des anticorps anti-CD3, anti-CD8, anti-CD63, anti-granzyme B et anti-perforine puis analysés par cytométrie en flux sur BD LSR II et le logiciel FlowJo. Dot plot d’une expérience représentative. Les résultats de 5 expériences indépendantes sont montrés. Les données sont montrées avec la moyenne \pm SEM des expériences représentatives. (ns = non significatif, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, *** $\leq 0,001$)

Les LT CD8⁺ sécrètent moins de granzyme B lorsqu’ils sont traités par le surnageant d’HuMoSC (p=0.028) mais le pourcentage de cellules CD8⁺Perforine⁺GranzymeB⁺ n’était pas affecté par ce même surnageant (Figure 28).

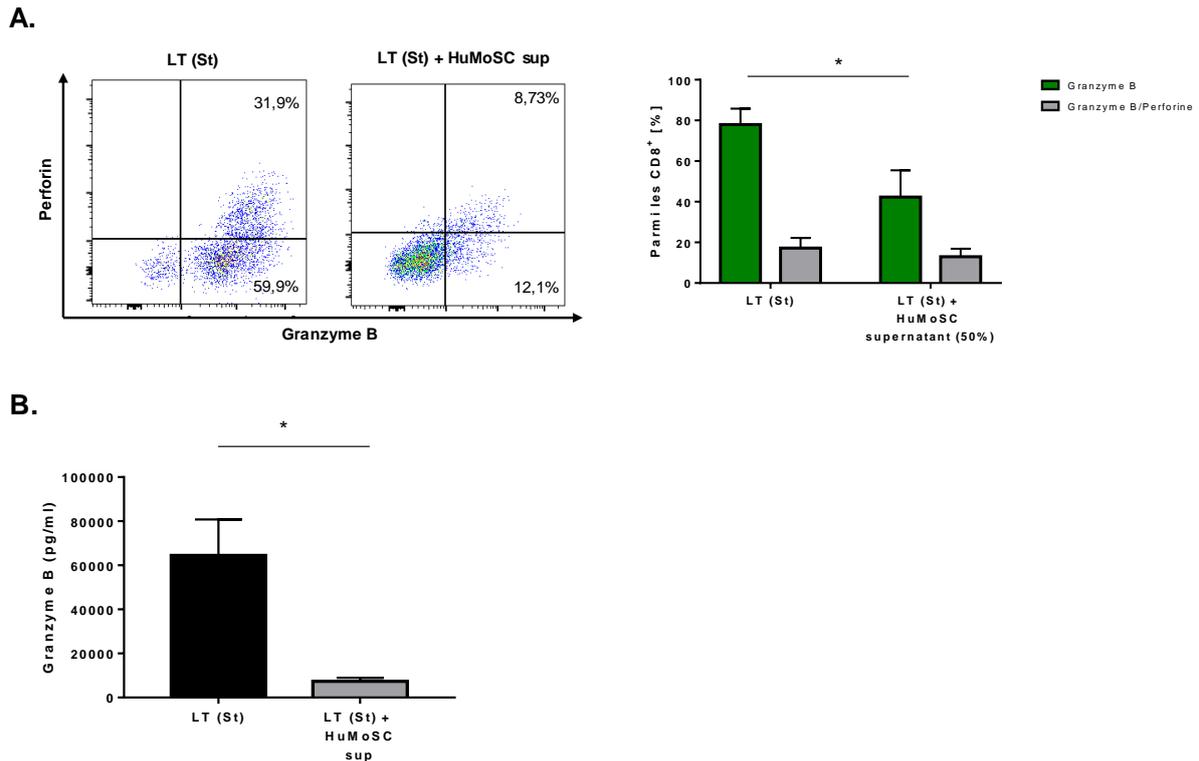


Figure 28 : Effet du surnageant d’HuMoSC sur la cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺. Les LT sont stimulés avec des billes d’activation anti-CD3/CD28 et mis en culture avec du surnageant d’HuMoSC ou du sérum physiologique (50%) pendant 4 jours et marqués par des anticorps anti-CD3, anti-CD8, anti-CD63, anti-granzyme B et anti-perforine et ensuite analysé par cytométrie en flux sur BD LSR II et le logiciel FlowJo. A. Dot plot d’une expérience représentative. Les résultats de 5 expériences indépendantes sont montrés. Proportions de cellules Granzyme B⁺ et Granzyme B⁺ Perforine⁺. B. La sécrétion de granzyme B a été mesurée dans le milieu de culture par multiplex. Les résultats de 4 expériences indépendantes sont montrés. Les données sont montrées avec la moyenne ± SEM des expériences représentatives. (ns = non significatif, *: p ≤ 0,05)

Ces résultats montrent un effet du surnageant sur la cytotoxicité des LT CD8⁺ et donc un effet potentiel *in vivo* dans la prévention de la GvHD et d’autres maladies auto-immunes.

Le surnageant d’HuMoSC induit la présence de Treg

L’équipe avait montré que les HuMoSC étaient capables d’induire des LT CD4⁺/CD8⁺ régulateurs *in vitro* et *in vivo* ⁵. Nous avons voulu déterminer si le surnageant d’HuMoSC pouvait permettre l’induction de Treg. Les CD4⁺ Treg ont été définis comme des cellules CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ et les CD8⁺ Treg comme des cellules CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺.

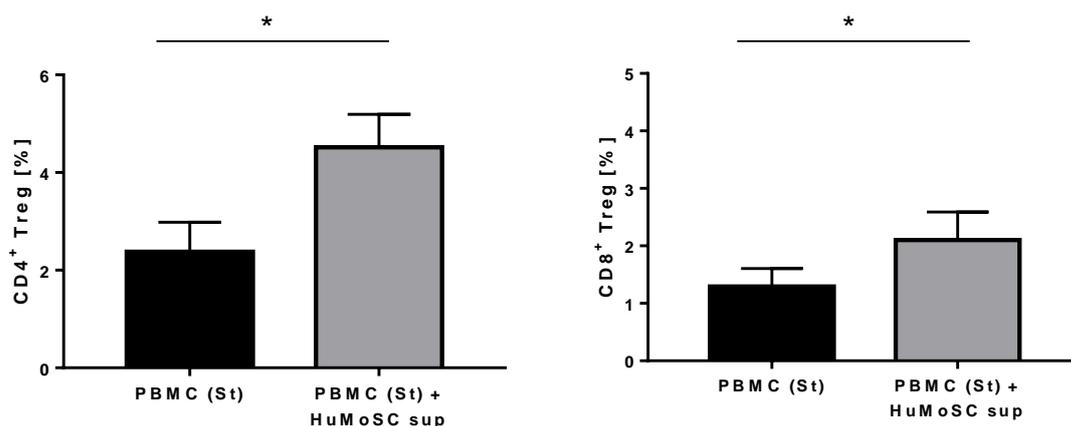


Figure 29 : Induction des Treg par le surnageant d’HuMoSC. Les LT sont stimulés avec des billes d’activation anti-CD3/CD28 et mis en culture avec du surnageant d’HuMoSC ou du sérum physiologique (50%) pendant 4 jours puis marqués par des anticorps anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-FoxP3 et analysés par cytométrie en flux sur BD LSR II et le logiciel FlowJo. A. Proportion de CD4 Treg induits en présence de surnageant d’HuMoSC. Dot plot d’une expérience représentative. B. Proportion de CD8 Treg induits en présence de surnageant d’HuMoSC. Dot plot d’une expérience représentative. Les résultats de 6 expériences indépendantes sont montrés. Les données sont montrées avec la moyenne \pm SEM des expériences représentatives. (ns = non significatif, *: $p \leq 0,05$)

Après traitement pendant 4 jours des PBMC issues de patients sains avec du surnageant d’HuMoSC ou du sérum physiologique on observe une nette augmentation de la proportion de CD4 Treg et CD8 Treg (Figure 29) lorsqu’ils sont traités avec le surnageant d’HuMoSC. Il semblerait donc que l’induction de Treg par les HuMoSC ne soit pas contact-dépendante.

Le surnageant d’HuMoSC n’altère pas la survie des LT

Afin de confirmer que le surnageant d’HuMoSC inhibe la prolifération des LT et n’induit pas leur apoptose ou leur nécrose, des LT isolés à partir de PBMC frais de patients sains ont été mis en culture en présence de surnageant d’HuMoSC. A J4, les LT ont été marqués à l’annexine V (identification des cellules apoptotiques) et avec le Fixable Viability Stain R780 (identification des cellules nécrotiques) puis analysés par cytométrie en flux. Les résultats montrent que les LT ne sont ni en apoptose, ni en nécrose lorsqu’ils sont traités par le surnageant d’HuMoSC (Figure 30).

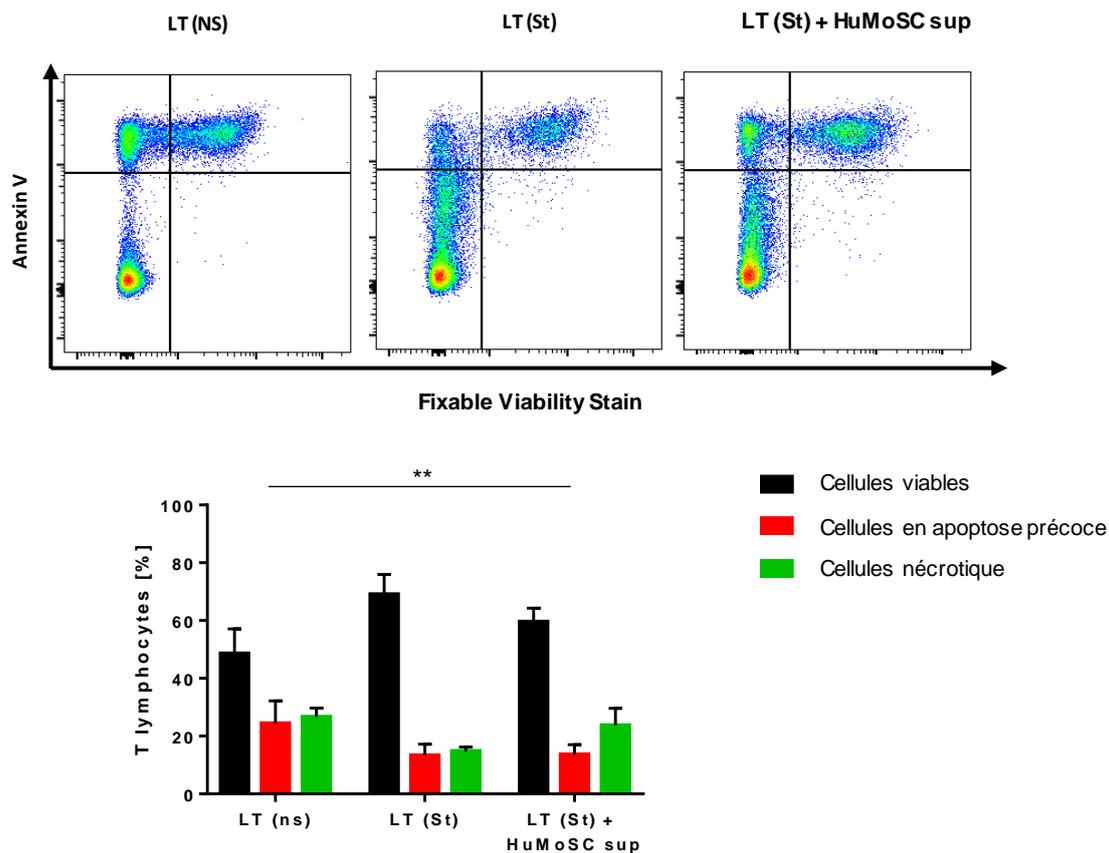


Figure 30 : Effet du surnageant d’HuMoSC sur la viabilité des lymphocytes T. Les LT sont stimulés avec des billes d’activation anti-CD3/CD28 et mis en culture avec du surnageant d’HuMoSC (50%) pendant 4 jours. Ils ont été marqués par l’annexine V et Fixable Viability Stain puis analysés par cytométrie en flux sur BD LSR II et sur le logiciel FlowJo. A. Dot plot représentatif d’une expérience. B. Les résultats de 3 expériences indépendantes sont montrés. Les données sont montrées avec la moyenne \pm SEM des expériences représentatives. (** : $p \leq 0,01$)

L’inhibition de la prolifération des LT est donc due uniquement aux composants régulateurs du surnageant d’HuMoSC.

Le surnageant d’HuMoSC diminue la fonction des DC à induire la prolifération des LT

Les DC coopérant étroitement avec les LT lors de la réponse immunitaire, il nous a paru important de déterminer si le surnageant d’HuMoSC avait un effet sur la différenciation des DC en étudiant leur phénotype et leur fonction. Dans un premier temps, nous avons ajouté le surnageant des HuMoSC dans la culture de génération des DC à J5 soit au moment de l’induction de la maturation par ajout de LPS. A J7, les DC matures ont été récupérées et leur

phénotype et fonctions ont été étudiés. Elles ont été mises en culture à différents ratios avec des PBMC afin d'évaluer leur capacité à induire leur prolifération. Plusieurs ratios DC:PBMC ont été testés.

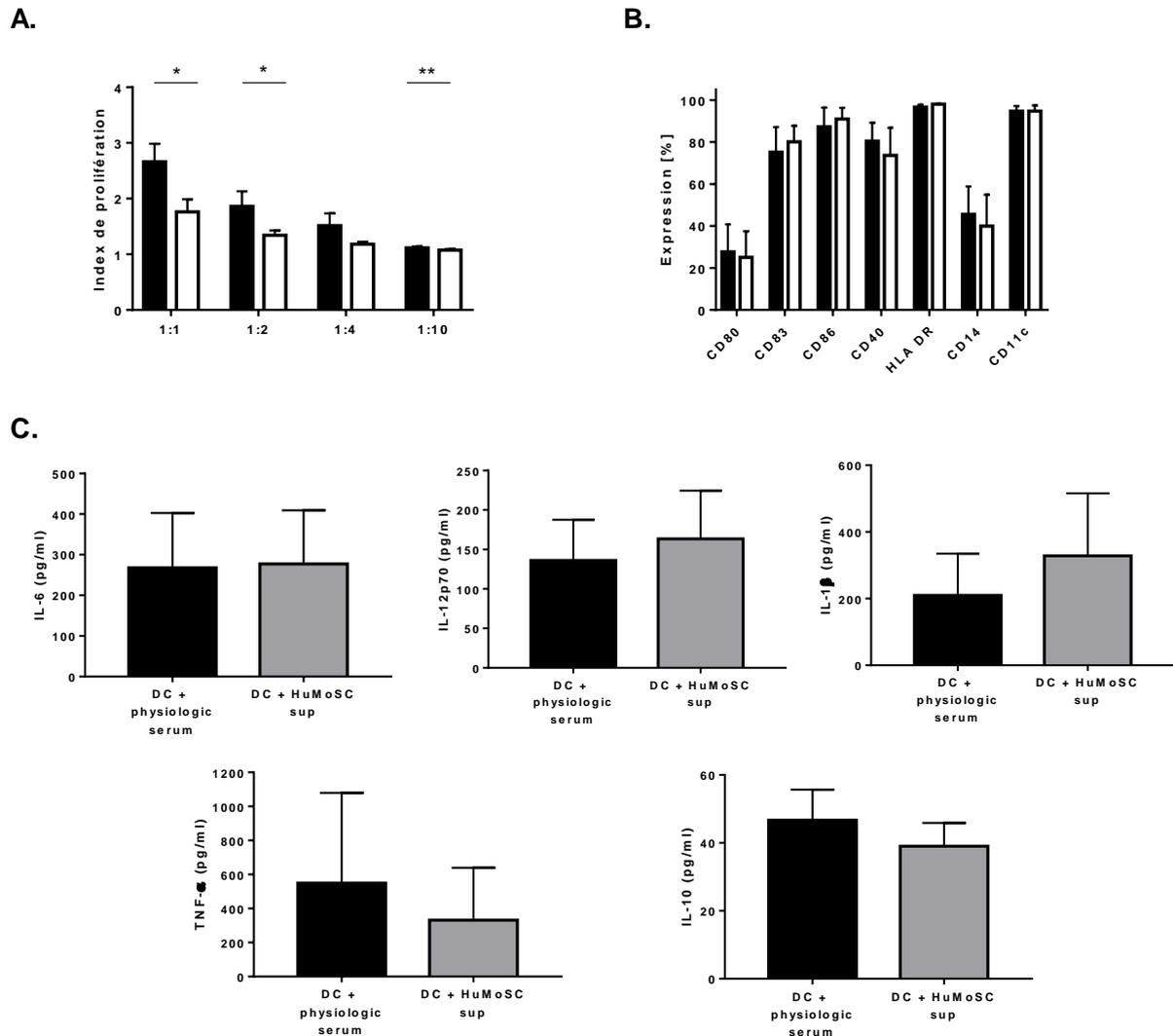


Figure 31 : Effet du surnageant d'HuMoSC sur la fonction et le phénotype des cellules dendritiques à J5. Le surnageant d'HuMoSC ou du sérum physiologique a été ajouté à J5 avec du LPS pour induire la maturation des DC, générées à partir de monocytes avec de l'IL-4 et du GM-CSF. A J7, les DC ont été récupérées et mises en culture avec des PBMC non stimulées et marquées au Cell-Trace Violet. A J7, les DC incubées avec du surnageant d'HuMoSC ou du sérum physiologique à J5 ont été récupérées puis analysées. Les résultats de 4 expériences indépendantes sont montrés. A. Index de prolifération des PBMC mis en culture avec les DC traitées avec du sérum physiologique ou surnageant d'HuMoSC au ratio 1:1. B. Phénotype des DC à J7. Analyse par cytométrie en flux avec un BD LSR II et le logiciel FlowJo ou Modfit 5.0. Les résultats de 4 expériences indépendantes sont montrés. C. Les concentrations de l'IL-6, l'IL12p70, l'IL-1β, le TNF-α et l'IL-10 ont été mesurées dans les surnageants de culture des DC à J7. Les résultats de 3 expériences indépendantes sont montrés. Les données sont montrées avec la moyenne ± SEM des expériences représentatives. (ns = non significatif, *: p < 0,05, p < 0,01)

Les résultats montrent que le surnageant d’HuMoSC ajouté au moment de la maturation diminue la fonction des DC d’induction de prolifération des LT car la prolifération des PBMC pour les ratios 1:1 ($p=0,0293$) et 1:10 ($p=0,0246$) est significativement diminué (Figure 31A et 31B). L’analyse du phénotype des DC ne montre pourtant pas de différence significative quant à l’expression des marqueurs de co-stimulation (données non montrées). De même, nous n’avons pas mis en évidence de différence d’expression cytokinique (Figure 31C).

Nous avons également étudié l’impact du surnageant d’HuMoSC sur des DC matures, c’est-à-dire à J7. Les DC ont été incubées pendant 24h avec le surnageant d’HuMoSC ou du sérum physiologique puis phénotypées et étudiées pour leur capacité à induire la prolifération des LT.

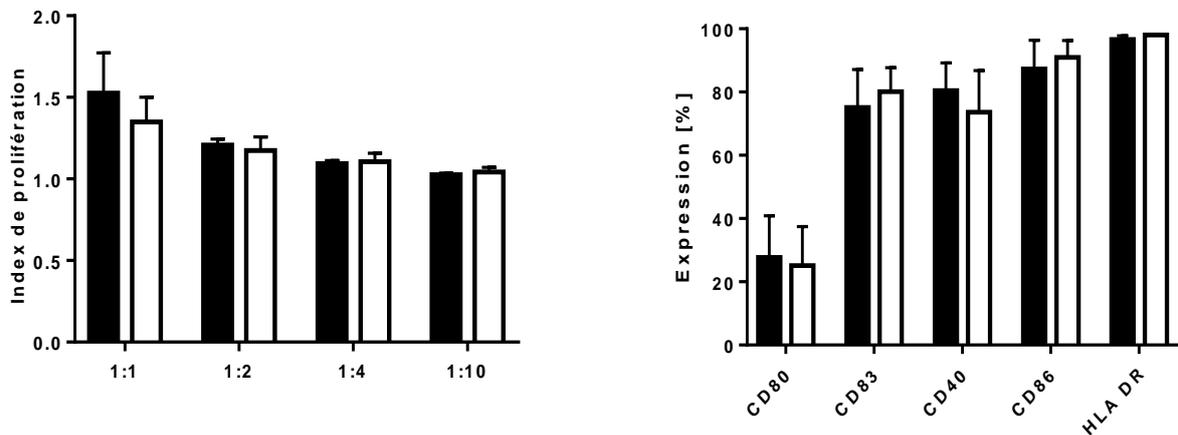


Figure 32 : Effet du surnageant d’HuMoSC sur la fonction et le phénotype des cellules dendritiques à J7. Le surnageant d’HuMoSC ou du sérum physiologique a été ajouté ou non à J7, les DC ont été incubées 24h puis récupérées à J8 pour être mises en culture avec des PBMC non stimulées et marquées au Cell-Trace Violet. A J8, les DC incubées avec du surnageant d’HuMoSC ou du sérum physiologique à J7 ont été récupérées puis marquées avec des anticorps anti-CD80, anti-CD83, anti-CD86 et anti-CD40. Les résultats de 5 expériences indépendantes sont montrés. Analyse par cytométrie en flux avec un BD LSR II et le logiciel FlowJo ou Modfit 5.0. Les données sont montrées avec la moyenne \pm SEM des expériences représentatives (ns = non significatif)

Nous avons montré ici que le traitement des DC avec le surnageant d’HuMoSC à J7, soit en fin de génération et donc de maturation, pour 24h n’influence ni la fonction ni le phénotype des DC (Figure 32), même pour l’expression du CD83 ($p=0,1134$).

Le surnageant d’HuMoSC garde ses propriétés immunosuppressives en présence d’immunosuppresseurs

Dans un premier temps, nous avons testé les fonctions immunosuppressives du surnageant d’HuMoSC en présence de différents immunosuppresseurs classiquement utilisés en clinique dans la prévention de la GvHD aigüe comme la CsA, le MTX et la méthylprednisolone (MP). Les concentrations des traitements ont été déterminées de façon à ne pas inhiber complètement la prolifération des PBMC, permettant de voir ainsi une différence lorsque des thérapies suppressives sont ajoutées à la culture. Nous avons montré que la fonction immunosuppressive du surnageant d’HuMoSC n’est pas affectée par la présence d’immunosuppresseurs seuls ou d’une association de ces 3 immunosuppresseurs (Figure 33).

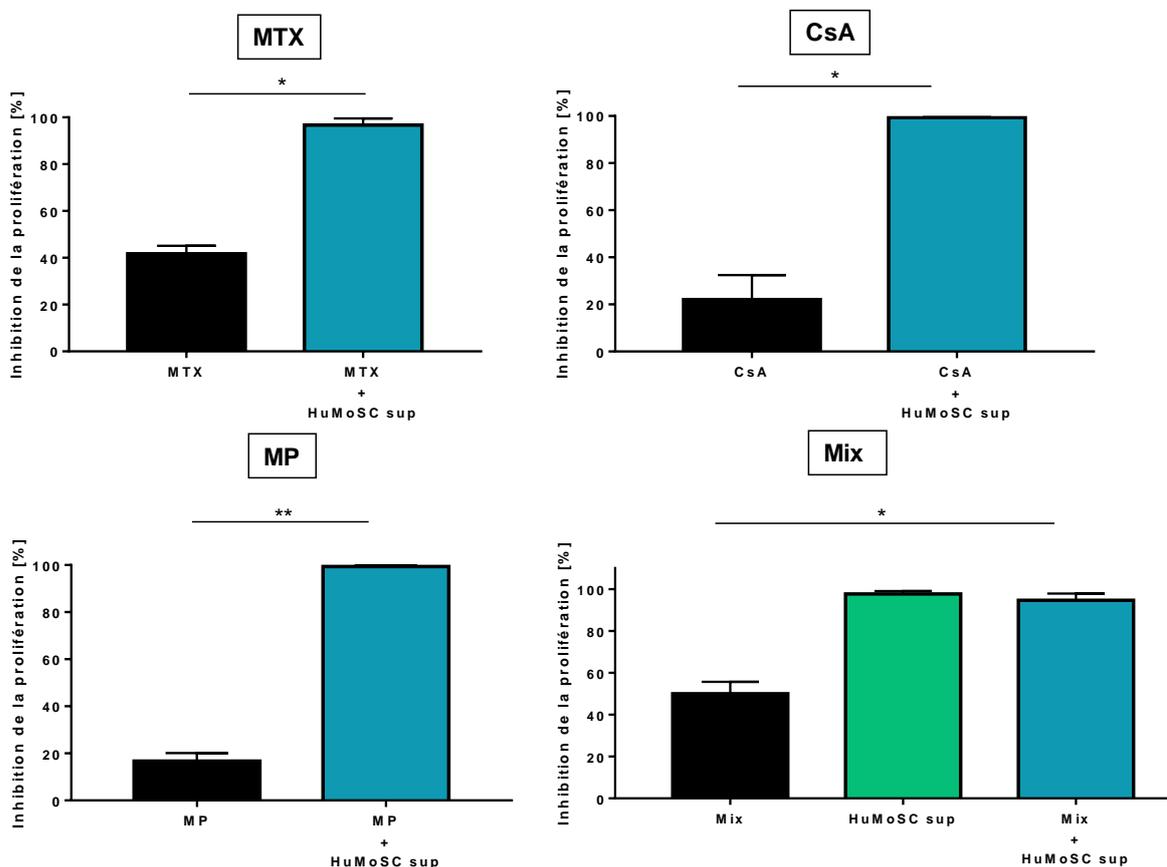


Figure 33 : Etude de l’efficacité du surnageant d’HuMoSC en conditions cliniques. A. Les PBMC sont marquées au Cell-Trace Violet et stimulées avec des billes anti-CD3/CD28 pendant 4jours. Ces PBMC sont traitées avec du méthotrexate (MTX) (concentration : 2,5ng/ml), de la ciclosporine (CsA) (concentration : 5ng/ml), de la méthylprednisolone (MP) (concentration : 25ng/ml) ou par un mix de ces trois immunosuppresseurs. L’acquisition a été faite par cytométrie en flux sur un BD LSR II et les données ont été analysées sur le logiciel ModFit. Les

résultats de 3 expériences indépendantes sont montrés. Les données sont montrées avec la moyenne \pm SEM des expériences représentatives. (ns = non significatif, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$)

Le traitement par le surnageant d'HuMoSC pourrait même permettre une diminution des doses d'immunosuppresseurs au cours de la GvHD en conservant les mêmes effets de diminution de la prolifération et de l'activation des LT.

L'environnement inflammatoire n'impacte pas la capacité inhibitrice du surnageant d'HuMoSC

De même il était important de vérifier si le surnageant des HuMoSC conservait ses capacités immunosuppressives dans des conditions inflammatoires puisque le but est d'utiliser cette thérapie dans des contextes de GvHD ou de maladies auto-immunes qui sont toujours associées à un fort syndrome inflammatoire. Pour cela nous avons *in vitro* utilisé des ligands de TLR capables d'activer différents TLR. Le LPS (ligand de TLR3), Pam₃Cys-SK4 (Pam₃CSK4) ligand de TLR2/6), Poly I:C (ligand de TLR3), Flagellin (ligand de TLR5) permettent de créer un environnement inflammatoire. Nous avons également utilisé différentes cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IFN- γ , l'IL-2 et l'IL-1 β .

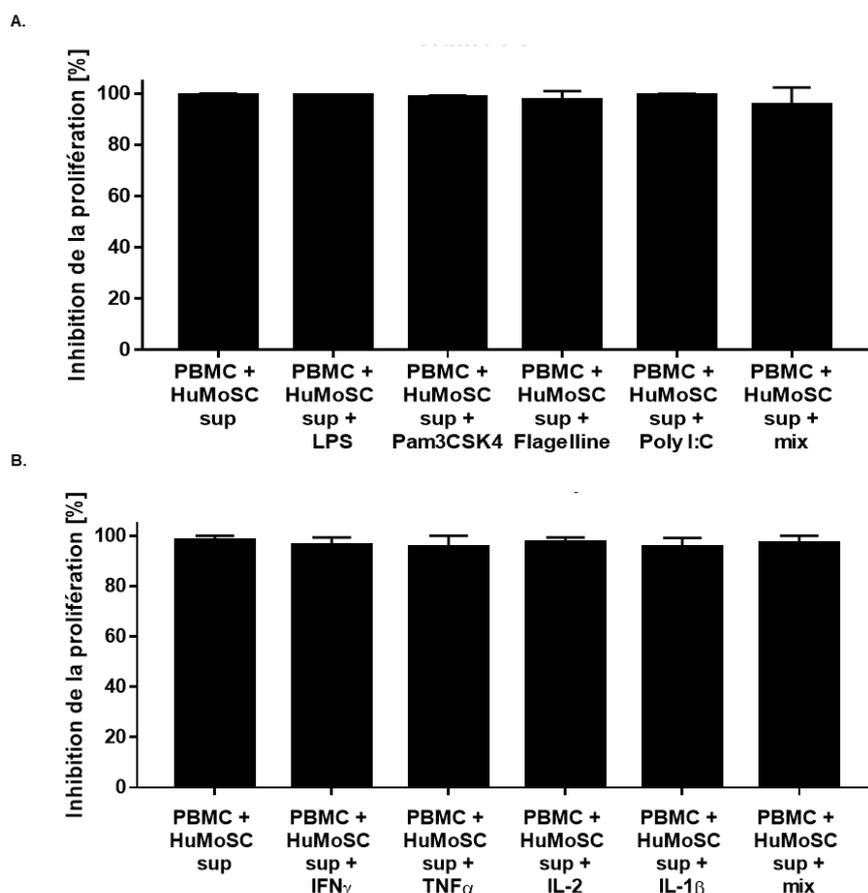


Figure 34 : Impact d'un milieu inflammatoire sur la fonction immunosuppressive des HuMoSC. Les PBMC sont marquées au Cell-Trace Violet et stimulées avec des billes anti-CD3/CD28 pendant 4 jours. A. Les PBMC ont été traitées par LPS, PAM₃CSK₄, Poly I:C et flagelline aux doses respectives de 50 ng/ml, 50 ng/ml, 50 μ g/ml et 50 ng/ml ou par un mix de ces ligands de TLR. B. Les PBMC sont traitées avec de l'IFN- γ (25ng/ml), du TNF- α (25ng/ml) de l'IL-2 (20UI/ml), de l'IL-1 β (25ng/ml) ou par un mix de ces cytokines. L'acquisition a été faite par cytométrie en flux sur un BD LSR II et les données ont été analysées sur le logiciel ModFit. Les résultats de 3 expériences indépendantes sont montrés. Les données sont montrées avec la moyenne \pm SEM des expériences représentatives.

Nous avons montré qu'un environnement inflammatoire *in vitro* ne diminuait pas la capacité du surnageant d'HuMoSC à inhiber la prolifération des PBMC (Figure 34A et 34B). Ces données obtenues *in vitro* doivent être confirmées *in vivo*.

Le surnageant d'HuMoSC montre un profil protéique immunosuppresseur

Etant donné que le surnageant d'HuMoSC est capable d'inhiber la prolifération des LT, une identification précise des protéines contenues dans ce dernier était indispensable afin de pouvoir

expliquer sa fonction immunosuppressive. L'étude protéomique de surnageant est souvent complexe car elle met souvent en évidence plusieurs centaines voire plusieurs milliers de protéines différentes. Pour contourner ce problème nous avons utilisé comme contrôle négatif le surnageant de cellules à partir desquelles nous avons généré les HuMoSC, à savoir les monocytes avant leur culture en présence de cytokines. Ce surnageant produit par ces cellules n'a aucune action immunosuppressive (données non montrées). L'étude protéomique a donc comparé les surnageants d'HuMoSC et de monocytes produits dans les mêmes conditions. Les monocytes ont été obtenus à partir de sang de patient sain, après centrifugation avec un gradient de Ficoll pour récupérer les PBMC puis tri magnétique positif CD14⁺. Les cellules ont ensuite été mises en culture à la concentration de 1 million/ml dans du sérum physiologique pendant 24h. Nous avons généré 3 surnageants d'HuMoSC différents et 3 surnageants de monocytes différents. Avant analyse, chaque surnageant a été testé pour vérifier son effet immunosuppresseur (surnageant d'HuMoSC) ou inflammatoire (surnageant de monocytes). L'analyse a permis d'identifier 912 sous-groupes de protéines sans contaminants, soit 2508 protéines. Les différences au niveau du sécrétome ont été visualisées par analyse en composante principale basée sur la totalité des protéines identifiées, permettant d'évaluer le regroupement des échantillons entre eux (Figure 35A). Le profil du sécrétome de ces deux types de surnageants est nettement différent et les surnageants au sein d'un même groupe sont homogènes. On note cependant une légère différence au niveau du sécrétome entre le second surnageant d'HuMoSC et les autres surnageants. Une des explications pourraient être la diminution des capacités immunosuppressives du second surnageant qui étaient plus faibles (70% d'inhibition) comparées aux deux autres surnageants (100% et 94% d'inhibition) (données non montrées).

Basé sur les termes de Gene Ontology (GO) « t cell activation », « response to stimulus » et « immune system process », nous avons mis évidence une expression différentielle de protéines responsables de l'immunosuppression (Figure 35B). On observe une forte modification du profil des protéines exprimées entre les surnageants d'HuMoSC et de monocytes avec 11 protéines surexprimées (en rouge) dans le surnageant d'HuMoSC possiblement responsables des propriétés immunosuppressives.

L'analyse de variance a permis d'identifier 416 protéines pour lesquelles on observe une différence significative entre les échantillons (p-value ajusté ≤ 0.05). L'analyse post-hoc de Tukey permet de montrer les profils d'abondance de ces protéines. Trois protéines connues pour avoir des propriétés immunosuppressives ont été identifiées, la galectine-3, l'ostéoactive

et l'IL-1RA (Figure 35C). Par analyse multiplex, nous avons pu quantifier dans le surnageant ces 3 protéines (Figure 35D). La galectine-3 est la protéine la plus retrouvée dans le surnageant et est différemment exprimée par rapport aux monocytes. De même pour l'IL-1RA et l'ostéoactivine, cette dernière n'étant pas retrouvée dans le surnageant de monocytes. Le CCL-2, l'IL-6 et l'IL-10 qui avaient été précédemment retrouvés dans le surnageant sont présentes en faibles quantités, voire ont presque disparu pour l'IL-6¹⁸⁹. Ceci peut être expliqué par le changement de protocole de génération des HuMoSC ou bien le fait qu'on génère le surnageant dans du sérum physiologique pendant 24h alors que les dosages avaient été faits dans un surnageant de 48h dans du RPMI complet. Nous avons trouvé de faibles quantités de PD-L1 soluble qui n'était pas produit par les monocytes (données non montrées). L'IL-2 et le TNF- α ne sont pas produits par les HuMoSC, des concentrations faibles d'IFN- γ ont été notées (données non montrées).

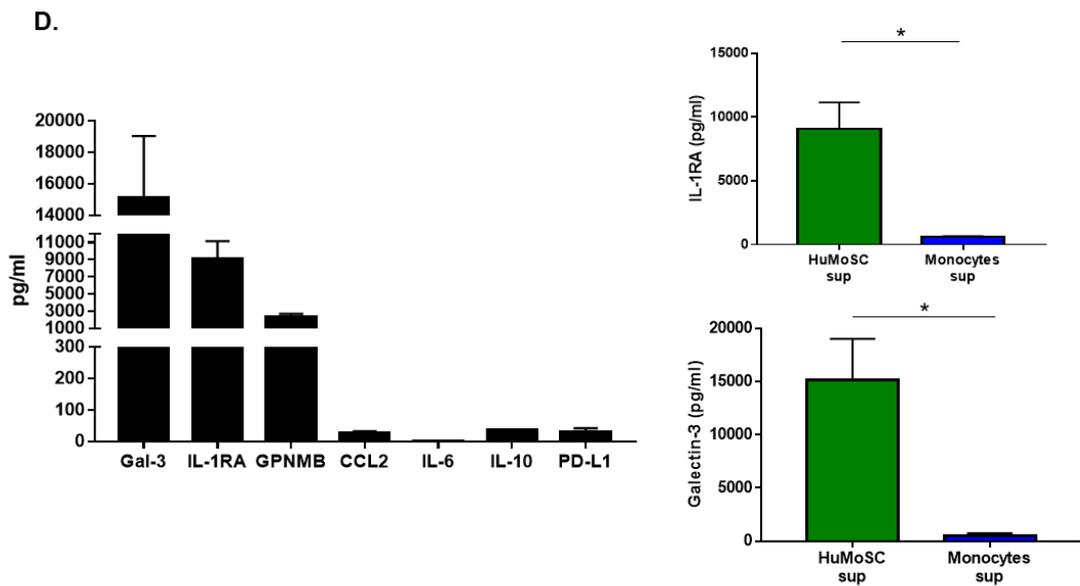
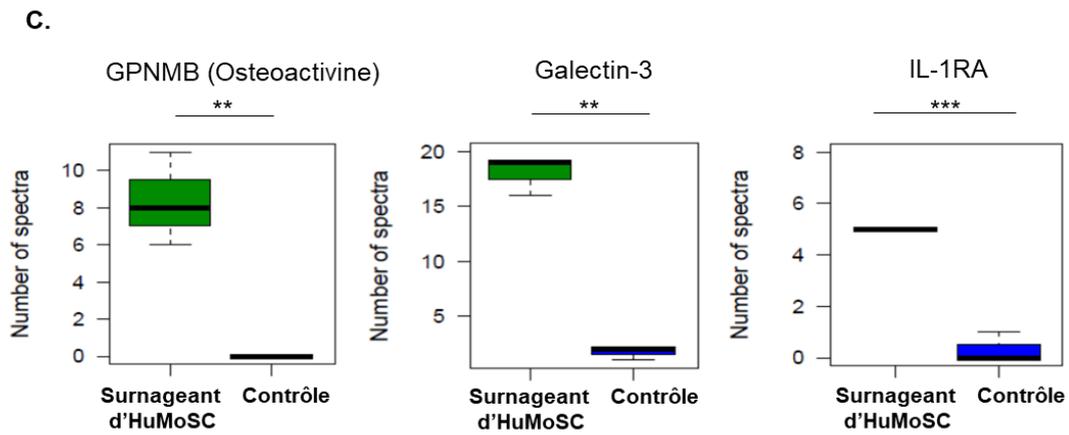
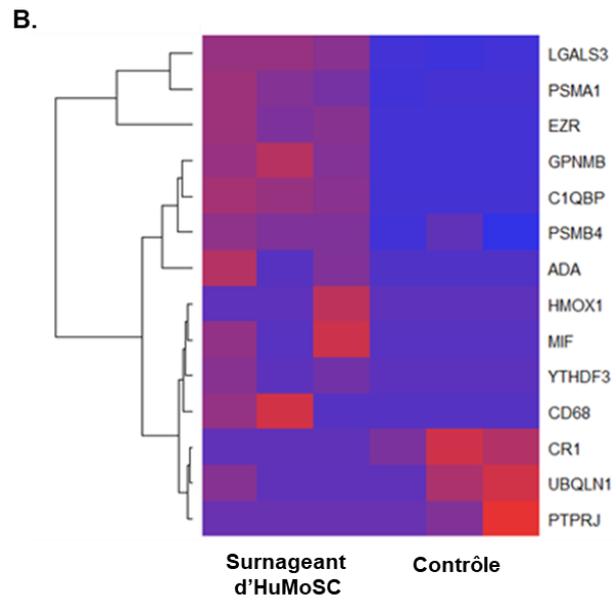
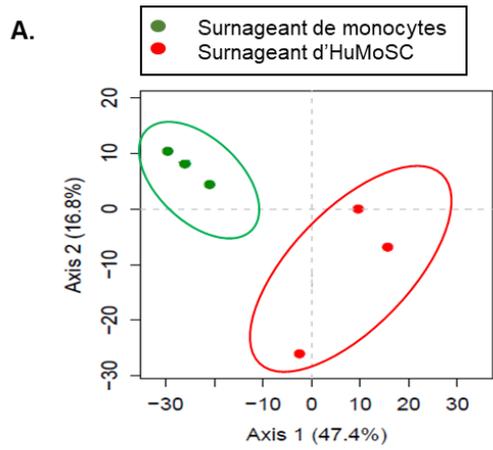


Figure 35 : Analyse protéomique comparative des surnageants d’HuMoSC (HuMoSC sup) et de monocytes (mono sup). 3 surnageants différents ont été générés pour chaque groupe. A. Analyse en composante principale basées sur toutes les protéines identifiées. Sont affichés les composants principaux 1 (axe x) et 2 (axe y). B. Heat map de l’expression moyenne des gènes identifiés par les GO terms « immune system process ». Les protéines sous-exprimées sont indiquées en bleu tandis que les protéines sur-exprimées sont identifiées par la couleur rouge. C. Protéines immunosuppressives sécrétées dans le surnageant d’HuMoSC identifiées par analyse de variance puis analyse post-hoc de Tukey. Les résultats de trois surnageants différents sont présentés. D. Les concentrations de Galectin-3, IL-1RA, ostéoactivine (GPNMB), CCLe, IL-6, IL-10, PD-L1 ont été mesurées par multiplex. Les données de 3 à 4 expériences indépendantes sont montrées. (ns = non significatif, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)

En conclusion, l’analyse du contenu du surnageant met en évidence un profil protéique très différent entre le surnageant d’HuMoSC et le surnageant contrôle des monocytes, avec identification de plusieurs protéines potentiellement impliquées dans les mécanismes d’immunosuppression.

Le surnageant d’HuMoSC a un impact sur le développement de la GvHD dans un modèle murin

Le potentiel thérapeutique du surnageant d’HuMoSC a ensuite été testé dans un modèle pertinent de GvHD^{1,2}. Des PBMC humains frais de patients sains ont été administrées à des souris NSG afin d’induire la GvHD. Des contrôles ont été réalisés avant l’injection *in vivo* des cellules et du surnageant. Les propriétés immunosuppressives du surnageant des HuMoSC ont été étudiées et les surnageants utilisés inhibaient d’au moins 80% la prolifération de PBMC stimulés par des billes anti-CD3/CD28. Pour être certain que l’injection de PBMC humains allait déclencher une GvHD chez les souris, la capacité proliférative des PBMC a été testée *in vitro* avant l’injection. Les souris ont été examinées tout au long de l’expérience deux fois par semaine avec recueil des données suivantes, le poids, la posture, l’aspect de la fourrure, la mobilité, l’aspect de la peau et la diarrhée afin de déterminer le score de GvHD. Les PBMC (10×10^6 millions) sont co-injectées avec 2ml de surnageant, de sérum physiologique (groupe contrôle) ou avec les HuMoSC (ratio 4 :1, soit 2.5×10^6 millions). Bien que l’amélioration de la survie ne soit pas significative ($p=0.50$), on note un décalage de 20 jours entre les premiers décès du groupe contrôle et celui du surnageant d’HuMoSC (Figure 36A). Cependant, le score de GvHD du groupe traité par le surnageant des HuMoSC est significativement diminué par

rapport au groupe contrôle (contrôle vs HuMoSC, $p=0.0367$; contrôle *versus* surnageant d' HuMoSC, $p=0.0367$) (Figure 36B).

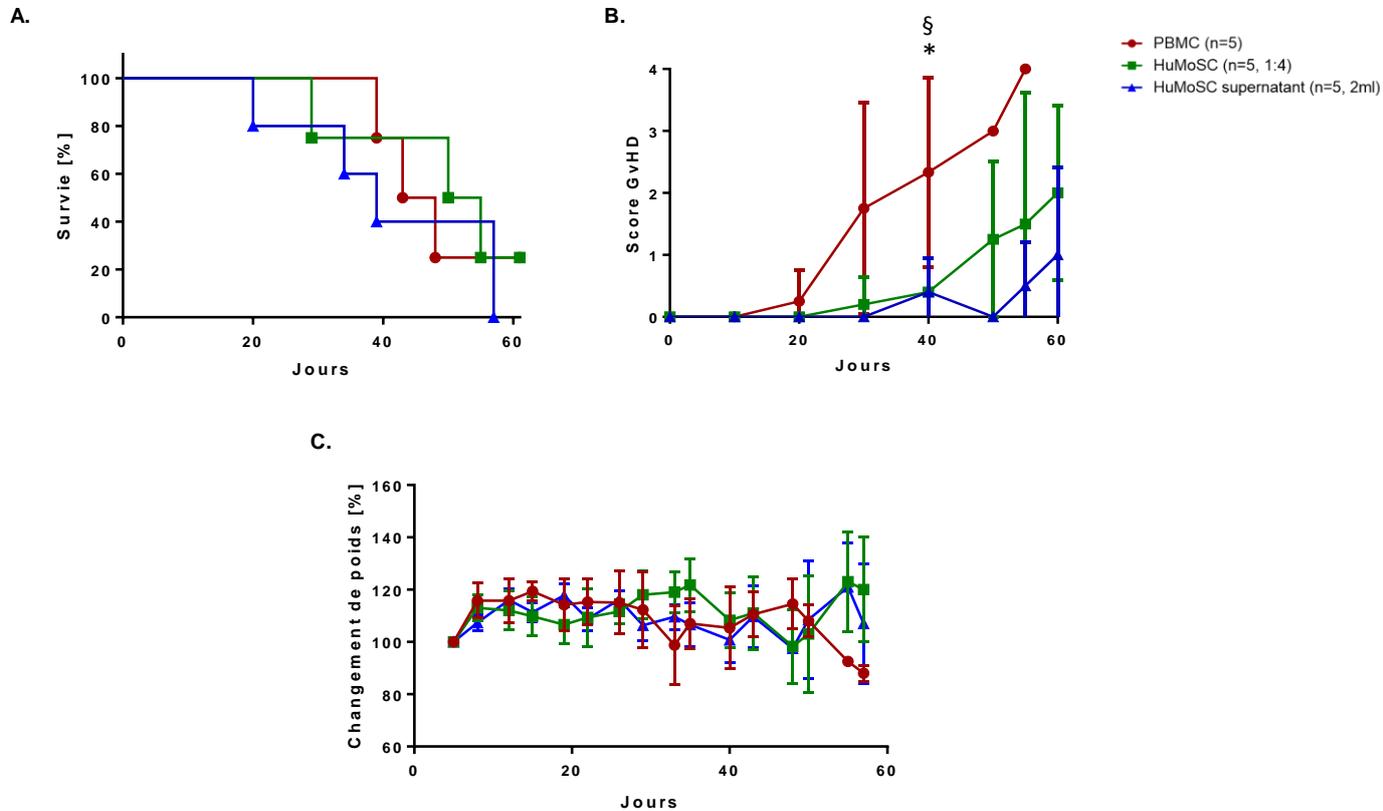


Figure 36 : Effet du surnageant d' HuMoSC dans la prévention de la GvHD. Trois groupes ont été définis, un groupe recevant uniquement 10×10^6 de PBMC à J0, un deuxième groupe recevant 10×10^6 de PBMC et 2.5×10^6 d' HuMoSC à J0 et un dernier groupe recevant 10×10^6 de PBMC et 2ml de surnageant d' HuMoSC à J0. Chaque groupe est constitué de 5 souris. A. Courbe de survie. Les courbes ont été comparées grâce au test du log-rank. B. Score clinique de GvHD, déterminé deux fois par semaine. Test de Student, * : PBMC versus surnageant d' HuMoSC ; § : PBMC versus HuMoSC. C. Pourcentage moyen de variation du poids par rapport au poids initial. Les données ont été censurées à J60. Les données sont montrées avec la moyenne \pm SD des expériences représentatives. (ns = non significatif, */§: $p \leq 0,05$)

Il est aussi important de préciser que les souris ne sont pas mortes à cause de la GvHD puisque qu'aucun signe clinique n'explique leur décès. Une hypothèse est qu'elles soient mortes d'infection, sans certitude.

Les résultats de ces expériences *in vivo* suggèrent fortement que le surnageant est un outil thérapeutique avec un grand potentiel pour diminuer les signes cliniques de GvHD mais que des investigations complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

Le surnageant d’HuMoSC est compatible avec une production pharmaceutique GMP

Nous avons généré le surnageant d’HuMoSC dans du sérum physiologique afin de pouvoir l’administrer au patient. Nous avons voulu savoir s’il était possible de congeler le surnageant d’HuMoSC mais aussi de le filtrer de façon stérile afin d’éliminer les microorganismes présents dans la solution. Le surnageant est généré dans un laboratoire de type L2 et sous un poste de sécurité microbiologique de type II. Pour la filtration stérilisante, nous avons utilisé des filtres stériles de 0.20µm et testé la fonction du surnageant avant et après filtration. De même, pour la congélation, nous avons testé le surnageant avant et après congélation à -20°C. Les résultats montrent que le surnageant d’HuMoSC peut être conservé à -20°C pendant au moins 2 mois sans aucun excipient et après décongélation à température ambiante (Figure 37.A). Cela pourrait permettre de produire le surnageant de façon continue et d’être décongelé au moment de son utilisation. Enfin, la filtration stérilisante n’affecte pas non plus les propriétés immunosuppressives du surnageant (Figure 37.B). Le filtre ne semble pas altérer le produit, ni en absorbant les constituants du surnageant ni en relarguant certaines substances.

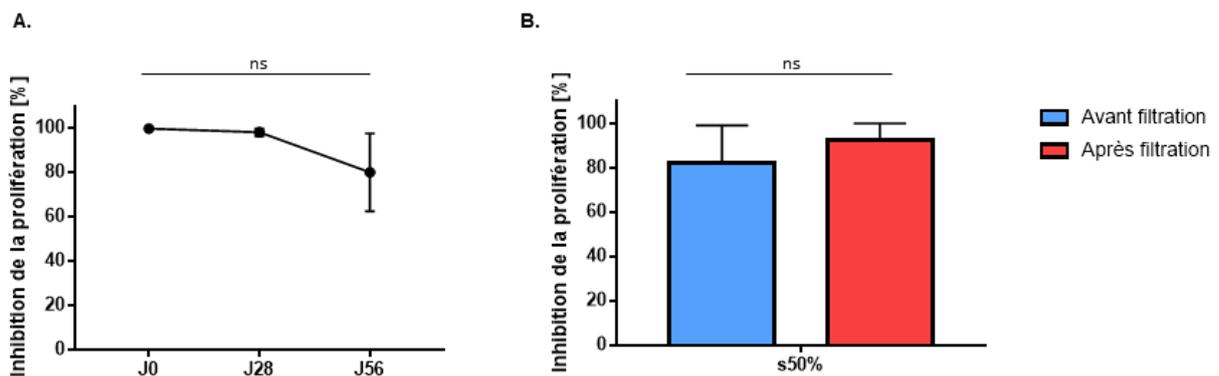


Figure 37 : Congélation et filtration stérilisante du surnageant d’HuMoSC. A. Congélation du surnageant d’HuMoSC à -20°C pendant 2 mois. Le surnageant d’HuMoSC a été testé pour l’inhibition de la prolifération des LT avant congélation (J0), à 1 mois (J28) et 2 mois (J56). B. Le surnageant d’HuMoSC a été filtré avec un filtre de 0.20µm. La fonction du surnageant a été testée avant et après filtration. Les résultats de 3 expériences indépendantes sont montrés. Les données sont montrées avec la moyenne \pm SEM des expériences représentatives. (ns = non significatif)

A l'avenir, chaque étape de la production du surnageant d'HuMoSC sera optimisée afin d'être en accord avec les BPF, en utilisant des réactifs au grade GMP comme les cytokines, billes magnétiques de tri, milieu de culture, anticorps afin de valider un grade clinique pour le surnageant d'HuMoSC. Les cytokines IL-6 et GM-CSF ont déjà le grade GMP et grâce à notre collaboration avec l'EFS de Bourgogne-Franche-Comté, nous avons déjà à disposition une salle dédiée à la production de médicament de thérapie innovant (MTI). Le produit thérapeutique final subira les contrôles qualités usuels : phénotype, propriétés immunorégulatrices, absence de contaminants. A la suite de ce développement respectant les BPF, nous effectuerons 3 essais pré-cliniques en utilisant les PBMC obtenues par leukaphérèse de 3 donneurs sains.

Phénotype comparatif entre les HuMoSC et les CD14-HuMoSC

Nous avons étudié l'expression de marqueurs immunosuppresseurs, exprimés notamment par les MDSC, à la surface des HuMoSC et des CD14-HuMoSC (Figure 38).

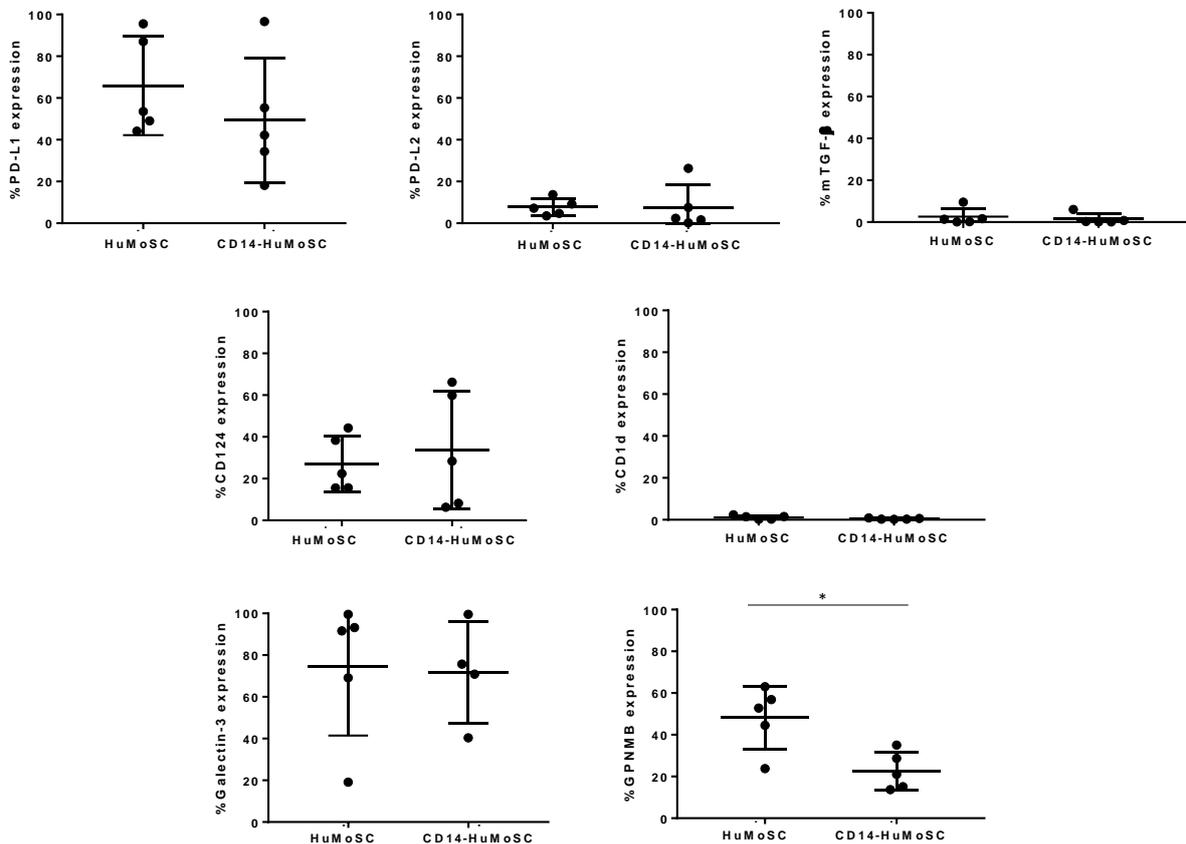


Figure 38 : Phénotype comparatif des HuMoSC et des CD14-HuMoSC. Les HuMoSC et CD14-HuMoSC ont été marquées par des anticorps anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-mTGF- β , anti-CD124, anti-galectine-3, anti-GPNMB. Analyse par cytométrie en flux avec un BD LSR II et le logiciel FlowJo. . Les résultats de 5 expériences indépendantes sont montrés. (* : $p \leq 0,05$).

Nous avons mis en évidence une forte expression de PD-L1 et de la galectine-3. Nous n'avons pas retrouvé une expression de CD1d sur nos deux populations cellulaires, le CD1d ayant été identifié comme un nouveau marqueur de MDSC immunosuppresseurs¹⁹⁰. En revanche, nous avons montré que l'ostéoactivine était différemment exprimé à la surface des HuMoSC et des CD14-HuMoSC ce qui pourrait expliquer les différences de fonction immunosuppresseurs entre les deux populations cellulaires.

Analyse comparative du contenu du surnageant d' HuMoSC et de CD14-HuMoSC

L'analyse par multiplex a aussi été l'occasion de voir si en termes de concentrations de cytokines et protéines nous pouvions mettre en évidence des différences entre le surnageant d' HuMoSC et de CD14-HuMoSC (Figure 39).

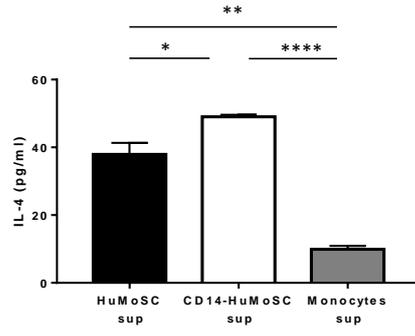
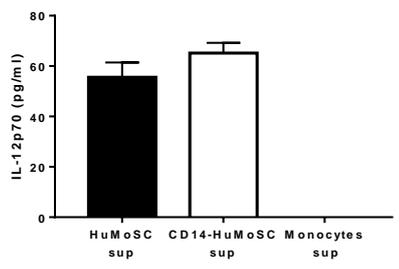
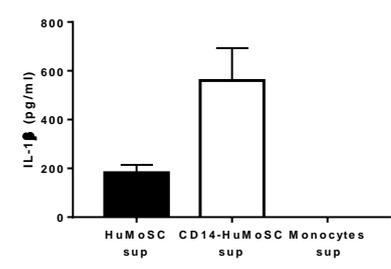
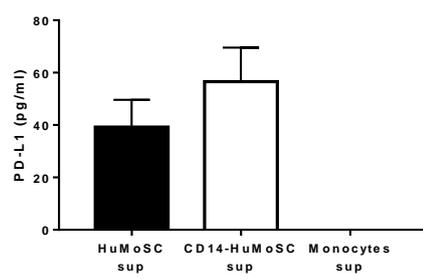
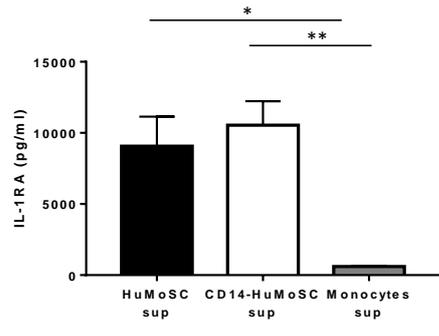
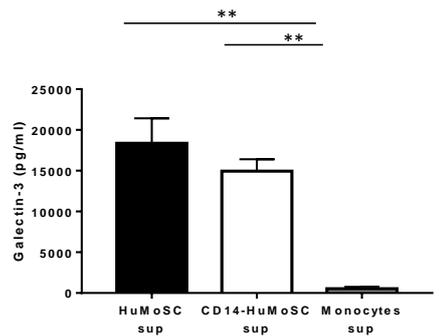
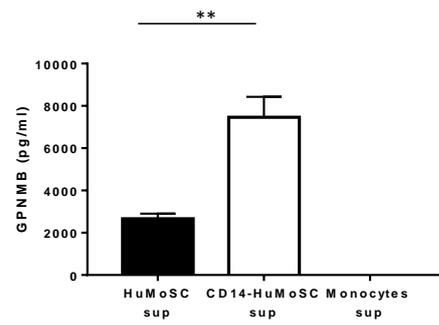
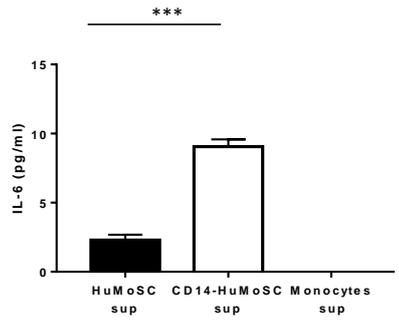
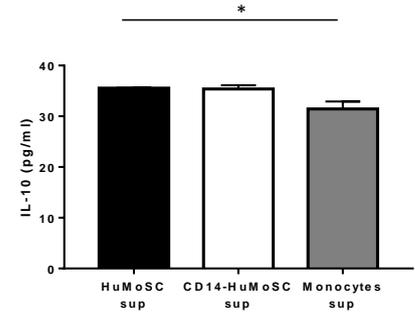
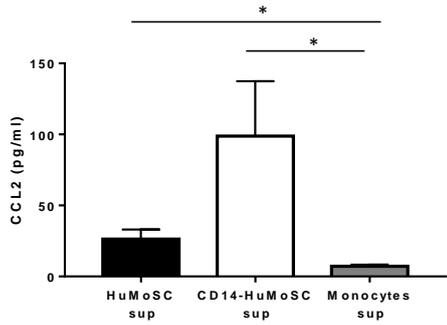


Figure 39 : Analyse par multiplex des surnageants d’HuMoSC et de CD14-HuMoSC. Les concentrations de CCL2, IL-10, IL-6, ostéoactivine (GPNMB), Galectine-3, IL-1RA, PD-L1, IL-1 β et IL-12p70 ont été mesurées par multiplex. Les données de 3 expériences indépendantes sont montrées. Les données sont montrées avec la moyenne \pm SEM des expériences représentatives. (ns = non significatif, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$).

Les concentrations d’IL-6, d’IL-4 et d’ostéoactivine diffèrent significativement entre les deux surnageants. Concernant l’IL-1 β , il y a une tendance à une plus grande excrétion par les CD14-HuMoSC ($p=0,0507$), quant aux concentrations de galectine-3 et d’IL-1RA, elles ne diffèrent pas. Les 2 différences principales sont donc au niveau d’une protéine immunosuppressive et d’une cytokine pro-inflammatoire.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION

Ce travail est une étude de l'intérêt thérapeutique des cellules myéloïdes immunosuppressives, les HuMoSC, et de leurs dérivés, les surnageants d'HuMoSC et CD14-HuMoSC, dans la prévention de la GvHD. Les HuMoSC sont générées selon un protocole original breveté et n'ayant pas d'origine tumorale.

Dans un premier temps, nous avons poursuivi les travaux sur les HuMoSC dans la prévention de la GvHD afin d'étayer les données déjà publiées et confirmer l'intérêt de cette thérapie cellulaire dans la prévention de la GvHD. Dans un second temps, nous avons montré clairement que le surnageant d'HuMoSC et aussi un de ses dérivés, le surnageant de CD14-HuMoSC, modulaient la réponse immunitaire à plusieurs niveaux, en agissant principalement sur les LT mais aussi sur les DC. Ces deux surnageants pourraient dans le futur être développés comme MTI et plus précisément comme un médicament biologique complexe. Au sein de l'unité INSERM, un autre surnageant de cellules myéloïdes, appelé SuperMAPO® et produit par des monocytes ayant phagocyté des corps apoptotiques, aussi considéré comme un médicament biologique complexe, est en cours de développement.

Les HuMoSC

Notre équipe a publié en 2015 les premiers résultats de ses travaux sur les HuMoSC, une nouvelle thérapie cellulaire capable de prévenir la survenue de la GvHD et capable d'induire des Treg, en particulier des CD8 Treg. Il était important de poursuivre ces travaux et de montrer que les HuMoSC ne perdaient pas leurs deux fonctions immunomodulatrices principales, que sont l'inhibition de la prolifération lymphocytaire et l'induction de Treg, dans un milieu inflammatoire mais aussi en présence d'immunosuppresseurs utilisés en transplantation. En effet, certaines thérapies cellulaires comme celles basées sur l'utilisation de Treg perdent leur capacité immunosuppressive en présence d'un environnement inflammatoire ou d'auto-immunité^{172,173,191-193}. Cette plasticité cellulaire, comme par exemple le shift Treg-Th17, pourrait expliquer le relatif manque d'efficacité de ces thérapies dans des essais cliniques^{192,194,195}. Pour les MDSC, il a été montré que l'activation de l'inflammasome par l'ATP entraînait une perte de leur fonction suppressive une fois injectées chez la souris^{158,196}. Nous avons montré ici que différents milieux inflammatoires *in vitro* (ligands de TLR,

cytokines pro-inflammatoires) n'affectaient pas les fonctions immunomodulatrices des HuMoSC, comme cela avait été montré pour les MSC en présence notamment de LPS^{197,198}.

Afin de prévenir la survenue de la GvHD chez l'Homme, l'utilisation d'immunosuppresseurs, notamment l'administration de ciclosporine A, de méthylprednisolone et de méthotrexate, est classiquement utilisée par la majorité des équipes de greffe de moelle. La CsA, un anti-calcineurine, inhibe la sécrétion de l'IL-2 par les LT tandis que le MTX est un analogue de l'acide folique qui va empêcher la synthèse de bases puriques et de la thymidine. La MP est un corticostéroïde qui diminue l'activation de nombreuses cellules de la réponse immunitaire, les lymphocytes, les macrophages, les DC et diminue notamment la production l'IL-2 et d'IFN γ . La combinaison de ces immunosuppresseurs entraîne une profonde immunosuppression chez le patient qui devient plus vulnérable aux infections opportunistes mais augmente aussi le risque de rechute. Nous avons montré que ces médicaments immunosuppresseurs ne modifiaient pas les fonctions immunorégulatrices des HuMoSC et les résultats de nos expériences suggèrent même que le co-traitement HuMoSC + médicaments immunosuppresseurs pourraient permettre de diminuer leur dose. Des données similaires ont été retrouvées avec les CSM, en effet, plusieurs études ont montré une augmentation de leur capacité immunosuppressive en présence d'immunosuppresseurs classiquement utilisés en clinique^{199,200}. Nous avons notamment montré qu'en présence de CsA, l'induction de CD4 Treg n'était pas modifiée ce qui peut être étonnant car les Treg ont besoin d'IL-2 pour leur survie mais aussi leur fonction suppressive²⁰¹⁻²⁰³. Comme nous avons montré ultérieurement que les HuMoSC ne produisaient pas d'IL-2, les HuMoSC induisent donc des Treg par une autre voie. Une explication pourrait être une persistance de CD4 Treg, indépendante de l'IL-2 mais dépendante de STAT-5 via une liaison au CD44 comme il a été montré par Ruppert *et al*²⁰⁴. Une étude a évalué l'effet *in vitro* et *in vivo* du tacrolimus, qui est aussi un anti-calcineurine, de l'acide mycophénolique, principe actif du mycophénolate mofétil, et de la MP sur la survie, la fonction et la stabilité de Treg multipliés *ex vivo*²⁰⁵. En présence de ces immunosuppresseurs, la viabilité mais aussi les capacités prolifératives ont été diminuées de façon dose-dépendante mais les capacités immunosuppressives quant à elles n'étaient pas altérées. Nous avons montré *in vivo* des résultats dans un modèle xénogénique de GvHD chez la souris NSG que les HuMoSC pourraient permettre de diminuer la dose de CTX tout en conservant un effet préventif sur la survenue de la GvHD.

Il est nécessaire de certifier que les interventions thérapeutiques dans la prévention de la GvHD n'altèrent pas l'effet GvL, la balance GvHD/GvL étant critique dans la greffe de CSH. Nous

avons établi un modèle murin de greffe pour lequel la cinétique de développement de l'effet GvL et de la GvHD permettait une intervention thérapeutique. Nous avons pu démontrer qu'une unique injection d'HuMoSC n'induisait pas de rechute de la leucémie et par conséquent n'altérait pas l'effet GvL tout en permettant de prévenir efficacement la survenue de la GvHD, dans une greffe allogénique puisque les cellules CAL-1 et les PBMC humains ne provenaient pas du même patient.

La cryopréservation permet un accès rapide au traitement dans le contexte clinique. Il était donc important de vérifier qu'après plusieurs mois de congélation, les HuMoSC conservaient leur phénotype et leur fonction immunosuppressive. Il est important de noter que les cellules sont congelées avant le tri CD33 positif car notre équipe avait montré une perte de fonction après décongélation. Nous avons montré qu'après 100 jours de congélation il n'y avait ni modification du phénotype ni diminution de leur capacité à inhiber la prolifération lymphocytaire. En effet, il a été montré pour d'autres thérapies cellulaires une perte de fonction après congélation, comme par exemple pour les CSM^{206,207} qui pourraient expliquer une faible réponse clinique chez les patients traités^{208,209}. Toujours dans l'objectif de mimer les conditions cliniques, nous avons montré que les HuMoSC conservaient leur phénotype et leurs capacités immunosuppressives jusqu'à 6h après décongélation à température ambiante et à 4°C, ce qui laisse suffisamment de temps pour les injecter aux patients.

Au final, nous avons complété les résultats obtenus sur les HuMoSC et attesté de l'intérêt de cette thérapie dans la prévention de la GvHD qui pourrait rapidement être utilisée en clinique.

Les dérivés d'HuMoSC : les surnageants d'HuMoSC et de CD14-HuMoSC

Le passage de la paillasse au lit du malade des HuMoSC s'est heurté à 2 problèmes insolubles au sein de l'unité. Tout d'abord le nombre de monocytes nécessaire pour générer un nombre suffisant d'HuMoSC pour traiter un patient est trop important pour être acceptable dans un protocole de recherche clinique. L'anticorps anti-CD33 n'est pas disponible en conditions GMP. Nous avons alors modifié notre protocole pour isoler les cellules CD14+ au lieu des CD33+ à la fin de la culture, ce qui nous a permis d'obtenir un nombre de cellules beaucoup plus important et avec un protocole totalement en conditions GMP. Les cellules ainsi générées ont été appelées CD14-HuMoSC ; leurs propriétés immunosuppressives sont plus faibles que

les HuMoSC (données non montrées). Nous avons alors choisi d'étudier les propriétés immunosuppressives des surnageants des HuMoSC et des CD14-HuMoSC. Les surnageants d'HuMoSC et de CD14-HuMoSC inhibent la prolifération et l'activation des LT, à la fois les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺. Dans un premier temps nous avons éliminé l'hypothèse d'une possible destruction cellulaire des LT induite par les surnageants, en montrant même une diminution de la proportion de cellules en apoptose précoce avec le surnageant d'HuMoSC. En effet, cette destruction aurait entraîné une franche diminution de nombre de LT qui aurait pu être prise à tort pour une inhibition de la prolifération. Nous avons montré que les surnageants d'HuMoSC et de CD14-HuMoSC n'affectaient pas la viabilité des LT et que sa propriété immunosuppressive était bien due à l'action régulatrice de ces composants. Les propriétés des MDSC, qui sont des cellules très proches des HuMoSC, ont été largement étudiées avec identification de plusieurs mécanismes suppressifs. Aussi, nous avons étudié si ces différents mécanismes étaient impliqués dans l'action immunosuppressive du surnageant des HuMoSC et des CD14-HuMoSC. Nous avons déjà montré que l'inhibition de la prolifération des LT par les HuMoSC n'était pas dû à la sécrétion de facteurs solubles connus comme l'Arg1, iNOS, COX2, IL-10, IDO⁵.

L'analyse protéomique a mis en évidence une surexpression des protéines suivantes, la galectine-3, l'ostéoactivine et l'IL-1RA dans les deux surnageants comparé au surnageant de monocyte. La galectine-3 est une protéine immunorégulatrice sécrétée entre autres par les CSM^{83,84}. Elle induit au niveau des lymphocytes une diminution de la différenciation des LB en plasmocytes mais induit également l'apoptose des LT, par liaison au CD7/CD29 ou CD45/CD71 à la surface des LT¹⁷⁸ et une diminution de leur signalisation via le TCR^{210,211}. Ses mécanismes seront explicités plus loin. Nous avons cependant montré que les surnageants d'HuMoSC et de CD14-HuMoSC n'induisaient ni l'apoptose, ni la nécrose des LT. Les autres mécanismes impliquant cette protéine sont en cours d'étude. De plus, il a aussi été décrit dans un modèle murin d'asthme que la galectine-3 était responsable de l'augmentation de la réponse Th2 et de la diminution de la réponse Th1¹⁸². Une autre propriété importante des surnageants d'HuMoSC et de CD14-HuMoSC est la diminution de la cytotoxicité des CTL. De même, la galectine-3 est capable d'influencer la sécrétion de cytokines intracellulaires par les LT CD8 infiltrant les tumeurs¹⁷⁷. L'importance de son rôle est confirmée par le fait que la suppression de l'expression de la galectine-3 restaure la sécrétion de l'IFN- γ par ces mêmes cellules¹⁷⁷, on retrouve une diminution significative de la sécrétion d'IFN- γ par les LT avec le surnageant de CD14-HuMoSC. La galectine-3 diminuerait la formation de la synapse immunologique et

diminuerait la sécrétion de cytokines intracellulaires par les LT CD8 cytotoxiques¹⁸⁰. Il a déjà été rapporté que des Mo-MDSC étaient capables de diminuer la maturation des CTL avec notamment une diminution de la production de granzyme B²¹². D'autres cellules myéloïdes CD45⁺CD33^{low}CD11b^{dim} ont aussi montré qu'elles avaient les propriétés de diminuer la production de granzyme B et d'IFN- γ par les LT CD8⁺ et cette diminution était dépendante de l'axe IL-6/IL-8-arginase I²¹³. Comme déjà précisé, la fonction immunorégulatrice de la galectine-3 résidait principalement dans l'altération de la formation de la synapse immunologique entre la DC et le LT¹⁷⁵. En effet, la galectine-3 se liait à la sous-unité α du TCR et diminuerait la mobilité de plusieurs molécules à la surface du LT et en particulier leur clustering au niveau de l'interface LT/CPA. Il y a donc un impact sur la formation de la synapse immunologique¹⁷⁶. Plusieurs études rapportées dans la revue de Gilson *et al*, précisent comment la galectine-3 impacte la formation de la synapse immunologique à plusieurs niveaux. La synapse immunologique est une organisation moléculaire hautement dynamique et qui peut être divisée en 3 zones, centrale, périphérique et distale. Au niveau de la partie centrale, la galectine-3 diminue la colocalisation du TCR avec les molécules CD4 et CD8, qui permettent de stabiliser la liaison TCR/CMH, et entraîne ainsi une diminution de la signalisation via le TCR¹⁷⁵. De plus la galectine-3 altère le recrutement de LFA-1 molécule essentielle pour la solidité de la synapse au niveau de la zone périphérique¹⁷⁷. Enfin, au niveau de la zone distale, il a été montré que la galectine-3 lie le CD45 exprimé à la surface des LT. Cette liaison va entraîner une diminution de la signalisation intracellulaire du LT et donc de son activation, elle pourrait également induire l'apoptose des LT^{178,179}. Tout ceci concourt à une diminution de l'activation du LT et donc sa prolifération.

L'ostéoactivine est une glycoprotéine transmembranaire exprimée à la surface de plusieurs types cellulaires comme les DC, macrophages, mélanocytes, ostéoblastes et les Mo-MDSC^{184,185}. L'ostéoactivine par liaison au syndecan-4 à la surface des LT inhibe leur prolifération. Il est également rapporté une co-expression de PD-L1 et de l'ostéoactivine sur les cellules myéloïdes avec augmentation de leur expression en présence de LT sécrétant de l'IFN- γ ^{185,186}. De façon intéressante, l'ostéoactivine a été retrouvée dans le milieu extracellulaire, ses effets sur la prolifération des LT étant pour l'instant non décrits. Elle pourrait être sécrétée dans les exosomes. En effet, il a été montré chez la souris que des cellules de mélanomes étaient capables de sécréter de l'ostéoactivine contenue dans des vésicules extracellulaires et ainsi exercer un effet immunosuppresseur sur les LT¹⁸⁸. Les macrophages M2 sont capables de

sécréter l'ostéoactivine qui aurait des effets positifs sur la viabilité, la migration et la prolifération des CSM via sa liaison avec le CD44 exprimé à leur surface²¹⁴.

L'IL-1RA est un antagoniste du récepteur à l'IL-1 qui va se fixer sur le récepteur et par compétition inhiber la fixation de l'IL-1 β et l'empêcher d'exercer ses effets inflammatoires. Cette molécule naturelle est aussi utilisée en thérapeutique. En effet, l'IL1-RA (Anakinra®) est couramment utilisée dans le traitement de certaines maladies auto-inflammatoires. Cependant il faut préciser que son effet est faible et que des doses très importantes d'IL-1RA sont nécessaires pour réussir à bloquer les effets de l'IL-1, sans doute en raison du grand nombre de récepteurs à l'IL-1 présents à la surface des cellules.

Nous avons clairement montré les effets immunosuppresseurs des 2 surnageants, surnageant d'HuMoSC et surnageant de CD14-HuMoSC mais nous n'avons pas identifié clairement les mécanismes. L'étude protéomique nous a permis d'identifier 3 candidats possibles, la poursuite de nos travaux montrera si l'inhibition de ces trois molécules identifiées séparément ou ensemble modifie les propriétés immunosuppressives de ces surnageants.

D'autres hypothèses pourraient être émises concernant les mécanismes immunosuppresseurs des surnageants, à la fois sur les LT et les DC, notamment via les cytokines identifiées ou via d'autres voies étudiées dans les travaux de notre équipe.

Nous avons montré une diminution de la réponse Th1 et une augmentation de la réponse Th2, cette inversion du ratio est bénéfique pour contrôler la GvHD^{32,133,183}. Des équipes ont montré que l'injection de MDSC Gr1⁺ murines mais aussi humaines diminuait la polarisation Th1²¹⁵ et induisait une réponse Th2 qui protégeait du développement de la GvHD chez la souris¹⁵⁹. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette perturbation du ratio Th1/Th2. Il a été rapporté que les CPA sécrétant de l'IL-6 seraient responsables de la polarisation des LT CD4⁺ en Th2 tout en inhibant leur polarisation en Th1²¹⁶. Or nous avons montré que les surnageants d'HuMoSC et de CD14-HuMoSC sécrétaient de petites quantités d'IL-6⁵. D'autres cytokines comme l'IL-4 et le TGF- β induisent aussi une polarisation Th2. Nous avons dosé de petites quantités d'IL-4 dans les deux surnageants mais nous n'avons pas montré de sécrétion de TGF- β . De même l'Arg1 et les ROS, produits par des G-MDSC issus de sang de cordon, ont été décrits comme potentiellement responsables de l'augmentation de la production de cytokines de type Th2 par les LT²¹⁷. Cependant, l'équipe avait montré que l'inhibition de l'Arg1 n'avait pas d'effet sur l'inhibition de la prolifération des LT par les HuMoSC mais ces expériences n'avaient pas été réalisées pour étudier l'effet de cette inhibition d'Arg1 sur leur polarisation⁵.

Une autre hypothèse est un éventuel rôle des exosomes contenus dans les surnageants. Les exosomes sont des microvésicules de 30 à 90 nm transportées dans le milieu extracellulaire qui contiennent des protéines, des ARNm, des ARNmi. Il a été montré que des vésicules extracellulaires relarguées par des DC étaient responsables de la polarisation des LT²¹⁸. L'étude des vésicules extracellulaires et en particulier des exosomes pourraient expliquer les mécanismes immunorégulateurs des HuMoSC et de leurs dérivés²¹⁹ comme la polarisation plutôt en Th2 et l'induction de Treg. L'induction des Treg par le surnageant pourrait être dépendant de l'IL-10, iNOS ou l'IDO^{217,220,221}. Leur inhibition n'a pas modifié l'effet des HuMoSC sur la prolifération des LT mais nous n'avons pas étudié l'effet de cette inhibition sur l'induction des Treg. L'IL-10 pourrait également avoir un effet sur les DC. Dans les conditions testées, nous n'avons pas vu de diminution de l'expression du CMH-II, du CD80 et du CD86. A J7, c'est-à-dire en fin de processus de maturation, nous n'avons montré aucun effet sur le phénotype ou bien la capacité à induire la prolifération des LT pour le surnageant d'HuMoSC mais une diminution de la prolifération des LT avec le surnageant de CD14-HuMoSC. Il est important de préciser que le phénotype des DC peut être altéré par le grattage des cellules au moment de leur collecte ce qui peut les activer et gommer certaines différences. Il n'est pas étonnant de retrouver des DC exprimant fortement des marqueurs de stimulation mais montrant des fonctions immunosuppressives comme il a été rapporté par Schmidt *et al*²²². La différence trouvée entre les deux surnageants concernant les DC traitées à J7 pourrait s'expliquer par la différence de concentrations d'IL-4, d'ostéoactivine et d'IL-6. Une hypothèse pourrait être la captation de l'ostéoactivine, qui est présente en plus grande quantité dans le surnageant de CD14-HuMoSC, et qui pourrait être ensuite présentée à la surface des DC. De plus, il a été montré que des moDC traitées avec de l'IL-10 pendant le processus de maturation surexpriment l'ostéoactivine à leur surface et montrent donc une diminution de leur capacité à induire la prolifération des LT une fois matures²²³⁻²²⁵. L'IL-10 est capable d'inhiber la maturation, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires des DC donc le priming et l'activation des LT^{226,227}. D'après De Smedt *et al*, lorsque les DC sont traitées avec de l'IL-10, elles diminuent la capacité des DC à activer des Th1 en faveur d'une activation des Th2²²⁶. On pourrait également penser que la production d'IL-10 pourrait être amplifiée par l'induction de Treg par le surnageant d'HuMoSC. Cependant les faibles concentrations d'IL-10 nous interrogent sur son implication réelle.

In vivo, les deux surnageants n'ont pas eu la même efficacité pour la prévention de la GvHD. En effet, une injection hebdomadaire de surnageant de CD14-HuMoSC améliore

significativement la survie mais aussi le score de GvHD contrairement au surnageant d' HuMoSC. Nous avons montré grâce à l'analyse multiplex des différences de concentrations de cytokines et protéines entre les deux surnageants, en particulier pour l'IL-4, l'IL-6 et l'ostéoactivine. Il existe probablement une balance entre les composants pro-inflammatoires et anti-inflammatoires *in vivo*. Une hypothèse est que le surnageant d' HuMoSC a un effet immunosuppresseur plus important *in vivo* car l'effet des 3 protéines n'est pas contrebalancé par l'IL-6 et l'IL-4 ce qui expliquerait qu'une injection hebdomadaire soit délétère sur la survie par une plus grande susceptibilité aux infections, sans oublier que les souris NSG n'ont pas de système immunitaire. Ainsi, le surnageant de CD14-HuMoSC devrait être injecté de façon plus fréquente pour avoir un effet immunomodulateur *in vivo*. Cette hypothèse devra être vérifiée dans une nouvelle expérience *in vivo* avec un schéma thérapeutique différent avec, par exemple, une injection à J0 et à J7 ou bien une dose plus faible de surnageant d' HuMoSC.

Une autre interrogation était la différence de fonction entre les HuMoSC et les CD14-HuMoSC puisque les HuMoSC ont une fonction suppressive constante tandis que les CD14-HuMoSC ne montrent que peu d'effet immunosuppresseur. La réponse pourrait se trouver dans l'expression de l'ostéoactivine plus importante à la surface des HuMoSC que des CD14-HuMoSC alors qu'à l'inverse les concentrations d'ostéoactivine sont plus importantes dans le surnageant des CD14-HuMoSC que celui des HuMoSC. Une hypothèse pourrait être un clivage de l'ostéoactivine chez les CD14-HuMoSC ce qui a déjà été décrit²²⁸, expliquant l'intérêt du surnageant plutôt que l'utilisation thérapeutique des cellules. Il est à noter que les deux populations cellulaires montrent une forte expression cellulaire de galectine-3 mais aussi une forte sécrétion de cette protéine.

Perspectives

Ce travail amène à de nombreuses perspectives que ce soit toujours dans la prévention de la GvHD mais aussi dans le traitement des maladies inflammatoires. En effet ces thérapies ont un puissant effet anti-inflammatoire qui pourrait être utilisé pour la guérison des maladies auto-immunes ou auto-inflammatoires. Cependant, il serait souhaitable d'élucider les mécanismes immunosuppresseurs. Nous prévoyons de compléter les études des effets des surnageants sur d'autres populations immunitaires, d'étudier les effets immunosuppresseurs des exosomes contenus dans ces 2 surnageants. De plus nous étudierons les effets de l'inhibition des protéines et cytokines identifiées sur les fonctions immunosuppressives des surnageants afin de préciser leur rôle dans les mécanismes immunosuppresseurs.

De plus, nous étudierons les effets des HuMoSC et de leurs surnageants dans des maladies auto-immunes ou auto-inflammatoires comme des modèles murins dans un premier temps, arthrite induite au collagène, sclérodermie induite par injection de bléomycine et *ex vivo* sur les artères des patients atteints d'artérite à cellules géantes.

CONCLUSION

CONCLUSION

Mon travail de thèse s'est articulé entre deux grands projets, la poursuite des travaux sur les HuMoSC d'une part et l'étude de produits dérivés des HuMoSC, les surnageants d'HuMoSC et de CD14-HuMoSC. Dans la première partie de ce travail, nous avons confirmé l'intérêt des HuMoSC. Nous avons montré qu'un environnement inflammatoire et la présence d'immunosuppresseurs n'altéraient pas leurs fonctions immunomodulatrices et que l'effet GvL n'était pas abrogé par les HuMoSC. Dans la seconde partie, le choix de développer les surnageant d'HuMoSC et de CD14-HuMoSC a permis de s'affranchir du fait que les billes de tri CD33 n'étaient pas GMP contrairement aux billes de tri CD14 et de développer deux produits thérapeutiques alternatifs aux cellules. Les deux surnageants sont hautement immunosuppresseurs et ces MTI pourraient être développés rapidement. Nos travaux ont donné quelques pistes intéressantes sur les mécanismes immunosuppresseurs. En particulier, les surnageants sont capables d'agir sur les deux acteurs principaux de la réponse immunitaire, les LT et les DC, permettant de contrôler les phases I et II de la GvHD²⁵. De plus les études protéomiques ont permis d'identifier 3 protéines immunosuppressives comme candidats potentiels pour expliquer les propriétés suppressives. Ces nouveaux MTI pourraient être utilisés pour prévenir ou traiter d'autres pathologies inflammatoires.

En conclusion de ce travail, nous avons montré que les HuMoSC et ses dérivés ont un intérêt certain dans la prévention de la GvHD et pourrait aussi être étudiés dans d'autres maladies inflammatoires.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Blazar BR, MacDonald KPA, Hill GR. Immune regulatory cell infusion for graft-versus-host disease prevention and therapy. *Blood*. 2018;131(24):2651–2660.
2. Zahid MF, Lazarus HM, Ringdén O, et al. Can we prevent or treat graft-versus-host disease with cellular-therapy? *Blood Reviews*. 2020;100669.
3. Fisher SA, Cutler A, Doree C, et al. Mesenchymal stromal cells as treatment or prophylaxis for acute or chronic graft-versus-host disease in haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients with a haematological condition. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;1:CD009768.
4. Zhou X, Jin N, Wang F, Chen B. Mesenchymal stem cells: a promising way in therapies of graft-versus-host disease. *Cancer Cell Int*. 2020;20:.
5. Janikashvili N, Trad M, Gautheron A, et al. Human monocyte-derived suppressor cells control graft-versus-host disease by inducing regulatory forkhead box protein 3–positive CD8+ T lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;135(6):1614–1624.e4.
6. Mathe G, Jammet H, Pendic B, et al. [Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation]. *Rev Fr Etud Clin Biol*. 1959;4(3):226–238.
7. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattan A, Schneider M. Haematopoietic chimera in man after allogenic (homologous) bone-marrow transplantation. (control of the secondary syndrome. Specific tolerance due to the chimerism). *Br Med J*. 1963;2(5373):1633–1635.
8. Thomas ED. A history of haemopoietic cell transplantation. *Br. J. Haematol*. 1999;105(2):330–339.
9. ABM. Activité nationale de greffe de CSH 2017. 2017;43.
10. Tay J, Levesque J-P, Winkler IG. Cellular players of hematopoietic stem cell mobilization in the bone marrow niche. *Int J Hematol*. 2017;105(2):129–140.
11. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi’s anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med*. 1989;321(17):1174–1178.
12. Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp. Hematol*. 2000;28(11):1197–1205.
13. Dickinson AM, Wang X-N, Sviland L, et al. In situ dissection of the graft-versus-host activities of cytotoxic T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Nat Med*. 2002;8(4):410–414.
14. Barrett AJ. Mechanisms of the Graft-versus-Leukemia Reaction. *STEM CELLS*. 1997;15(4):248–258.
15. Soiffer RJ, Alyea EP, Hochberg E, et al. Randomized trial of CD8+ T-cell depletion in the prevention of graft-versus-host disease associated with donor lymphocyte infusion. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2002;8(11):625–632.
16. Meyer RG, Britten CM, Wehler D, et al. Prophylactic transfer of CD8-depleted donor lymphocytes after T-cell-depleted reduced-intensity transplantation. *Blood*. 2007;109(1):374–382.
17. D’Aveni M. Comparaison de deux doses de Sérum Anti-Lymphocytaire dans l’allogreffe de Cellules souches hématopoïétiques issues de donneur non apparenté. 153.
18. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*. 2001;22(11):633–640.
19. Farag SS. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 2002;100(6):1935–1947.

20. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2005;11(12):945–956.
21. Paul J, Nakasone H, Sahaf B, et al. A confirmation of chronic graft-versus-host disease prediction using allogeneic HY antibodies following sex-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Haematologica*. 2019;e314–e317.
22. Wang W, Huang H, Halagan M, et al. Chromosome Y–encoded antigens associate with acute graft-versus-host disease in sex-mismatched stem cell transplant. *Blood Adv*. 2018;2(19):2419–2429.
23. Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, et al. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood*. 2007;110(7):2235–2241.
24. den Haan JM, Sherman NE, Blokland E, et al. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science*. 1995;268(5216):1476–1480.
25. Ferrara JLM, Cooke KR, Pan L, Krenger W. The Immunopathophysiology of Acute Graft-Versus-Host-Disease. *STEM CELLS*. 1996;14(5):473–489.
26. Zhang H, Chen J, Que W. Allogeneic peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation for hematologic malignancies: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Leukemia Research*. 2012;36(4):431–437.
27. Lee SJ, Vogelsang G, Flowers MED. Chronic graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2003;9(4):215–233.
28. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18(4):295–304.
29. Billingham RE, Brent L. A simple method for inducing tolerance of skin homografts in mice. *Transplant Bull*. 1957;4(2):67–71.
30. Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 1999;5(6):347–356.
31. Sun Y, Tawara I, Toubai T, Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. *Transl Res*. 2007;150(4):197–214.
32. Carlson MJ, West ML, Coghill JM, et al. In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood*. 2009;113(6):1365–1374.
33. Pidala J, Beato F, Kim J, et al. In vivo IL-12/IL-23p40 neutralization blocks Th1/Th17 response after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Haematologica*. 2018;103(3):531–539.
34. Belaiche S, Yafour N, Balcaen S, et al. Immunosuppresseurs dans la prévention de la réaction du greffon contre l'hôte: rapport de la SFGM-TC. *Pathologie Biologie*. 2014;62(4):197–203.
35. Bôle-Richard E, Gamonet C, Certoux J-M, et al. Exposure to hypomethylating agent, 5-azacytidine, may improve iCasp9 suicide gene therapy for treating GvHD in allografts. *Gene Ther*. 2016;23(8–9):664–672.
36. Zeiser R, von Bubnoff N, Butler J, et al. Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 2020;382(19):1800–1810.
37. Schroeder MA, Houry HJ, Jagasia M, et al. A phase 1 trial of itacitinib, a selective JAK1 inhibitor, in patients with acute graft-versus-host disease. 2020;4(8):14.
38. Srinivasan M, Flynn R, Price A, et al. Donor B-cell alloantibody deposition and germinal center formation are required for the development of murine chronic GVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood*. 2012;119(6):1570–1580.

39. Socié G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2014;124(3):374–384.
40. Forcade E. Immunobiologie de la GVH chronique humain: dérégulation de la réaction du centre germinatif et implication de la réponse Th17. 191.
41. SFGM-TC. Prise en charge de la réaction chronique du greffon contre l'hôte (GVHc) - Traitement de première ligne.
42. Jamil MO, Mineishi S. State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment. *International Journal of Hematology*. 2015;101(5):452–466.
43. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(6):443–458.
44. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):523–32.
45. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 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*. 1995;155(3):1151–64.
46. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, et al. Isolation of CD4+CD25+ Regulatory T Cells for Clinical Trials. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2006;12(3):267–274.
47. Afzali B, Edozie FC, Fazekasova H, et al. Comparison of Regulatory T Cells in Hemodialysis Patients and Healthy Controls: Implications for Cell Therapy in Transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2013;8(8):1396–1405.
48. Safinia N, Vaikunthanathan T, Fraser H, et al. Successful expansion of functional and stable regulatory T cells for immunotherapy in liver transplantation. *Oncotarget*. 2016;7(7):7563–7577.
49. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med*. 2015;7(315):315ra189.
50. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127– T regulatory cells. *Clinical Immunology*. 2009;133(1):22–26.
51. Canavan JB, Scottà C, Vossenkämper A, et al. Developing in vitro expanded CD45RA+ regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn's disease. *Gut*. 2016;65(4):584–594.
52. Beres A, Komorowski R, Mihara M, Drobyski WR. Instability of Foxp3 Expression Limits the Ability of Induced Regulatory T Cells to Mitigate Graft versus Host Disease. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(12):3969–3983.
53. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur. J. Immunol*. 2009;39(4):1088–1097.
54. Battaglia M. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood*. 2005;105(12):4743–4748.
55. Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, et al. Rapamycin Promotes Expansion of Functional CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells of Both Healthy Subjects and Type 1 Diabetic Patients. *J Immunol*. 2006;177(12):8338–8347.
56. Scottà C, Esposito M, Fazekasova H, et al. Differential effects of rapamycin and retinoic acid on expansion, stability and suppressive qualities of human CD4+CD25+FOXP3+ T regulatory cell subpopulations. *Haematologica*. 2013;98(8):1291–1299.
57. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2011;117(3):1061–1070.

58. McKenna DH, Sumstad D, Kadidlo D, et al. Optimization of cGMP Purification and Expansion of Umbilical Cord Blood-Derived T-Regulatory Cells in Support of First-in-Human Clinical Trials. *Cytotherapy*. 2017;19(2):250–262.
59. Gaidot A, Landau DA, Martin GH, et al. Immune reconstitution is preserved in hematopoietic stem cell transplantation coadministered with regulatory T cells for GVHD prevention. *Blood*. 2011;117(10):2975–2983.
60. Trenado A, Charlotte F, Fisson S, et al. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest*. 2003;112(11):1688–1696.
61. Trenado A, Sudres M, Tang Q, et al. Ex Vivo-Expanded CD4⁺ CD25⁺ Immunoregulatory T Cells Prevent Graft-versus-Host-Disease by Inhibiting Activation/Differentiation of Pathogenic T Cells. *J Immunol*. 2006;176(2):1266–1273.
62. Kong N, Lan Q, Chen M, et al. Antigen-specific transforming growth factor β -induced Treg cells, but not natural Treg cells, ameliorate autoimmune arthritis in mice by shifting the Th17/Treg cell balance from Th17 predominance to Treg cell predominance. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2548–2558.
63. Lu L, Wang J, Zhang F, et al. Role of SMAD and non-SMAD signals in the development of Th17 and regulatory T cells. *J Immunol*. 2010;184(8):4295–4306.
64. Zheng SG, Wang J, Horwitz DA. Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF- β are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J Immunol*. 2008;180(11):7112–7116.
65. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med*. 2002;196(3):389–399.
66. Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK, et al. Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (Tregs) with minimal loss of in vivo functional activity. *Sci Transl Med*. 2011;3(83):83ra41.
67. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. 2003;9(9):1144–1150.
68. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 2011;117(14):3921–3928.
69. ClinicalTrials. Home - ClinicalTrials.gov.
70. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363(9419):1439–1441.
71. Aggarwal S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815–1822.
72. Barminko J, Gray AG, Maguire TJ, Schloss RA, Yarmush ML. Mesenchymal Stromal Cell Mechanisms of Immunomodulation and Homing. *Mesenchymal Stem Cell Therapy*. 2018;15–38.
73. Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy*. 2016;2(1):3–20.
74. Krampera M. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003;101(9):3722–3729.
75. Maccario R, Podestà M, Moretta A, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005;90(4):516–525.

76. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW-F, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005;105(7):2821–2827.
77. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005;106(5):1755–1761.
78. Akiyama K, Chen C, Wang D, et al. Mesenchymal Stem Cell-Induced Immunoregulation Involves Fas Ligand/Fas-Mediated T Cell Apoptosis. *Cell Stem Cell*. 2012;10(5):544–555.
79. Meisel R, Zibert A, Laryea M, et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004;103(12):4619–4621.
80. Nasef A, Mathieu N, Chapel A, et al. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation*. 2007;84(2):231–237.
81. Selmani Z, Naji A, Zidi I, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008;26(1):212–222.
82. Davies LC, Heldring N, Kadri N, Le Blanc K. Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. *Stem Cells*. 2017;35(3):766–776.
83. Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Fløisand Y. Evidence for the Involvement of Galectin-3 in Mesenchymal Stem Cell Suppression of Allogeneic T-Cell Proliferation. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2010;71(4):267–274.
84. Sioud. Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. *Int J Oncol*. 2011;38(2):395–90.
85. Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, et al. Mesenchymal Stem Cells Protect Breast Cancer Cells through Regulatory T Cells: Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived TGF- β . *J.I.* 2010;184(10):5885–5894.
86. Yan Z, Zhuansun Y, Chen R, Li J, Ran P. Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism. *Experimental Cell Research*. 2014;324(1):65–74.
87. Spaggiari GM, Moretta L. Interactions Between Mesenchymal Stem Cells and Dendritic Cells. *Mesenchymal Stem Cells - Basics and Clinical Application II*. 2013;199–208.
88. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009;113(26):6576–6583.
89. Chiesa S, Morbelli S, Morando S, et al. Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(42):17384–17389.
90. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367–372.
91. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells. *STEM CELLS*. 2006;24(1):74–85.
92. Spaggiari GM. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006;107(4):1484–1490.
93. Luz-Crawford P, Djouad F, Toupet K, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation. *STEM CELLS*. 2016;34(2):483–492.
94. François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC Suppression Correlates With Cytokine Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Bystander M2 Macrophage Differentiation. *Molecular Therapy*. 2012;20(1):187–195.

95. Melief SM, Geutskens SB, Fibbe WE, Roelofs H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory function: the link with key immunoregulatory molecules. *Haematologica*. 2013;98(9):e121–e122.
96. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, et al. Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: A Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche. *STEM CELLS*. 2008;26(1):151–162.
97. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells and hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol. Lett*. 2015;168(2):215–221.
98. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–317.
99. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *The Lancet*. 2008;371(9624):1579–1586.
100. von Bonin M, Stölzel F, Goedecke A, et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43(3):245–251.
101. Fang B, Song Y, Liao L, Zhang Y, Zhao RC. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant. Proc*. 2007;39(10):3358–3362.
102. Lucchini G, Introna M, Dander E, et al. Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2010;16(9):1293–1301.
103. Weng JY, Du X, Geng SX, et al. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(12):1732–1740.
104. Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, et al. Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal™) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2011;17(4):534–541.
105. Kurtzberg J, Prockop S, Teira P, et al. Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (remestemcel-L, Prochymal) as a rescue agent for severe refractory acute graft-versus-host disease in pediatric patients. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2014;20(2):229–235.
106. Muroi K, Miyamura K, Ohashi K, et al. Unrelated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a phase I/II study. *Int J Hematol*. 2013;98(2):206–213.
107. Muroi K, Miyamura K, Okada M, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (JR-031) for steroid-refractory grade III or IV acute graft-versus-host disease: a phase II/III study. *Int J Hematol*. 2016;103(2):243–250.
108. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-Identical Sibling Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells and Hematopoietic Stem Cells in Hematologic Malignancy Patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2005;11(5):389–398.
109. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. 2007;110(7):2764–2767.
110. Ning H, Yang F, Jiang M, et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia*. 2008;22(3):593–599.
111. MacMillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in

- pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I–II clinical trial. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43(6):447–454.
112. Baron F, Lechanteur C, Willems E, et al. Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2010;16(6):838–847.
 113. Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, et al. Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46(2):200–207.
 114. Galleu A, Milojkovic D, Deplano S, et al. Mesenchymal stromal cells for acute graft-versus-host disease: response at 1 week predicts probability of survival. *Br J Haematol*. 2019;185(1):89–92.
 115. Trento C, Bernardo ME, Nagler A, et al. Manufacturing Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Graft-versus-Host Disease: A Survey among Centers Affiliated with the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2018;24(11):2365–2370.
 116. Cheung TS, Bertolino GM, Giacomini C, et al. Mesenchymal Stromal Cells for Graft Versus Host Disease: Mechanism-Based Biomarkers. *Front. Immunol*. 2020;11:1–15.
 117. Martin PJ, Uberti JP, Soiffer RJ, et al. Prochymal Improves Response Rates In Patients With Steroid-Refractory Acute Graft Versus Host Disease (SR-GVHD) Involving The Liver And Gut: Results Of A Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Phase III Trial In GVHD. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2010;16(2):S169–S170.
 118. Galipeau J. The mesenchymal stromal cells dilemma--does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytotherapy*. 2013;15(1):2–8.
 119. Jacobs SA, Pinxteren J, Roobrouck VD, et al. Human multipotent adult progenitor cells are nonimmunogenic and exert potent immunomodulatory effects on alloreactive T-cell responses. *Cell Transplant*. 2013;22(10):1915–1928.
 120. Boozer S, Lehman N, Lakshmipathy U, et al. Global Characterization and Genomic Stability of Human MultiStem, A Multipotent Adult Progenitor Cell. *J Stem Cells*. 2009;4(1):17–28.
 121. Kovacsovics-Bankowski M, Streeter PR, Mauch KA, et al. Clinical scale expanded adult pluripotent stem cells prevent graft-versus-host disease. *Cellular Immunology*. 2009;255(1–2):55–60.
 122. Reading JL, Yang JHM, Sabbah S, et al. Clinical-Grade Multipotent Adult Progenitor Cells Durably Control Pathogenic T Cell Responses in Human Models of Transplantation and Autoimmunity. *J.I.* 2013;190(9):4542–4552.
 123. Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, et al. 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*. 2010;116(25):5738–5747.
 124. Maziarz RT, Devos T, Bachier CR, et al. Single and Multiple Dose MultiStem (Multipotent Adult Progenitor Cell) Therapy Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease in Myeloablative Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: A Phase 1 Trial. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(4):720–728.
 125. Lan F, Zeng D, Higuchi M, et al. Predominance of NK1.1⁺ TCRαβ⁺ or DX5⁺ TCRαβ⁺ T Cells in Mice Conditioned with Fractionated Lymphoid Irradiation Protects Against Graft-Versus-Host Disease: “Natural Suppressor” Cells. *J Immunol*. 2001;167(4):2087–2096.

126. Guan P, Bassiri H, Patel NP, Nichols KE, Das R. Invariant natural killer T cells in hematopoietic stem cell transplantation: killer choice for natural suppression. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(5):629–637.
127. Leveson-Gower DB, Olson JA, Segal EI, et al. Low doses of natural killer T cells provide protection from acute graft-versus-host disease via an IL-4-dependent mechanism. *Blood.* 2011;117(11):3220–3229.
128. Schneidawind D, Pierini A, Alvarez M, et al. CD4+ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality through expansion of donor CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood.* 2014;124(22):3320–3328.
129. Schneidawind D, Baker J, Pierini A, et al. Third-party CD4+ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality. *Blood.* 2015;125(22):3491–3500.
130. Kuwatani M, Ikarashi Y, Iizuka A, et al. Modulation of acute graft-versus-host disease and chimerism after adoptive transfer of in vitro-expanded invariant Valpha14 natural killer T cells. *Immunol. Lett.* 2006;106(1):82–90.
131. Yang J, Gao L, Liu Y, et al. Adoptive therapy by transfusing expanded donor murine natural killer T cells can suppress acute graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplantation. *Transfusion.* 2010;50(2):407–417.
132. Trujillo-Ocampo A, Cho H-W, Herrmann AC, et al. Rapid ex vivo expansion of highly enriched human invariant natural killer T cells via single antigenic stimulation for cell therapy to prevent graft-versus-host disease. *Cytotherapy.* 2018;20(8):1089–1101.
133. Coman T, Rossignol J, D’Aveni M, et al. Human CD4- invariant NKT lymphocytes regulate graft versus host disease. *Oncoimmunology.* 2018;7(11):e1470735-10.
134. Chen Y-B, Efebera YA, Johnston L, et al. Increased Foxp3 + Helios + Regulatory T Cells and Decreased Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Patients Receiving Sirolimus and RGI-2001, an Activator of Invariant Natural Killer T Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2017;23(4):625–634.
135. Kuns RD, Morris ES, Macdonald KPA, et al. Invariant natural killer T cell-natural killer cell interactions dictate transplantation outcome after alpha-galactosylceramide administration. *Blood.* 2009;113(23):5999–6010.
136. Morris ES, MacDonald KPA, Rowe V, et al. NKT cell-dependent leukemia eradication following stem cell mobilization with potent G-CSF analogs. *J. Clin. Invest.* 2005;115(11):3093–3103.
137. Pillai AB, George TI, Dutt S, Teo P, Strober S. Host NKT cells can prevent graft-versus-host disease and permit graft antitumor activity after bone marrow transplantation. *J. Immunol.* 2007;178(10):6242–6251.
138. Pillai AB, George TI, Dutt S, Strober S. Host natural killer T cells induce an interleukin-4-dependent expansion of donor CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells that protects against graft-versus-host disease. *Blood.* 2009;113(18):4458–4467.
139. Morecki S, Panigrahi S, Pizov G, et al. Effect of KRN7000 on induced graft-vs-host disease. *Experimental Hematology.* 2004;32(7):630–637.
140. Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, et al. Stimulation of Host NKT Cells by Synthetic Glycolipid Regulates Acute Graft-versus-Host Disease by Inducing Th2 Polarization of Donor T Cells. *J Immunol.* 2005;174(1):551–556.
141. Duramad O, Laysang A, Li J, Ishii Y, Namikawa R. Pharmacologic Expansion of Donor-Derived, Naturally Occurring CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells Reduces Acute Graft-versus-Host Disease Lethality Without Abrogating the Graft-versus-Leukemia Effect in Murine Models. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2011;17(8):1154–1168.

142. Mavers M, Maas-Bauer K, Negrin RS. Invariant Natural Killer T Cells As Suppressors of Graft-versus-Host Disease in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:1–9.
143. Lowsky R, Grumet FC, Johnston LJ, Negrin RS. Protective Conditioning for Acute Graft-versus-Host Disease. *The New England Journal of Medicine*. 2005;1321–31.
144. Malard F, Labopin M, Chevallier P, et al. Larger number of invariant natural killer T cells in PBSC allografts correlates with improved GVHD-free and progression-free survival. *Blood*. 2016;127(14):1828–1835.
145. Chaidos A, Patterson S, Szydlo R, et al. Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2012;119(21):5030–5036.
146. Rubio M-T, Bouillié M, Bouazza N, et al. Pre-transplant donor CD4- invariant NKT cell expansion capacity predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2017;31(4):903–912.
147. Bronte V, Brandau S, Chen S-H, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications*. 2016;7:1–10.
148. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol*. 2009;182(8):4499–506.
149. Dilek N, Vuillefroy de Silly R, Blancho G, Vanhove B. Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Front Immunol*. 2012;3:.
150. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(4):253–268.
151. Movahedi K, Williams M, Van den Bossche J, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*. 2008;111(8):4233–44.
152. Youn J-I, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2008;181(8):5791–5802.
153. Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, et al. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*. 2009;182(9):5693–701.
154. Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*. 2009;183(2):937–44.
155. Li J, Wang L, Chen X, et al. CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF- β -mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*. 2017;6(6):e1320011-1–13.
156. Ballbach M, Dannert A, Singh A, et al. Expression of checkpoint molecules on myeloid-derived suppressor cells. *Immunology Letters*. 2017;(192):1–6.
157. Huang A, Zhang B, Yan W, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Regulate Immune Response in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection through PD-1-Induced IL-10. *The Journal of Immunology*. 2014;193(11):5461–5469.
158. Koehn BH, Apostolova P, Haverkamp JM, et al. GVHD-associated, inflammasome-mediated loss of function in adoptively transferred myeloid-derived suppressor cells. *Blood*. 2015;126(13):1621–1628.
159. Messmann JJ, Reisser T, Leithauser F, et al. In vitro-generated MDSCs prevent murine GVHD by inducing type 2 T cells without disabling antitumor cytotoxicity. *Blood*. 2015;126(9):1138–1148.

160. Zhang J, Chen H-M, Ma G, et al. The mechanistic study behind suppression of GVHD while retaining GVL activities by myeloid-derived suppressor cells. *Leukemia*. 2019;33(8):2017–2089.
161. Lim J-Y, Ryu D-B, Park M-Y, et al. Ex Vivo Generated Human Cord Blood Myeloid-Derived Suppressor Cells Attenuate Murine Chronic Graft-versus-Host Diseases. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2018;
162. Park M-Y, Lim B-G, Kim S-Y, et al. GM-CSF Promotes the Expansion and Differentiation of Cord Blood Myeloid-Derived Suppressor Cells, Which Attenuate Xenogeneic Graft-vs.-Host Disease. *Front Immunol*. 2019;10:1–15.
163. Casacuberta-Serra S, Parés M, Golbano A, et al. Myeloid-derived suppressor cells can be efficiently generated from human hematopoietic progenitors and peripheral blood monocytes. *Immunology & Cell Biology*. 2017;95(6):538–548.
164. Lechner MG, Megiel C, Russell SM, et al. Functional characterization of human Cd33+ And Cd11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *J Transl Med*. 2011;9:2–20.
165. Li Y, Tu Z, Qian S, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Potential Therapy for Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis. *The Journal of Immunology*. 2014;193(5):2127–2134.
166. Zhou Z, French DL, Ma G, et al. Development and Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells Generated From Mouse Embryonic and Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells*. 2010;28(3):620–632.
167. D’Aveni M, Rossignol J, Coman T, et al. G-CSF mobilizes CD34+ regulatory monocytes that inhibit graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. 2015;7(281):281ra42.
168. Janikashvili N, Trad M, Gautheron A, et al. Human monocyte-derived suppressor cells control graft-versus-host disease by inducing regulatory forkhead box protein 3-positive CD8+ T lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2015;135(6):1614-1624.e4.
169. Raghu H, Lepus CM, Wang Q, et al. CCL2/CCR2, but not CCL5/CCR5, mediates monocyte recruitment, inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(5):914–922.
170. Romieu-Mourez R, François M, Boivin M-N, et al. Cytokine Modulation of TLR Expression and Activation in Mesenchymal Stromal Cells Leads to a Proinflammatory Phenotype. *J Immunol*. 2009;182(12):7963–7973.
171. Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol*. 2013;25(4):305–312.
172. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, et al. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med*. 2014;20(1):62–68.
173. Massoud AH, Charbonnier L-M, Lopez D, et al. An asthma-associated IL4R variant exacerbates airway inflammation by promoting conversion of regulatory T cells to TH17-like cells. *Nat Med*. 2016;22(9):1013–1022.
174. Hwang S-M, Sharma G, Verma R, et al. Inflammation-induced Id2 promotes plasticity in regulatory T cells. *Nat Commun*. 2018;9:4736–4749.
175. Gilson RC, Gunasinghe SD, Johannes L, Gaus K. Galectin-3 modulation of T-cell activation: mechanisms of membrane remodelling. *Prog. Lipid Res*. 2019;76:101010.
176. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*. 2001;409(6821):733–739.
177. Petit A-E, Demotte N, Scheid B, et al. A major secretory defect of tumour-infiltrating T lymphocytes due to galectin impairing LFA-1-mediated synapse completion. *Nat Commun*. 2016;7(1):12242–57.

178. Stillman BN, Hsu DK, Pang M, et al. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J. Immunol.* 2006;176(2):778–789.
179. Chen I-J, Chen H-L, Demetriou M. Lateral compartmentalization of T cell receptor versus CD45 by galectin-N-glycan binding and microfilaments coordinate basal and activation signaling. *J. Biol. Chem.* 2007;282(48):35361–35372.
180. Kouo T, Huang L, Pucsek AB, et al. Galectin-3 shapes antitumor immune responses by suppressing CD8⁺ T cells via LAG-3 and inhibiting expansion of plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(4):412–423.
181. Demotte N, Wieers G, Van Der Smissen P, et al. A Galectin-3 Ligand Corrects the Impaired Function of Human CD4 and CD8 Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Favors Tumor Rejection in Mice. *Cancer Research.* 2010;70(19):7476–7488.
182. Zuberi RI, Hsu DK, Kalayci O, et al. Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am. J. Pathol.* 2004;165(6):2045–2053.
183. Gutiérrez-Hoya A, López-Santiago R, Vela-Ojeda J, et al. Role of CD8 Regulatory T Cells versus Tc1 and Tc17 Cells in the Development of Human Graft-versus-Host Disease. *J Immunol Res.* 2017;2017:1–11.
184. Heine A, Held SAE, Schulte-Schrepping J, et al. Generation and functional characterization of MDSC-like cells. *Oncoimmunology.* 2017;6(4):e1295203-12.
185. Colombo MP. Is GPNMB the Achilles' Heel of Mo-MDSC While Marking Their Suppressive Activity? *Clin. Cancer Res.* 2019;25(2):453–454.
186. Kobayashi M, Chung J-S, Beg M, et al. Blocking Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell Function via Anti-DC-HIL/GPNMB Antibody Restores the In Vitro Integrity of T Cells from Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* 2019;25(2):828–838.
187. Ripoll VM, Irvine KM, Ravasi T, Sweet MJ, Hume DA. *Gpnmb* Is Induced in Macrophages by IFN- γ and Lipopolysaccharide and Acts as a Feedback Regulator of Proinflammatory Responses. *J Immunol.* 2007;178(10):6557–6566.
188. Tomihari M, Chung J-S, Akiyoshi H, Cruz PD, Ariizumi K. DC-HIL/Glycoprotein Nmb Promotes Growth of Melanoma in Mice by Inhibiting the Activation of Tumor-Reactive T Cells. *Cancer Research.* 2010;70(14):5778–5787.
189. Janikashvili N, Trad M, Gautheron A, et al. Human monocyte-derived suppressor cells control graft-versus-host disease by inducing regulatory forkhead box protein 3-positive CD8⁺ T lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015;135(6):1614–1624.e4.
190. An B, Lim J-Y, Jeong S, et al. CD1d is a novel cell-surface marker for human monocytic myeloid-derived suppressor cells with T cell suppression activity in peripheral blood after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 495(1):519–525.
191. Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol.* 2013;25(4):305–312.
192. Hwang S-M, Sharma G, Verma R, et al. Inflammation-induced Id2 promotes plasticity in regulatory T cells. *Nat Commun.* 2018;9(1):4736–4749.
193. Dean JW, Peters LD, Fuhrman CA, et al. Innate inflammation drives NK cell activation to impair Treg activity. *Journal of Autoimmunity.* 2020;108:102417.
194. Elias S, Rudensky AY. Therapeutic use of regulatory T cells for graft-versus-host disease. *Br J Haematol.* 2019;187(1):25–38.
195. Massoud AH, Charbonnier L-M, Lopez D, et al. An asthma-associated IL4R variant exacerbates airway inflammation by promoting conversion of regulatory T cells to TH17-like cells. *Nat Med.* 2016;22(9):1013–1022.
196. Koehn BH, Saha A, McDonald-Hyman C, et al. Danger-associated extracellular ATP counters MDSC therapeutic efficacy in acute GVHD. *Blood.* 2019;134(19):1670–1682.

197. Romieu-Mourez R, François M, Boivin M-N, et al. Cytokine Modulation of TLR Expression and Activation in Mesenchymal Stromal Cells Leads to a Proinflammatory Phenotype. *J Immunol.* 2009;182(12):7963–7973.
198. Durand N, Russell A, Zubair AC. Effect of Comedications and Endotoxins on Mesenchymal Stem Cell Secretomes, Migratory and Immunomodulatory Capacity. *J Clin Med.* 2019;8(4):497–510.
199. Hajkova M, Hermankova B, Javorkova E, et al. Mesenchymal Stem Cells Attenuate the Adverse Effects of Immunosuppressive Drugs on Distinct T Cell Subpopulations. *Stem Cell Rev and Rep.* 2017;13(1):104–115.
200. Hajkova M, Jaburek F, Porubska B, et al. Cyclosporine A promotes the therapeutic effect of mesenchymal stem cells on transplantation reaction. *Clin. Sci.* 2019;133(21):2143–2157.
201. Wu T, Zhang L, Xu K, et al. Immunosuppressive drugs on inducing Ag-specific CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells during immune response in vivo. *Transplant Immunology.* 2012;27(1):30–38.
202. Lion J, Burbach M, Cross A, et al. Endothelial Cell Amplification of Regulatory T Cells Is Differentially Modified by Immunosuppressors and Intravenous Immunoglobulin. *Front Immunol.* 2017;8:1–15.
203. Bonnefoy F, Masson E, Perruche S, et al. Sirolimus enhances the effect of apoptotic cell infusion on hematopoietic engraftment and tolerance induction. *Leukemia.* 2008;22(7):1430–1434.
204. Ruppert SM, Falk BA, Long SA, Bollyky PL. Regulatory T Cells Resist Cyclosporine-Induced Cell Death via CD44-Mediated Signaling Pathways. *Int J Cell Biol.* 2015;2015:1–10.
205. Scottà C, Fanelli G, Hoong SJ, et al. Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells. *Haematologica.* 2016;101(1):91–100.
206. Moll G, Alm JJ, Davies LC, et al. Do Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Display Impaired Immunomodulatory and Therapeutic Properties? *Stem Cells.* 2014;32(9):2430–2442.
207. Chinnadurai R, Copland IB, Garcia MA, et al. Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Are Susceptible to T-Cell Mediated Apoptosis Which Is Partly Rescued by IFN γ Licensing. *Stem Cells.* 2016;34(9):2429–2442.
208. Keto J, Kaartinen T, Salmenniemi U, et al. Immunomonitoring of MSC-Treated GvHD Patients Reveals Only Moderate Potential for Response Prediction but Indicates Treatment Safety. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;9:109–118.
209. Salmenniemi U, Itälä-Remes M, Nystedt J, et al. Good responses but high TRM in adult patients after MSC therapy for GvHD. *Bone Marrow Transplant.* 2017;52(4):606–608.
210. Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res.* 2003;63(23):8302–8311.
211. Dumeric J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1760(4):616–635.
212. Schoupe E, Mommer C, Movahedi K, et al. Tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subsets exert either inhibitory or stimulatory effects on distinct CD8+ T-cell activation events. *European Journal of Immunology.* 2013;43(11):2930–2942.
213. Mao F, Zhao Y, Lv Y, et al. CD45+CD33lowCD11bdim myeloid-derived suppressor cells suppress CD8+ T cell activity via the IL-6/IL-8-arginase I axis in human gastric cancer. *Cell Death Dis.* 2018;9(7):763–776.
214. Yu B, Sondag GR, Malcuit C, Kim M-H, Safadi FF. Macrophage-Associated Osteoactivin/GPNMB Mediates Mesenchymal Stem Cell Survival, Proliferation, and

- Migration Via a CD44-Dependent Mechanism. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2016;117(7):1511–1521.
215. Tsukamoto H, Nishikata R, Senju S, Nishimura Y. Myeloid-derived suppressor cells attenuate TH1 development through IL-6 production to promote tumor progression. *Cancer Immunol Res*. 2013;1(1):64–76.
 216. Rincón M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 Directs the Differentiation of IL-4-producing CD4+ T Cells. *J Exp Med*. 1997;185(3):461–470.
 217. Köstlin N, Vogelmann M, Spring B, et al. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells from human cord blood modulate T-helper cell response towards an anti-inflammatory phenotype. *Immunology*. 2017;152(1):89–101.
 218. Tkach M, Kowal J, Zucchetti AE, et al. Qualitative differences in T-cell activation by dendritic cell-derived extracellular vesicle subtypes. *EMBO J*. 2017;36(20):3012–3028.
 219. Zöllner M, Zhao K, Kutlu N, et al. Immunoregulatory Effects of Myeloid-Derived Suppressor Cell Exosomes in Mouse Model of Autoimmune Alopecia Areata. *Front Immunol*. 2018;9:1–21.
 220. Park M-J, Lee S-H, Kim E-K, et al. Interleukin-10 produced by myeloid-derived suppressor cells is critical for the induction of Tregs and attenuation of rheumatoid inflammation in mice. *Sci Rep*. 2018;8:.
 221. Tomić S, Joksimović B, Bekić M, et al. Prostaglandin-E2 Potentiates the Suppressive Functions of Human Mononuclear Myeloid-Derived Suppressor Cells and Increases Their Capacity to Expand IL-10-Producing Regulatory T Cell Subsets. *Front Immunol*. 2019;10:1–15.
 222. Schmidt SV, Nino-Castro AC, Schultze JL. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Front Immunol*. 2012;3:1–17.
 223. Gutknecht M, Geiger J, Joas S, et al. The transcription factor MITF is a critical regulator of GPNMB expression in dendritic cells. *Cell Commun Signal*. 2015;13:19–34.
 224. Knödler A, Schmidt SM, Bringmann A, et al. Post-transcriptional regulation of adapter molecules by IL-10 inhibits TLR-mediated activation of antigen-presenting cells. *Leukemia*. 2009;23(3):535–544.
 225. Schwarzbich M-A, Gutknecht M, Salih J, et al. The immune inhibitory receptor osteoactivin is upregulated in monocyte-derived dendritic cells by BCR–ABL tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(2):193–202.
 226. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, et al. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur. J. Immunol*. 1997;27(5):1229–1235.
 227. Haase C, Jørgensen TN, Michelsen BK. Both exogenous and endogenous interleukin-10 affects the maturation of bone-marrow-derived dendritic cells in vitro and strongly influences T-cell priming in vivo. *Immunology*. 2002;107(4):489–499.
 228. Rose AAN, Annis MG, Dong Z, et al. ADAM10 Releases a Soluble Form of the GPNMB/Osteoactivin Extracellular Domain with Angiogenic Properties. *PLoS One*. 2010;5(8):1–11.

ANNEXES

Publications personnelles

Publications :

Gérard C, Fagnoni, P, Vienot, A, Borg C, Limat s, Daval F, Calais F, Vardanega J, Jary M, Nerich V. A systematic review of economic evaluation in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 2017; 86: 207–216.

Couchoud C, Fagnoni P, Aubin F, Westeel V, Maurina T, Thiery-Vuillemin A, **Gérard C**, Kroemer M, Borg C, Limat S, Nerich V. The economic impact of cancer immunotherapy, a systematic review and quality evaluation. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2020.

Janikashvili N*, **Gérard C***, Thébault M, Boibessot C, Brazdova A, Cladière C, Ciudad M, Greigert H, Ouandji S, Ghesquière T, Samson M, Audia S, Saas P, Bonnotte B. Efficiency of human monocyte-derived suppressor cell (HuMoSC)-based treatment in GvHD prevention while preserving GvL effect. *En cours de soumission*

Samson M, Greigert H, Ciudad M, **Gérard C**, Ghesquière T, Trad M, Corbera M, Genet C, Ouandji S, Cladière C, Thébault M, Ly K, Liozon E, Vernier N, Maurier F, Bienvenu B, Terrier B, Guillevin L, Charles P, Quipourt V, Devilliers H, Gabrielle PH, Creuzot-Garcher C, Tarris G, Martin L, Saas P, Audia S, Cid MC, Bonnotte B. Restoration of altered Treg immune response by tocilizumab treatment in Giant Cell Arteritis. *En cours de soumission*

Communications orales et affichées :

- Présentations affichées aux Journées de l'UMR 1098 de 2017 à 2019, Besançon :

2017 : **Gérard C**, Thébault M, Brazdova A, Samson M, Sylvain A, Bonnotte B. *Development of an immunosuppressive therapeutic strategy derived from myeloid cells*

2018 : **Gérard C**, Thébault M, Samson M, Audia S, Bonnotte B. *First insights in Human monocyte-derived suppressor cell immunosuppressive mechanisms*

2019 : **Gérard C**, Thébault M, Janikashvili N, Hyvrier F, Maes P, Samson M, Audia S, Bonnotte B. *A new immunosuppressive therapeutic derived from myeloid cells in graft-versus-host disease*

- Présentation affichée au 52e Congrès Annuel de la Société Française d'Immunologie en novembre 2019, Nantes :

Gérard C, Thébault M, Janikashvili N, Hyvrier F, Maes P, Samson M, Audia S, Bonnotte B.
A new immunosuppressive therapeutic derived from myeloid cells in graft-versus-host disease.
Sélectionnée pour le prix poster

- Présentation orale à la Société de Médecine et Pharmacie de Franche-Comté le 19 octobre 2017, Besançon :

Gérard C, Fagnoni, P, Vienot, A, Borg C, Limat s, Daval F, Calais F, Vardanega J, Jary M, Nerich V. *Revue systématique des évaluations économiques dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique*

- Présentation orale aux Journées de l'UMR 1098 le 29 novembre 2019, Besançon :

Gérard C, Thébault M, Janikashvili N, Hyvrier F, Maes P, Samson M, Audia S, Bonnotte B.
A new immunosuppressive therapeutic derived from myeloid cells in graft-versus-host disease

Titre : Développement d'une stratégie thérapeutique immunosuppressive dérivée de cellules myéloïdes dans la maladie du greffon contre l'hôte

Mots-clés : cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes, lymphocytes T, lymphocyte T régulateur, inflammation, GvHD, immunorégulation

Résumé :

Notre équipe a développé une thérapie cellulaire originale dérivant de la lignée monocytaire. Cette sous-population de cellules humaines suppressives d'origine myéloïde, appelée Human Monocyte-derived Suppressor Cells (HuMoSC, cellules CD33+), est capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T effecteurs et d'induire des CD4 et CD8 Treg. De plus, les HuMoSC préviennent l'apparition de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

Dans un premier temps, nous avons montré qu'un environnement inflammatoire ou la présence d'immunosuppresseurs ne diminuaient pas la capacité des HuMoSC à inhiber la prolifération lymphocytaire et à favoriser l'induction de CD4 et CD8 Treg. Enfin, nous avons montré que l'effet graft-versus-leukemia (GvL) est préservé en présence des HuMoSC. Toutes ces données confirment l'intérêt des HuMoSC dans la prévention de la GvHD.

Cependant, en raison d'un faible rendement de génération des HuMoSC et d'un problème de disponibilité de billes de tri CD33+ GMP, nous avons aussi modifié notre protocole pour isoler les cellules CD14+, appelées CD14-HuMoSC. Ainsi, dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux propriétés des surnageants des HuMoSC et des CD14-

HuMoSC. Ces modifications du protocole ont permis d'obtenir un grand nombre de cellules CD14-HuMoSC et de grandes quantités de surnageant produit en conditions GMP. Nous avons montré que les deux surnageants diminuaient l'activation et la prolifération des LT, diminuaient la réponse Th1 au profit de la réponse Th2, favorisaient l'induction des Treg et diminuaient la capacité des cellules dendritiques à induire la prolifération des LT. In vivo, les surnageants préviennent le développement de la GvHD dans un modèle murin de GvHD xénogénique. Enfin, pour montrer que ces deux surnageants seront efficace chez les patients, nous avons montré qu'un environnement inflammatoire ou que la présence d'immunosuppresseurs n'altéraient pas l'effet immunosuppresseur des surnageants. Ces résultats confirment leur intérêt thérapeutique. L'étude protéomique de ces deux surnageants a permis d'identifier des protéines immunosuppressives qui pourraient être responsables de leurs capacités immunosuppressives.

En conclusion, les HuMoSC et les surnageants des cellules dérivées des HuMoSC représentent un arsenal thérapeutique prometteur dans la prévention de la GvHD mais aussi dans les maladies inflammatoires.

Title : Development of an immunosuppressive therapeutic strategy derived from myeloid cells in graft-versus-host disease

Key words : myeloid derived suppressor cells, T lymphocytes, regulatory T cells, inflammation, GvHD, immunoregulation

Abstract :

Our team has developed an original cell therapy derived from monocytes. This sub-population of human suppressor cells of myeloid origin, called Human Monocyte-Derived Suppressor Cells (HuMoSC, CD33+ cells) is able to inhibit effector T cell proliferation and to induce CD4 and CD8 Treg. It has been demonstrated that HuMoSC prevent from graft-versus-host disease (GvHD) after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation.

In a first time, we showed that an inflammatory environment or the presence of immunosuppressive drugs did not decrease HuMoSC abilities to inhibit T cell proliferation and to promote CD4 and CD8 Treg induction. Finally, we showed that graft-versus-leukemia (GvL) effect is preserved in presence of HuMoSC. Taken together, those data confirm the interest of HuMoSC in GvHD prevention. Nevertheless, due to a low yield of HuMoSC generation with this protocol and problem with availability of CD33 GMP beads, we also modified our protocol to isolate CD14+ cells, called CD14-HuMoSC. This is why in a second time, we took interest in HuMoSC and CD14-HuMoSC supernatant properties. These protocol

modifications allow us to obtain large number of CD14-HuMoSC cells and large quantities of supernatant produced under GMP conditions. We showed that both supernatants decrease T cell activation and proliferation, decrease Th1 response in favor of Th2 response, promote Treg induction and decrease capacity of dendritic cells to induce T cell proliferation. In vivo, supernatants prevent from GvHD in a murine model of xenogenic GvHD. Finally, in order to assess that these supernatants will be efficient in patient, we showed that an inflammatory environment or presence of immunosuppressive drugs did not alter both supernatant immunosuppressive effects. These results confirm their therapeutic interest. Proteomic analysis allowed us to identify immunosuppressive proteins which could be responsible for supernatants immunosuppressive capacities.

In conclusion, HuMoSC and supernatant derived from HuMoSC represent a promising therapeutic arsenal for GvHD prevention but also in inflammatory diseases.