



HAL
open science

Immunorégulation de la maladie du Greffon contre l'Hôte (GVH) par les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton : études in vitro et in vivo sur un modèle de GVH chez la souris NSG

Cécile Pochon

► **To cite this version:**

Cécile Pochon. Immunorégulation de la maladie du Greffon contre l'Hôte (GVH) par les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton : études in vitro et in vivo sur un modèle de GVH chez la souris NSG. Biologie cellulaire. Université de Lorraine, 2022. Français. NNT : 2022LORR0225 . tel-04058134

HAL Id: tel-04058134

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04058134>

Submitted on 4 Apr 2023

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

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



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé - BioSE

par **Cécile POCHON**

**Immunorégulation de la maladie du Greffon contre l'Hôte (GVH) par les
cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton : Etudes *in vitro*
et *in vivo* sur un modèle de GVH chez la souris NSG**

Mercredi 14 septembre 2022

Membres du jury :

Président de jury :	Pr Jean-Hugues DALLE	PU-PH, Paris Université de Paris Cité et APHP GHU Nord, Paris
Rapporteurs :	Pr Jean-Hugues DALLE	PU-PH, Paris Université de Paris Cité et APHP GHU Nord, Paris
	Pr Frédéric BARON	PU-PH, Service d'Hématologie clinique, laboratoire de transplantation médullaire, Université de Liège, Liège
Examineurs :	Pr Jérôme LARGHERO	PU-PH, Unité de thérapie cellulaire, Hôpital St Louis, centre MEARY, et Unité Inserm 976 Immunologie Humaine, Pathophysiologie, Immunothérapie, Paris
	Dr Natalia DE ISLA	Maître de Conférences des Universités, équipe 6 IMoPA UMR 7365 CNRS-UL, Vandoeuvre-lès-Nancy
	Dr Maud D'AVENI-PINEY	MCU-PH, équipe 6 IMoPA UMR 7365 CNRS-UL, Vandoeuvre-lès-Nancy
Membres invités :	Pr Danièle BENSOUSSAN	PU-PH, équipe 6 IMoPA UMR 7365 CNRS-UL, Vandoeuvre-lès-Nancy
Directrice de thèse :	Pr Marie-Thérèse RUBIO	PU-PH, équipe 6 IMoPA UMR 7365 CNRS-UL, Vandoeuvre-lès-Nancy

UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA)-Campus Santé Brabois, 9, Avenue Forêt de Haye 54500 Vandœuvre-lès-Nancy

Remerciements

Je souhaite remercier très sincèrement ma directrice, le Pr Rubio, qui m'a confié cette tâche, et qui m'a toujours montré sa confiance, dans tous les travaux, y compris au moment où l'hôpital me rappelait à 100%. Merci de m'ouvrir des portes Marie-Thérèse, merci pour toutes ces opportunités de travail et de recherche. Rien n'aurait eu lieu sans ton soutien. Je t'en suis profondément reconnaissante. Tu es un modèle qu'il serait bien difficile d'approcher, mais qui nous permet de progresser.

Je remercie également ma co-encadrante, le Dr D'Aveni, pour les conseils bienheureux (« fais les transwells ! »), pour la patience et la sérénité lors des moments de synthèse. Il s'est toujours dégagé de tes mots un optimisme sur les résultats à venir, sur l'issue de ce travail, et cela était précieux.

Je remercie vivement le Pr Bensoussan, qui a toujours été pour moi un grand soutien. Merci pour vos conseils Danièle, merci pour votre gentillesse avec moi.

Je remercie le Dr Natalia de Isla qui a eu une oreille attentive et bienveillante sur mon travail, et qui a su apporter des réponses à mes questions sur la sénescence et le métabolisme.

Je remercie vivement mes rapporteurs, M le Pr Jean-Hugues Dalle et M le Pr Frédéric Baron, ainsi que tous les membres de mon Jury (M le Pr Jérôme Larghero) pour m'avoir fait l'Honneur de relire mon travail et de le Juger.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Pr Jean-Hugues Dalle, qui, au-delà de ce travail de thèse, a été un soutien indéfectible dans la prise en charge des patients, et dans mes balbutiements professionnels. Jean-Hugues, tu es un collègue et un Maître formidables.

Je souhaite remercier l'association AREMIG qui a participé au financement de ce travail de recherche. Je voudrais en particulier dire à Françoise Laperdrix, si brusquement disparue, MERCI pour son soutien, et sa force.

Je souhaite aussi remercier l'association Anaïs contre la Leucémie, présidée par Mme Nadège Daniel-Begel, qui a également participé au financement de ce travail de recherche. Quel courage pour la maman d'Anaïs !

Je remercie le Pr Emond et son équipe à Tours pour leur collaboration, en réalisant le dosage des métabolites du tryptophane.

L'élément essentiel que je retiens de ces années dans l'équipe 6 est qu'aucun travail ne peut être accompli seul. Il est le fruit de la collaboration et du travail de beaucoup de personnes. Je souhaite dire un immense merci à chacun d'entre vous, qui m'avez accordé votre temps, votre patience, et votre amitié. Vous avez été les briques indispensables de ce travail. J'espère pouvoir vous délivrer de vive voix ces remerciements, et personnaliser pour chacun d'entre vous l'amitié que je vous porte. Pour le moment, je souhaite inscrire vos noms dans ce manuscrit qui vous revient :

Ghislaine Cauchois (pour votre patience, votre aide et votre soutien, quel vide à votre départ en retraite !), **Anne-Béatrice Notarantonio** (pour ton optimisme, ta joie, ton intelligence humaine,...Anne Bé, tu es un ouragan de vie, vivement le Népal), **Laura Boulangé** (pour ton dynamisme, ton travail, ta générosité et ton soutien), **Romain Perouf** (pour les MLR, le Seahorse, pour ta passion, les mitochondries !), **Charlotte Voisin** (pour les ELISA, et pour ta gentillesse), **Naceur Charif** (pour ton aide avec les CSM, les MLR), **Allan Bertrand** (pour les terribles MLR), **Laurie Targa** (pour les heures d'explications de manips), **Guillemette Fouquet** (pour les premières manips souris), **Marion Claudel** (pour ta présence et ton pragmatisme joyeux), **Huguette Louis** (pour avoir fermé les yeux sur mes retards en cytométrie), **Alice Aarninck** (pour le multiplex), le Dr **Jean-Baptiste Vincourt** (pour la protéomique membranaire), **Pr Sartelet** (pour le long travail d'anatomo-pathologie), et spécialement aussi le **Dr David Moulin** (pour l'aide scientifique que tu m'as apportée, ton expertise, sans compter tes jus de pomme et pieds de tomates !).

Mes collègues et amis de l'Hôpital ont aussi contribué, en prenant mes consultations, et en supportant mes moments de lassitude : **Marion Lubnau** (quelle énergie vive, merci de tout mon cœur), **Audrey Contet** (les premières années de cette thèse où j'ai été beaucoup absente du service), **Julie Valduga** (malgré toute la douleur), **Ludovic Mansuy** (Joyeux Noël), **Aurélie Phulpin** (le calme incarné), **Hélène Deutsch** (une chance de t'avoir parmi nous), **M. Chastagner** (pour votre pragmatisme, et le fait que vous ne paraissiez jamais avoir de doute sur les issues). **A toutes les infirmières (et infirmiers) du service** (trop de noms pour les citer mais je pense bien à chacun d'entre vous) qui ont patiemment collecté l'albumine dans les frigos, et qui ont participé aux prises de sang, **à Sylvie Tarillon notre coordinatrice de greffe** (sans qui je suis totalement désorganisée), **à toutes les auxiliaires de puériculture, aux ASH du service, à Lyse Navarro, à tous et toutes les secrétaires** (qui apportent de la douceur à nos journées chargées, et de l'efficacité !), **à Céline** notre psychologue, **Aux patients aussi** qui pour certains se demandaient pourquoi je ne consultais pas tel ou tel jour, et où en était l'état de mes recherches (en particulier le papa d'Eva).

Mes professeurs, depuis la plus tendre enfance, qui m'ont toujours donné la soif d'apprendre.

Mes amis en dehors de l'hôpital et du laboratoire, par souci de pudeur je ne vous citerai pas toutes et tous. Vous êtes toujours mes piliers, certains depuis le collège (**Jean-François**) et le lycée (**Hélène, Emilie**), et pour les autres amis chers, au hasard des rencontres.

Ma famille. Les premiers soutiens de toujours. Qui ne savent plus trop quelle est la prochaine étape mais qui ont la gentillesse de paraître fiers de moi. En premier lieu **mes parents**, merci est un mot bien maigre... **Ma sœur** bien sûr aussi, avec mes **neveu** et **nièce**. **Ma tata Colette** et tonton **Jean-Louis**. **Chacun des membres de ma famille** et de mon quotidien (**Antho**, pour ta patience et tes remèdes). Rien de tout cela n'aurait été possible sans vous.

Enfin, bien qu'il ne soit pas spécialement d'accord, **je voudrais dédier ce travail à mon fils, Daniel**. Entré en petite section de maternelle au début de ce travail, il est actuellement en CM1. Cette dédicace est faite pour lui donner la confiance de se lancer dans ce qui le passionne, peu importe le temps que cela nécessitera...

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	12
Partie 1. La maladie du Greffon contre l'Hôte (GVH).....	13
1.1 Principes de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.....	13
1.2 La maladie du greffon contre l'Hôte aiguë : physiopathologie.....	15
1.3 La maladie du greffon contre l'Hôte chronique : physiopathologie.....	18
1.4 La prophylaxie et le traitement de la GVH.....	21
Partie 2. Les Cellules Stromales mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW).....	29
2.1 Définition des CSM-GW.....	29
2.2 Propriétés immunomodulatrices des CSM-GW.....	33
2.2.1 Modification du métabolisme et arrêt de la prolifération des cellules immunitaires (lymphocytes T en particulier).....	36
2.2.2 Induction de l'exhaustion et/ou de l'apoptose des lymphocytes T activés....	42
2.2.3 Polarisation des autres cellules immunitaires, notamment régulatrices, vers un phénotype tolérogène.....	43
2.2.4 Modification de l'adhésion et de la migration des cellules immunitaires.....	44
2.3 Intérêt des CSM-GW dans le contexte de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	44
2.4 Priming des CSM-GW par IFN- γ	47
Partie 3. Objectifs du travail de thèse.....	50
MATERIELS ET METHODES.....	51
1. Etudes <i>in vitro</i>.....	52
1.1 Isolation et expansion des CSM-GW.....	52
1.2 Décongélation et activation par IFN- γ	54
1.3 Prolifération T, co-cultures, mixed lymphoid reactions (MLR).....	54
1.4 Inhibition du contact cellulaire.....	56
1.5 Inhibition d'IFN- γ , d'IDO, de la voie PDL-1/PD-1, des galectines.....	56
1.6 Elisa et Multiplex.....	57
1.7 Dosages du tryptophane et de ses dérivés métaboliques.....	57
1.8 Etudes dans le plasma humain et sénescence.....	57
1.9 Etude du transfert mitochondrial.....	58
1.10 Etude du métabolisme des lymphocytes T (Seahorse).....	58
2. Etudes <i>in vivo</i>.....	58
2.1 Modèle de xeno-GVH.....	59
2.2 Injections des CSM-GW <i>in vivo</i>	62

2.3 Marquage et suivi du « homing » des CSM-GW.....	62
3. Analyses statistiques	62
RESULTATS	63
1. Impact de l'IFN- γ sur l'effet immunosuppresseur des CSM-GW	64
1.1 L'IFN- γ entraîne des modifications phénotypiques des CSM-GW	64
1.2 La pré-incubation par IFN- γ augmente le potentiel antiprolifératif des CSM-GW <i>in vitro</i>	65
1.3 L'activation par IFN- γ des CSM-GW induit l'apoptose des lymphocytes T activés, mais ne modifie pas leur épuisement (<i>exhaustion</i>) <i>in vitro</i>	70
2. Etude des mécanismes immunomodulateurs des CSM-GW-IFN.....	71
2.1 L'IFN- γ augmente l'expression de PDL-1, PDL-2 et d'IDO des CSM-GW	71
2.2 Molécules immunosuppressives dans le surnageant de co-culture LT/CSM-GW: augmentation de Galectine-9 et d'IDO en présence de CSM-GW-IFN	72
2.3 L'effet immunosuppresseur des CSM-GW et des CSM-GW-IFN est dépendant d'IDO.....	73
2.4 Les CSM-GW-IFN ont une activité IDO augmentée.....	77
2.5 Outre l'activation d'IDO, le contact cellulaire entre CSM-GW (ou CSM-GW-IFN) et les lymphocytes T est nécessaire à leur effet immunosuppresseur.....	81
2.6 IDO et transfert mitochondrial	83
2.7 Les CSM-GW-IFN entraînent une élévation de la concentration des chémoattractants IL-6, MCP-1 et IL-8 dans les surnageants de co-culture avec les LT	91
3. Impact des CSM-GW et CSM-GW-IFN sur la xéno-GVH <i>in vivo</i>	92
3.1 L'injection intraveineuse répétée de CSM-GW-IFN diminue la mortalité des souris en diminuant l'incidence et la sévérité de la GVH.....	92
3.2 Les CSM-GW-IFN entrent en contact avec les lymphocytes T au niveau des poumons, de la peau mais ne persistent pas dans ces organes au-delà de 24h	97
3.3 Le plasma humain modifie l'aspect des CSM-GW <i>in vitro</i> et pourrait participer à leur clairance rapide <i>in vivo</i>	99
DISCUSSION	102
1. Synthèse des résultats	103
2. Discussion des mécanismes immuno-régulateurs des CSM-GW <i>in vitro</i> , focus sur IDO, le transfert mitochondrial et le métabolisme des lymphocytes T	104
2.1 Mécanismes immuno-modulateurs d'IDO	104
2.2 Impact immunomodulateur du transfert mitochondrial.....	107
2.3 Interaction entre transfert de mitochondries et IDO	109
2.4 Hétérogénéité des sources de CSM-GW	110

2.5	Production de cytokines inflammatoires et de chimiokines	111
2.6	Limites de l'étude <i>in vitro</i>	112
3.	Discussion sur le devenir des CSM-GW après injection intraveineuse, et sur les modalités d'administration des CSM-GW.....	112
3.1	Nécessité d'injections itératives.....	112
3.2	Devenir des CSM-GW après injection.....	113
3.3	Limites de l'étude <i>in vivo</i>	117
	CONCLUSION et PERSPECTIVES.....	119
	REFERENCES	122
	ANNEXES.....	139

ABBREVIATIONS

ATP: Adenosine Triphosphate

AhR: récepteur aryl hydrocarbure

CFU-F: Colony Forming Units-Fibroblast

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CSH: Cellules souches hématopoïétiques

CSM: Cellules Souches/Stromales Mésoenchymateuses

CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène

DAMP: Damage Associated Molecular Pattern

DMSO: Diméthyl Sulfoxyde

ECAR: niveau d'acidification extra-cellulaire

GVH: Maladie du Greffon contre l'Hôte

GVL: Greffon *Versus* Leucémie

GW: Gelée de Wharton

HLA: Human Leukocyte Antigen

HMGB: High Mobility Group Box

HSP: Heat shock protein

IDO: indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN : Interféron

IL: Interleukine

JAK: Janus Kinase

LP: lysat plaquettaire

LT: lymphocyte T

MLR: Mixed Lymphocyte Reaction

MT: Méthyltryptophane

NAD: nicotinamide adénine dinucléotide

NK: Natural Killer cell

NKT: Natural Killer T cell

OCR: Niveau de consommation d'oxygène

PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells (cellules mononucléées du sang)

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

PGE2: Prostaglandine E2

PNN: polynucléaires neutrophiles

SVF: Sérum de veau foetal

TCR: T cell receptor

TDO: Tryptophan 2,3-dioxygénase

TGF: Transforming Growth Factor

Th: T helper

TLR: Toll Like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

ROS: Reactive Oxygen Species

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Répartition des indications des allogreffes de CSH (activité nationale de greffe de CSH, rapport de l'Agence de Biomédecine 2020).....	14
Figure 2. Survie des patients après allogreffe de CSH pour leucémies aiguës sur la période 2011-2020.....	14
Figure 3. Schématisation des mécanismes de GVH aiguë.....	18
Figure 4. Schématisation des étapes de la GVH chronique.....	21
Figure 5. Mode d'action des principaux traitements prophylactiques de la GVH.....	23
Figure 6. Les traitements de la GVH aiguë.....	27
Figure 7. Prévention et traitements de la GVH chronique.....	28
Figure 8. Description anatomique de la gelée de Wharton.....	30
Figure 9. Principaux mécanismes immunomodulateurs avec l'ensemble des acteurs de l'immunité innée et adaptative.....	34
Figure 10. Mécanismes immunomodulateurs précliniques des CSM dans la GVH.....	35
Figure 11. Schématisation des métabolites du tryptophane en scindant les voies de l'IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase)/TDO (Tryptophan 2,3-dioxygénase) de celle de la Tryptophan hydroxylase.....	39
Figure 12. Technique des explants.....	53
Figure 13. Expression membranaire de marqueurs avec (en rouge) et sans (en vert) pré-incubation par IFN- γ	64
Figure 14. Lymphocytes T non activés en culture avec des CSM-GW-IFN allogéniques....	65
Figure 15. Prolifération des lymphocytes T en présence de CSM-GW et CSM-GW-IFN....	66
Figure 16. Inhibition de la prolifération des lymphocytes T en présence de CSM-GW (vert) et CSM-GW-IFN (rouge) en fonction du ratio cellulaire (MSC : lymphocytes T).....	66
Figure 17. Les CSM-GW-IFN inhibent davantage la prolifération des lymphocytes T que les CSM-GW non primées.....	67
Figure 18. Comparaison d'inhibition de prolifération des lymphocytes T activés entre T CD4+ et T CD8+	68

Figure 19. Impact du cordon sur le potentiel des CSM-GW.....	68
Figure 20. Inhibition de l'IFN γ durant la co-culture des CSM avec les T activés.....	69
Figure 21. Les CSM-GW induisent l'apoptose des lymphocytes, et la pré-incubation par IFN- γ majore l'apoptose.....	70
Figure 22. Les CSM-GW n'induisent pas l'épuisement des lymphocytes T <i>in vitro</i>	71
Figure 23. Comparaison des phénotypes des CSM-GW et CSM-GW-IFN pour HLA-G, Galectine-3, Glaectine-9, PDL-1, PDL-2 et IDO.....	71
Figure 24. Concentrations des cytokines et protéines dans le surnageant des co-cultures....	73
Figure 25. Inhibition de la voie PDL1/PD1 par nivolumab dans les co-cultures.....	74
Figure 26. Inhibition de la galectine-9 dans les co-cultures.....	75
Figure 27. Inhibition de l'activité d'IDO dans les co-cultures.....	76
Figure 28. Dosages des métabolites du tryptophane dans les milieux de co-culture.....	79
Figure 29. Activité d'IDO en fin de co-culture.....	81
Figure 30. Le contact entre CSM et lymphocytes est nécessaire pour l'immunosuppression des CSM.....	82
Figure 31. Activité IDO dans les co-cultures avec et sans transwell.....	83
Figure 32. Transfert mitochondrial vers les lymphocytes T à l'état basal, en présence d'un transwell, avec et sans activation par IFN- γ , avec et sans 1L-méthyltryptophane.....	86
Figure 33. Analyse du métabolisme des lymphocytes T en fin de co-culture par le rapport OCR/ECAR.....	90
Figure 34. Comparaison relative des chimiokines et cytokines dans le surnageant obtenu le 5 ^{ème} jour des co-cultures.....	92
Figure 35. Les CSM-GW-IFN injectées à J7, J14 et J21 améliorent la survie des souris NSG xénotreffées par des PBMC humaines.....	93

Figure 36. Aspects histologiques de GVH cutanée et hépatique et immunohistochimiques..	95
Figure 37. Visualisation des CSM-GW-IFN en microscopie à fluorescence à 24h de l'injection IV chez la souris NSG.....	98
Figure 38. Effet du plasma humain sur les CSM-GW.....	100

INTRODUCTION

Partie 1. La maladie du Greffon contre l'Hôte (GVH)

1.1 Principes de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

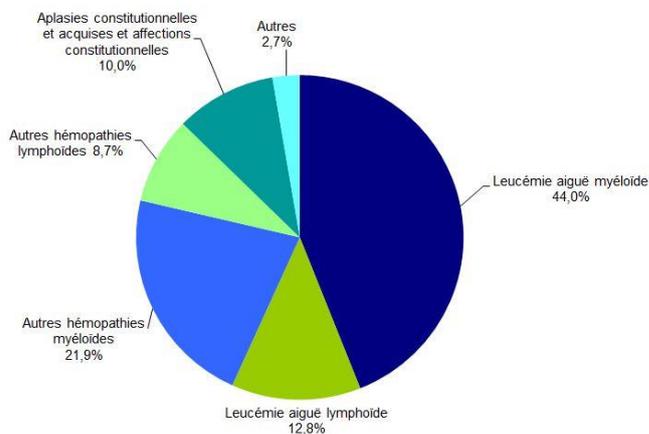
L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est historiquement la première immunothérapie. En 1957, Donnell Thomas rapporte le cas de 6 patients transfusés de moelle osseuse pour une aplasie médullaire secondaire à une irradiation ou à une drogue myélotoxique (1).

A cette époque, la connaissance du système de reconnaissance du soi « Human Leucocyte Antigen » (HLA) et de l'immunogénicité des greffons est balbutiante, et les premiers patients décèdent, après une prise de greffe transitoire (2).

L'allogreffe de moelle osseuse, puis d'autres sources de cellules souches hématopoïétiques (CSH) (unité de sang placentaire, cellules souches périphériques), entraîne une réinitialisation du système immunitaire, avec une reconstitution immunitaire d'origine donneur. Cette réinitialisation est à l'origine de l'effet « GVL », Greffon *versus* Leucémie, alias de l'immunothérapie anti-tumorale. Mais le corolaire non souhaité de l'effet GVL est nommé « GVH », Greffon *versus* Hôte, source d'une altération profonde de la qualité de vie post greffe, et source de mortalité toxique (3). Cet effet GVH a limité le développement de l'allogreffe de moelle osseuse dans des pathologies dysimmunitaires pour lesquelles une réinitialisation du système immunitaire pourrait s'avérer curative. L'allogreffe de CSH est donc réservée jusqu'à présent aux hémopathies malignes pour lesquelles aucun autre traitement curateur n'existe, ou aux hémopathies non malignes menaçant le pronostic vital, ou aux déficits immunitaires combinés sévères (Figure 1). Cependant, l'amélioration des traitements anti-infectieux (antiviraux et antifongiques) et des soins de support, la meilleure définition au niveau allélique du groupe HLA, et l'amélioration de la compréhension de la physiopathologie de la GVH, menant au développement de nouveaux traitements préventifs ou curatifs, ont amélioré la survie et la qualité de vie des patients (Figure 2). En France, en 2020, 1878 allogreffes de CSH ont été réalisées.

Figure CSH G11. Répartition des indications des allogreffes de CSH en 2020 (n = 1603 patients)*

	Nombre	Pourcentage
Leucémie aiguë myéloïde	705	44,0%
Leucémie aiguë lymphoïde	205	12,8%
Autres hémopathies myéloïdes	351	21,9%
Autres hémopathies lymphoïdes	139	8,7%
Aplasies constitutionnelles et acquises et affections constitutionnelles	160	10,0%
Autres	43	2,7%
Total	1603	100,0%



* Parmi les patients dont les données sont saisies dans ProMISe
 Source : Base ProMISe (extraction du 21 mai 2021)

Figure 1. Répartition des indications des allogreffes de CSH (activité nationale de greffe de CSH, rapport de l'Agence de Biomédecine 2020)

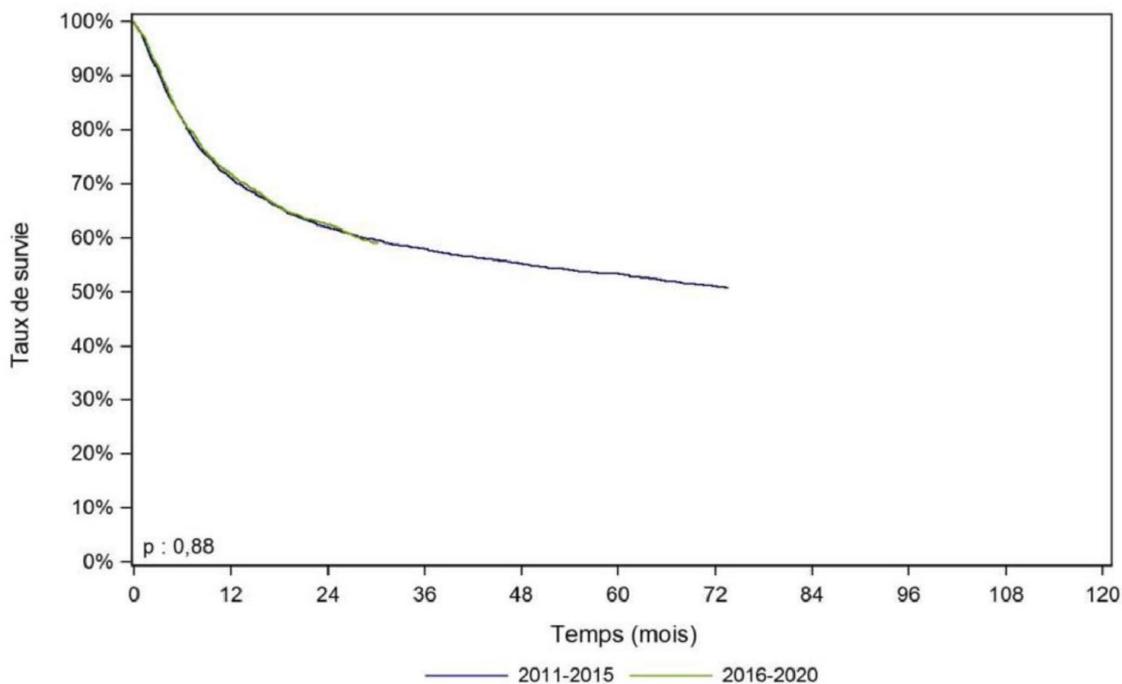


Figure 2. Survie des patients après allogreffe de CSH pour leucémies aiguës sur la période 2011-2020 (activité nationale de greffe de CSH, rapport de l'Agence de Biomédecine 2020)

1.2 La maladie du greffon contre l'Hôte aiguë : physiopathologie

La maladie du greffon contre l'hôte (GVH) aiguë est historiquement définie par sa survenue dans les 100 jours qui suivent l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Il existe néanmoins des formes persistantes, récurrentes ou de survenue tardive. Les organes le plus fréquemment affectés sont la peau (77%), le tube digestif (haut 27% et bas 31%) et le foie (8%) (4). Son incidence est élevée, estimée entre 20 et 70% selon les types de donneurs de CSH et de greffons, la prophylaxie utilisée, le conditionnement, l'âge du donneur et du receveur, et l'hémopathie sous-jacente (5,6).

Comme nous l'avons décrit dans une revue publiée récemment dans un chapitre de livre (**annexe 1(7)**), la physiopathologie de la GVH aiguë peut être schématiquement décrite en 3 phases (8) (Figure 3):

- La première phase est la conséquence du conditionnement de greffe. Ce conditionnement est réalisé à visée immunosuppressive, et parfois myélo-ablative (chez les patients jeunes, à visée antitumorale, ou pour permettre une prise de greffe dans certaines pathologies non malignes). Il comporte de la chimiothérapie, parfois associée à de la radiothérapie. Ce traitement entraîne des dommages endothéliaux diffus, induisant une néo-angiogenèse et une infiltration dans le tractus intestinal de cellules de l'immunité innée, à savoir des polynucléaires neutrophiles (PNN), des monocytes et macrophages (9).

Les PNN, activés par des bactéries pénétrant la barrière intestinale, relarguent des radicaux superoxyde et des ROS (Reactive Oxygen Species), à l'origine de dommages directs du tractus gastrointestinal (10).

Les signaux inflammatoires générés par les dommages du tractus intestinal comportent des molécules nommées « DAMP » (Damage Associated Molecular Pattern), correspondant à des acides nucléiques, des protéines intracellulaires telles que les HMGB1 (High Mobility Group Box 1), les HSP (Heat Shock Proteins), les histones, l'actine, l'ATP, les ROS, et des protéines

extracellulaires telles que l'acide hyaluronique et le biglycane, des alarmines (IL-1 α , IL-33) relarguées par dégranulation, et des cytokines inflammatoires, comme l'IL-6 et le TNF (Tumor Necrosis Factor)- α .

Ces molécules stimulent la translocation à travers la muqueuse endommagée de molécules issues du microbiote, les « PAMP » (Pathogen Associated Molecular Pattern) que composent les lipoprotéines, les lipopolysaccharides, les peptidoglycanes, les flagellines, des fragments fongiques et des acides nucléiques viraux.

Les DAMPs et PAMPs agissent sur des récepteurs spécifiques cellulaires. Les PAMPs activent en particulier les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Les Toll-like récepteurs (TLR), présents sur la membrane plasmique (pour les TLR 2 et 4) et dans les endosomes (TLR 3, 7/8, 9) sont activés spécifiquement par certaines de ces molécules, et induisent la production d'IFN α par les CPA. A cette étape, l'activation de complexes multiprotéiques intracytoplasmiques, nommés inflammasomes, tels que NLRP1 et NLRP3, vont eux-mêmes conduire à l'activation de protéases de la famille des caspases, pour synthétiser et sécréter des formes matures d'IL-1 β et d'IL-18. Cette cascade conduit à la mort cellulaire des macrophages et monocytes appelée pyroptose (11). La pyroptose conduit également au relargage de DAMPs (notamment IL-1 α , HMGB1, et ATP) et accentue la réaction inflammatoire. Les monocytes, macrophages et PNN activés par les DAMPs et PAMPs sécrètent des cytokines, en particulier TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-33, IL-12, IL-23, les IFN de type I, et des chémokines telles que CCL5. Ces cytokines et chémokines vont stimuler la présentation d'antigène, et l'activation des CPA de l'hôte, qui exprimeront alors des molécules de co-stimulation et sécrèteront des cytokines.

Les cellules dendritiques de l'hôte, les monocytes et PNN pro-inflammatoires vont migrer de l'épithélium intestinal aux ganglions lymphatiques mésentériques (12), où les CPA vont activer les lymphocytes T du donneur.

De plus, les cytokines IFN α et γ produites vont induire la production de chémokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11, capables de recruter les lymphocytes T helper Th1, les lymphocytes T cytotoxiques Tc1 et les cellules Natural Killer (NK), exprimant le récepteur CXCR3 (13).

-La 2^{ème} phase correspond à l'activation des lymphocytes T du donneur. Les peptides allogéniques présentés par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité sont reconnus par le TCR

(T cell Receptor) des lymphocytes T issus du donneur. C'est le premier signal. Les molécules de co-stimulation, présentes sur les CPA du receveur, telles que CD40, OX40L, CD155/112, ICOSL, vont permettre le 2^{ème} signal, nécessaire à l'activation des lymphocytes T. La production de cytokines par les CPA, les cellules NK et les lymphocytes T, comme l'IL-2, l'IL-12, l'IL-6, l'IL-23, va entraîner la différenciation de lymphocytes T naïfs en T helper et cytotoxiques matures, Th1/Tc1, Th17/Tc17, et ceci constitue le 3^{ème} signal. A noter que ce 3^{ème} signal utilise la voie JAK1/2. La différenciation en Th17 est en particulier médiée par TGF- β et IL-6, et la différenciation en Tc17 par IL-1 β et TNF- α .

- La 3^{ème} phase consiste en la migration des lymphocytes T vers les tissus inflammés et la destruction des tissus cibles. Les lymphocytes T activés, vont eux-mêmes produire des cytokines, en particulier IL-2 et IFN- γ par les Th1/Tc1, et IL-17 par les Th17/Tc17, coopérant avec le TNF- α et le Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), pour recruter et activer des effecteurs capables d'induire l'apoptose des tissus cibles *via* Fas ligand, Granzyme et Perforine (9).

Parallèlement, des phénomènes inhibiteurs existent également, notamment par l'interaction des lymphocytes T avec des molécules inhibitrices sur les CPA, telles que PDL1/2, galectine-9, par la production de facteurs par les tissus en cours de cicatrisation tels que le keratinocyte growth factor (KGF), ou l'IL-22 par les cellules innées lymphoïdes (ILC) de type 3, et par la présence de lymphocytes T régulateurs issus du donneur (4).

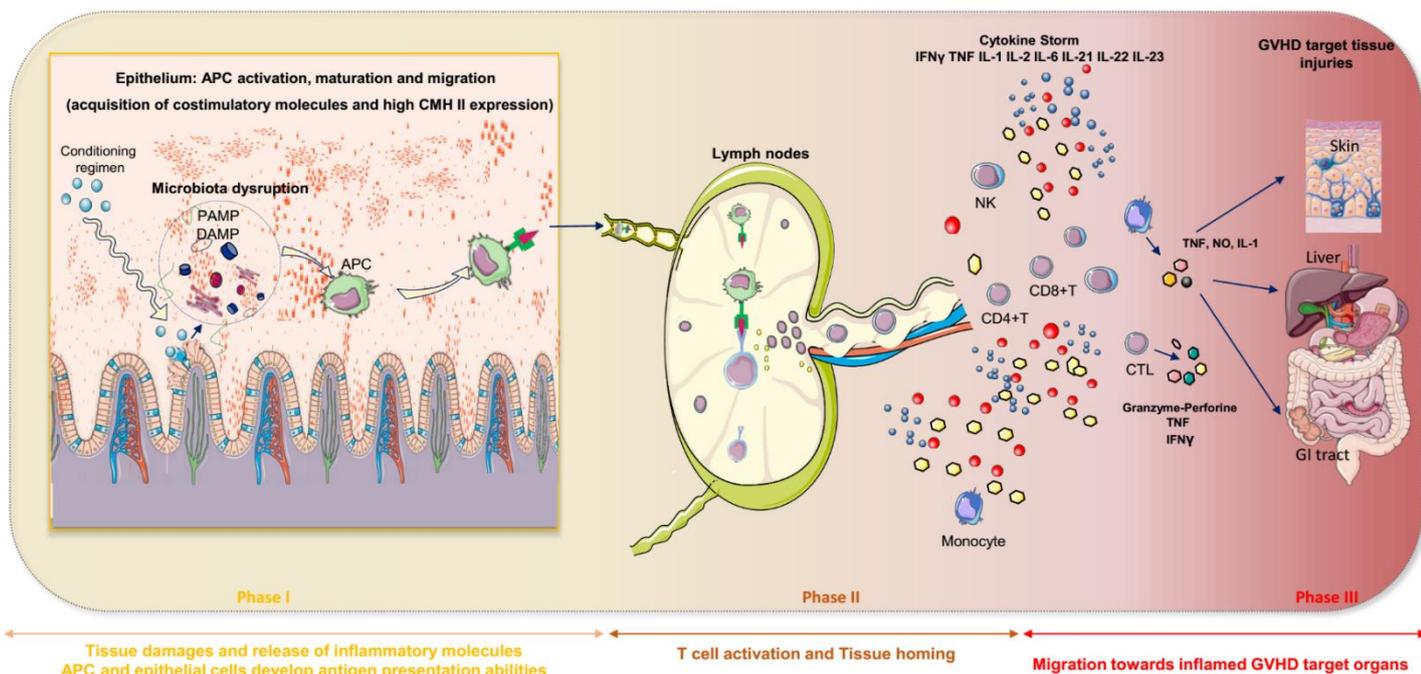


Figure 3. Schématisation des mécanismes de GVH aiguë (7) :

La 1^{ère} phase consiste en l'activation des CPA, et le recrutement des monocytes et neutrophiles. La 2^{ème} phase correspond à l'activation des lymphocytes T dans les ganglions. La 3^{ème} phase correspond à la migration des lymphocytes T activés vers les tissus cibles et leur destruction.

1.3 La maladie du greffon contre l'Hôte chronique : physiopathologie

La GVH chronique est une complication de l'allogreffe de CSH dont l'incidence varie de 10 à 70% des cas, selon les donneurs (compatibilité HLA et âge), le greffon, la prophylaxie de la GVH, des caractéristiques du receveur (âge, sérologie CMV...) et l'hémopathie sous-jacente. Elle reste une cause majeure de mortalité des patients au-delà de 2 ans post greffe, et impacte lourdement la qualité de vie des patients survivants (14). La GVH chronique peut toucher tous les organes, incluant les épithelia affectés dans la GVH aiguë (peau, tractus digestif, foie), mais aussi les poumons, la muqueuse buccale, oesophagienne, le tissu musculo-squelettique, les articulations, les fascias, les yeux, le système immunitaire et hématopoïétique, les cheveux et les ongles, la sphère génitale, et le système nerveux. La sévérité est évaluée grâce à un système de classification (15), en particulier *via* les critères de consensus NIH (National Institutes of Health) publiés en 2014 (10).

La GVH chronique peut se manifester par des atteintes inflammatoires telles que des polysérites ou des polymyosites, et par des atteintes fibrosantes avec une part inflammatoire moindre impliquant un ou plusieurs organes (15,16).

La GVH chronique est secondaire à une perte d'équilibre immunitaire, alliant un excès d'activation d'effecteurs immunitaires induisant une inflammation, à un défaut d'éléments régulateurs (en lien avec les dommages thymiques, et les inhibiteurs de calcineurine) censés induire la tolérance.

Sa physiopathologie peut être schématiquement présentée en 3 étapes (17) (Figure 4):

- La 1^{ère} étape est similaire à ce qui est décrit pour la GVH aiguë, et correspond à une inflammation précoce, avec dommages tissulaires, liés également aux effets du système immunitaire inné. Les cellules endothéliales activées et endommagées vont participer à la migration des lymphocytes T donneurs vers les tissus cibles de la GVH. Les molécules DAMPs et PAMPs vont favoriser la présentation d'antigènes par les monocytes, les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les lymphocytes B.

-La 2^{ème} étape est liée à l'activation des lymphocytes T et l'excès d'activation des lymphocytes B. L'activation des lymphocytes T conduit à la formation de centres germinaux, en coopération avec les lymphocytes T folliculaires helper (TFh) (issus du donneur) sécrétant des cytokines telles que l'IL-21, favorisant la survie des lymphocytes B. Les dommages du thymus, tissu cible des lymphocytes T alloréactifs, tant sur la médulla, responsable de la sélection négative, que sur la partie corticale, responsable de la sélection positive, vont conduire à une perte de tolérance centrale, et à l'émergence de lymphocytes T alloréactifs spécifiques d'antigènes tissulaires du receveur (18).

Les populations régulatrices, Tregs, Bregs, NKregs, cellules NKT invariantes, et les lymphocytes T de type 1 régulateurs, sont diminuées, conduisant à une perte de tolérance périphérique (8). Au-delà de l'alloréactivité des lymphocytes T et B contre le CMH de l'hôte, on observe la génération d'anticorps et l'activation de lymphocytes T et B contre des néoantigènes. Les patients atteints de GVH chronique développent des anticorps contre les antigènes mineurs d'histocompatibilité. La GVH chronique est associée à des taux élevés de BAFF (B-cell Activating Factor), et un phénotype B activé, avec un ratio BAFF/B élevé. De plus, les lymphocytes B activés sont résistants à l'apoptose, ce qui contribue à une expansion

des lymphocytes B en réponse au BAFF soluble issu de cellules allo ou autoréactives à la sélection inappropriée. Le BCR et les molécules de signalisation de la voie de la Bruton Tyrosine Kinase (BTK) sont hyperactivés. Parallèlement, on observe une réduction des lymphocytes B mémoires (CD27+) et IgD négatives, ce qui induit une diminution de la réponse anti-microbienne (19).

-la 3^{ème} étape correspond à l'installation de la fibrose. Les tissus endommagés par les lymphocytes T du donneur et leur dérégulation, ainsi que les mécanismes aberrants de réparation tissulaire conduisent à l'activation des fibroblastes, au dépôt de collagène, à la fibrose et à la dysfonction irréversible d'organes (17).

Cette succession d'événements est principalement liée à la production de TGF- β et de PDGF- α par les macrophages activés de type M2. Les macrophages, en effet, sont des acteurs majeurs du contrôle de l'inflammation, par la phagocytose de débris et de neutrophiles apoptotiques. Les macrophages de type 1 exacerbent les dommages tissulaires et initient la réponse inflammatoire. Les macrophages de type 2, au contraire, sécrètent des cytokines anti-inflammatoires, telles qu'IL-10, l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1RA) et le récepteur leurre de l'IL-1 (IL-1R2), ainsi que de hauts niveaux de récepteurs éboueurs et de chémokines spécifiques, qui contribuent à la résolution de l'inflammation (20). Cette dichotomie est une vision actuellement considérée comme trop manichéenne ou simpliste, et il existe certainement un continuum dans la différenciation fonctionnelle des macrophages. Quoiqu'il en soit, le TGF- β et la phagocytose de débris de neutrophiles peut transformer la fonction des macrophages (21).

Les lymphocytes T Th2 et Th17, et les lymphocytes B, vont contribuer à cette sécrétion de TGF- β et de PDGF- α par les macrophages M2 : les Th2 et Th17 *via* la sécrétion d'IL-13 et IL-17 ; les lymphocytes B *via* la production d'allo-anticorps, qui vont se lier aux récepteurs Fc γ présents sur les macrophages et entraîner l'opsonisation, induisant une forte sécrétion de TGF- β .

Ainsi, la cicatrisation des tissus est coordonnée avec l'arrêt de l'inflammation, et cet équilibre est altéré dans la GVH chronique, avec le développement d'une réparation aberrante et d'une fibrose.

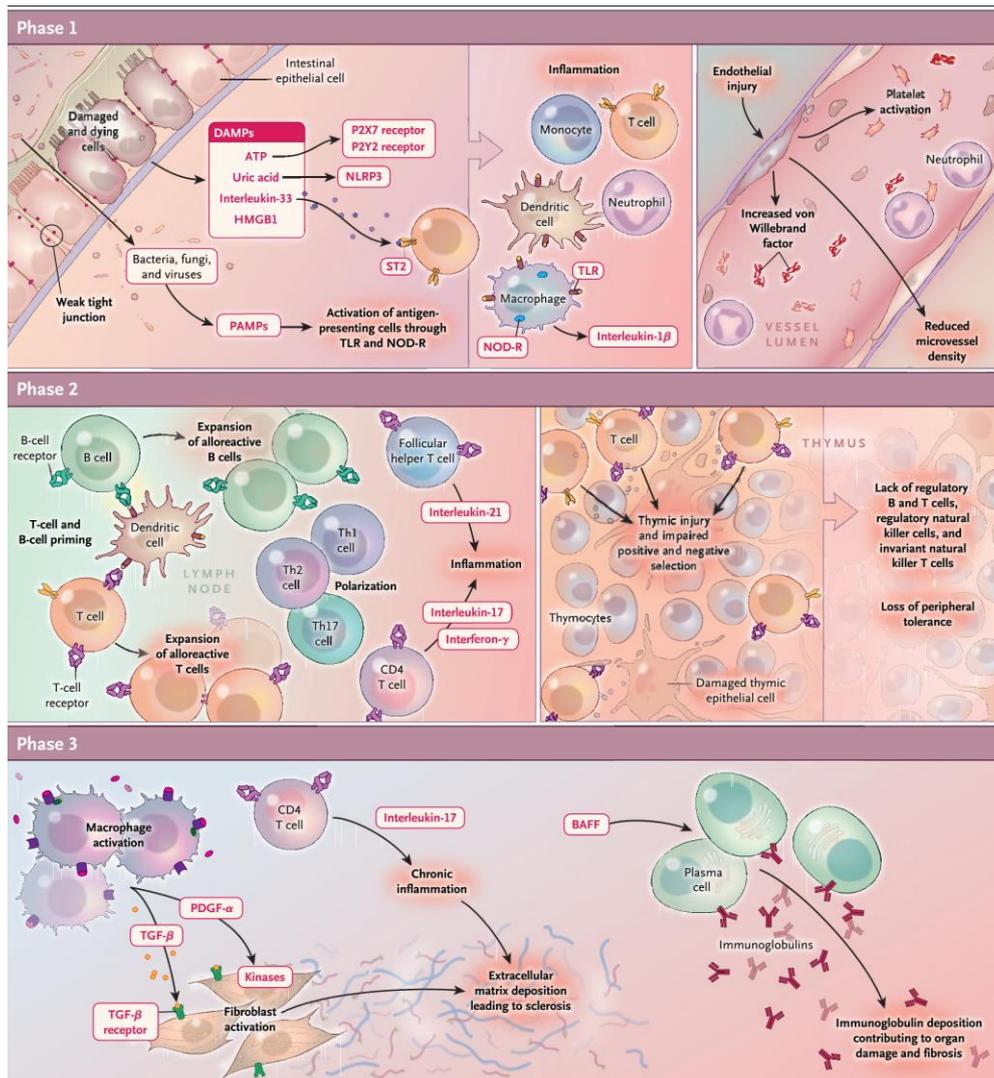


Figure 4. Schématisation des étapes de la GVH chronique (22).

La 1^{ère} étape correspond à l'activation des cellules de l'immunité innée aboutissant à des lésions endothéliales. La 2^{ème} étape consiste en l'activation et l'expansion des lymphocytes B et T, aboutissant à des dommages thymiques et la perte de tolérance périphérique. La 3^{ème} étape correspond à l'activation des fibroblastes induisant la fibrose.

1.4 La prophylaxie et le traitement de la GVH

Les traitements immunosuppresseurs employés dans la prophylaxie et le traitement de la GVH interagissent avec au moins l'un des 3 signaux impliqués dans l'activation et la prolifération des lymphocytes T suivant leur interaction avec les CPA.

Le premier signal correspond à la cascade de phosphorylation de protéines intracellulaires faisant suite à la stimulation du TCR (T-cell receptor), et aboutissant à l'activation de la

calcineurine (une sérine/thréonine phosphatase). Cette dernière va déphosphoryler et activer le facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T cells). La voie NF- κ B (nuclear factor kappa-B) est également activée à la suite de l'activation du TCR, conduisant à la transcription de cytokines (IL-2), de récepteur aux cytokines (CD25, récepteur de l'IL-2) et de molécules de costimulation (CD40L).

Le 2^{ème} signal est médié par l'interaction entre les molécules de co-stimulation exprimées à la surface des CPA (CD80, CD86 et CD40) et leurs récepteurs sur les lymphocytes T activés (CD28 et CD40L).

Le 3^{ème} signal correspond à l'action des cytokines (IL-2, IL-7 et IL-15) sur les récepteurs des lymphocytes T. La stimulation du CD25 active des Janus Kinases (JAK/STAT5) et la protéine mTOR (mammalian target of rapamycin). Ces 2 voies régulent la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à S, permettant la synthèse d'ADN et la prolifération lymphocytaire.

1.4.1 Prophylaxie

La prophylaxie de la GVH repose en premier lieu sur le choix du donneur, dont la compatibilité HLA est la première priorité : ainsi, un donneur familial HLA compatible, ou un donneur HLA compatible 10/10 sur les gènes HLA-A, B, C, DR, DQ sera préféré à un donneur avec mismatch HLA (23). La source de greffon peut également avoir un impact, puisque les cellules souches périphériques sont liées à un risque accru de GVH chronique, en comparaison à la moelle osseuse (24).

Il est également nécessaire d'utiliser une prophylaxie médicamenteuse, dont l'intensité et la qualité dépend de la compatibilité HLA entre le donneur et le receveur, et du type de greffon. Les prophylaxies médicamenteuses les plus fréquemment employées sont les suivantes (25) (Figure 5):

-les inhibiteurs des calcineurine (ciclosporine, tacrolimus) (26)

-les inhibiteurs du cycle cellulaire (antimétabolites inhibant la synthèse d'ADN), méthotrexate et mycophénolate mofetil (27)

-le sérum anti lymphocytaire ou l'alemtuzumab, entraînant une lymphopénie profonde et prolongée (28)

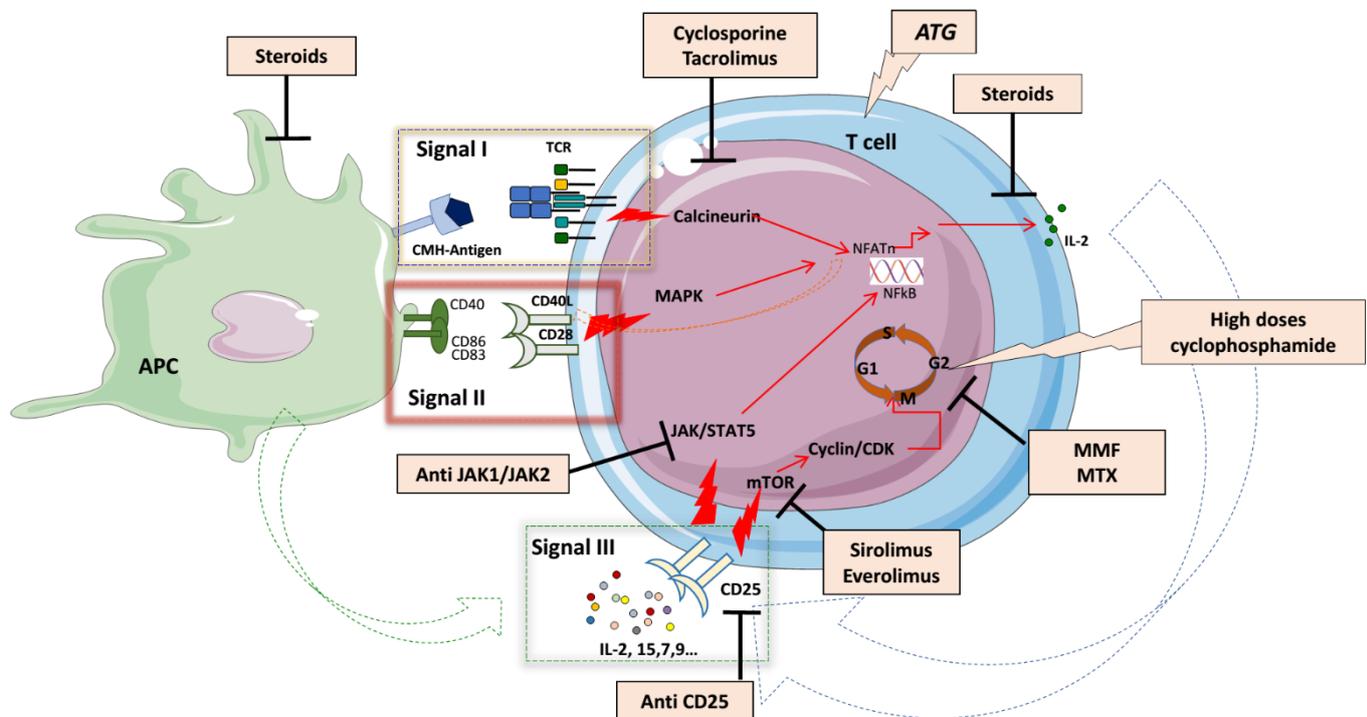
-le cyclophosphamide à haute dose, utilisé à J3 et J4 post greffe en particulier haplo-identique, qui inhibe la prolifération des lymphocytes T activés (29)

- le sirolimus, ou l'everolimus, qui inhibent mTOR (30)

Les schémas les plus classiques de prophylaxie médicamenteuse de la GVH sont l'association de ciclosporine et méthotrexate (ou mycophénolate mofetil) +/- sérum anti-lymphocytaire, pour les allogreffes de donneur HLA compatible (géo-identique ou phéno-identique 10/10). Pour les allogreffes de donneur présentant un mismatch HLA (haplo-identique voire éventuellement phéno-identique HLA 9/10), l'association du cyclophosphamide post greffe, suivi de la ciclosporine et du mycophénolate mofetil est actuellement celle recommandée.

Figure 5. Mode d'action des principaux traitements prophylactiques de la GVH (7).

Les principaux médicaments prophylactiques sont illustrés selon leur mode d'action sur les voies d'activation des lymphocytes T et des CPA.



1.4.2 Traitement de la GVH aiguë

Pour la GVH aiguë, le traitement de la GVH repose en première ligne sur les corticostéroïdes, en association avec les inhibiteurs de calcineurine (31). Les corticostéroïdes agissent sur les facteurs de transcription associés à l'inflammation et réduisent la production de cytokines pro-inflammatoires, de chémokines, et de molécules d'adhésion. Ils inhibent la voie NF- κ B dans les CPA et dans les lymphocytes T. Ils modulent l'activation et la différenciation des cellules dendritiques et des macrophages. Ils inhibent également l'activation et la prolifération des lymphocytes T par la modulation de différents signaux clefs, inhibent la différenciation Th1 et Th17, promeuvent la différenciation Th2 et Tregs, et inhibent la migration des lymphocytes T dans les tissus cibles (31). Cependant, 35 à 50% des patients vont présenter une corticorésistance (32).

Les traitements de 2^{ème} ligne sont peu codifiés mais reposent récemment sur les inhibiteurs de JAK (Janus Kinase), en particulier le ruxolitinib qui a obtenu l'autorisation de la FDA (Food and Drug Administration) en octobre 2019, puis de l'Agence Européenne du Médicament (EMA) en 2022, pour la GVH aiguë corticorésistante chez les patients âgés de plus de 12 ans (33).

Les autres molécules immunosuppressives employées en cas de résistance aux corticostéroïdes sont nombreuses, et ont des cibles moléculaires diverses. Cependant, la supériorité de l'une ou l'autre dans le traitement de la GVH corticorésistante n'a pas été prouvée (34). A titre d'exemple (Figure 6) :

- le sérum anti-lymphocytaire ou l'alemtuzumab : mais ces traitements lymphodépétants sont associés à un risque majeur de mortalité infectieuse.
- les anti-CD25 (récepteur de l'IL-2)
- les antimétabolites (méthotrexate, mycophénolate mofetil)
- les anti TNF- α : infliximab, etanercept
- le tocilizumab (anti récepteur de l'IL-6) est en cours d'essai dans le traitement de la GVH aiguë (35).

- le vedolizumab est un anticorps monoclonal bloquant l'intégrine $\alpha 4\text{-}\beta 7$, une molécule clé du homing des lymphocytes vers la muqueuse intestinale. Cette molécule est en cours d'essai clinique pour le traitement de la GVH (36).

Les traitements immunomodulateurs offrent l'avantage de ne pas augmenter le risque infectieux chez des patients déjà à haut risque d'infection opportuniste. Parmi eux, on peut citer :

- l'alpha-1 antitrypsine, un inhibiteur naturel de sérine protéase, est en essai dans le traitement de la GVH aiguë corticorésistante. Elle modulerait l'inflammation et augmenterait le ratio Tregs/T effecteurs (37).

- l'azacytidine est également en cours d'investigation pour le traitement de la GVH. Elle induirait *in vivo* une prolifération de Tregs sans diminuer l'effet « Greffon *versus* Leucémie » (38).

- la photophérèse extracorporelle : il s'agit d'un prélèvement des leucocytes du patient, qui sont photosensibilisés par du psoralène avant irradiation aux UVA puis réinjection (39). Les lymphocytes T apoptotiques réinjectés au patient induisent alors la polarisation des cellules dendritiques vers un phénotype tolérogène, et une augmentation des Tregs (40).

- la transplantation fécale ou la modulation du microbiote fécal : le lien étroit et complexe entre la flore fécale et l'immunité est un sujet de recherche en plein essor. Les altérations fonctionnelles et phylogénétiques du microbiome intestinal ont été récemment décrites comme liées à la sévérité de la GVH aiguë (41). Le développement d'essais cliniques se multiplie avec des résultats encourageants (42).

- les thérapies cellulaires : de nombreux travaux de recherche de thérapie cellulaire adoptive s'intéressent à des populations cellulaires diverses, telles que les Tregs (43,44) et les NKT invariants (45,46), les MDSC (myeloid derived suppressive cells) (47,48) et les cellules stromales mésenchymateuses (49).

1.4.1 Traitement de la GVH chronique

Les traitements utilisés en GVH aiguë peuvent également être employés dans le traitement de la GVH chronique.

On citera néanmoins, de façon spécifique pour la GVH chronique, l'ibrutinib qui a obtenu l'autorisation de la FDA dans cette indication (50). Il s'agit d'un inhibiteur sélectif et irréversible de la Tyrosine Kinase de Bruton (BTK). L'activation de cette kinase est essentielle pour la survie, la prolifération et la migration des lymphocytes B.

En 2022, le Belumosudil, inhibiteur de Rock2 (rho associated coiled-coil-containing protein kinase-2), a eu l'AMM aux Etats-Unis. Ce médicament régule en effet la balance Th17/Tregs, et semble contrôler les mécanismes pro-fibrosants (51).

D'autres traitements peuvent également être employés dans le traitement de certaines formes de GVH chronique, en particulier sclérodermiques, tels que le rituximab (anti CD20) et des inhibiteurs de tyrosine kinase (52). La figure 7 schématise les différents traitements approuvés ou en développement pour la GVH chronique.

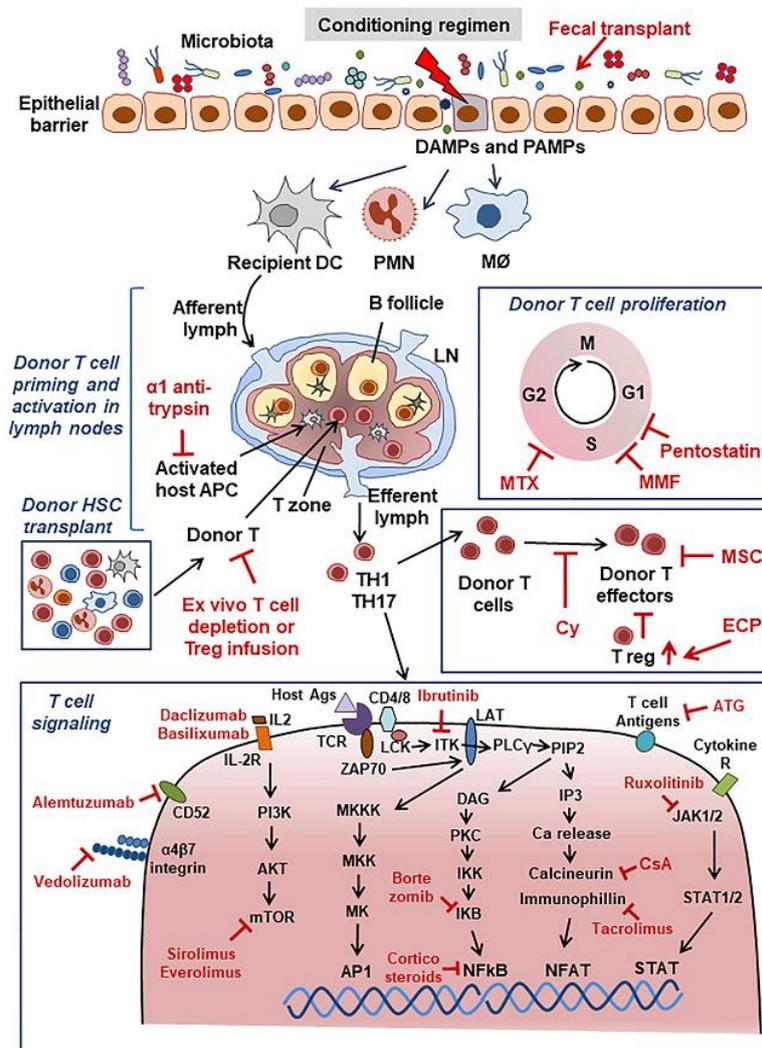


Figure 6. Les traitements de la GVH aiguë (8).

Les médicaments, ou procédures, immunosuppresseurs ou immunomodulateurs, validés ou en cours d'essai, sont illustrés selon leur mécanisme d'action.

Abbreviation	Full name	Abbreviation	Full name
APC	Antigen presenting cell	LIF	Leukaemia inhibitory factor
ATG	Anti-thymocyte globulin	LN	Lymph node
BCR	B cell receptor	LPS	Lipopolysaccharide
BM	Bone marrow	NK	Natural killer cell
Breg	Regulatory B cell	NLRP	Nucleotide binding oligomerisation domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing
CR	Complete response	MHC	Major histocompatibility complex
CsA	Cyclosporin A	MMF	Mycophenolate mofetil
Cy	Cyclophosphamide	MMPs	Matrix metalloproteases
DAMP	Damage associated molecular pattern	MSC	Mesenchymal stromal cell
DC	Dendritic cells	MTX	Methotrexate
ECP	Extracorporeal photopheresis	MØ	Macrophage
EV	extracellular vesicles	PAMP	Pathogen associated molecular pattern
FcγR	Fogamma receptor	PGE2	Prostaglandin-E2
FDA	Federal Drug Agency (US)	PDGF	Platelet derived growth factor
GC	Germinal center	PR	Partial response
GM-CSF	Granulocyte-monocyte colony stimulating factor	ROS	Reactive oxygen species
GMP	Good manufacturing practice	SR	Steroid resistant
GvHD	Graft versus host disease (a: acute; c: chronic)	TCR	T cell receptor
HMGB1	High mobility group box 1	Tc	T cytotoxic (cytotoxic T cell)
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation	TGF	Tumour growth factor
IBMIR	Instant blood mediated inflammatory reaction	Th	T helper (helper T cell)
IDO	Indoleamine 2,3 dioxygenase	TIMPs	Tissue inhibitor of metalloprotease
ISCT	International Society of Cell Therapy	TLR	Toll like receptor
IFN	Interferon	TNF	Tumor necrosis factor
IL-	Interleukin-	Treg	Regulatory T cell
ISCT	International Society of Cell Therapy	Tr1	Regulatory Type 1 T cells

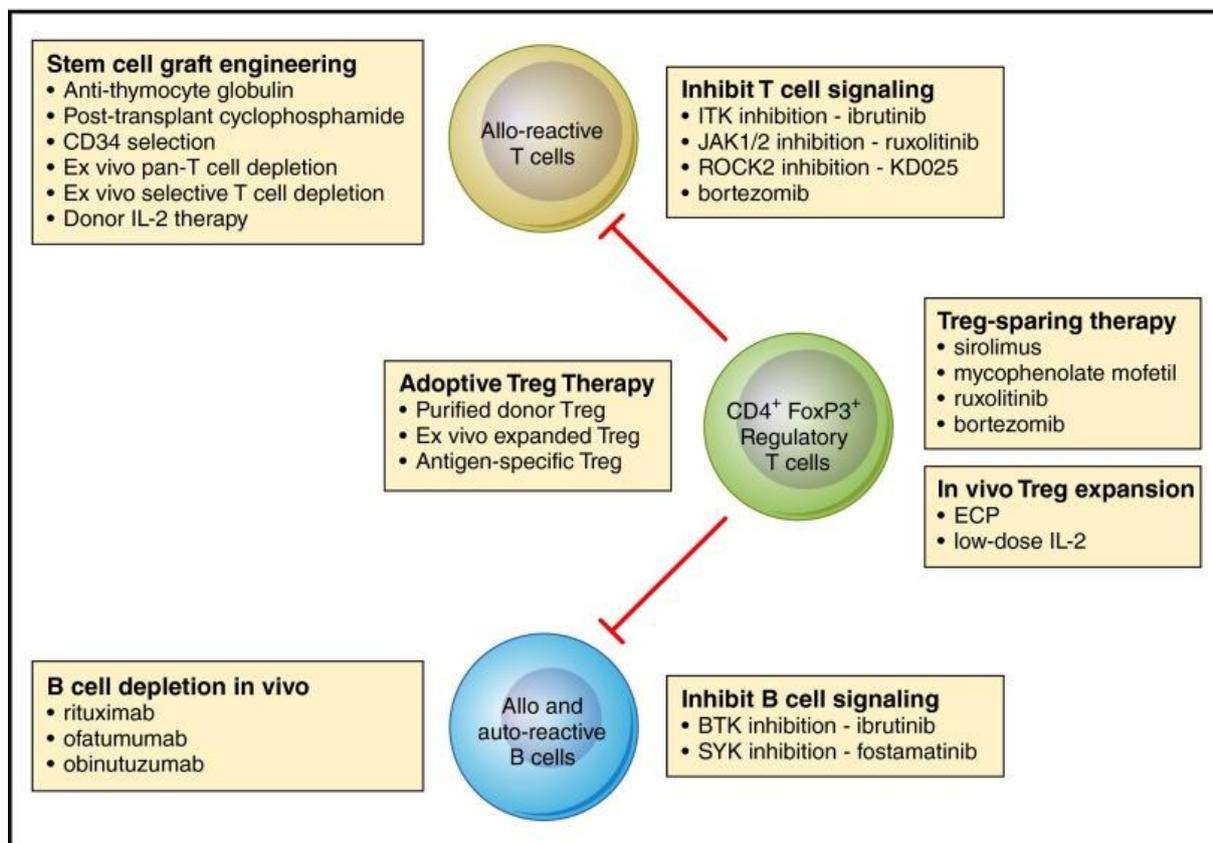


Figure 7. Prévention et traitements de la GVH chronique (50).

Les principales modalités sont l'inhibition des lymphocytes T, l'expansion des Tregs, et l'inhibition des lymphocytes B.

Partie 2. Les Cellules Stromales mésenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW)

2.1 Définition des CSM-GW

Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) sont des cellules hétérogènes, non hématopoïétiques, définies selon des critères minimum proposés par la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (51), à savoir :

- une adhérence au plastique dans les conditions de culture standard avec une morphologie de fibroblaste.
- une expression à leur surface de CD73, CD90 et CD105, en l'absence d'expression de marqueurs de la lignée hématopoïétique (CD34, CD45, CD79a, CD14 (ou CD11b), et HLA-DR).
- une différenciation en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes *in vitro* après stimulations spécifiques.

Les CSM ont été identifiées pour la première fois dans la moelle osseuse, en 1970, par l'équipe de A. Friedenstein (52). Ces cellules d'origine mésodermique donnent naissance au tissu conjonctif, et dans la moelle osseuse génèrent la composante stromale de la niche hématopoïétique. Dans cette niche, elles participent à la régulation de la survie, de l'auto-renouvellement, de la migration et de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Elles peuvent également donner naissance, dans certaines conditions de culture, à des cellules d'origine non mésodermique (en particulier des hépatocytes et des progéniteurs neuronaux).

Les CSM ont ensuite été découvertes dans divers tissus, et peuvent être issues de tissus adultes, que représentent, outre la moelle osseuse, le tissu adipeux (53), la pulpe dentaire (54), les poumons (55), le cœur (56), la membrane synoviale, l'os trabéculaire, le périoste, le muscle squelettique, le sang menstruel (57) et virtuellement tous les tissus.

Les CSM résident également dans des tissus fœtaux, et ont été isolées à partir de membranes amniotiques, du placenta, sang de cordon ombilical, gelée de Wharton (GW) (Figure 8).

Les CSM de source extra-embryonnaire partagent des propriétés similaires avec les CSM issues de tissus adultes, mais présentent des caractéristiques de cellules souches primitives, comme l'expression de Oct-4, Nanog, Sox-2, c-Kit, et parfois Dnmt3b et hTert, mais à une intensité moindre que les cellules souches embryonnaires (58).

Les CSM de la GW (CSM-GW) ont été isolées pour la première fois en 1991 (59) (Figure 8).

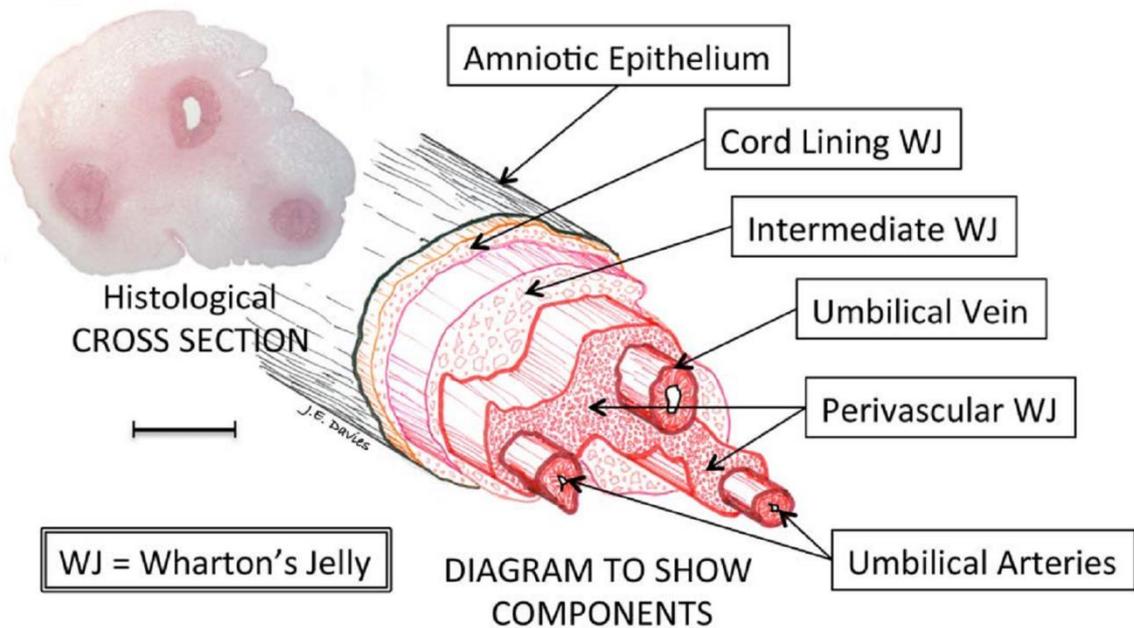


Figure 8. Description anatomique de la gelée de Wharton (60).

Section de cordon ombilical illustrant les différentes composantes du cordon, et les trois zones de GW.

La GW est un tissu conjonctif mucoïde. Son origine embryologique dérive de plusieurs sources: épithélium amniotique, somatopleure et splanchnopleure, et allantoïde. Elle comporte pour 95% de sa composition une matrice extracellulaire, contenant du collagène (3,6% du poids sec de GW), des glycoprotéines (0,3%), de la hyaluronine (0,31%), des glycosaminoglycanes sulfatés (0,14%) et des protéines plasmatiques (par diffusion, 1,2%) (60). L'apport sanguin est assuré uniquement par la veine ombilicale et les 2 artères ombilicales. Il n'y a pas de cellule vasculaire, ni d'éléments nerveux, ni de cellules phagocytaires dans cette GW, ce qui en fait un tissu conjonctif unique, seulement constitué

de cellules mésenchymateuses, qui sont des myofibroblastes fonctionnels et leurs précurseurs. La GW est peu à peu peuplée de cellules périvasculaires CD146⁺ durant la gestation, entre le premier trimestre et le terme. Le fluide amniotique comporte du PDGF-AB, et les cellules épithéliales amniotiques produisent du PDGF-B. Cela pourrait expliquer le « homing » périvasculaire des cellules comportant un récepteur au PDGF (les cellules périvasculaires du cordon ombilical expriment le récepteur PDGFR-β). Le CD146, NG2 et PDGF-Rβ sont des marqueurs identifiant une sous-population de cellules périvasculaires, exprimant aussi les marqueurs de CSM, à l'origine de myofibroblastes fonctionnels de la GW. Si l'origine périvasculaire des CSM est débattue depuis une publication de Crisan et coll. relatant l'isolation de CSM de cellules périvasculaires d'un très large nombre de tissus adultes et fœtaux (61), des preuves récentes suggèrent une distinction fonctionnelle entre péricytes et CSM *in vivo* (62). Toutes les zones de la GW recèlent des CSM, et les CSM hors des zones périvasculaires pourraient être simplement des cellules ayant migré depuis la zone périvasculaire, comme cela se voit dans les tissus adultes lors du processus de cicatrisation d'une plaie. Ainsi, si les progéniteurs des myofibroblastes sont trouvés dans toutes les régions de la GW, leur équivalence (phénotypique et fonctionnelle) est encore débattue (63,64). De plus, le phénotype communément admis, à savoir l'adhérence au plastique, et l'expression de CD90, CD73 et CD105, n'est peut-être pas le reflet du phénotype *in vivo*, puisque seulement une petite fraction de cellules exprime ces marqueurs dans le tissu fraîchement digéré, alors qu'elles expriment fortement ces marqueurs après un passage de culture.

Les CSM-GW sont une population cellulaire hétérogène, dont les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation diffèrent. Les cellules d'origine périvasculaire ont été rapportées comme des cellules souches mésenchymateuses, multipotentes (65). D'autres cellules sont pluripotentes. Ainsi, dans leur ensemble, ces cellules hétérogènes sont plutôt appelées cellules « stromales » mésenchymateuses. La méthode d'extraction des cellules (digestion enzymatique, retrait des vaisseaux, technique des explants...) peut donc entraîner une variation des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des CSM-GW après expansion (66).

La densité en CSM-GW est plus élevée dans la zone périvasculaire. Dans l'ensemble de la GW, les Fibroblastes-Unités Formant Colonies (CFU-F) ont été estimées à 1 :1 609 (contre 1 :10 000 voire 1 :100 000 dans la moelle osseuse), et à 1 :300 dans la zone périvasculaire.

La comparaison est cependant limitée par la différence de la méthode d'extraction dans ces 2 études (65,67).

La GW est selon la plupart des auteurs une zone relativement hypoxique, dans la mesure où la pression en O₂ dans la veine ombilicale est équivalente à environ 20 à 30% de la pression d'O₂ dans les vaisseaux adultes, et où l'absence de microcirculation limite l'apport en O₂. Il est possible que les CSM survivent mieux que les fibroblastes dans un environnement hypoxique et que cela favorise la richesse de la GW en CSM. Tout comme les CSM de moelle osseuse (qui ont une capacité clonogénique supérieure dans un milieu hypoxique), les CSM-GW prolifèrent davantage *in vitro* en hypoxie qu'en normoxie (68).

Les CSM-GW sont une source cellulaire intéressante, dans la mesure où elles sont aisément isolées et expansées (69) sans controverse éthique, et peuvent être mises en banque. Leur temps de doublement est de 24 heures jusqu'au 10^{ème} passage, contre 40 heures pour les CSM de moelle osseuse (67). Certaines études ont montré une moindre immunogénicité de ces cellules en comparaison avec d'autres sources, lorsque la culture est faite en hypoxie. En effet, à l'état basal, elles n'expriment pas les molécules HLA II (contrairement à certaines CSM de moelle osseuse), ni les molécules de co-stimulation CD40, CD80, CD86, tout en exprimant les molécules HLA I (70,71). Dans une étude comparative entre CSM issues de tissus annexiels fœtaux caprins, les CSM-GW étaient supérieures aux CSM issues du liquide amniotique, du sac amniotique et du sang placentaire en terme de croissance, d'expression d'ARN messager des antigènes de surface CD90, CD73 et CD105, de marqueurs de pluripotence, et de potentiel de différenciation dans les 3 lignées adipocytaires, ostéoblastiques et chondroblastiques (72).

Ces cellules sont particulièrement étudiées dans l'équipe 6 IMoPA UMR 7365 CNRS-UL, et à l'unité de thérapie cellulaire du CHRU de Nancy, où elles sont cultivées en grade clinique, et banquées. Elles ont fait l'objet de recherches antérieures dans l'équipe, vis-à-vis de leur isolation, conditions d'expansion (en hypoxie notamment, pour augmenter leurs capacités prolifératives) (68,73), et de leurs propriétés immunomodulatrices, en particulier dans le choc septique (74,75). Deux essais cliniques promus par le CHRU de Nancy sont en cours ou achevés avec les CSM-GW produites par l'unité de thérapie cellulaire de Nancy (Pr Bensoussan) dans des pathologies inflammatoires : le choc septique (NCT02883803), et le syndrome de détresse respiratoire aigüe au SARS-Cov2 (NCT04625738).

L'objectif de ce travail était d'étudier *in vitro* et *in vivo* (dans un modèle murin) ces CSM-GW dans un autre contexte inflammatoire, celui de la GVH après allogreffe de CSH.

2.2 Propriétés immunomodulatrices des CSM-GW

Nous avons au cours de mon travail de thèse publié une revue sur les mécanismes d'immunosuppression des CSM-GW (Annexe 2, (76)) Les principaux éléments des caractéristiques des CSM-GW en comparaison des autres sources de CSM sont décrites dans les paragraphes suivants.

Les CSM-GW ont des capacités immunomodulatrices au moins similaires, voire supérieures selon les données de la littérature, aux CSM de moelle osseuse, *in vitro* (77–80), et *in vivo* dans un modèle de choc septique (75). Les CSM-GW semblent maintenir ces capacités au-delà d'un nombre élevé de passages (au-delà de 7), contrairement aux CSM de moelle osseuse (81). En outre, une analyse comparative du sécrétome protéique de 4 sources de CSM (tissu adipeux, moelle osseuse, placenta, et GW) a montré des profils distincts. Le sécrétome des CSM issues du placenta et de GW contient plus de protéines et est donc plus diversifié (protéines impliquées dans la motilité, l'assemblage, la survie, et la fonction cellulaire) que celui des CSM issues du tissu adipeux et de la moelle osseuse. Ces différences seraient à l'origine, selon les auteurs, d'une fonctionnalité supérieure, sous réserve de la reproductibilité dans un milieu sans sérum de veau fœtal (82).

Les propriétés immunomodulatrices des CSM ont été décrites comme secondaires à des interactions directes avec les cellules immunitaires, requérant un contact entre CSM et cellules immunitaires, mais aussi à la sécrétion de facteurs solubles par les CSM. Ce 2^{ème} mode d'action a été particulièrement décrit comme prépondérant pour les CSM-GW.

Les CSM-GW ont un impact sur toutes les cellules de l'immunité, innée (83,84) comme adaptative (70,85), au même titre que les autres sources de CSM.

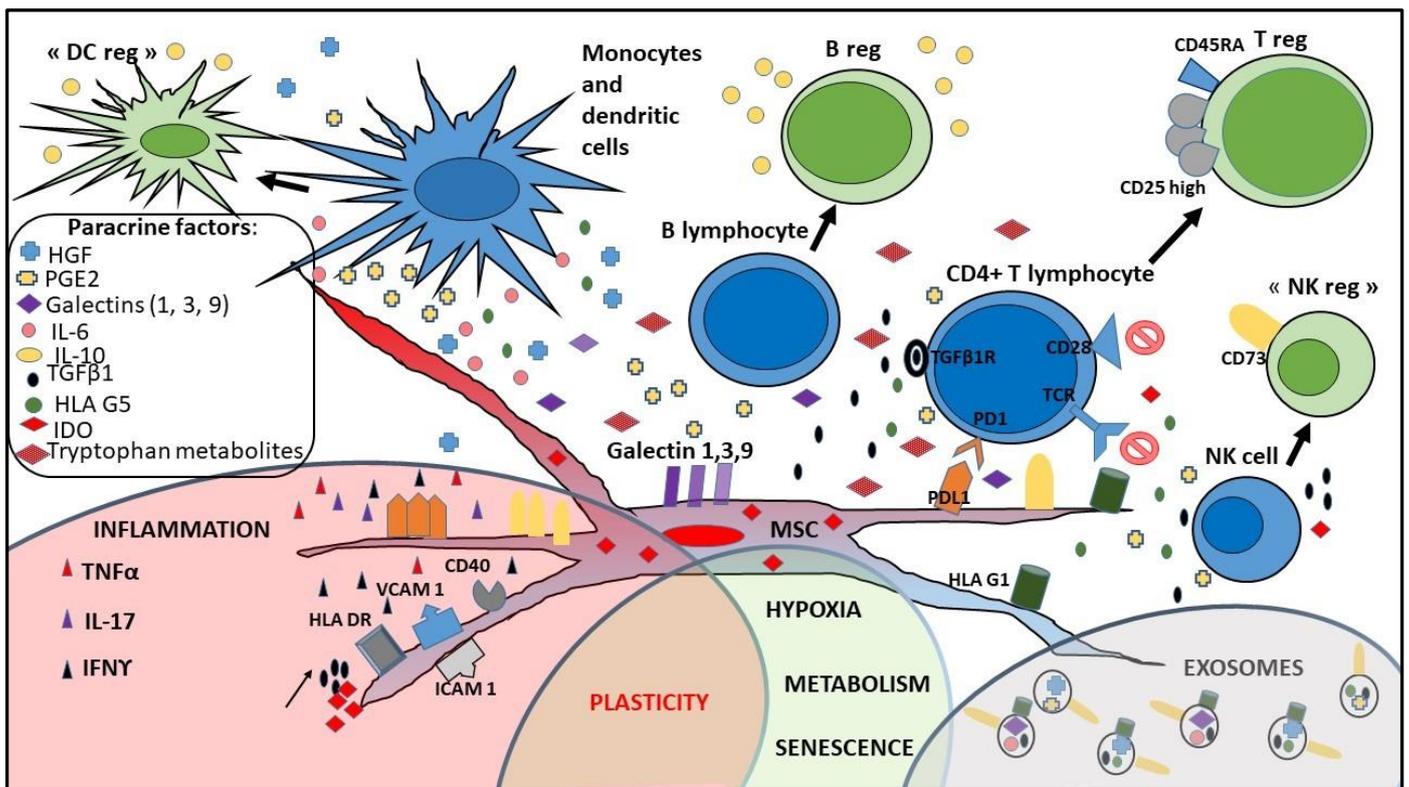


Figure 9. Principaux mécanismes immunomodulateurs avec l'ensemble des acteurs de l'immunité innée et adaptative (76).

Les CSM-GW ont la capacité de modifier le phénotype des cellules de l'immunité innée, telles que les monocytes, cellules dendritiques, cellules NK, et celui des cellules de l'immunité adaptative, comme les lymphocytes B et T, en leur conférant un phénotype régulateur ou « anti-inflammatoire ». Les mécanismes en jeu sont la sécrétion de facteurs solubles impactant directement les cellules immunitaires, la modification du métabolisme du tryptophane, acide aminé environnant les cellules immunitaires, et des mécanismes dépendant du contact cellulaire comme les ligands/récepteurs membranaires PDL1 et HLA-G1, qui vont interagir avec les ligands/récepteurs correspondant sur les lymphocytes T notamment.

Les CSM vont déployer des modes d'action différents selon leur cordon d'origine, selon les conditions obstétricales (86), selon leur technique d'isolation et de culture (87), selon leur environnement (et leur « polarisation »), selon la cellule immunitaire « cible » (70,83,85,88). Les CSM ont une grande plasticité et ont été décrites comme de type 1 (pro-inflammatoire) ou 2 (anti-inflammatoire) en fonction de leur environnement cytokinique et de la stimulation de leurs TLR (89).

Les mécanismes décrits d'immunomodulation des CSM-GW sont nombreux, et la hiérarchisation de leur impact (prépondérance d'un mécanisme) varie selon les équipes. Ils sont résumés dans les Figures 9 et 10.

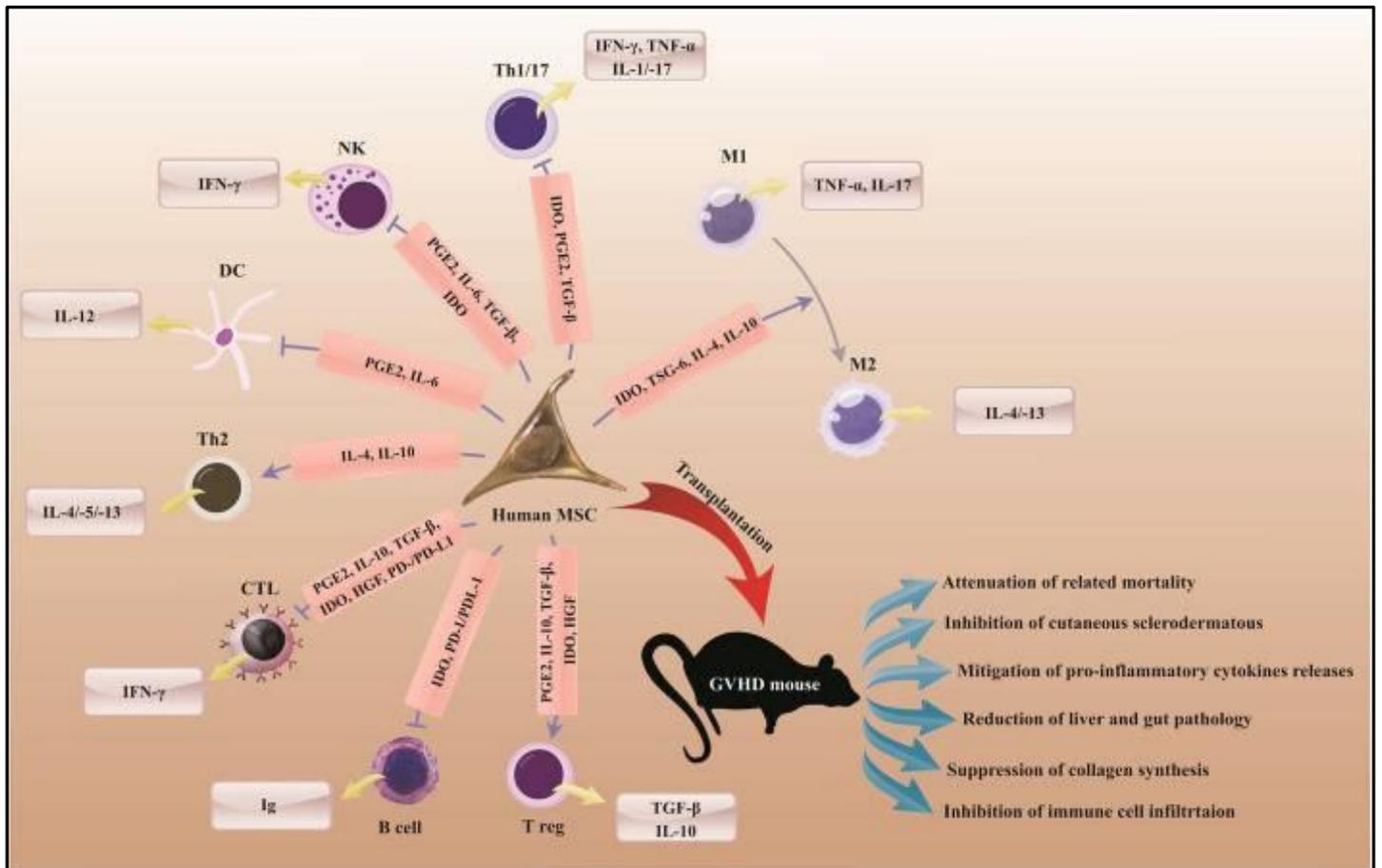


Figure 10. Mécanismes immunomodulateurs précliniques des CSM dans la GVH (90).
On retrouve les facteurs solubles et membranaires précédemment décrits dans la Figure 9. L'impact des CSM sur le profil cytokinique des cellules immunitaires est illustré.

Nous avons choisi de trier ces mécanismes selon leur conséquence sur les cellules immunitaires

2.2.1 Modification du métabolisme et arrêt de la prolifération des cellules immunitaires (lymphocytes T en particulier)

Focus sur le métabolisme des lymphocytes T (LT)

Depuis quelques années, les travaux menés sur l'immunométabolisme des LT qui a permis de mieux distinguer différents sous-types de LT et leurs fonctions à chaque étape de la réponse immunitaire (la prolifération, la différenciation, les fonctions immunologiques activatrices et/ou inhibitrices). Brièvement, il existe 3 sources bioénergétiques principales : le glucose, les acides aminés et les acides gras. Ces substrats sont métabolisés dans les cellules par les voies interconnectées telles que la glycolyse, de la glutaminolyse, de la β -Oxydation des acides gras et de la respiration mitochondriale. La compréhension de modifications métaboliques induites par les CSM dans les lymphocytes T (et plus généralement tous les acteurs cellulaires de l'immunité) n'est que peu étudiée.

Voici une synthèse des connaissances actuelles sur le métabolisme des lymphocytes T selon leur état, dont les points clés sont présentés ci-dessous :

L'activation du TCR et du récepteur de co-stimulation CD28 entraîne une bascule vers un métabolisme glycolytique. Cette bascule est liée à l'augmentation d'activités enzymatiques telles qu'hexokinase I/II, lactate déshydrogénase (avec la démonstration récente de l'induction de l'enzyme glycolytique lactate déshydrogénase A par la signalisation de PI3K (phosphoinositide 3-kinase) pouvant expliquer l'effet Warburg, correspondant à l'emploi de la glycolyse comme voie métabolique préférentielle même en présence d'O₂ (91)), et glycéraldéhyde-3-phosphate-déhydrogénase, l'augmentation de transporteurs du glucose (GLUT1) (92), et la voie de signalisation mTOR (93). Parallèlement à cette bascule vers la glycolyse aérobie, on observe le déclin de l'activité de la carnitine-palmitoyl-transferase-1 (cpt1a), ce qui induit une diminution de la phosphorylation oxydative dépendante de l'oxydation des acides gras (94). Ainsi, l'activation des lymphocytes T induit un switch métabolique vers un métabolisme glycolytique, corrélé à une augmentation de leur prolifération (95).

Le métabolisme dépend cependant du phénotype des lymphocytes T, ce qui complexifie la compréhension globale de l'activation lymphocytaire : certaines équipes décrivent un niveau de glycolyse (et de glutaminolyse, et de biosynthèse lipidique) bas dans les LT CD4 et CD8 naïfs, puis une induction de glycolyse (et glutaminolyse et biosynthèse lipidique) dans les LT effecteurs (après activation des LT naïfs), et enfin une régulation négative de la glycolyse (et glutaminolyse et biosynthèse lipidique) dans les LT mémoires (96). Une équipe a rapporté que l'inhibition de la glycolyse aérobie et l'autophagie induisent un phénotype mémoire des lymphocytes T et leur persistance (97).

Une étude de 2016 publiée par Buck et al. a objectivé un remodelage mitochondrial constituant un mécanisme de signalisation pour instruire la programmation du métabolisme lymphocytaire T. Les T effecteurs activés ont des mitochondries ponctiformes, tandis que les T mémoires voient leurs mitochondries fusionner. Cette fusion dépend de la protéine Opa1, et configure une chaîne de transport d'électrons, favorisant la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras. La fusion mitochondriale « forcée » des T effecteurs leur imposerait un phénotype mémoire et augmenterait leur fonction anti-tumorale (98).

Rôle de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO)

L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) est une enzyme intracellulaire qui dégrade le tryptophane en dérivés métaboliques tels que la kynurénine et l'acide kynurénique. Le métabolisme du tryptophane est détaillé précisément dans la Figure 11. Certains métabolites dépendent d'IDO, ou de TDO (tryptophane 2,3-dioxygénase) exprimée dans le foie, en particulier : la kynurénine, l'acide kynurénique, la 3-OH-kynurénine, l'acide anthranilique, l'acide 3-OH-anthranilique, l'acide xanthurénique et l'acide quinolinique. D'autres enzymes qu'IDO sont impliquées dans la synthèse de ces métabolites, en particulier les kynurénine aminotransférases (KAT) I et II (appelée également ADAAT pour alpha-aminoadipate aminotransférase). D'autres métabolites ne dépendent pas d'IDO, mais de la tryptophane hydroxylase, en particulier le 5-OH-tryptophane, la 5-OH-tryptamine, la sérotonine, et l'acide 5-OH indoleacétique.

IDO a été décrite par de nombreuses équipes comme un mécanisme clé de l'immunomodulation des CSM, quelle que soit leur source, y compris des CSM-GW (99).

Les mécanismes de cette voie d'immunomodulation sont encore imparfaitement compris et décrits ci-dessous.

Effets décrits de la déprivation du tryptophane du milieu par IDO :

Cette diminution du tryptophane active la GCN2K (general control non-derepressible kinase), qui phosphoryle son substrat eIF2 α . La diminution du tryptophane pourrait également inhiber mTORC1 (100), un taux suffisant de tryptophane activant mTOR (101). L'inhibition de mTOR diminue la capacité de glycolyse aérobie (93). L'inhibition de mTOR induit également l'autophagie *via* la dé-répression de LC3 (93). Ces 2 éléments sont favorables à la persistance des lymphocytes T et à leur phénotype mémoire. Ainsi les lymphocytes T co-cultivés avec des CSM expriment plus de CD62L et de gènes liés à la réponse mémoire (97).

Cependant, Kawasaki et al. rapportent que l'ajout de 1-MT ou de tryptophane ne restaure pas la glycolyse aérobie (102), et les conclusions trop simplistes doivent donc être modulées par l'existence vraisemblable de co-facteurs. Dans cette dernière étude, c'est la voie PD1/PDL1 qui est responsable de la diminution d'entrée de glucose dans le lymphocyte activé, et de la diminution de capacité de glycolyse aérobie. Dans cette étude, les CSM inhibent l'entrée de glucose dans les LT de phénotypes centraux mémoires et effecteurs mémoires, mais pas dans les LT naïfs (102).

Parallèlement à l'inhibition de la glycolyse aérobie, cette déprivation en tryptophane entraîne une augmentation de l'activité carnitine palmitoyltransferase I (cpt1a) et l'oxydation des acides gras dans les lymphocytes T CD4+ (103). Il y a aussi une réduction des niveaux de stress oxydant, une augmentation des thiols et une augmentation des antioxydants (93).

Effets des métabolites du tryptophane :

La kynurénine, produite par IDO, (mais également ses dérivés 3- hydroxykynurénine et l'acide 3-hydroxyanthranilique) a été décrite comme ayant un impact indépendant de la diminution du tryptophane sur les lymphocytes T. Elle induit l'arrêt de prolifération des lymphocytes T et leur mort cellulaire (104). En activant AhR (Arylhydrocarbon receptor),

elle induit l'expression de PD-1 et l'apoptose des lymphocytes T, et la β -oxydation des acides gras (105).

Effets globaux d'IDO sur le métabolisme des lymphocytes T :

IDO inhibe la glycolyse aérobie des lymphocytes T activés et la glutaminolyse, et diminue la synthèse d'acides gras (100), avec une tendance à l'augmentation de la phosphorylation oxydative mais non significative.

L'inhibition de la glycolyse aérobie passe par l'inhibition de mTOR, mais IDO induit aussi dans les lymphocytes T une activation de TP53, et une augmentation de HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor). Il s'ensuit une augmentation des cibles transcriptionnelles de TP53, à savoir p21 et le régulateur de l'apoptose et de la glycolyse induit par TP53, ainsi qu'une diminution de l'hexokinase II et de la lactate déshydrogénase-A. Cependant, la kinase pyruvate dehydrogenase, cible transcriptionnelle de HIF-1 α , n'est pas modifiée (106).

L'inhibition de la glycolyse et l'incitation à l'autophagie sont pourvoyeuses d'une plus grande persistance des lymphocytes T anti-tumoraux et d'un phénotype mémoire, mais il n'a pas été prouvé que les CSM augmentaient *stricto sensu* le nombre de T mémoires en co-culture. D'autres mécanismes que IDO sont en cause dans les modifications phénotypiques et métaboliques des lymphocytes T par les CSM.

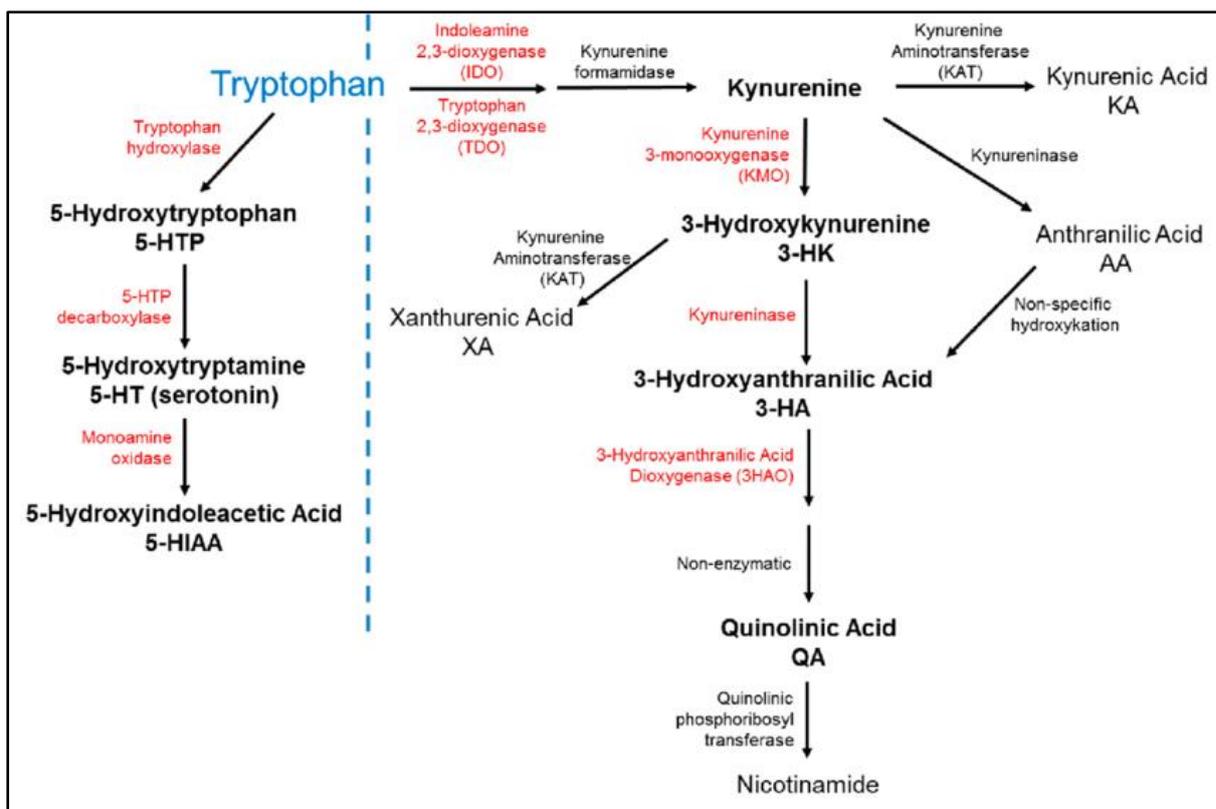


Figure 11. Schématisation des métabolites du tryptophane en scindant les voies de l'IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase)/TDO (Tryptophan 2,3-dioxygénase) de celle de la Tryptophan hydroxylase (107). Le tryptophane est métabolisé en kynurénine via l'activité d'IDO, puis en acide kynurénique via la kynurénine aminotransférase.

Rôle de l'adénosine

Le CD73 est une ecto-nucléotidase qui déphosphoryle l'AMP (adénosine monophosphate) extracellulaire, la convertissant en adénosine. L'adénosine active notamment le récepteur ADORA2, entraînant un flux d'AMPcyclique intracellulaire, ce qui conduit à une inhibition de l'activation et des fonctions effectrices des lymphocytes T (108).

Rôle des ligands « Programmed-death-ligand »

L'expression de PDL (programmed-death ligand)-1 et 2 à la surface des CSM-GW, ainsi que la sécrétion de PDL-1 et PDL-2 solubles, ont été rapportés comme une voie majeure d'immunomodulation des CSM-GW. Cette voie a été préalablement décrite avec les CSM de moelle osseuse (109), qui en activant le récepteur PD1 sur les lymphocytes T, induit

l'inhibition de leur activation/prolifération (110). Par ailleurs, une équipe a rapporté le rôle de B7-H3 (CD276) dans l'inhibition de prolifération des lymphocytes T par les CSM-GW *in vitro* (111).

Rôle du transfert des mitochondries

Un mécanisme récemment décrit concerne la délivrance directe de mitochondries par les CSM (112) dans les lymphocytes T.

Les CSM, à l'état basal, et en particulier dans leur niche hypoxique de la moelle osseuse, ont un métabolisme glycolytique prépondérant. Dans un contexte inflammatoire et de stress oxydant, les CSM répondent aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) et aux DAMPs telles que les mitochondries endommagées et les produits mitochondriaux, par le don de leurs mitochondries aux cellules endommagées. Ce transfert mitochondrial a été décrit pour la première fois en 2006 par Spees et al., pour les CSM de moelle osseuse et les fibroblastes cutanés (113), puis par plusieurs équipes dans des contextes différents, avec de plus en plus d'illustrations de transfert par les CSM ou vers les CSM. Les CSM seraient donc à la fois des censeurs des mitochondries relarguées par des cellules endommagées, et des pourvoyeurs de mitochondries, comme décrit dans des contextes différents : transfert de mitochondries des plaquettes vers les CSM (114), transfert de mitochondries des cellules musculaires lisses vasculaires vers les CSM (115), transfert de mitochondries des CSM vers des macrophages (116), transfert de mitochondries des CSM vers les cellules mononucléées du sang de cordon (117), transfert de mitochondries des CSM vers des cellules tumorales (blastes myéloïdes et lymphoïdes, cellules de myélome multiple, cellules souches de glioblastome, mélanomes) (118–121), transfert de mitochondries vers des cellules endothéliales (stressées par chimiothérapie) (122), transfert de mitochondries des CSM vers des cardiomyocytes (123), transfert de mitochondries des CSM vers des cellules neuronales murines soumises à un stress oxydant (124), transfert de mitochondries vers des cellules épithéliales cornéennes (125), transfert de mitochondries des CSM vers les lymphocytes T (126,127).

Ce transfert serait dépendant de Miro1, une Rho-GTPase mitochondriale, et serait assuré majoritairement par des nanotunnels (128), ce qui requiert un contact entre les CSM et la cellule réceptrice. D'autres publications rapportent le rôle des vésicules extracellulaires

(129) et des corps apoptotiques dans le transfert mitochondrial, mais les nanotunnels semblent être le mécanisme prépondérant.

Peu de données existent sur les mécanismes qui activent le transfert mitochondrial des CSM : le rôle d'ICAM-1 a été rapporté pour le transfert vers les cellules blastiques lymphoïdes (130), le rôle de CD39/CD73 a été rapporté pour le transfert vers des T regs induits en prolifération (127), ainsi que le rôle du mismatch HLA-C et DRB1 (131), et le rôle de PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator), un co-activateur transcriptionnel, acteur majeur de la biogénèse mitochondriale, de la phosphorylation oxydative et de la détoxification des ROS, dans le transfert vers les cellules de mélanome (120). Le rôle de CXCL12/CXCR4 dans le transfert vers des cellules myélomateuses a également été évoqué par une équipe, avec une réversion du transfert lors de l'ajout du plerixafor (132).

Le rôle du stress oxydant, en particulier des ROS a été évoqué dans divers modèles cellulaires (119). Enfin, la présence de mitochondries issues de cellules endommagées a également été rapportée comme un élément indispensable du transfert de mitochondries par les CSM. Les mitochondries sont endocytées par les CSM, et dégradées, ce qui induit l'activation de l'enzyme HO-1 (Heme oxygenase-1), et la stimulation de la synthèse de mitochondries par les CSM (133).

La formation des nanotubes est inhibée par la vincristine (chimiothérapie utilisée en particulier dans les leucémies aiguës lymphoblastiques), et le transfert mitochondrial serait inhibé par la corticothérapie. A l'inverse, l'aracytine, chimiothérapie induisant des ROS, entraînerait l'activation des CSM, le transfert mitochondrial vers les blastes lymphoïdes, et la masse mitochondriale des blastes *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin (119).

Le transfert mitochondrial induirait une augmentation de la β -oxydation des acides gras, de la phosphorylation oxydative et de la production d'ATP dans les cellules ayant reçu les mitochondries issues des CSM (134). Ce transfert mitochondrial interviendrait également dans la polarisation des lymphocytes T (voir ci-dessous).

2.2.2 Induction de l'exhaustion et/ou de l'apoptose des lymphocytes T activés

Les CSM-GW peuvent induire l'apoptose des lymphocytes T *via* les dérivés métaboliques du tryptophane, tels que la **kynurénine** et l'**acide kynurénique** produits par IDO (Figure 11), Par ailleurs, la **galectine-9** sécrétée par les CSM se lie à Tim-3 et induit l'exhaustion puis l'apoptose des lymphocytes T activés (135). Les ligands **PDL-1** et **PDL-2** se lient à PD-1 sur les lymphocytes T et induisent également leur exhaustion (136).

2.2.3 Polarisation des autres cellules immunitaires, notamment régulatrices, vers un phénotype tolérogène

Cette polarisation correspond en particulier à un phénotype M2 pour les macrophages/monocytes (137), un phénotype immature pour les cellules dendritiques, une limitation des profils Th1 et Th17 pour les lymphocytes T (138) et une augmentation de la différenciation en Tregs (139,140), un profil « Breg » pour les lymphocytes B (85). Cette polarisation est induite par des facteurs solubles et membranaires tels que TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) (141,142), galectines 1 et 3, IL-6, HLA-G1, HLA-G5, HLA-E, ou HGF sécrétés par les CSM (88,143–145).

La prostaglandine E2 (PGE2) produite par les CSM a également un rôle majeur dans la polarisation des cellules immunitaires, en induisant la sécrétion d'IL-10 (67,68).

Le TSG-6 (tumor necrosis factor alpha-stimulated gene) sécrété par les CSM-GW a également été décrit comme acteur de polarisation des macrophages (vers un phénotype M2) et des lymphocytes T (d'un phénotype Th17 vers un phénotype Th2) (146). L'augmentation de TSG-6 serait liée à l'acide kynurénique issue du métabolisme du tryptophane induit par IDO (99).

Le rôle de transfert de mitochondries entre CSM-GW et lymphocytes T (décrit essentiellement vers les T CD4⁺), les lymphocytes B et NK a été rapporté comme permettant une transformation du métabolisme des lymphocytes, et également de leur polarisation.

Concernant le transfert mitochondrial vers les LT CD4⁺, il induirait un profil Treg. Les CSM-GW assureraient un don de mitochondries à jusqu'à 40% des lymphocytes T activés, rapidement (entre 1 et 5h) après la mise en contact entre les cellules (126). Les CSM de

moelle osseuse transfèrent des mitochondries avec les lymphocytes T *via* des nanotubes, et cet échange stabiliserait FoxP3 dans les Tregs induits (127). Le transfert mitochondrial entraînerait également une diminution de production d'IL-17 et un switch des Th17 vers un profil Treg (147).

Rôle de la phagocytose des CSM *in vivo*

Un autre mécanisme de polarisation Treg est décrit dans la littérature : *in vivo* chez la souris, la phagocytose rapide des CSM-GW par les monocytes induit un changement de leur phénotype CD14⁺⁺, CD16⁺, CD206⁺, PD-L1⁺, IL-10⁺. Ces monocytes tolérogènes induisent eux-mêmes une polarisation des lymphocytes T vers un profil Treg (148).

2.2.4 Modification de l'adhésion et de la migration des cellules immunitaires

Les CSM-GW expriment à leur surface des intégrines ou des ligands d'intégrines tels que CD29 (β1), CD49d (α4), CD54 (ICAM-1) et CD106 (VCAM-1), à un niveau plus élevé que les CSM de moelle osseuse (149,150). Elles produisent également les chémokines IL-1Rα, RANTES, IP-10, et MCP1 à une concentration élevée (151). Le cocktail de cytokines et de molécules d'adhésion membranaire va influencer leur « homing » et également la migration et l'adhésion des cellules immunitaires environnantes. Ainsi, les CSM peuvent diminuer l'adhésion des polynucléaires neutrophiles à l'endothélium.

2.3 Intérêt des CSM-GW dans le contexte de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Dans le domaine de l'allogreffe de CSH, les CSM de moelle osseuse ont été les premières dont le potentiel a été rapporté pour le traitement de la GVH chez l'Homme, (en particulier dans le traitement de la GVH aiguë corticorésistante) (49,152,153), et pour le support hématopoïétique (89,154,155).

Les CSM-GW, dont nous avons décrit ci-dessus les caractéristiques immunosuppressives et la faible immunogénicité, particulièrement intéressantes, ainsi que la facilité d'obtention et

d'expansion, ont également été rapportées, essentiellement par des équipes chinoises, en usage clinique, dans la prophylaxie ou le traitement de la GVH, et dans le soutien à la prise de greffe.

Les CSM-GW produisent, au même titre que les CSM issues d'autres tissus, des vésicules extracellulaires ou exosomes (156). Ces exosomes ont également des propriétés immunomodulatrices qui font l'objet de travaux de recherche préclinique et clinique. Ils permettraient dans un contexte de GVH de limiter les éventuels effets secondaires d'une thérapie cellulaire, en particulier la transmission virale, la transformation cellulaire, le retentissement de l'injection des cellules sur l'hémostase, ou l'immunisation anti HLA, tout en modulant le système immunitaire (157,158). Néanmoins, les exosomes n'ont pas la plasticité des CSM, et nous ne savons pas si leur phagocytose a un impact sur les monocytes/macrophages. N'ayant pas exploré les exosomes, nous ne détaillerons pas davantage ce champ de recherche sur les CSM-GW dans ce travail.

Dans notre revue (**Annexe 2 (76)**), nous avons détaillé les éléments précliniques et cliniques disponibles à ce jour pour ces 2 utilisations. En particulier, pour la GVH, nous avons synthétisé les données de la littérature concernant les études précliniques ainsi que les résultats des essais cliniques, réalisés majoritairement par des équipes chinoises (Table 1 de l'article de revue).

Indications	Auteurs Pays	Nombre de patients Phase	Dose	Schéma	Résultats	Effets secondaires
Traitement curatif de la GVH	Soder et al(159) USA	N=10 Phase 1	2 ou 10x10 ⁶ CSM/kg/injection	2 injections: J0 et J7	ORR 70%, RC 40%, RP 30%	Pas d'effet secondaire Pas de formation de tissu ectopique
	Wu et al (160) Chine	N=24 phase 2	0.6x10 ⁶ CSM/kg (0.5–1.0)	Une seule injection, GVHa et GVHc réfractaires	55.6% de réponse cutanée, 100% de réponses cavité buccale, 37.5% de réponses du tractus digestif, échec atteintes hépatiques et pulmonaires	Pas d'effet secondaire lié au traitement

Prophylaxie de GVH	Zhu et al (161) Chine	N=25, enfants Phase 1-2	1.14x10 ⁶ CSM/kg (1.03– 1.39)	Une seule injection 1h avant la greffe de CSH	2 patients GVH aiguë tardive sévère 2 patients GVHc extensive	Infection à CMV (23 patients) infections bactériennes et fongiques Pas d'effet indésirable
	Wu et al (162) Chine	N=50 Phase 2	5x10 ⁵ CSM/kg	Une seule injection 4h avant la greffe de CSH	12/50 GVHa gr II-IV 3 GVHc extensives	
	Gao et al (163) Chine	N=124 Multicentrique, double aveugle, Phase 2 randomisée	3x10 ⁷ CSM/mois	1 injection/mois pendant 4 mois à partir de 4 mois de la greffe de CSH	3/62 GVHc sévères <i>versus</i> 8/62 sans le groupe contrôle, 27,4% de GVHc vs 49% dans le groupe contrôle (P=0.021)	Pas d'effet indésirable infections et dysfonctions et hépatiques et rénales de grade 1–2 chez 45 patients (72.6%) dans le groupe CSM et 40 patients (64.5%) dans le groupe contrôle
Prise de greffe et GVH	Wang et al (164) Chine	N=22, SAA Phase 1-2	Moyenne 1.2x10 ⁶ CSM/kg, (0.27-2.5)	Une seule injection 4h avant la greffe de CSH	22 prises de greffe, pas de GVHa ni GVHc sévères. Chimérisme complet donneur à long terme pour 21/22 patients	2 patients ont eu une fièvre légère immédiatement après l'injection de CSM, résolue dans les 12h.
	Li et al (165) Chine	N=17, SAA Phase 1-2	Moyenne 4x10 ⁶ CSM/kg (2.87–10)	Une seule injection 6 h avant la greffe de CSH	16/17 prises de greffe avec chimérisme complet donneur, 1 non prise 4 GVHa grade III-IV 6GVHc (1 sévère)	Pas d'effet indésirable: infections à CMV et/ou EBV chez 10 patients.
	Wang et al (166) Chine	N=17, SAA enfants Phase 1-2	Dose médiane 4x10 ⁷ CSM(0.5-8)	Une seule injection à J1 de la greffe de CSH	17/17 reconstitutions myéloïdes 16/17 reconstitutions plaquettaires 1 rejet secondaire 1 GVHa grade III-IV 21.2% de GVHc OS=71%	Pas d'effet indésirable 3 décès toxiques: infection à J36, GVHa sévère à J44, pneumopathie interstitielle virale à J634
	Wu et al (167) Chine	N=20 (8 patients dans le groupe CSM, Phase 2 randomisée), greffes de sang placentaire	Dose médiane de 7.19 x 10 ⁶ CSM/kg (2.44-10.12)	Une seule injection 4h avant l'injection du sang placentaire	Reconstitution des neutrophiles et des plaquettes plus rapide dans le groupe CSM (respectivement p=0.003 et p=0.004)	Pas d'effet indésirable Pas de tissu ectopique (IRM et TEP jusqu'à 3 mois après l'injection Pas de maladie à CMV, pas d'infection fongique ni de choc septique. 4 GVH modérées et 1 rechute 2 décès d'infections et 2 rechutes dans le groupe comparateur

Wu et al (168) Chine	N=21, SAA Phase 1-2	5x10 ⁵ CSM/kg	Une seule injection 4h avant la greffe de CSH	21/21 prises de greffe pérenne Survie sans rechute à 2 ans= 74% 5 GVHa grade III-IV 3 GVHc extensives	Pas d'effet indésirable lié au traitement
-------------------------	------------------------	--------------------------	---	---	---

Table 1. Injections de CSM-GW rapportées dans des indications hématologiques

CSH : cellules souches hématopoïétiques ; *GVHa*: GVH aiguë; *GVHc*: GVH chronique, *ORR*: overall response (réponse globale); *OS* : overall survival (survie globale) ; *RC*: réponse complète; *RP*: réponse partielle, *SAA*: Severe Aplastic Anemia (aplasie médullaire sévère).

2.4 « Priming » des CSM-GW par IFN-γ

L'environnement cytokinique a un impact sur les propriétés immunomodulatrices des CSM. En particulier, l'inflammation majorerait certaines capacités immunosuppressives des CSM, quelle que soit leur source tissulaire. Cette plasticité des CSM représente un intérêt particulier en vue de leur utilisation à des fins de thérapie adoptive dans les maladies inflammatoires.

L'impact de certaines cytokines ou molécules de l'inflammation a été rapporté par de nombreuses équipes, *in vitro* et parfois *in vivo*. Les molécules ou cytokines ayant fait l'objet de publications quant à leur usage en tant que « licensing » des CSM sont entre autres l'IFN-γ, le TNF-α, le lipopolysaccharide, l'IL-1, parfois utilisées en association (169,170).

La pré-incubation par IFN-γ a fait l'objet des plus nombreuses démonstrations d'intérêt préclinique, *in vitro* et *in vivo*, quelle que soit la source de CSM, et en particulier dans des modèles de GVH (143,171).

L'IFN-γ est l'unique cytokine de la classe des IFN de type II. Il a été décrit en 1965 comme une protéine inhibitrice virale (172), produit des leucocytes humains activés par la phytohémagglutinine, puis comme un produit des lymphocytes activés par des antigènes.

Il s'agit d'une cytokine essentielle à l'immunité innée et adaptative. Elle est produite principalement par les cellules NK, les lymphocytes NKT et les cellules innées lymphoïdes (ILC) dans la réponse immunitaire innée, ainsi que par les lymphocytes T cytotoxiques CD4 Th1 et CD8 après contact avec un antigène dans la réponse immunitaire adaptative.

Cette cytokine est un dimère, chaque monomère étant composé de 6 hélices alpha et d'une séquence non pliée dans la région C-terminale. Il interagit avec un hétéro-récepteur dimérique (IFNGR1 et IFNGR2). Cette interaction active la voie JAK-STAT, et modifie la transcription de nombreux gènes.

Krampera et al. en 2006 ont rapporté le rôle de l'IFN- γ dans les fonctions immunosuppressives des CSM de moelle osseuse (173). Sheng en 2008 démontrait que les CSM cultivées avec des lymphocytes T déficients pour l'IFN- γ abrogeait l'effet immunosuppresseur des CSM (174).

De nombreuses publications décrivent les effets divers de l'IFN- γ sur les CSM. L'IFN- γ majorerait l'expression de l'enzyme IDO et cette majoration serait l'une des explications à l'augmentation de l'immunosuppression des CSM (173). L'activation par IFN- γ avant coculture des CSM-GW avec les lymphocytes T majorerait l'expression de CTLA-4 sur les lymphocytes T et diminuerait l'expression de CD28 (169). L'IFN- γ majorerait également l'expression de PDL-1 à la surface des CSM, mais le rôle fonctionnel de cette expression dans l'immunomodulation des CSM ayant été primées par IFN- γ est débattu (174,175).

Par contre, l'IFN- γ ne modulerait pas directement le transfert mitochondrial des CSM-GW vers les lymphocytes T (126).

Si l'on s'intéresse aux voies de signalisation intracellulaire, dans des CSM murines, l'IFN- γ induit une phosphorylation précoce de STAT1 et STAT3 (signal transducer and activator of transcription), une inhibition de mTOR dépendant d'ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2), entraînant une translocation du facteur nucléaire pSTAT1 (176). L'IFN- γ modifie également la qualité des exosomes des CSM, majorant leurs capacités inhibitrices *via* l'augmentation de la concentration en miR-125a et miR-125b, inhibant la différenciation Th17 (177).

Dans le domaine de la GVH, l'IFN- γ a été rapporté comme une pré-incubation d'intérêt pour les CSM de moelle osseuse et de GW. Polchert en 2008 rapportait le rôle spécifique du « licensing » par l'IFN- γ des CSM de moelle osseuse murines afin de rendre « fonctionnelles » les CSM injectées, et donc de diminuer la mortalité par GVH des souris (171).

Kim et al. rapportent la supériorité des CSM humaines (de moelle osseuse, de tissu adipeux, de sang de cordon et de GW) activées par IFN- γ pour la prévention de mortalité par xéno-GVH, en lien avec une production supérieure d'IDO par les CSM primées, *via* l'activation de la voie JAK-STAT1 (178).

Cependant, l'activation par IFN- γ pose le problème d'une potentielle majoration de l'immunogénicité des CSM. En effet, *in vitro*, l'IFN- γ augmente l'expression des molécules HLA de classe II. Une étude *in vivo* en particulier a montré que la pré-incubation par IFN- γ pour des CSM de moelle osseuse murines majorait la production d'IgG et IgM après injection chez la souris dans un contexte allogénique (179). L'immunisation pourrait entraîner une disparition plus précoce des CSM allogéniques injectées *in vivo*, mais l'impact défavorable de cette immunisation contre les CSM « primées » n'a jamais été démontré.

Cette cytokine est utilisable en grade clinique (commercialisée en GMP, Good Manufacturing Product), et pourrait être utilisée dans un projet de développement clinique des CSM-GW à des fins de thérapie cellulaire dans la GVH.

La posologie et le temps de pré-incubation permettant d'obtenir un effet immunomodulateur le plus fort ont aussi fait l'objet de publications. Une concentration élevée (de minimum 500 UI/ml ou de 25 à 100 ng/ml) est nécessaire pour constater un effet *in vivo* de l'activation par IFN- γ (171). Concernant la durée de la pré-incubation, une durée courte de 48h semble être la meilleure condition avec les CSM de moelle osseuse (180).

Enfin, Wobma et al détaillent la synergie entre l'activation par IFN- γ et l'hypoxie sur les CSM de tissu adipeux : alors que l'IFN- γ augmente l'expression d'IDO, HLA-G, HLA-E, PDL-1, l'hypoxie induit un métabolisme de type glycolyse anaérobie des CSM, et majore de façon synergique avec l'IFN- γ l'expression d'IDO et HLA-G (87).

Partie 3. Objectifs du travail de thèse

L'objectif de notre travail était de déterminer les meilleures modalités de culture des CSM-GW pour l'obtention d'un effet immunosuppresseur le plus puissant *in vitro* sur les lymphocytes T puis d'analyser leurs mécanismes immunomodulateurs *in vitro* et déterminer les meilleures modalités d'administration pour optimiser leur efficacité *in vivo* dans un modèle de GVH, et enfin de décrire leur devenir *in vivo*.

Nous avons donc dans un premier temps analysé l'impact de l'IFN- γ sur les CSM-GW de grade clinique *in vitro*. Nous avons retenu la concentration de 100 ng/ml d'IFN- γ , durant 48h, pour nos travaux, au regard des éléments rapportés ci-dessus dans la littérature. En outre, les CSM-GW ont été cultivées en hypoxie, du fait d'une prolifération plus importante dans cette condition rapportée par notre équipe (39), et d'un intérêt particulier de l'hypoxie dans le caractère immunomodulateur des CSM-GW (data de l'équipe non encore publiées). L'hypoxie a été retenue dans le procédé de production des CSM-GW au CHRU de Nancy par l'unité de thérapie cellulaire, et fait partie du cahier des charges ayant conduit à l'autorisation de procédé délivrée par l'ANSM.

La plus grande partie de mon travail de thèse s'est attelée à déterminer les mécanismes immunomodulateurs de ces CSM-GW activées par IFN- γ en comparaison avec les CSM non primées et en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques et protéomiques. Nous avons identifié que leur mécanisme d'action impliquait de manière synergique IDO et le transfert de mitochondries (manuscrit soumis, **Annexe 3**).

Enfin, nous avons établi qu'une administration séquentielle de CSM-GW primées par IFN- γ dans un modèle murin de xéno-GVH permettait un meilleur contrôle de la GVH et avons pu suivre le devenir de ces cellules après injection dans ce modèle.

MATERIELS ET METHODES

1. Etudes *in vitro*

1.1 Isolation et expansion des CSM-GW

Les CSM-GW (correspondant dans les Figures à l'acronyme en anglais WJ-MSCs) ont été obtenues selon la technique décrite précédemment par notre équipe de recherche (38).

Les cordons ombilicaux étaient recueillis après consentement écrit et éclairé des parturientes à la Maternité Régionale et Universitaire de Nancy, conformément à la Loi Française régissant la collection, la manipulation d'échantillons humains et la protection des données personnelles.

Cette collection a reçu l'approbation du Comité d'éthique du CHRU de Nancy, et du ministère de la recherche (N° DC-214-2114).

Les CSM-GW étaient obtenues à partir de la technique dite des « explants » (Figure 12). Cette technique consiste à couper les cordons en segments de 3 mm environ, et les fragments sont transférés dans une flasque (TPP 90552 Dutscher). Après 15 minutes, le milieu de culture était ajouté précautionneusement pour ne pas détacher les fragments du plastique. Ce milieu de culture est composé d' α -MEM, avec du lysat plaquettaire (LP) (Macopharma) 5%. Les flasques sont placées à 37°C en hypoxie (5% CO₂, 5% O₂). Les CSM migrent alors en quelques jours autour des segments de cordons, en adhérant au plastique. Le milieu était changé tous les 4-5 jours. Après environ 10 jours, les segments de cordons étaient retirés et le milieu renouvelé. Lorsque la confluence des cellules atteignait 80%, le milieu était retiré, et un lavage au PBS (Macopharma, France) était réalisé. Sept à 10 ml de trypsine étaient ajoutés pendant 5 min à 37°C, puis les cellules étaient centrifugées et remises en flasques à la densité de 3000 CSM-GW/cm². Les mêmes conditions de culture étaient appliquées pour les passages 1 et 2 (P1 et P2). A la fin de P2, Les CSM étaient congelées à la concentration de 1x10⁶/ml dans une solution de congélation composée d'albumine humaine (diluée à 5% dans du sérum physiologique) et 10% de Diméthyl sulfoxyde (DMSO). Les CSM étaient maintenues à -80°C puis dans de l'azote liquide.

Le phénotypage des CSM-GW était réalisé par un marquage CD90-FITC (clone: DG3), CD105-PE (clone: 43A4E1), CD73-APC (clone: AD2), CD14-PerCp (clone: TÜK4), CD20-

PerCp (clone: LT20.B4), CD34-PerCp (clone: AC136), CD45-PerCp (clone: 5B1) (MSC Phenotyping Kit, human, 130-095-19, MiltenyiBiotec).

Les analyses des marqueurs de surface ont été réalisées par cytométrie de flux avec les anticorps suivants :

CD80-FITC (clone 2D10.4) eBioscience, CD86-PE (clone IT2.2, eBioscience), CD209-APC (clone eB-h209, eBioscience), CD40-PE, eBioscience, HLA-DR-eFluor 450 (clone L243, eBioscience), NP1-PE, eBioscience, CD29-FITC (clone TS2/16, Fisher Scientific), VCAM-1-PE (clone STA, Fisher Scientific), mouse anti-human CD47 (clone B6-H12, eBioScience), Mouse anti-human HLA-G (clone 87G, eBioscience), Gal-3-PE (clone M3/38 Fisher Scientific), mouse anti-human Gal-9 (functional grade, clone 9M1-3, Fisher Scientific), PDL-1-APC (clone MIH1, Fisher Scientific), PDL-2-APC, Fisher Scientific,IDO-Alexa Fluor 488 (clone 700838, Biotechne), et anticorps secondaire goat anti-mouse Alexa Fluor 594 (Fisher Scientific).



Figure 12. Technique des explants. Les cordons ombilicaux sont sectionnés en tranches et placés dans des flasques avec du milieu α MEM + LP 5%, puis incubés en hypoxie à 37°C.

1.2 Décongélation et activation par IFN- γ

Les CSM-GW utilisées dans les expérimentations ont toutes été remises en culture après décongélation, afin de limiter l'impact fonctionnel de la congélation mentionné en particulier par François et al. (181).

Lors de la décongélation, les CSM-GW étaient mises au bain marie à 37°C pendant 5 minutes puis lavées dans un milieu frais α -MEM avec 5% LP. Elles étaient ensuite transférées en flasques à la concentration de 3000 CSM viables/cm² et cultivées une semaine en hypoxie, afin de restaurer leurs fonctions après décongélation.

La protéine humaine recombinante IFN- γ (285-IF-100, Biotechne) était ajoutée au milieu à la concentration de 100 ng/ml pendant 48 heures, avant que les CSM ne soient considérées comme des « CSM-GW-IFN ». (Dans les Figures, l'acronyme anglais est mentionné, IFN-WJ-MSCs)

1.3 Prolifération T, co-cultures, mixed lymphoid reactions (MLR)

- Proliférations T par activation non spécifique du TCR :

Les lymphocytes T étaient obtenus à partir de cellules mononucléées du sang (PBMC) de donneurs sains, après Ficoll, et tri magnétique des lymphocytes T (pan-T cell isolation kit, MiltenyiBiotec).

Les lymphocytes T étaient ensuite marqués par du CFSE (carboxyfluoresceinsuccinimidyl) ou par Cell Proliferation Dye eFluor 450 (eBioscience) à la concentration finale de 5 μ M.

Ils étaient activés dans des plaques 96 puits à fonds ronds (Plaque PS U96 Nunclon Fisher Scientific) (50 000 lymphocytes T /puits) préalablement recouverts d'anticorps monoclonaux anti-CD3 (clone UCHT1, MAB100-500, Biotechne) à 10 μ g/ml et anti-CD28 (clone 37407, MAB342-500, Biotechne) à 10 μ g/ml.

Les cellules étaient incubées en normoxie à 37°C dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 10mM d'HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-

2ethanesulfonic acid buffer), 1mM de sodium pyruvate, et 100 U/ml de pénicilline et streptomycine.

Les CSM-GW étaient immédiatement ajoutées à un ratio 1 :1 dans le milieu RPMI 1640 + 10%SVF pour les co-cultures.

La prolifération des lymphocytes T était analysée après 5 jours de culture par cytométrie de flux, avec les marqueurs suivants : Cell Proliferation Dye eFluor 450 eBioscience, CD3 APC (clone UHCT1 BD Biosciences), CD4 PeCy7 (clone SK3, BD Biosciences), CD8 PerCpCy5.5 (clone SK1, BD Biosciences)

Après 5 jours de culture, l'étude de l'apoptose a reposé sur les anticorps : CD95 FITC (clone DX2 Bd Biosciences), et Annexin V, l'épuisement lymphocytaire sur PD1-BV510 (clone EH12.2H7, SONY), Tim3-PE-DAZZLE (clone F38-2E2, SONY), LAG-3-PE (clone7H2C65, SONY), l'étude des Tregs: CD4 PeCy7 (clone SK3, BD Biosciences), CD25-BV421 (clone 2A3, BD Biosciences). CD127-PE (clone HIL-7R-M21, BD Biosciences).

Le surnageant des cultures était congelé à -20°C avant analyses.

- Activation des lymphocytes T par cellules dendritiques allogéniques (réactions mixtes lymphocytaires ou MLR)

Les cellules dendritiques allogéniques étaient obtenues à partir de monocytes d'un autre donneur sain, après Ficoll et tri magnétique CD14 (CD14 MicroBeads, 130-050-201, MiltenyiBiotec), différenciation *in vitro* par IL-4 (Recombinant Human IL-4 Protein, RD, 247-ILB-025) 20 ng/ml, GM-CSF (Recombinant Human GM-CSF Protein, RD, 215-GM-010) 20 ng/ml pendant 5 jours, puis maturation par TNF- α (Recombinant Human TNF-alpha Protein, RD, 210-TA-020) 100 UI/ml et PGE2 (2296/10, RD) 10 ng/ml pendant 48 heures. Les cellules dendritiques étaient déposées dans les plaques 96 puits et les lymphocytes T allogéniques (obtention décrite précédemment) dans les puits à un ratio 1 :5 (soit 10 000 cellules dendritiques/puits).

La prolifération des lymphocytes T était analysée par cytométrie de flux après 7 jours de co-culture.

1.4 Inhibition du contact cellulaire

Les co-cultures ont été réalisées dans des plaques 24 puits à fond plat avec porte-inserts, et inserts de 0,4 μm (diamètre ne permettant pas les échanges cellulaires, ThermoScientific® Nunc® Cell culture inserts in Carrier Plate System, 141002). Les CSM-GW étaient placées dans les inserts, tandis que les lymphocytes T étaient activés dans le puits, au contact des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 préalablement appliqués. L'insert était disposé au plus proche du fond du puits *via* le porte-insert. Le volume total de milieu RPMI + SVF10% était 4 fois supérieur/puits à celui des plaques 96 puits, soit 800 μl /puits.

1.5 Inhibition d'IFN- γ , d'IDO, de la voie PDL-1/PD-1, des galectines

L'inhibition d'IFN- γ dans la co-culture a consisté en l'ajout à H0 d'un anticorps humain anti-IFN- γ (clone NIB42 RUO, BD) à la concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$ dans le milieu de co-culture.

L'inhibition d'IDO a été réalisée avec l'ajout de 1-méthyl-L-tryptophane (Sigma-Aldrich) préalablement dilué dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde), à la concentration de 0,5 mM et 1 mM (la concentration finale de DMSO dans la co-culture était dans les 2 cas $<$ à 0,1%).

L'inhibition de la voie PDL-1/PD1 a été effectuée par 3 types d'anticorps : le nivolumab, à la concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ et jusqu'à 60 $\mu\text{g/ml}$. Le pembrolizumab, à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$. Les anticorps anti-PDL1 (Human B7-H1 Affinity Purified Polyclonal Ab, Biotechne) et anti-PDL2 (Human PD-L2/B7-DC Affinity Purified Polyclonal Ab, Biotechne), ajoutés tous 2 dans la co-culture à H0, à la concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$ chacun.

L'inhibition de la voie des galectines a comporté : l'usage de bêta-lactose (Sigma-Aldrich) à 10 mmol/L, et l'usage d'un anticorps monoclonal neutralisant spécifique de la Galectine-9 (clone 9S2-1, Sigma-Aldrich) à la concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$.

1.6 Elisa et Multiplex

Les dosages de TGF- β 1 ont été réalisés par ELISA (kit Human LAP (TGF-Beta 1) DuoSet Elisa, Biotechne).

Les dosages d'IDO ont été réalisés par ELISA (kit Human Indoleamine 2,3-dioxygénase DuoSet Elisa, BioTechne).

Les dosages de PGE2 ont été réalisés par ELISA (kit Prostaglandin E2 Parameter Assay Kit, Biotechne).

Les dosages d'IL-10, PDL-1 soluble, Galectine-3, Galectine 9, HGF ont été réalisés par Multiplex à technologie Luminex, grâce à un kit à façon Human Magnetic Luminex Assay, Biotechne et analysés sur la plateforme d'histocompatibilité du CHRU de Nancy.

Les dosages des cytokines, chimiokines et adipokines ont été faits à l'aide d'un kit « Proteome Profiler Human Adipokine Array », Biotechne.

1.7 Dosages du tryptophane et de ses dérivés métaboliques

Les surnageants (au moins 200 μ l) de co-culture entre lymphocytes T activés et CSM-GW (à J5 de la co-culture) ont été congelés à -20°C, et ont été envoyés en carboglace à l'équipe du Pr Emond à Tours (UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France, CHRU de Tours, Service de Médecine Nucléaire In Vitro, Tours, France). Ils ont été analysés selon la technique publiée par cette équipe par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse de haute résolution (182). Vingt catabolites du tryptophane ont été ainsi dosés pour chaque surnageant.

1.8 Etudes dans le plasma humain et sénescence

Le plasma humain a été obtenu à partir de donneurs sains par ponction sanguine dans des tubes héparinés, centrifugés à 300 g durant 20 min.

De l'HEPES 1% a été ajouté.

Les CSM ont été cultivées dans des plaques 24 puits.

Le suivi de la prolifération cellulaire a été fait par marquage Edu 24 heures avant la fixation des cellules. Ce marquage a été réalisé suivant les instructions du kit Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 594 Imaging Kit, Réf C10639.

La fixation des cellules puis le marquage de β -galactosidase a été réalisé suivant les instructions du kit Senescence β -galactosidase Staining kit, Réf 9860, Cell Signaling Technology.

Un marquage au DAPI (dilution 1/2500) a été réalisé durant 45 minutes avant lecture des puits au microscope optique et à fluorescence.

1.9 Etude du transfert mitochondrial

Les CSM-GW ont été marquées par Mitotracker Green, (488/516 nm), Invitrogen, à la concentration de 50 μ M dans du milieu α -MEM sans sérum durant 30 minutes à 37°C, 1 à 2 heures avant leur co-culture avec les lymphocytes T.

A J2 et J5 des co-cultures, l'analyse en cytométrie de flux permettait de différencier les lymphocytes T ayant reçu des mitochondries (Mito+) et ceux n'en ayant pas reçu (Mito-).

1.10 Etude du métabolisme des lymphocytes T (Seahorse)

Le kit Seahorse XF Cell Mito Stress, Agilent, a été utilisé pour l'analyse du métabolisme des lymphocytes T en fin de co-culture. Brièvement, 300 000 lymphocytes T ont été déposés dans chaque puits. Le taux de consommation d'Oxygène (OCR, pmol/min) et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR, mpH/min) ont été relevés à l'état basal, puis après injection d'oligomycine, de FCCP et d'Actinomycine A/Rotenone, afin d'analyser la respiration basale, la respiration liée à l'ATP, et la capacité respiratoire maximale. Le ratio OCR/ECAR a été analysé dans toutes les conditions (12 mesures par échantillon).

2. Etudes *in vivo*

2.1 Modèle de xeno-GVH

Les souris NOD.Cg-PrkdcscidII2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) issues du laboratoire Jackson (Bar Harbor, ME) ont été importées et élevées en conditions exemptes d'organisme pathogène spécifique (EOPS) dans des cages stérilisées à l'autoclave disposées dans des portoirs ventilés, avec de l'eau stérile et de la nourriture irradiée. Les souris étaient âgées de 8 à 12 semaines lors des expérimentations. Le protocole a été approuvé par un comité local d'éthique (n°APAFIS23270-2017060417575295-V10).

La xéno-GVH induite dans ce modèle a été réalisée selon D'Aveni et al (47). Les souris NSG recevaient une irradiation corporelle totale à 2 Grays (plateforme NancycloTEP, irradiateur X Rad 200) à J-1. Le lendemain (J0), 5 millions de PBMC d'un donneur sain étaient injectées dans du PBS (300 μ l) dans l'une des veines caudales, en intraveineux direct. Les souris étaient ensuite surveillées cliniquement tous les jours (avec une évaluation du score de GVH), et pesées 2 fois/semaine. Le chimérisme et l'analyse des Tregs étaient réalisés après prélèvement sanguin sur l'artère caudale (sous réchauffeur) de façon hebdomadaire à partir de J21. Le chimérisme consistait en un marquage par anticorps anti-CD45 humain V500 (CD45h, BD Biosciences) après lyse des GR. L'analyse des Tregs consistait en un gating des populations CD4⁺, CD25^{high}, CD127^{low} parmi les cellules CD45⁺. Les souris étaient sacrifiées lorsque les points limites étaient atteints. Les organes (foie, rate, peau, tube digestif) étaient alors disséqués, et conservés dans du formol puis inclus dans la paraffine. Les coupes d'organe ont ensuite été analysées avec l'expertise du Pr Hervé Sartelet (service d'anatomopathologie, CHRU de Nancy) par coloration HES et en immunohistochimie après marquage CD3, CD20, CD68 et CD163.

La GVH était gradée selon les critères suivants relevés tous les jours dans le suivi clinique des animaux :

Score	0	1	2	3	4	5
aspect de la fourrure	0	0,5	1	2		
voussure dorsale	0	0,5	1	2		

inflammation oculaire	0	0,25	0,5	1	1,5	2
Perte d'activité	0	0,25	0,5	1		
Diarrhée	0	1				
	0	<10%	<25%	<50%	>50%	
Alopécie	0	0,25	0,5	0,75	1	
% de surface cutanée érythémateuse	0	0,25	0,5	0,75	1	

Le score de GVH histologique utilisé pour les analyses anatomopathologiques a été décrit par Blazar et coll. (183) :

Il s'agit d'un score semi-quantitatif :

- Grade 0 : normal

- Grade 0.5 : infiltration cellulaire périvasculaire minime (foie, poumon). Cellules nécrotiques occasionnelles (rate). Nécrose occasionnelle de cellule cryptique, infiltration minime dans la lamina *propriae* et la sous-muqueuse (colon).

- Grade 1 : infiltrat périvasculaire, 1 à 2 cellules d'épaisseur, impliquant jusqu'à 15% des vaisseaux (foie, poumon). Cellules nécrotiques / apoptotiques composant jusqu'à 10 cellules/mm² de tissu (rate). Cellules nécrotiques composant jusqu'à 15% des cryptes, infiltration mineure composant jusqu'à 20% de la lamina *propriae* (1 à 2 cellules d'épaisseur dans les zones intermuqueuses et sous-muqueuses) (colon).

-Grade 1.5 : infiltrat périvasculaire, 1 à 2 cellules d'épaisseur, touchant jusqu'à 15% des vaisseaux et infiltration intraparenchymateuse (foie, poumon). Cellules nécrotiques/apoptotiques représentant jusqu'à 10 cellules/mm² de tissu et hémolyse occasionnelle (rate). Cellules nécrotiques représentant jusqu'à 15% des cryptes, infiltration mineure ou ≤ 1/3 de la lamina *propriae* (1 à 2 cellules d'épaisseur dans les espaces intermuqueux et sous-muqueux) (colon).

- Grade 2 : infiltrat périvasculaire, 2 à 3 cellules d'épaisseur, touchant jusqu'à 25% des vaisseaux et infiltration intraparenchymateuse (foie, poumon). Cellules

nécrotiques/apoptotiques représentant jusqu'à 20 cellules/mm² de tissu et hémolyse occasionnelle avec architecture anormale (rate). Cellules nécrotiques représentant jusqu'à 25% des cryptes, infiltration mineure ou $\leq 1/3$ de la lamina *propriae* (3 cellules d'épaisseur dans les espaces intermuqueux et sous-muqueux) (colon).

- Grade 2,5 : infiltrat périvasculaire, 2 à 3 cellules d'épaisseur, touchant 25 à 50% des vaisseaux et infiltration intraparenchymateuse (foie, poumon). Cellules nécrotiques/apoptotiques représentant jusqu'à 20 cellules/mm² de tissu et hémolyse présente dans moins d'un quart du tissu avec architecture anormale (rate). Cellules nécrotiques dans 25 à 50% des cryptes, infiltration mineure ou $\leq 1/3$ de la lamina *propriae* (3 à 4 cellules d'épaisseur dans les espaces intermuqueux et sous-muqueux) (colon).

- Grade 3 : infiltrat périvasculaire, 4 à 5 cellules d'épaisseur, touchant 25 à 50% des vaisseaux, infiltration péribronchique (2 à 3 cellules) et infiltration intraparenchymateuse (foie, poumon). Cellules nécrotiques/apoptotiques représentant jusqu'à 40 cellules/mm² de tissu et hémolyse présente dans 25 à 50% du tissu avec architecture anormale et aires de leucopénie dans moins de 25 % du tissu, formation de bandes fibreuses (rate). Cellules nécrotiques dans plus de 50% des cryptes, infiltration de la lamina *propriae* (5 à 6 cellules d'épaisseur dans les espaces intermuqueux et sous-muqueux) avec perte de moins de 25 % des cellules caliciformes (colon).

- Grade 3.5 : infiltrat périvasculaire, 6 à 7 cellules d'épaisseur, touchant plus de 50% des vaisseaux, infiltration péribronchique (4 à 5 cellules), foyers de nécrose (foie) et infiltration intraparenchymateuse (foie, poumon) avec altération sévère de la structure. Cellules nécrotiques/apoptotiques représentant jusqu'à 40 cellules/mm² de tissu et hémolyse présente dans plus de 50% du tissu avec architecture anormale et aires de leucopénie dans 25 à 50% du tissu, formation de bandes fibreuses (rate). Cellules nécrotiques dans plus de 50% des cryptes, infiltration de la lamina *propriae* résultant en un déplacement de moins de la moitié de la muqueuse avec perte de 50% des cellules caliciformes (colon).

- Grade 4 : infiltrat périvasculaire, 8 cellules et plus d'épaisseur, touchant plus de 50% des vaisseaux, infiltration péribronchique (6 cellules et plus), larges foyers de nécrose (foie) et infiltration intraparenchymateuse (foie, poumon) avec lésions nécrotiques. Grandes aires de nécrose et hémolyse présente dans plus de 50% du tissu avec architecture anormale, et aires

de leucopénie dans plus de 50% du tissu (rate). Cellules nécrotiques dans plus de 50% des cryptes, infiltration de la lamina *propriae* résultant en un déplacement de plus de la moitié de la muqueuse avec perte de 75 à 100% des cellules caliciformes (colon).

2.2 Injections des CSM-GW *in vivo*

Les souris ont reçu des injections intraveineuses dans la veine caudale de 500 000 CSM-GW ou 500 000 CSM-GW-IFN- γ suspendues dans 300 μ l de PBS, à J7, J14 et J21 de la greffe de PBMC. Les souris témoins ont reçu une injection de 300 μ l de PBS à J7, J14 et J21.

2.3 Marquage et suivi du « homing » des CSM-GW

Après retrait du milieu de culture, les CSM-GW cultivées en flasques T75, ont été incubées pendant 30 minutes dans du milieu α -MEM, sans sérum, contenant 20 μ l d'un marqueur (CelltrackerTM Deep Red Dye, ThermoFisher), à 37°C. Elles ont ensuite été maintenues 24h en culture en hypoxie dans le milieu complet α MEM + LP 5%. Après adjonction de trypsine (pour décrocher les CSM du plastique) et mise en suspension dans du PBS, 1 million de CSM-GW ou CSM-GW-IFN marquées par le Celltracker ont été injectées aux souris NSG, à J7 de la greffe de PBMC. Les souris ont été euthanasiées à H24 et H48 de l'injection. Les organes (poumons, foie, rate, peau, tube digestif) ont été congelés dans des cassettes dans de l'OCT (Optimal Cutting Temperature).

Les organes, après coupe au cryotome, ont été analysés en microscopie à fluorescence pour la détection des CSM visualisées en rouge profond (spectre maximal 630/650 nm).

3. Analyses statistiques

Le logiciel Graphpad Prism 6 a été utilisé pour les analyses statistiques. Tous les tests utilisés sont mentionnés dans les légendes des figures de la section Résultats.

RESULTATS

1. Impact de l'IFN- γ sur l'effet immunosuppresseur des CSM-GW

1.1 L'IFN- γ entraîne des modifications phénotypiques des CSM-GW

Les CSM-GW sont décrites dans la littérature pour leurs propriétés immunosuppressives, notamment par la modulation de la prolifération des LT conventionnels. Nous avons donc voulu explorer l'effet d'une pré-incubation par IFN- γ sur ces propriétés. Après 48h d'incubation avec 100 ng/ml d'IFN- γ (CSM-GW-IFN), la viabilité des CSM-GW et leur morphologie n'étaient pas modifiées. Concernant leurs marqueurs membranaires, nous avons observé (Figure 13):

- Le maintien des marqueurs qui les définissent selon la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ISCT) : CD73, CD90 et CD105.
- une augmentation d'intensité d'expression des marqueurs HLA-DR (plus ou moins marquée selon les CSM-GW, mais toujours présente), et CD40. En revanche, nous n'observons pas d'expression des molécules de costimulation telles que CD80, CD86 et CD209 (DC sign).
- Une augmentation d'intensité d'expression de la molécule d'adhérence « vascular cell adhesion molecule » VCAM-1 à la surface. Par contre, nous n'avons pas noté de modifications d'expression de Neuropilin-1 (NP1), CD29 ni de CD47.

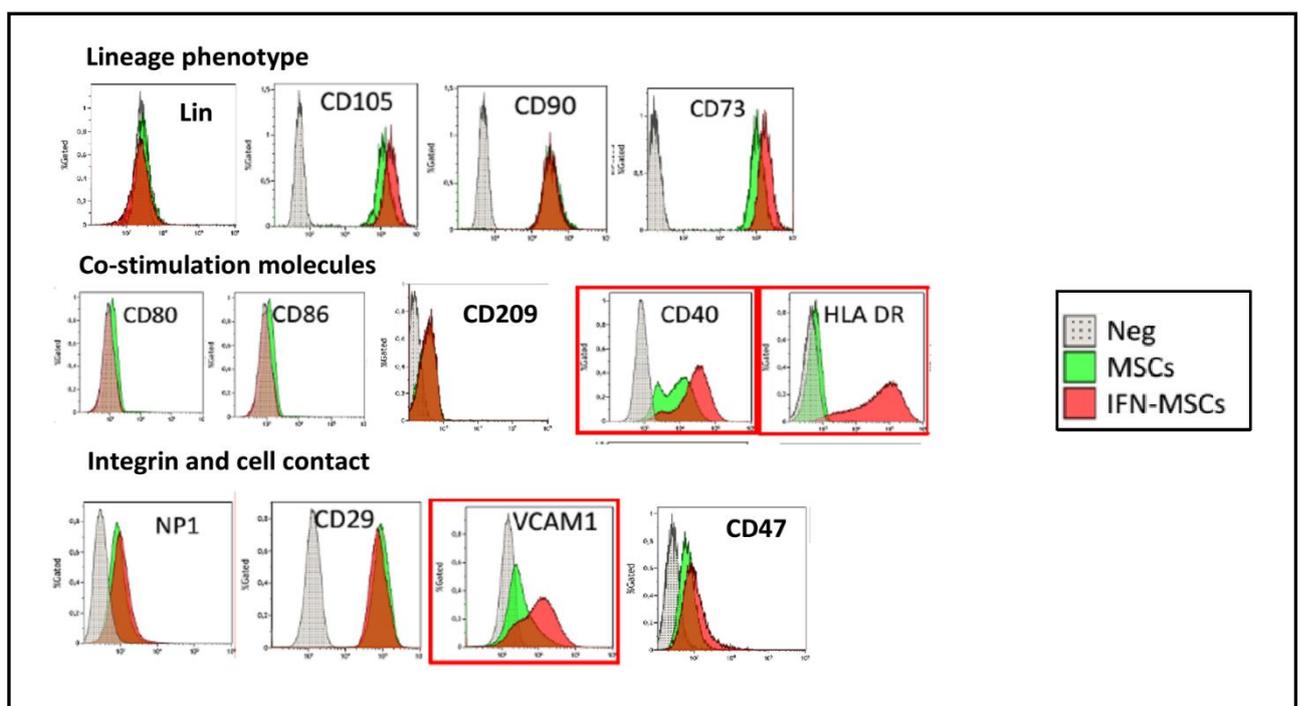


Figure 13. Phénotype des CSM-GW avec ou sans pré-incubation par IFN- γ

Expression membranaire de marqueurs avec (en rouge) et sans (en vert) pré-incubation par IFN- γ . Les courbes grises sont le témoin négatif. La pré-incubation par IFN- γ augmente l'expression de CD40, HLA DR, VCAM1 (n=10).

Malgré l'augmentation d'expression de HLA-DR et de CD40 à la membrane, nous n'avons pas observé d'immunogénicité des CSM-GW-IFN en co-culture avec des lymphocytes T allogéniques (Figure 14).

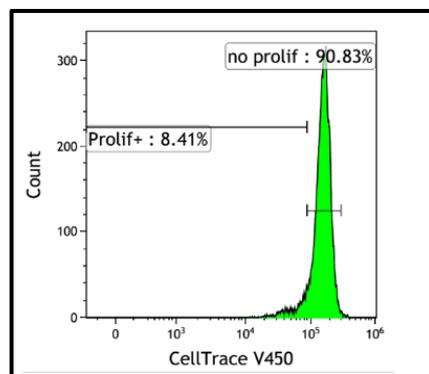


Figure 14. Immunogénicité des CSM-GW pré-incubées par IFN- γ

Lymphocytes T non activés en co-culture avec des CSM-GW-IFN allogéniques (ratio 1 :1 durant 5 jours). L'analyse du celltrace en cytométrie de flux ne montre pas de prolifération des lymphocytes T (cellules Celltrace faible) (n=5).

1.2 La pré-incubation par IFN- γ augmente le potentiel antiprolifératif des CSM-GW *in vitro*.

L'effet immunosuppresseur sur les LT et notamment l'effet antiprolifératif *in vitro* des CSM-GW a été évalué après activation des lymphocytes T par anti-CD3 et anti-CD28, ainsi que dans un modèle de réaction mixte lymphocytaire (activation des lymphocytes T en présence de cellules dendritiques allogéniques issues de monocytes).

La pré-incubation par IFN- γ majeure, dans les 2 types d'activation lymphocytaire T, l'effet anti-prolifératif des CSM-GW (Figure 15). Nous avons noté un effet dose, puisque c'est avec

les ratio cellulaires CSM : lymphocytes T les plus élevés que nous observions l'effet anti-prolifératif des CSM le plus significatif (Figure 16) ($p=0.008$ et 0.001 pour respectivement CSM-GW et CSM-GW-IFN). Nous avons retenu pour la suite des expérimentations le ratio 1 :1.

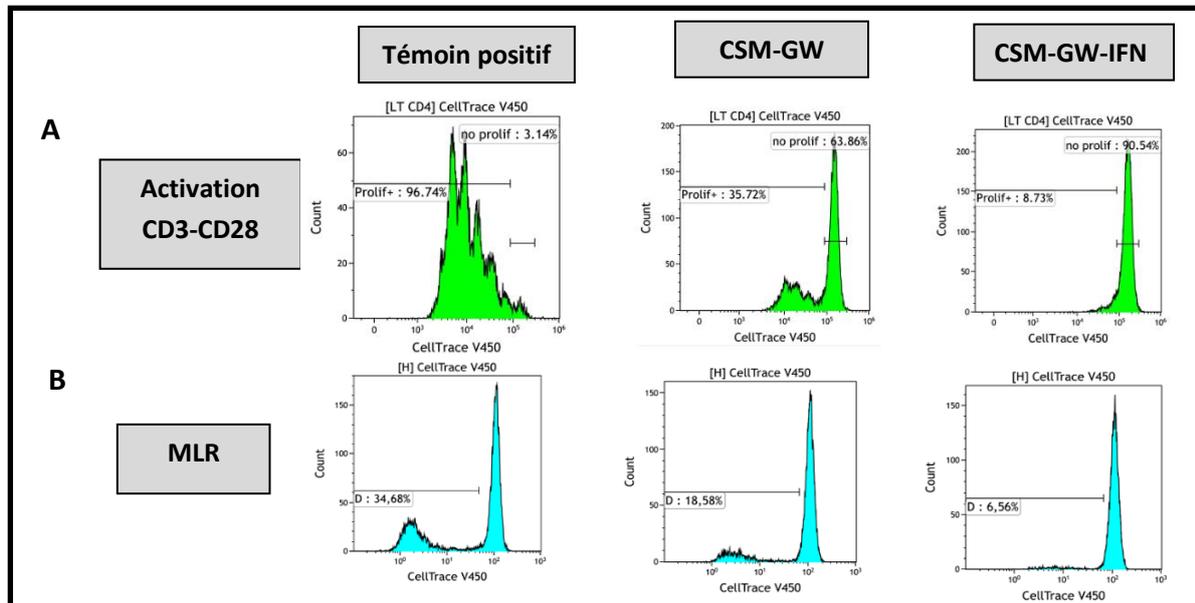


Figure 15. Prolifération des lymphocytes T en présence de CSM-GW et CSM-GW-IFN
La prolifération des lymphocytes T est quantifiée par la dilution du marqueur intracellulaire CFSE. A : activation T par anti-CD3 et anti-CD28. B, activation des T par cellules dendritiques allogéniques. A gauche : T activés seuls (témoins positifs). Au milieu : T activés en présence de CSM-GW (ratio 1 :1). A droite : T activés en présence de CSM-GW-IFN (ratio 1 :1).

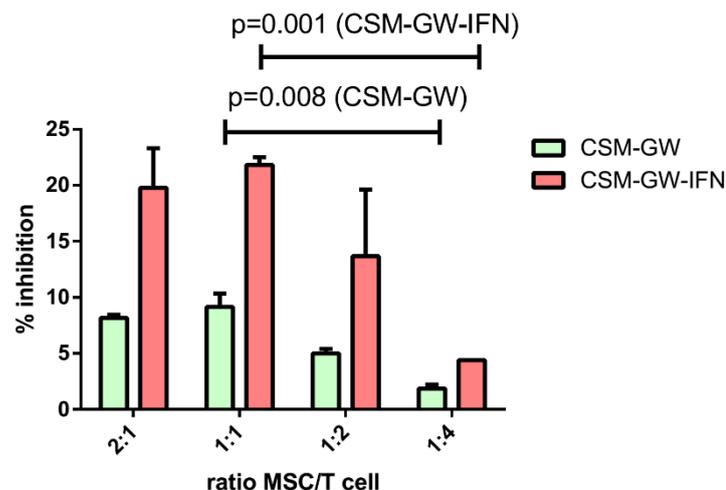


Figure 16. Effet immunosupresseur des CSM-GW et CSM-GW-IFN selon le ratio CSM:T

Pourcentage d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T en présence de CSM-GW (vert) et CSM-GW-IFN (rouge) par rapport aux LT activés sans CSM et en fonction du ratio cellulaire (MSC : lymphocytes T) ($n=2$). Les « *t tests* » paramétriques comparant les résultats aux ratios 1 :1, 1 :2 et 1 :4 montrent une différence significative globale entre ces 3 ratios pour les CSM-GW ($p=0,008$) et pour les CSM-GW ($p=0,001$)

A un ratio 1 :1, les CSM-GW-IFN ont un effet antiprolifératif statistiquement plus élevé que les CSM-GW ($p=0.002$) (Figure 17).

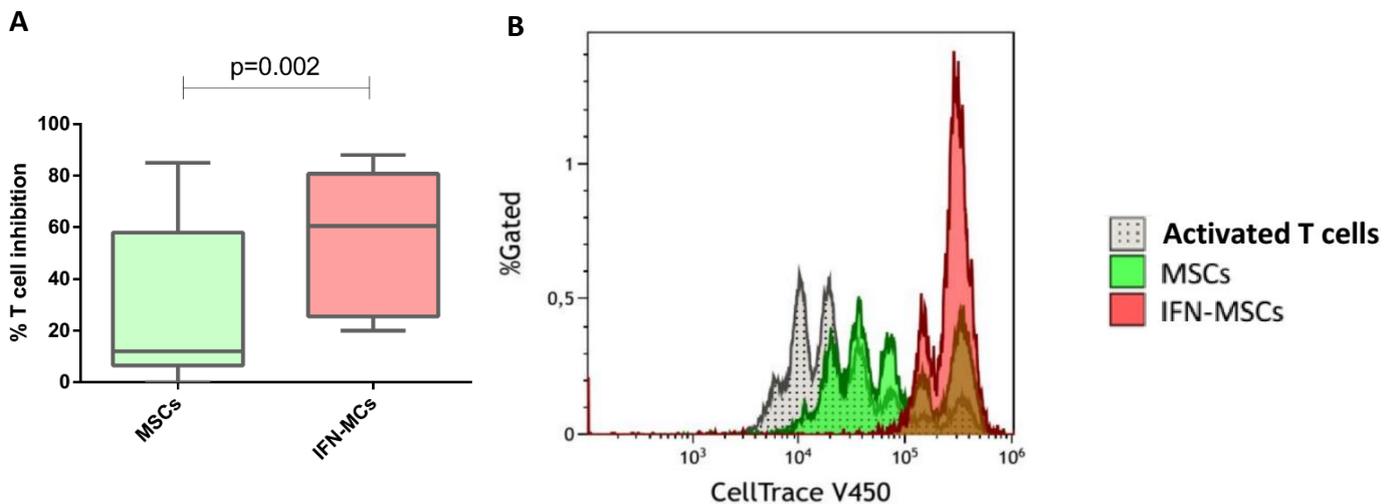


Figure 17. Augmentation de l'effet immunosuppresseur sur les LT activés par les CSM-GW-IFN en comparaison des CSM-GW non primées

A: Comparaison des pourcentages d'inhibition des LT en présence de CSM-GW-IFN versus CSM-GW non primées ($p=0.002$, test de Wilcoxon, $n=10$ avec 10 sources de CSM-GW différentes, ratio 1 :1). *B* : illustration de la prolifération des T dans l'une des 10 expérimentations. En gris : les lymphocytes T activés seuls. En vert : co-culture avec les CSM-GW. En rouge : co-culture avec les CSM-GW-IFN.

Nous avons par ailleurs constaté, que les CSM-GW-IFN, contrairement aux CSM-GW non primées, inhibaient significativement plus les lymphocytes T CD4 que les lymphocytes T CD8 ($p=0.008$) (Figure 18).

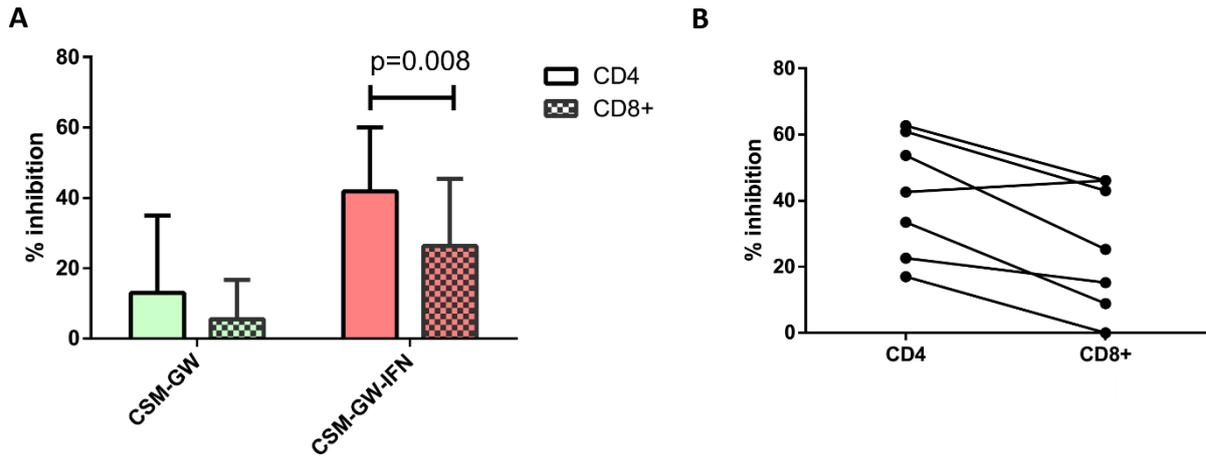


Figure 18. Comparaison d'inhibition de prolifération des lymphocytes T activés entre T CD4⁺ et T CD8⁺ par les CSM-GW et CSM-GW-IFN.

A. A un ratio 1 :1, le pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT CD4 et CD8 activés par CD3/CD28 est comparable avec les CSM-GW non primées alors que les CSM-GW-IFN inhibent significativement plus la prolifération des lymphocytes T CD4 + que celle des lymphocytes T CD8+ (n=7, p=0.008, test de Student apparié). B. Appariement de l'inhibition des lymphocytes T CD4+ et CD8+ en co-culture avec les CSM-GW-IFN (n=7).

Toutefois, il existe une très forte hétérogénéité en fonction de la source des CSM-GW, illustrée dans la Figure 19. L'activation par IFN- γ augmente le potentiel anti-prolifératif de toutes les sources de CSM-GW, mais ne permet pas d'obtenir une homogénéisation de ce potentiel.

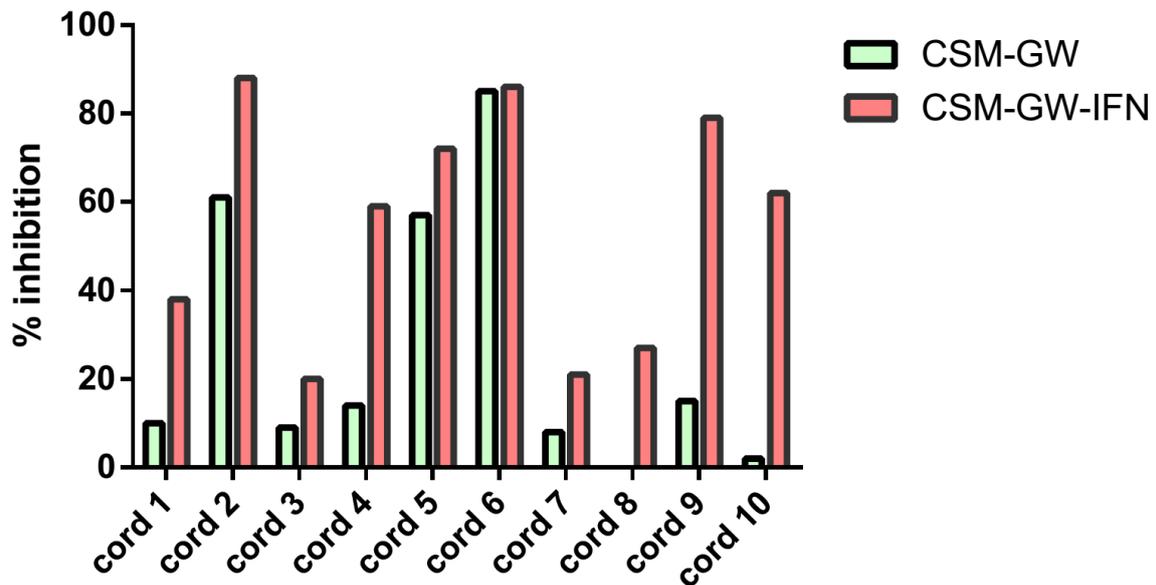


Figure 19. Impact de la source du cordon ombilical sur le potentiel immunosuppresseur des CSM-GW et CSM-GW-IFN.

Pourcentage d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T après activation par anti-CD3 et anti-CD28, en présence de CSM-GW (vert) et CSM-GW-IFN (rouge), ratio 1 :1, en fonction de la source de cordon ombilical des CSM-GW.

Le rôle de l'IFN- γ secrété par les lymphocytes T activés durant la co-culture a été analysé en utilisant un anticorps anti-IFN- γ bloquant, ajouté dès le début de la co-culture à la concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$. Cette inhibition a entraîné une perte partielle de l'effet des CSM-GW ($p=0.048$) et des CSM-GW-IFN ($p=0.09$, tendance non significative, en lien avec une hétérogénéité plus importante en fonction de la source de CSM), témoignant du rôle de l'IFN- γ à la fois pour la pré-incubation mais aussi durant la co-culture pendant la phase d'activation des LT (Figure 20).

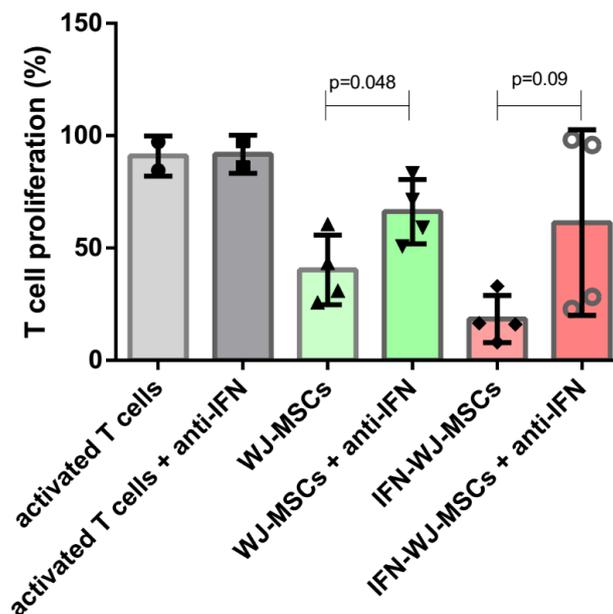


Figure 20. Rôle de l'IFN- γ pendant la phase de co-culture CSM/LT activés

Pourcentage de prolifération des LT activés par CD3/CD28 en présence ou non de CSM-GW ou CSM-GW-IFN et avec ou sans inhibition d'IFN- γ pendant la co-culture. L'inhibition d'IFN- γ reverse partiellement l'inhibition de la prolifération des LT en présence de CSM-GW ($p=0.048$) et CSM-GW-IFN ($p=0.09$) ($n=4$, avec 2 souches différentes de CSM-GW, test de Student).

1.3 L'activation par IFN- γ des CSM-GW induit l'apoptose des lymphocytes T activés, mais ne modifie pas leur épuisement (*exhaustion*) *in vitro*.

Nous avons analysé l'apoptose des lymphocytes T par l'expression d'Annexin V en cytométrie en flux à 48 heures de co-culture entre CSM-GW et LT activés par CD3/CD28. En comparaison des LT activés sans CSM-GW, la proportion de lymphocytes T apoptotiques (Annexine V+) était supérieure en co-culture avec les CSM-GW ($p=0.0048$), et maximale en co-culture avec les CSM-GW-IFN ($p=0.03$) (Figure 21A).

Par rapport au contrôle sans CSM-GW, l'expression de Fas (CD95) sur les lymphocytes T activés était augmentée en co-culture avec les CSM-GW et CSM-GW-IFN ($p < 0.0001$), mais aucune différence d'expression entre ces 2 conditions n'a été mise en évidence (Figure 21B).

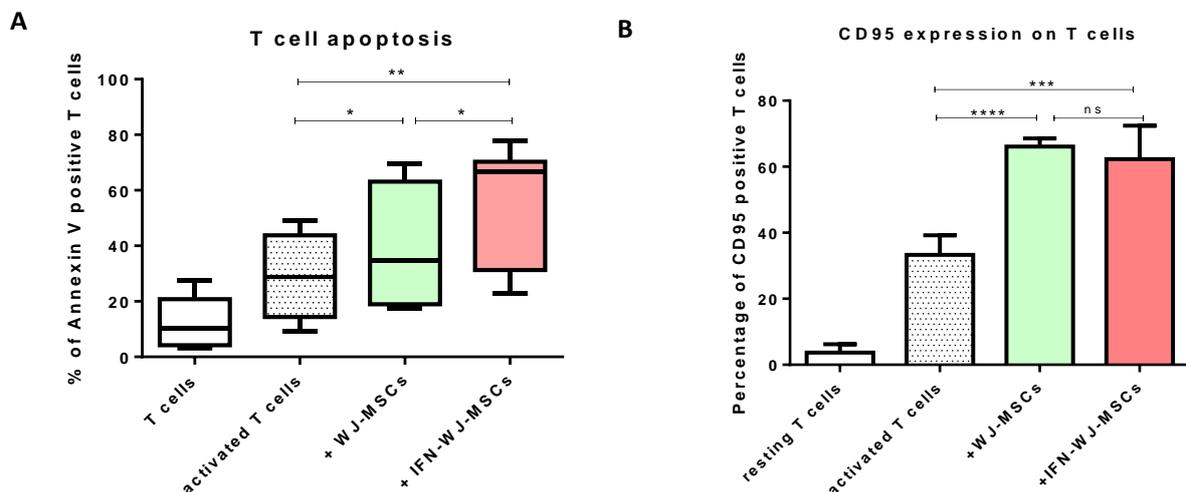


Figure 21. Apoptose des LT et expression de CD95 sur les LT activés en présence de CSM-GW et CSM-GW-IFN

A : Le pourcentage de lymphocytes T exprimant l'Annexin V, soit apoptotiques, 48 heures après l'activation des lymphocytes T seuls ou en présence de CSM-GW ou CSM-GW-IFN ($n=6$, tests de Student appariés). *B* : Pourcentage de lymphocytes T exprimant CD95. ($n=6$ sauf $n=3$ pour CSM-GW, test de Student, * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,0099$, *** : $p < 0,00099$).

L'épuisement des lymphocytes T a été analysé en mesurant l'intensité d'expression membranaire de PD1 à la fin de la co-culture à la surface des lymphocytes T. Il n'y avait pas de différence significative de l'expression de PD1 lorsque les lymphocytes T étaient activés seuls et lorsqu'ils étaient en contact avec les CSM-GW ou CSM-GW-IFN (Figure 22).

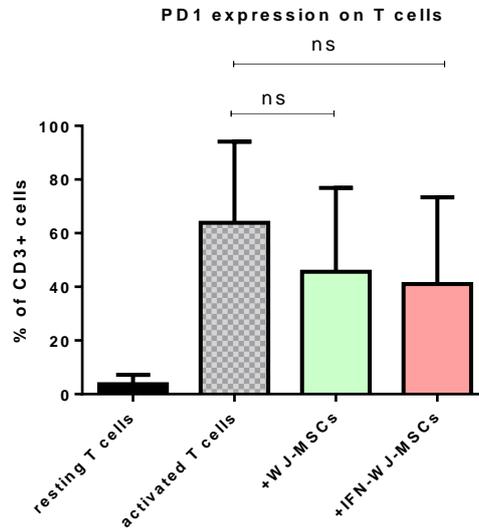


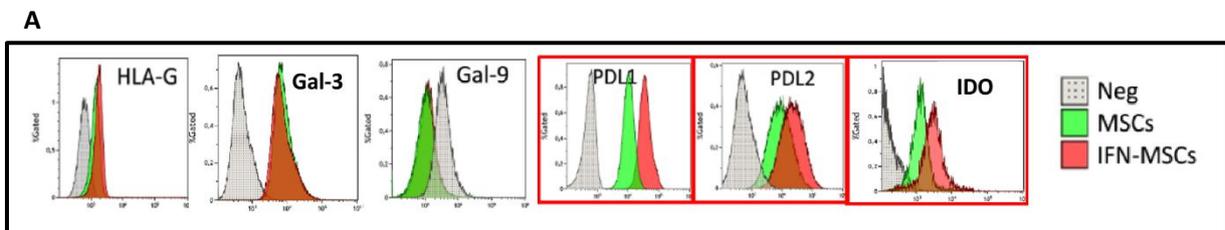
Figure 22. Proportion de LT épuisés après activation CD3/CD28 et selon la présence de CSM-GW ou CSM-GW-IFN

Le pourcentage de lymphocytes T exprimant le PD-1 à leur surface en fin de culture est identique entre LT activés seuls et LT activés en présence de CSM-GW et CSM-GW-IFN (n=5, p=ns, tests de Student).

2. Etude des mécanismes immunomodulateurs des CSM-GW-IFN

2.1 L'IFN- γ augmente l'expression de PDL-1, PDL-2 et d'IDO des CSM-GW

Les CSM-GW-IFN ont été comparées aux CSM-GW pour l'expression de molécules connues dans l'immunomodulation des CSM, par cytométrie en flux. L'IFN- γ augmente l'expression membranaire de PDL-1 et PDL-2 et l'expression intracellulaire d'IDO (Figure 23A). Galectine-9 n'est pas exprimée à la surface des CSM-GW, mais était visualisée au niveau cytosolique et périnucléaire en microscopie à fluorescence (Figure 23B).



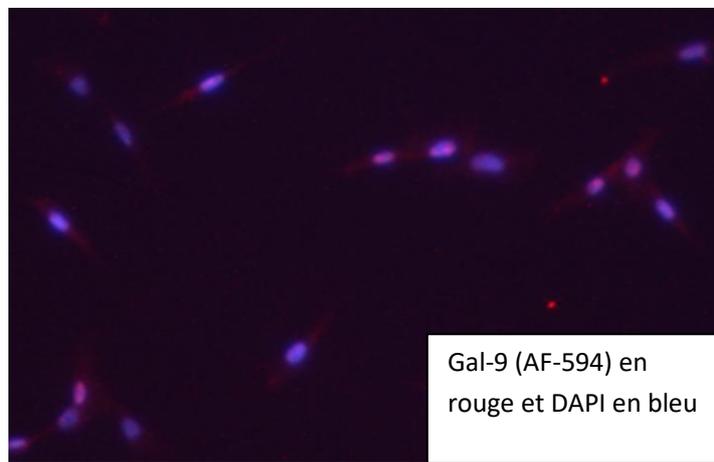


Figure 23. Comparaison des phénotypes des CSM-GW et CSM-GW-IFN pour HLA-G, Galectine-3, Galectine-9, PDL-1, PDL-2 et IDO.

A : Analyse par cytométrie en flux des CSM-GW-IFN (en rouge) comparées aux CSM-GW (en vert). L'isotype contrôle est en gris. On note une augmentation d'expression de PDL-1 et de PDL-2 à la surface des CSM-GW-IFN (n=6) et d'IDO intracellulaire (n=3). B : Galectin-9 qui n'est pas exprimée à la surface des CSM-GW est par contre visualisée en microscopie à fluorescence au niveau cytosolique et périnucléaire (Galectin-9 en rouge et DAPI marquant les noyaux en bleu).

2.2. Molécules immunosuppressives dans le surnageant de co-culture LT/CSM-GW: augmentation de Galectine-9 et d'IDO en présence de CSM-GW-IFN

Nous avons mesuré par Elisa et Multiplex les concentrations d'IL-6, IL-10, PDL-1 soluble, Galectine-3, Galectine-9, HGF, IDO, TGF- β 1, et PGE2 dans les surnageants de culture, à J5, de lymphocytes T activés seuls ou avec des CSM-GW (ratio 1 :1) ou des CSM-GW-IFN (ratio 1 :1). Nous avons mis en évidence une augmentation des concentrations de galectine-9 et d'IDO et une diminution de PGE2 entre les surnageants de co-culture contenant des CSM-GW-IFN *versus* CSM-GW (Figure 24).

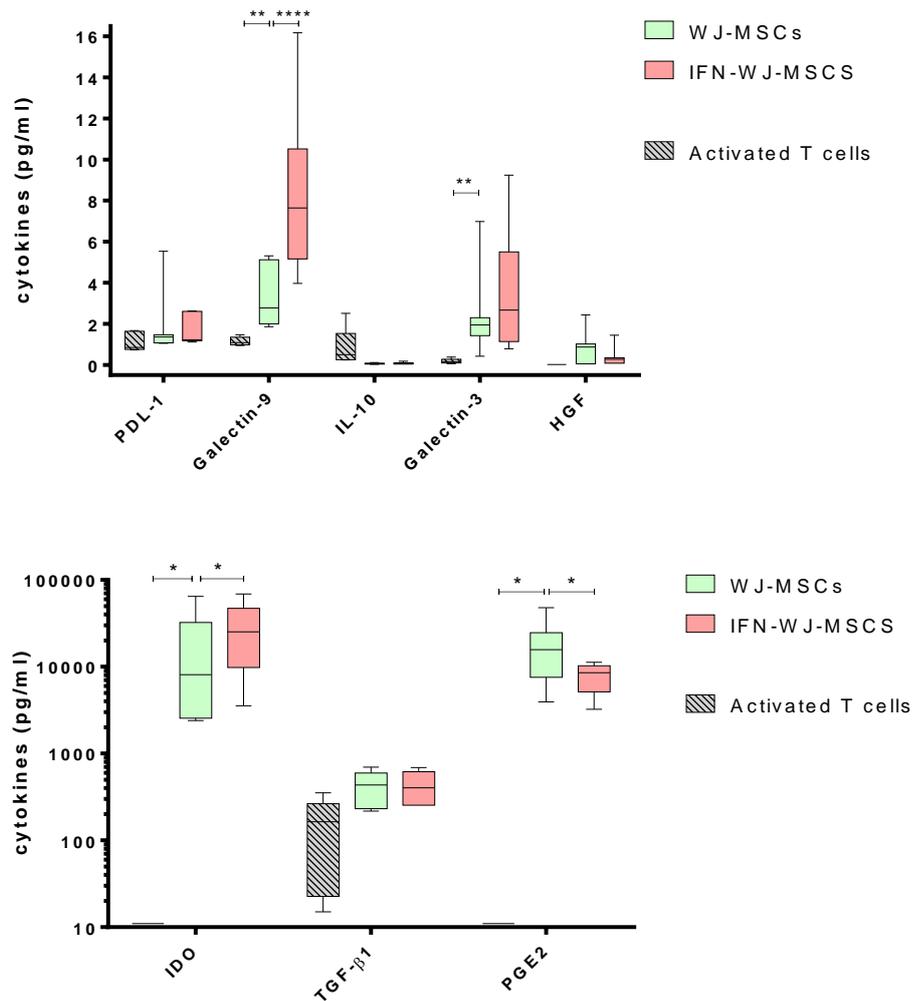


Figure 24. Concentrations des cytokines et protéines dans le surnageant des co-cultures.

En vert, co-cultures T activés et CSM-GW. En rouge, co-cultures T activés et CSM-GW-IFN. En gris, lymphocytes T activés seuls (n=6 expérimentations indépendantes, tests de Student pour chaque molécule). Les concentrations de galectine 9, IDO étaient augmentées en présence de CSM-GW-IFN versus CSM-GW ($p < 0,05$) tandis que PGE2 était diminuée en présence de CSM-GW-IFN ($p < 0,05$) (n=6, test de Student)

2.3. L'effet immunosuppresseur des CSM-GW et des CSM-GW-IFN est dépendant d'IDO

La comparaison des caractéristiques fonctionnelles, phénotypiques et protéomiques des CSM-GW indiquent que leur pré-activation par IFN- γ leur permet d'acquérir des propriétés immunosuppressives sur les lymphocytes T activés supérieures qui sont

associées à une augmentation de leur expression de PDL1, PDL2 et IDO, ainsi que d'une plus forte capacité à sécréter la galectine 9 et IDO.

Ces résultats nous ont permis d'orienter les expériences cherchant à déterminer par quels mécanismes les CSM-GW régulent l'activation des lymphocytes T et quels effets sont induits ou majorés par leur pré-stimulation *via* IFN- γ .

Dans ces objectifs, nous avons inhibé les voies de PDL-1-PDL-2/PD1, des galectines, de galectine 9 en particulier et d'IDO lors des co-cultures de CSM avec les T activés par des inhibiteurs spécifiques.

L'inhibition de PD1 a été réalisée par l'ajout de nivolumab en début de co-culture. Le nivolumab n'a pas entraîné de restauration, même partielle, de la prolifération des lymphocytes T (Figure 25). Lorsque l'activation des lymphocytes T n'était réalisée que par anti-CD3 (dans l'hypothèse où la co-stimulation trop forte des T par anti-CD28 entraînerait un état d' « exhaustion » irréversible), le nivolumab ne modifiait pas non plus l'impact des CSM-GW, ni des CSM-GW-IFN (Figure 25).

Nous avons ensuite inhibé la voie des galectines par du bêta-lactose, à la concentration de 10 mmol/l. Cela n'a pas entraîné de modification sur la prolifération des lymphocytes T activés en présence de CSM-GW ou de CSM-GW-IFN (résultats non montrés). Nous n'avons pas non plus réversé l'effet immunosuppresseur des CSM-GW et CSM-GW-IFN sur les LT activés en inhibant spécifiquement la galectine-9 par un anticorps neutralisant (Figure 26).

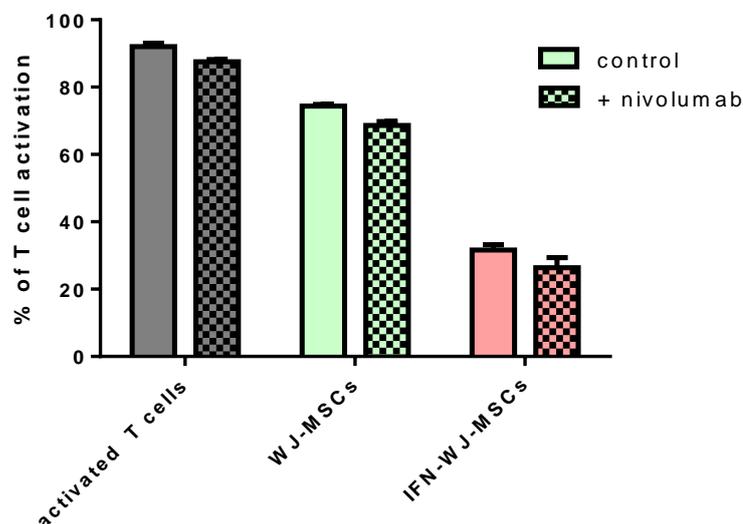


Figure 25. Effets du nivolumab sur les capacités immunosuppressives des CSM-GW et CSM-GW-IFN

L'ajout de nivolumab en début de coculture ne permet pas de réverser l'effet immunosupresseur des CSM-GW ni des CSM-GW-IFN sur la prolifération des LT activés par anti-CD3 +/- CD28 (activation par anti-CD3 et antiCD28, n=3 et activation par anti-CD3 seul, n=3, p=ns, test de Student).

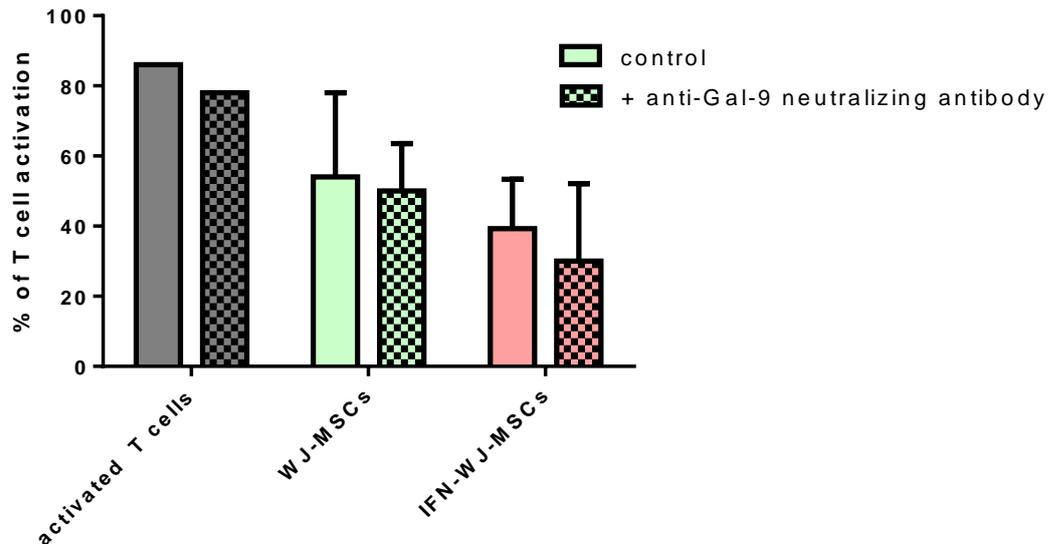


Figure 26. Effet de l'inhibition de la galectine-9 sur les capacités immunosuppressives des CSM-GW et CSM-GW-IFN

Le pourcentage de prolifération des LT activés par anti-CD3/CD28 en présence de CSM-GW et CSM-GW-IFN n'est pas impacté par l'ajout en début de co-culture d'un anticorps neutralisant anti Galectine-9 à la concentration de 20 µg/ml (n=3, p=ns, test de Student).

Nous avons finalement inhibé l'activité enzymatique d'IDO par l'ajout de 1L-méthyltryptophane dès le début de la co-culture. Cette inhibition a permis une restauration complète de la prolifération des lymphocytes T, en co-culture avec les CSM-GW ainsi qu'avec les CSM-GW-IFN (Figure 27).

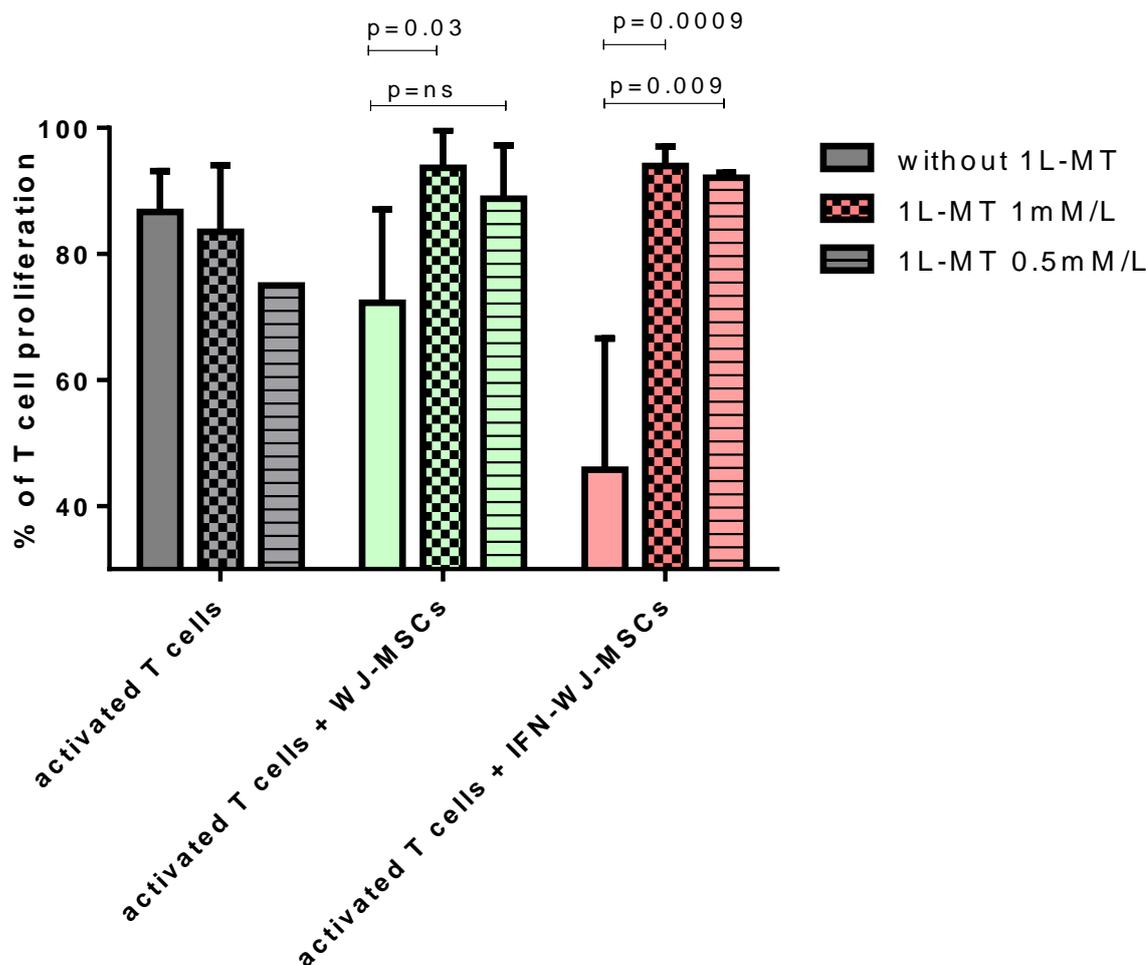


Figure 27. Effet de l'inhibition de l'activité d'IDO sur les capacités immunosuppressives des CSM-GW et CSM-GW-IFN.

Pourcentage de prolifération des lymphocytes T activés par anti-CD3/CD28 seuls à J5 (gris), en présence de CSM-GW (vert), ou de CSM-GW-IFN (rouge), en l'absence (vide) ou en présence dès le début de la co-culture de 1L-méthyltryptophane à 1 mmol/L (mosaïque carrée), ou à 0,5 mmol/L (hachures). L'ajout de 1L-MT reverse complètement l'effet immunosuppresseur des CSM-GW et des CSM-GW-IFN à la dose de 1 mmol/L ($p=0,03$ et $p=0,009$, respectivement, $n=6$, tests de Student). A la concentration de 0.5mmol/L, le 1L-MT reverse complètement l'effet des CSM-GW-IFN ($p=0.009$, $n=3$, $p=ns$ pour les CSM-GW, tests de Student).

Ces résultats nous ont permis de conclure qu'IDO était une voie prépondérante d'immunomodulation des CSM-GW et des CSM-GW-IFN envers les lymphocytes T activés *in vitro*.

2.4 Les CSM-GW-IFN ont une activité IDO augmentée

Pour conforter les résultats sur l'impact d'IDO dans l'immunomodulation des CSM-GW, nous avons procédé à des dosages du tryptophane et de ses métabolites dans les surnageants des co-cultures de lymphocytes T activés et de CSM-GW +/- IFN- γ à J5. Ces dosages ont été réalisés par l'équipe du Pr Emond à Tours par chromatographie liquide et spectrométrie de masse de haute résolution.

IDO est une enzyme qui dégrade le tryptophane en métabolites, en particulier la kynurénine et l'acide kynurénique, dont la concentration augmente dans le milieu. IDO diminue donc la concentration de tryptophane, et indirectement la synthèse d'autres dérivés du tryptophane, ne dépendant pas d'IDO, comme le 5-OH tryptophane, le tryptophol et la tryptamine.

Nous avons montré que les CSM-GW-IFN, en co-culture avec les LT activés, ont une activité enzymatique d'IDO supérieure aux CSM-GW (Figures 28 et 29).

En effet, nous avons observé une diminution du tryptophane dans le milieu de co-culture à J5 pour les conditions CSM-GW et CSM-GW-IFN, avec une diminution drastique du tryptophane lors de la co-culture des LT activés avec les CSM-GW ($p=0,0002$), et une quasi-disparition du tryptophane avec les CSM-GW-IFN ($p<0,0001$) (Figure 28A). Il y a une tendance à une diminution supérieure du tryptophane avec les CSM-GW-IFN en comparaison avec les CSM-GW ($p=0,06$).

Parallèlement, nous avons observé une diminution de 5-OH-tryptophane ($p=0,04$ pour les CSM-GW, $p=0,0007$ pour les CSM-GW-IFN, Figure 28 B), de la tryptamine ($p=0,003$ pour les CSM-GW, $p=0,002$ pour les CSM-GW-IFN, Figure 28C) et du tryptophol (tendance pour les CSM-GW, $p=0,05$, et significativité pour les CSM-GW-IFN, $p=0,006$, Figure 28 D).

En aval de la voie d'IDO, nous avons observé une augmentation de la kynurénine avec les CSM-GW ($p=0,0022$) et les CSM-GW-IFN ($p<0,0001$), avec une différence à la limite de la significativité entre CSM-GW et CSM-GW-IFN ($p=0,05$, Figure 28 E). Nous avons également observé une augmentation d'acide kynurénique dans le surnageants des

co-cultures avec CSM-GW-IFN ($p=0,0004$), avec une différence significative entre CSM-GW et CSM-GW-IFN ($p=0,003$, Figure 28 F).

Ainsi, IDO est activée et diminue le tryptophane et métabolites du tryptophane non IDO dépendants, tout en augmentant la kynurénine et l'acide kynurénique dans le milieu. Les CSM-GW-IFN produisent plus d'acide kynurénique que les CSM-GW en présence de LT activés.

Lors de l'ajout de 1L-MT à 0,5 mmol/L, il y a une réaugmentation du tryptophane ($p=0,01$), du 5-OH-tryptophane ($p=0,019$) et du tryptophol ($p=0,003$) pour les CSM-GW-IFN, et seulement du tryptophol pour les CSM-GW ($p=0,03$) (Figure 28). Cependant, en présence de 1L-MT, nous n'avons pas observé de diminution de la kynurénine (mais plutôt une augmentation de la kynurénine pour les CSM-GW-IFN), et aucune modification de l'acide kynurénique n'a été objectivée lors de l'ajout de 1L-MT à 0,5 mmol/L (Figure 28 E et F).

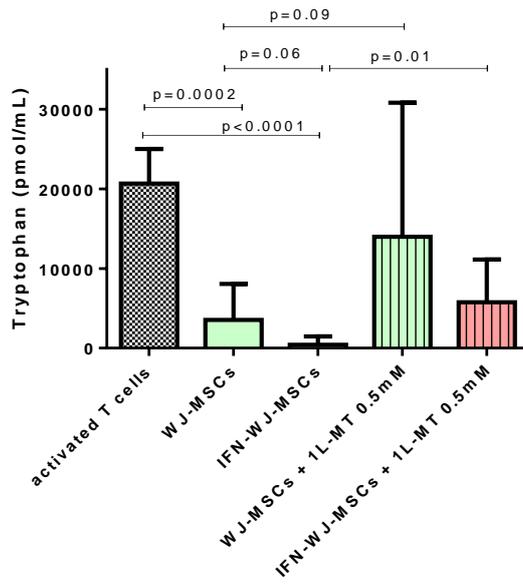
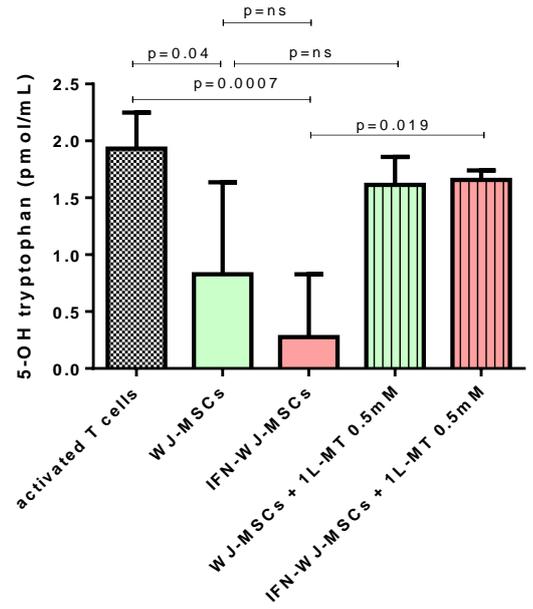
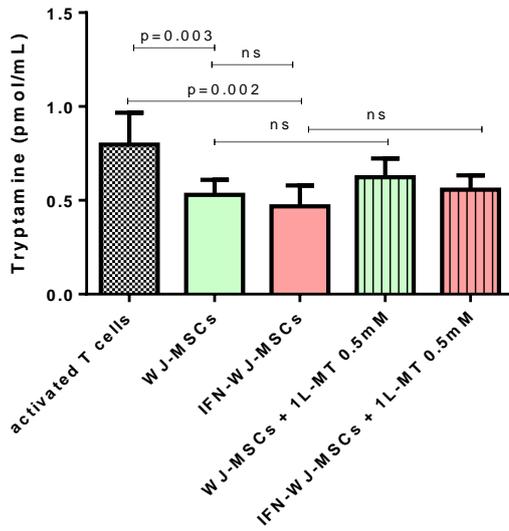
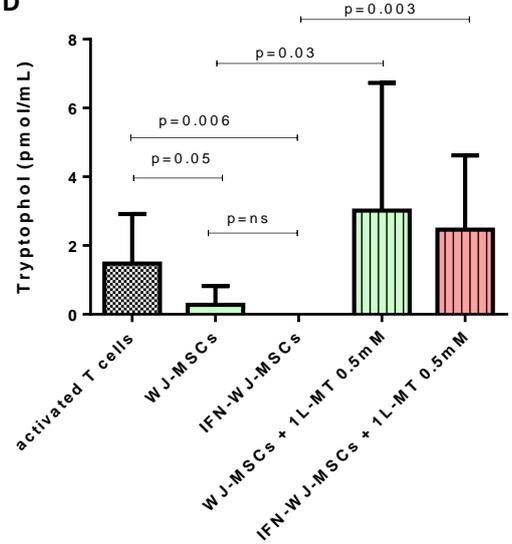
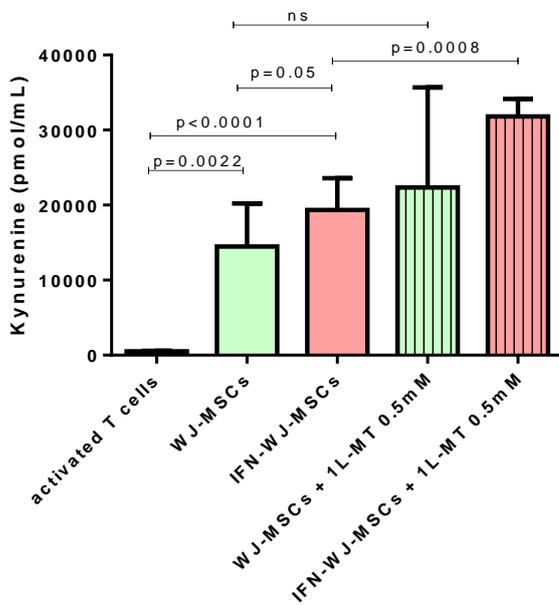
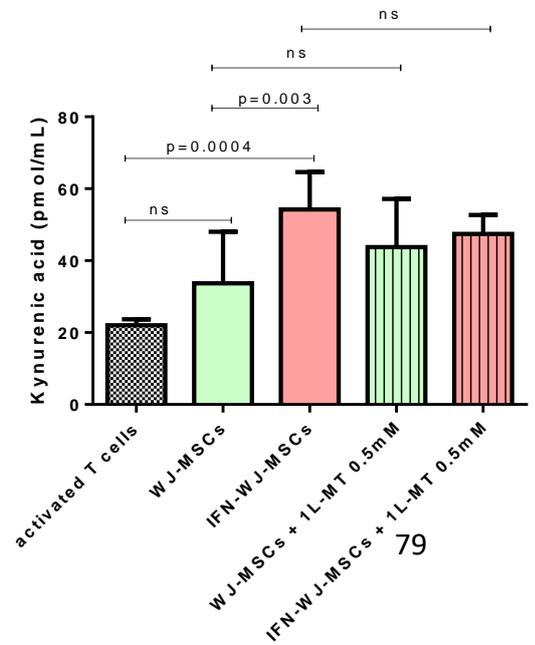
A**B****C****D****E****F**

Figure 28. Effets de l'inhibition d'IDO sur les métabolites du tryptophane

Dosages des métabolites du tryptophane dans les milieux de co-culture entre lymphocytes T activés (gris) (n=3) et CSM-GW (vert) (n=6), ou CSM-GW-IFN (rouge) (n=6), sans ou avec 1L-méthyltryptophane à 0,5 mM (hachures) (n=3). Les comparaisons statistiques ont été réalisées par des tests de Student. A. Concentration de tryptophane en fin de co-culture. B. Concentration de 5-OH tryptophane. C. Concentration de tryptamine. D. Concentration de tryptophol. E. Concentration de kynurénine. F. Concentration d'acide kynurénique.

Pour confirmer le rôle prédominant de la voie d'IDO comme mécanisme d'action des CSM-GW, et pour vérifier que le 1L-MT inhibait bien IDO (bien que la kynurénine et l'acide kynurénique ne soient pas diminués par le 1L-MT), nous avons comparé le ratio entre la somme des métabolites du tryptophane dépendant d'IDO à des concentrations supérieures aux seuils de détection (Kynurénine + acide kynurénique + 3-OH-kynurénine + acide quinolinique + acide xanthurénique) et la somme du tryptophane et autres dérivés, ne dépendant pas d'IDO (tryptophane + 5-OH-tryptophane + tryptamine + sérotonine + tryptophol). Ce ratio représente l'activité de l'enzyme IDO. Comme le montre la Figure 29, l'activité enzymatique d'IDO est augmentée dans les surnageants de co-culture contenant des CSM-GW-IFN par rapport aux LT activés seuls ($p=0,002$), avec une différence significative entre CSM-GW et CSM-GW-IFN ($p=0,02$). Cette analyse confirme par ailleurs que le 1L-MT à la concentration de 0,5mM et de 1mM inhibe l'activité d'IDO *in vitro* (Figure 29).

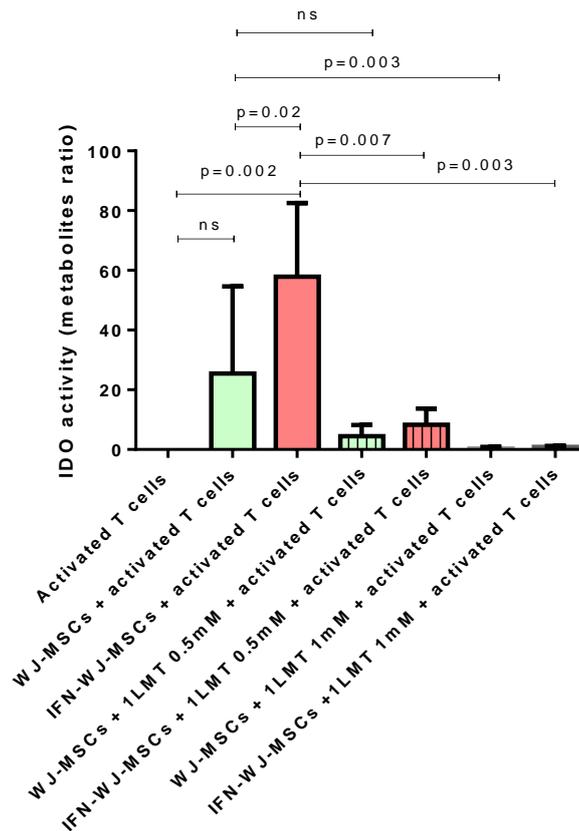


Figure 29. Estimation de l'activité enzymatique d'IDO

L'activité d'IDO en fin de co-culture est estimée par le ratio entre la somme des métabolites du tryptophane dépendant d'IDO à des concentrations supérieures aux seuils de détection (Kynurénine + acide kynurénique + 3-OH-kynurénine + acide quinolinique + acide xanthurénique) et la somme du tryptophane et autres dérivés, ne dépendant pas d'IDO (tryptophane + 5-OH-tryptophane + tryptamine + sérotonine + tryptophol). Ce ratio augmente dans les surnageants de culture contenant des LT activés + CSM-GW-IFN par rapport aux LT activés seuls ($p=0,002$), avec une différence significative entre CSM-GW et CSM-GW-IFN ($p=0,02$). L'adjonction de IL-MT à 0,5 et 1 mM/L inhibe l'activité enzymatique d'IDO avec CSM-GW-IFN ($p=0,007$ et $p=0,003$ respectivement) ($n=6$ pour les conditions avec CSM-GW +/- IFN, et $n=3$ pour les lymphocytes T seuls et les conditions avec IL-MT, tests de Student).

2.5. Outre l'activation d'IDO, le contact cellulaire entre CSM-GW (ou CSM-GW-IFN) et les lymphocytes T est nécessaire à leur effet immunosuppresseur.

Afin de déterminer le rôle du contact cellulaire entre les CSM et les LT, nous avons réalisé des co-cultures en présence d'un transwell de diamètre 0,4 μm , les CSM étant disposées au-dessus de l'insert et les LT activés par CD3/CD28 en-dessous. Ainsi, les échanges de molécules solubles entre CSM et LT étaient préservés, mais aucun contact cellulaire n'était possible.

Ces expériences ont clairement montré que l'absence de contact cellulaire était associée à une réversion complète de l'effet antiprolifératif des CSM-GW ($p=0,0002$) et quasi-complète des CSM-GW-IFN ($p=0,017$) (Figure 30).

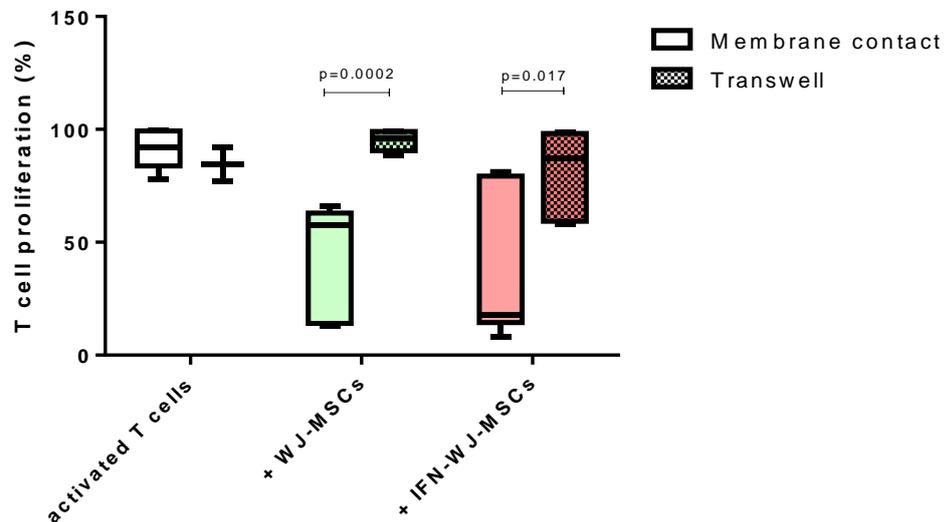


Figure 30. Le contact entre CSM et lymphocytes est nécessaire pour les effets d'immunosuppression des LT par les CSM-GW et CSM-GW-IFN.

Pourcentage de prolifération des LT activés par CD3/CD28 seuls ou en co-culture avec CSM-GW (vert) et CSM-GW-IFN (rouge) en fonction de la possibilité de contact cellulaire (vide) ou de l'absence de contact (hachures). L'effet immunosuppresseur des CSM-GW et de CSM-GW-IFN est réversé en l'absence de contact cellulaire avec les LT ($p=0,0002$ et $p=0,017$, respectivement) ($n=6$, tests de Student).

Afin de déterminer si le contact cellulaire était nécessaire à l'activation d'IDO, nous avons analysé les métabolites du tryptophane et comparé l'activité d'IDO comme décrit précédemment dans les surnageants des puits de co-cultures CSM/LT activés avec ou sans transwell.

Nous n'avons pas observé de différence d'activité d'IDO entre les co-cultures contenant des LT activés et des CSM-GW ou des CSM-GW-IFN, que les cellules soient en contact cellulaire ou pas (Figure 31). Ainsi, le contact cellulaire ne semble pas être nécessaire à la production d'IDO par les CSM, mais le contact cellulaire reste nécessaire aux propriétés immunosuppressives des CSM-GW dans ces expériences. Nous en avons déduit qu'en

l'absence de contact cellulaire, les CSM perdaient leurs capacités immunosuppressives par un mécanisme indépendant d'IDO et du métabolisme du tryptophane.

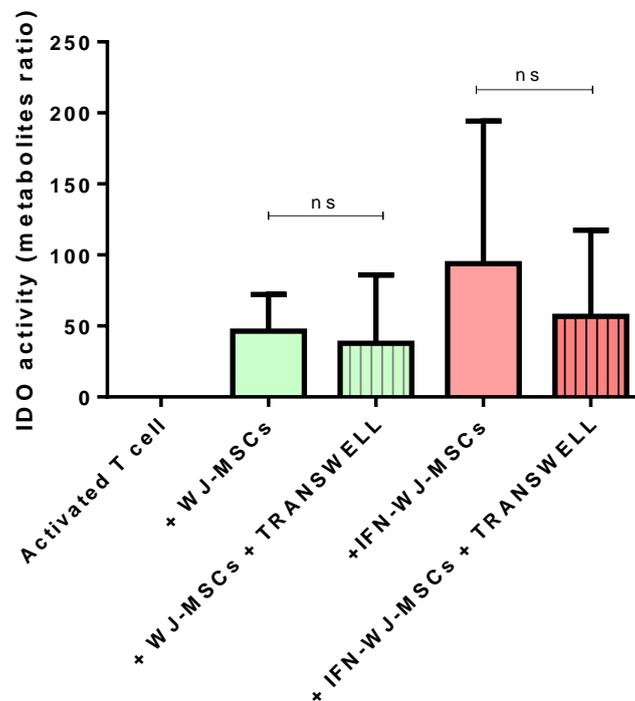


Figure 31. Effet du contact cellulaire sur l'activité IDO dans les co-cultures CSM-GW/LT activés.

Comparaison de l'activité d'IDO, estimée par le ratio des métabolites décrits précédemment, dans les co-cultures de LT activés sans CSM, LT activés en présence de CSM-GW (vert) et CSM-GW-IFN (rouge) avec (hachuré) ou sans (vide) transwell. Absence de différence entre les conditions avec et sans transwell pour les 2 types de CSM-GW alors que la prolifération des LT étaient complètement restaurée en présence de CSM-GW +/- IFN en l'absence de contact cellulaire (n=4, de 2 souches de CSM différentes, tests de Student).

2.6 IDO et transfert mitochondrial

Puisque le contact cellulaire permet le transfert de mitochondries, un mécanisme plus récemment décrit comme impliqué dans l'inhibition de la prolifération des LT en présence de CSM (126), nous avons exploré le transfert mitochondrial des CSM-GW et CSM-GW-IFN vers les lymphocytes T activés dans nos conditions de culture et par la technique du Mitotracker. Celle-ci consiste à marquer les mitochondries des cellules vivantes, indépendamment du potentiel de membrane des mitochondries. Les sondes Mitotrackers

diffusent passivement à travers la membrane plasmique, puis s'accumulent dans les mitochondries actives grâce à leur terminaison chlorométhyl réactive aux thiols. Le Mitotracker Green reste dans les mitochondries des cellules vivantes quel que soit leur potentiel de membrane, mais ne permet pas la fixation des cellules car est relargué en cas de mort cellulaire.

Le suivi du marquage des mitochondries de CSM-GW par un Mitotracker nous a permis de détecter par cytométrie en flux, dès J2 de la co-culture entre CSM-GW +/- IFN et LT activés par CD3/CD28, l'existence d'un transfert mitochondrial des CSM-GW vers des LT activés (Figure 32A). Le pourcentage de transfert est comparable entre les CSM-GW-IFN et les CSM-GW (Figure 32A et 32C).

Ce transfert de mitochondries est complètement aboli, aussi bien avec les CSM-GW que les CSM-GW-IFN, en présence d'un transwell entre les lymphocytes T activés et les CSM-GW. Par conséquent, le contact cellulaire entre les CSM-GW et les LT est nécessaire pour observer le transfert de mitochondries (Figure 32 A).

Nous avons analysé l'impact du transfert sur les capacités prolifératives des LT activés. Ainsi, nous avons observé que les LT CD4+ ayant reçu des mitochondries (Mito+) prolifèrent significativement moins que les LT n'ayant pas reçu de mitochondries (Mito-), que ce soit en présence de CSM-GW ($p=0,02$) ou de CSM-GW-IFN ($p=0,009$) (Figure 32 B). La même tendance existe pour les LT CD8+ (Figure 32B).

Concernant le taux de transfert mitochondrial, il est supérieur vers les LT CD4+ (de 19,9 à 39,7%) par rapport aux LT CD8+ (de 5 à 20%, $p < 0,0001$, Figure 32 C). Nous avons ensuite exploré le rôle d'IDO dans le transfert de mitochondries en ajoutant ou non le 1L-MT aux co-cultures CSM-GW/LT activés. L'inhibition d'IDO diminue légèrement le pourcentage de LT ayant reçu des mitochondries à J5 de co-culture avec les CSM-GW, (mais cette diminution n'est pas statistiquement significative), et elle ne modifie pas le taux de transfert de mitochondries vers les LT activés avec les CSM-GW-IFN (Figure 32 C).

Par contre, l'inhibition d'IDO par le 1L-MT restaure la prolifération des LT (CD4+ et CD8+) Mito+ et LT Mito-. Pour les LT CD4+ : en présence de CSM-GW, la prolifération des LT activés n'ayant pas reçu de mitochondries (Mito-) passe de 60% en médiane (IQR 41-77) sans 1L-MT à 107%(IQR 106-109) en présence de 1L-MT ($p=0,01$), et ceux ayant reçu

des mitochondries (Mito+) de 15.8% (IQR 10-52) sans inhibition d'IDO à 85% (IQR 62,6-98) en présence de l'inhibiteur d'IDO ($p=0,02$) (Figure 32D). Cette restauration de la prolifération des LT CD4+ Mito+ a aussi été constatée en co-culture avec les CSM-GW-IFN : la prolifération des LT Mito- augmente de 32% (IQR 25-38.2), sans 1L-MT à 98% (IQR 83-111) avec 1L-MT ($p=0,0002$) et celle des LT Mito + passe de 11.2% (IQR 7.8-23.8) sans inhibiteur d'IDO à 74.4% (IQR 62.7-98.2) en présence d'inhibition d'IDO ($p=0,001$) (Figure 32D). Pour les LT CD8+ : en présence de CSM-GW, la prolifération des LT activés n'ayant pas reçu de mitochondries (Mito-) passe de 83% (IQR 66.3-88.2) en médiane sans 1L-MT à 110% (IQR 107-116) en présence de 1L-MT ($p=0,01$), et ceux ayant reçu des mitochondries (Mito+) de 51% (IQR 39-58) sans inhibition d'IDO à 101% (IQR 96-110) en présence de l'inhibiteur d'IDO ($p=0,001$) (Figure 32E). En présence des CSM-GW-IFN : la prolifération des LT Mito- augmente de 44% (IQR 36.2.-64) sans 1L-MT à 108% (IQR 96-116) avec 1L-MT ($p=0,004$) et celle des LT Mito + passe de 26% (IQR 20-30) sans inhibiteur d'IDO à 102% (IQR 89-108) en présence d'inhibition d'IDO ($p=0,003$) (Figure 32E).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le transfert de mitochondries entre CSM-GW et LT activés est un mécanisme d'immunosuppression, contact dépendant, agissant en synergie avec IDO. En effet les LT activés ayant reçu du matériel mitochondrial des CSM-GW sont plus inhibés dans leurs capacités prolifératives que les LT n'ayant pas reçu de mitochondries. L'activité d'IDO n'est pas nécessaire au transfert de mitochondries mais est importante pour que le transfert de mitochondries ait une action immunosuppressive puisque l'inhibition d'IDO restaure la prolifération des LT Mito+.

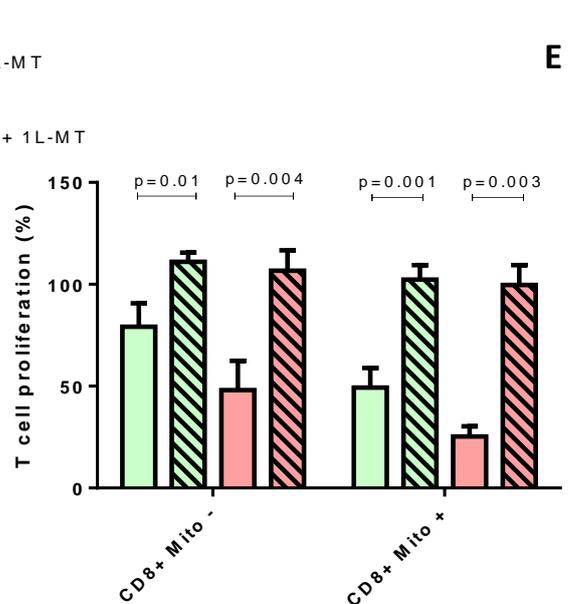
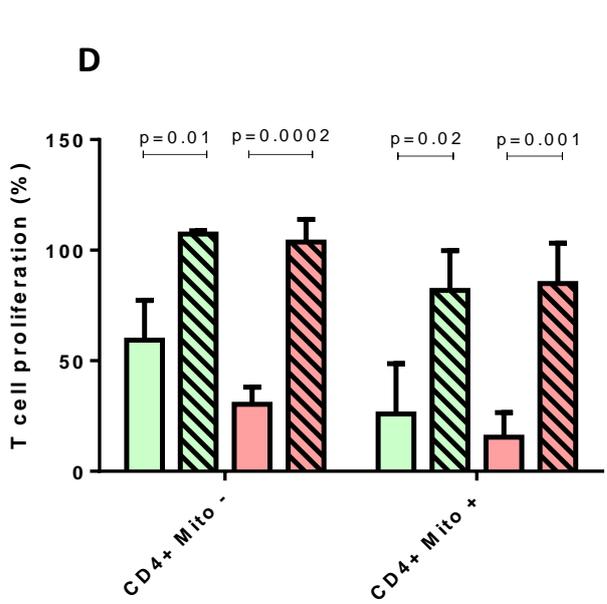
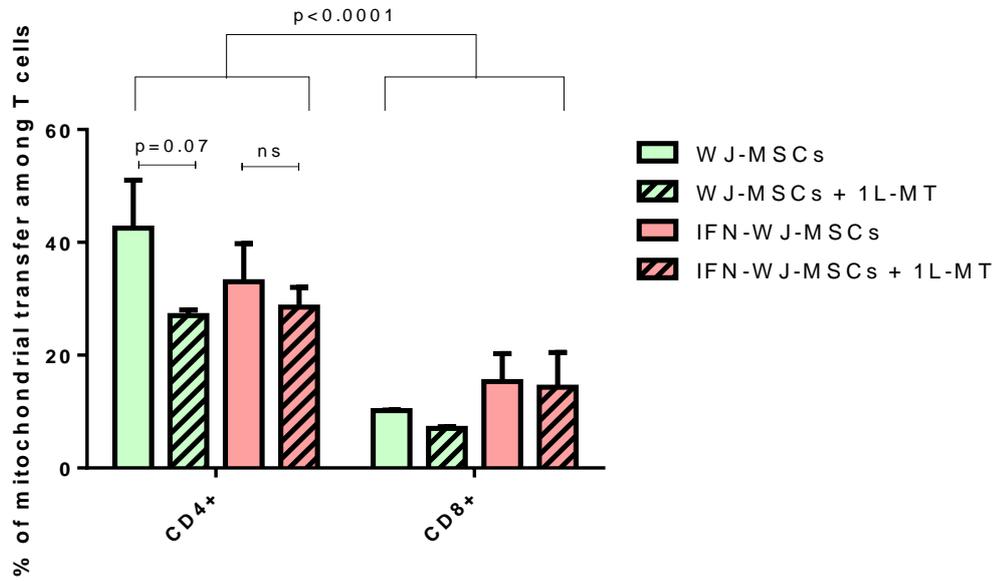
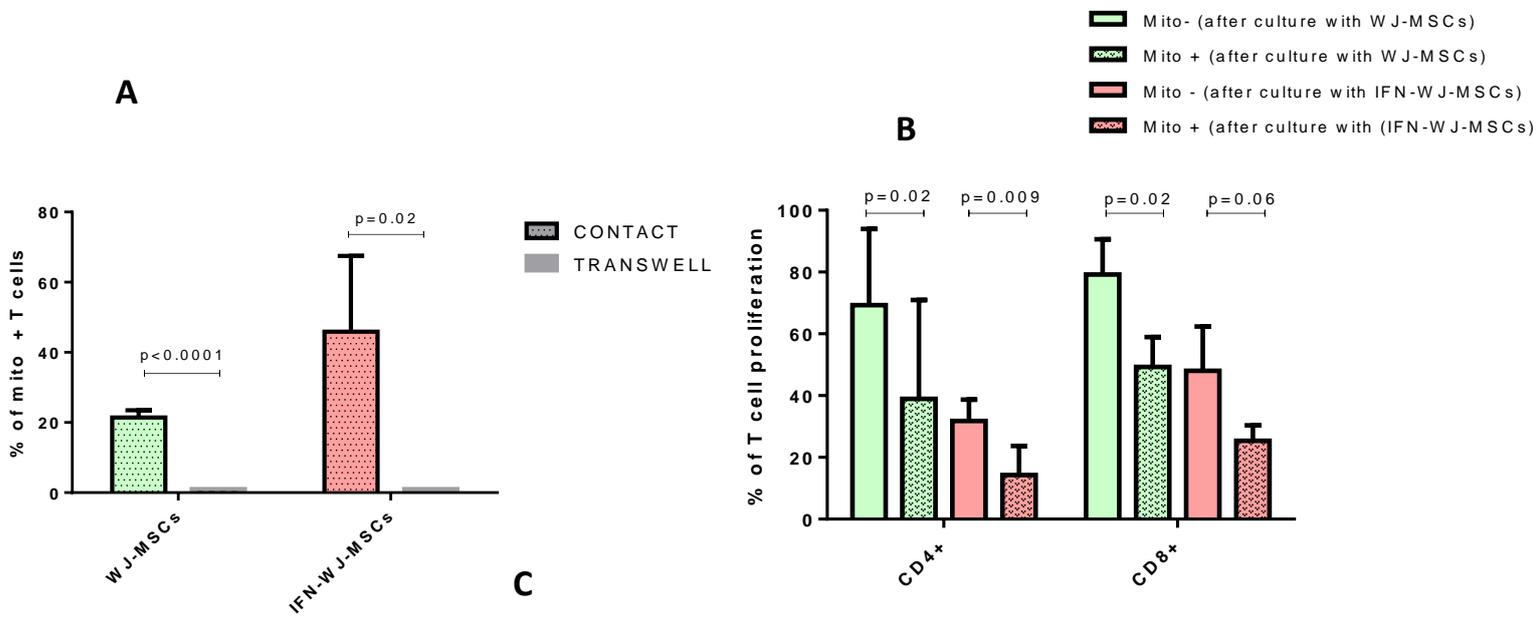


Figure 32. Transfert mitochondrial des CSM-GW +/- IFN vers les LT activés : rôle du contact cellulaire et d'IDO.

A. Pourcentage de LT activés ayant reçu des mitochondries en fin de co-culture avec les CSM-GW (vert) ou des CSM-GW-IFN (rouge) avec (contact) et sans contact cellulaire (transwell). L'absence de contact inhibe le transfert de mitochondries en cas de CSM-GW ($p < 0,0001$) et de CSM-GW-IFN ($p = 0,02$), ($n = 3$, tests de Student). B. Prolifération des LT activés selon qu'ils aient reçu des mitochondries (Mito+) ou non (Mito-) en co-culture avec les CSM-GW et CSM-GW-IFN. Les LT Mito+ ont une plus forte diminution de leur capacité de prolifération que les LT Mito- en présence de CSM-GW ($p = 0,02$) et de CSM-GW-IFN ($p = 0,009$); ($n = 4$, tests de Student appariés). C. L'ajout de 1L-MT à la concentration de 1mM tend à diminuer le taux de LT Mito+ lors de la co-culture avec CSM-GW (sans être significatif $p = 0,07$), mais n'impacte pas le taux de transfert CSM-GW-IFN vers les LT activés ($n = 4$, test de Student). Le taux de transfert vers les LT CD4+ est supérieur au taux de transfert vers les LT CD8+ ($p < 0,0001$) D. Le 1L-MT reverse complètement l'inhibition de la prolifération des LT CD4+ Mito+ et Mito- induite par des CSM-GW et par des CSM-GW-IFN ($n = 4$, tests de Student). E. Le 1L-MT reverse complètement l'inhibition de la prolifération des LT CD8+ Mito+ et Mito- induite par des CSM-GW-IFN ($n = 4$, tests de Student).

Nous avons finalement exploré le métabolisme de LT activés en présence de CSM-GW-IFN pour déterminer les conséquences métaboliques de l'activité d'IDO et du contact cellulaire (soit potentiellement le transfert de mitochondries sur les LT) et si celles-ci pouvaient expliquer l'inhibition de la prolifération des LT activés par ces 2 mécanismes d'action des CSM-GW.

Nous avons analysé le métabolisme des LT activés en présence de CSM-GW-IFN en fin de co-culture par la technique de Seahorse et comparé les conditions avec et sans contact cellulaire, et avec et sans inhibition d'IDO par le 1L-MT (Figure 33).

La technique Seahorse permet de mesurer le taux de consommation d'oxygène (OCR) et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR) d'un tapis de cellules vivantes. Ce sont 2 indicateurs clés de la respiration mitochondriale (pour l'OCR) et de la glycolyse (pour l'ECAR).

Les 3 premières mesures sont réalisées à l'état basal. Les 3 mesures suivantes sont faites après ajout d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase (complexe V) qui diminue le flux d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons, et de ce fait diminue la respiration mitochondriale (et l'OCR). Cette réduction d'OCR est proportionnelle à la production d'ATP cellulaire (plus l'OCR diminue après oligomycine, plus la cellule produit d'ATP). Les 3 mesures suivantes sont faites après injection de Fccp (Carbonyl cyanide-4 (trifluorométhoxy) phénylhydrazone) qui abolit le gradient de protons et induit donc une interruption du potentiel

de membrane. Ceci permet la reprise du flux d'électrons et la consommation d'O₂ est alors maximale. Suivant cette injection, on mesure donc la capacité respiratoire maximale mitochondriale, permettant aux cellules de répondre à l'augmentation de demande énergétique ou au stress. Enfin, les 3 dernières mesures sont réalisées après injection de Roténone et Antimycine A, inhibiteurs des complexes I et III. Ces inhibiteurs coupent la respiration mitochondriale et permettent donc le calcul de la respiration non mitochondriale (consommation d'O₂ hors de la mitochondrie).

L'acidification extracellulaire traduit le niveau de glycolyse. Le rapport OCR/ECAR permet d'évaluer la prépondérance d'un mécanisme de phosphorylation oxydative ($OCR > ECAR$) ou la prépondérance de la glycolyse ($ECAR > OCR$).

Nous avons ainsi mis en évidence que les LT activés en l'absence de CSM-GW avaient un métabolisme glycolytique prépondérant ($OCR < ECAR$, et donc ratio $OCR/ECAR < 1$, Figure 33 C).

Les LT activés en contact avec les CSM-GW utilisent la voie de la phosphorylation oxydative ($ECAR > OCR$, ratio $OCR/ECAR > 1$, Figure 33 C). Nous observons une diminution plus marquée de l'OCR des LT après oligomycine, en cas de co-culture des LT avec les CSM-GW, ce qui témoigne d'une production d'ATP élevée (Figure 33 A). Après ajout de Fccp, le niveau d'OCR est plus élevé, témoignant d'une respiration maximale augmentée (Figure 33 A). Enfin, après ajout de Roténone et Antimycine A, le niveau de la courbe est superposable aux autres conditions, témoignant donc d'une réserve respiratoire essentiellement mitochondriale (Figure 33 A). Par ailleurs, le ratio $OCR/ECAR$ est > 1 , témoignant donc, pour les LT activés en présence de CSM-GW, d'une phosphorylation oxydative prépondérante (Figures 33 A, B et C).

L'ajout de 1L-MT, à la concentration de 1 mmol/L, entraîne une diminution du niveau d'OCR basal pour les LT activés en co-culture avec les CSM-GW (Figure 33 B). Par ailleurs, la production d'ATP, analysée par la diminution du niveau d'OCR après oligomycine, en cas de 1L-MT, est moindre que sans inhibiteur d'IDO (Figure 33 B). La respiration maximale est également diminuée en présence de 1L-MT (Figure 33 B). Enfin, le ratio $OCR/ECAR$ est environ égal à 1, ce qui témoigne d'un état métabolique des T intermédiaire avec à la fois de

la glycolyse et de la phosphorylation oxydative. Il y a donc une réversion partielle de l'état métabolique, moins oxydatif et plus glycolytique que sans 1L-MT (Figure 33 A, B et C).

Ainsi, nous pouvons affirmer qu'IDO inhibe la glycolyse des LT activés, tout en augmentant la capacité respiratoire mitochondriale, et la phosphorylation oxydative.

Nous avons ensuite étudié l'impact du contact entre CSM-GW et LT activés, pour la modulation du métabolisme des LT.

Lorsqu'un transwell sépare les CSM-GW des LT activés, nous observons les mêmes modifications qu'avec l'inhibiteur d'IDO (les courbes sont superposables), à savoir : une diminution du rapport OCR/ECAR qui est proche de 1 (Figure 33 B et C), une diminution de la production d'ATP, une diminution de la capacité respiratoire mitochondriale par rapport aux LT activés en contact avec les CSM-GW (Figure 33 B et C).

Il apparaît donc qu'IDO, et le contact entre LT activés et CSM-GW, sont 2 éléments indépendants et nécessaires, conduisant aux mêmes transformations métaboliques des LT activés : une diminution de la glycolyse au profit de la phosphorylation oxydative, une production supérieure d'ATP et une capacité respiratoire mitochondriale maximale exacerbée.

La double inhibition d'IDO et du contact cellulaire entre CSM et LT induit un état métabolique quasi similaire aux LT activés seuls (Figure 33B et C). IDO et le contact cellulaire sont donc complémentaires et synergiques dans leurs effets sur le métabolisme des LT activés.

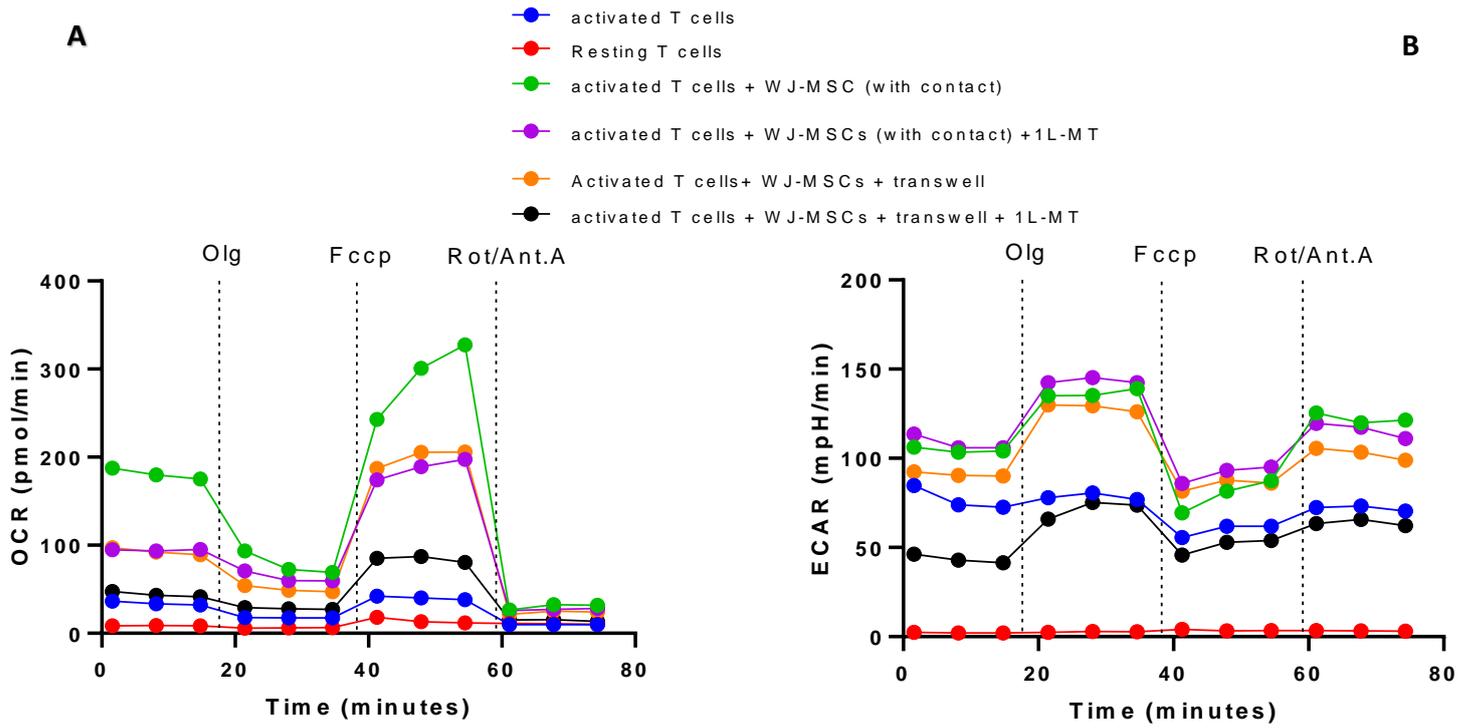


Figure 33. Analyse du métabolisme des lymphocytes T en fin de co-culture.

A. Niveau d'OCR des lymphocytes T pour les différentes conditions de culture (T activés, T non activés, T activés + CSM-GW en contact et avec transwell, T activés + CSM-GW avec IL-MT), n=1 source de CSM-GW, à l'état basal, après injections d'oligomycine, Fccp, Roténone et Antimycine A. B. Niveau d'ECAR pour les différentes conditions. C. Ratio OCR/ECAR (test de Mann-Whitney, n=2 sources de CSM-GW) : le ratio est en médiane de 0,27 (IQR 0,19-0,44) pour les LT activés, témoignant d'une activité métabolique glycolytique prépondérante. Ce ratio est en médiane de 2,82 (IQR 1,39-5,40) lorsque les LT activés ont été en contact avec les CSM-GW, témoignant d'une phosphorylation oxydative prépondérante sur la glycolyse ($p < 0,0001$). Ce ratio est en médiane de 0,87 (IQR 0,76-0,95) lors de l'ajout de IL-MT, et de 1,02 (IQR 0,39-2,31) lorsqu'un transwell sépare les LT activés des CSM-GW, et cette différence est significative, à la fois pour la condition IL-MT et la condition transwell, par comparaison avec les LT activés seuls ($p < 0,0001$ et $p = 0,0006$) et avec les LT activés en contact avec les CSM-GW ($p = 0,001$ et $p = 0,01$).

2.7 Les CSM-GW-IFN entraînent une élévation de la concentration des chémoattractants IL-6, MCP-1 et IL-8 dans les surnageants de co-culture avec les LT

La démonstration du rôle crucial du contact entre les CSM-GW et les LT activés nous a conduit à analyser les chimiokines qui permettraient d'induire ce contact, en dosant dans le surnageant des co-cultures, à l'aide d'un kit Protéome Profiler Human Adipokine Array, des cytokines, chimiokines et adipokines.

Nous avons constaté que les cytokines et chimiokines IL-1 β , IL-6, MCP-1 et IL-8 étaient particulièrement augmentées lors des co-cultures des LT activés avec les CSM-GW-IFN par rapport aux co-cultures des LT activés avec des CSM-GW non primées, et par rapport aux LT activés seuls, alors que le TNF- α était effondré (Figure 34).

Nous pourrions émettre l'hypothèse que cette élévation de cytokines et chimiokines inflammatoires pourrait entraîner une chémo-attraction des neutrophiles, des monocytes/macrophages, et des lymphocytes T, et ainsi favoriser leur contact avec les CSM-GW-IFN. Cependant, à ce stade, cette hypothèse nécessite d'être vérifiée.

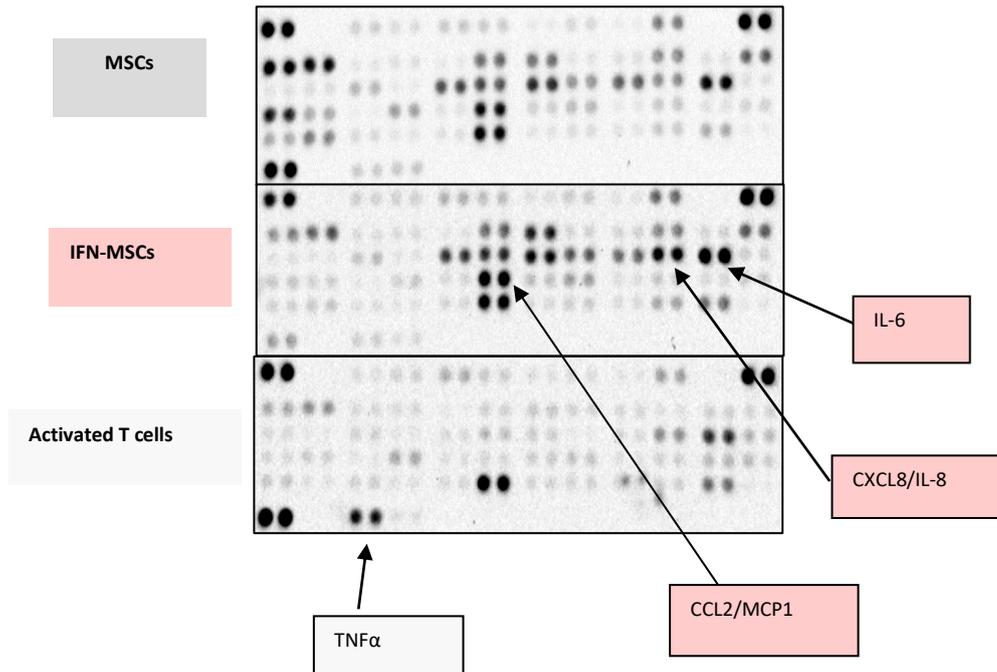


Figure 34. Profil protéomique des surnageants de co-cultures CSM-GW et LT activés

Quantification relative des chimiokines et cytokines détectées par analyse protéomique dans le surnageant obtenu le 5^{ème} jour des co-cultures entre LT activés et CSM-GW (en haut), ou CSM-GW-IFN (au milieu) en comparaison des LT activés seuls (en bas) (n=1 co-culture, kit Protéome Profiler Human Adipokine Array).

3. Impact des CSM-GW et CSM-GW-IFN sur la xéno-GVH *in vivo*

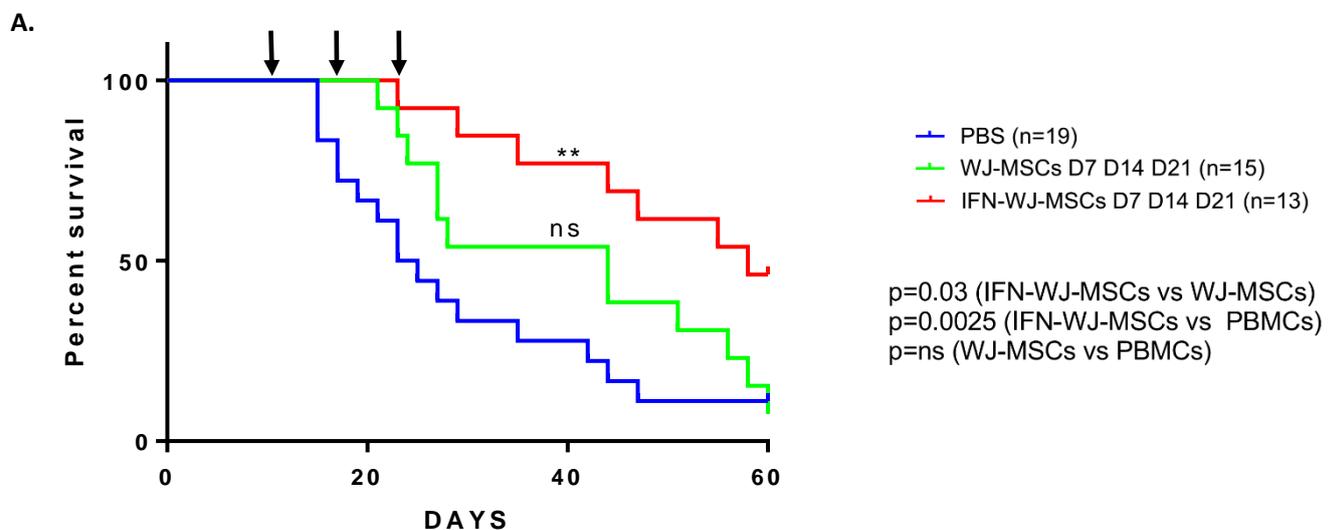
3.1 L'injection intraveineuse répétée de CSM-GW-IFN diminue la mortalité des souris en diminuant l'incidence et la sévérité de la GVH.

Compte tenu des propriétés immunosuppressives supérieures des CSM-GW primées par IFN, nous avons voulu tester leur effet immunosuppresseur par rapport à des CSM-GW non primées dans un modèle de xéno-GVH, chez la souris NSG comme décrit dans matériels et méthodes. Brièvement, la xéno-GVH est induite chez ces souris immunodéprimées par administration de PBMC humaines après avoir réalisé une irradiation corporelle à la souris à dose sublétales en guise de conditionnement.

Nous avons ensuite traité les souris greffées par des PBMC humaines avec des injections itératives de 500 000 CSM-GW ou CSM-GW-IFN à J7, J14, J21 de la greffe. En effet, une seule injection de 500 000 CSM-GW ou CSM-GW-IFN à J0 ou J7 ne permettait pas d'améliorer la survie des souris par rapport aux contrôles dans des expériences antérieures non montrées.

Les souris ayant reçu 3 injections de CSM-GW-IFN ont eu une survie statistiquement prolongée comparativement aux souris ayant reçu des CSM-GW ou des PBMC seules (Figure 35A).

La prise de greffe est globalement similaire dans les trois groupes : le chimérisme sanguin (marquage CD45 panleucocytaire humain) précoce à J21 était au moins équivalent voire supérieur dans le groupe CSM-GW-IFN (Figure 35 B) comparativement aux deux autres groupes. A partir de J30, le chimérisme est comparable dans les trois groupes et aucune différence dans le ratio CD4/CD8 n'a pu être mise en évidence. De plus, aucune différence dans le phénotype des LT humains circulants n'a été observée entre J30 et J45. En effet, l'expression membranaire des marqueurs d'« exhaustion » LAG-3, TIM-3 et PD-1 (Figure 35C), et la proportion de Tregs (définis comme CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻), qui étaient très minoritaires dans ce modèle (entre 1,5 et 3%, Figure 35D), étaient homogènes entre les 3 groupes de souris.



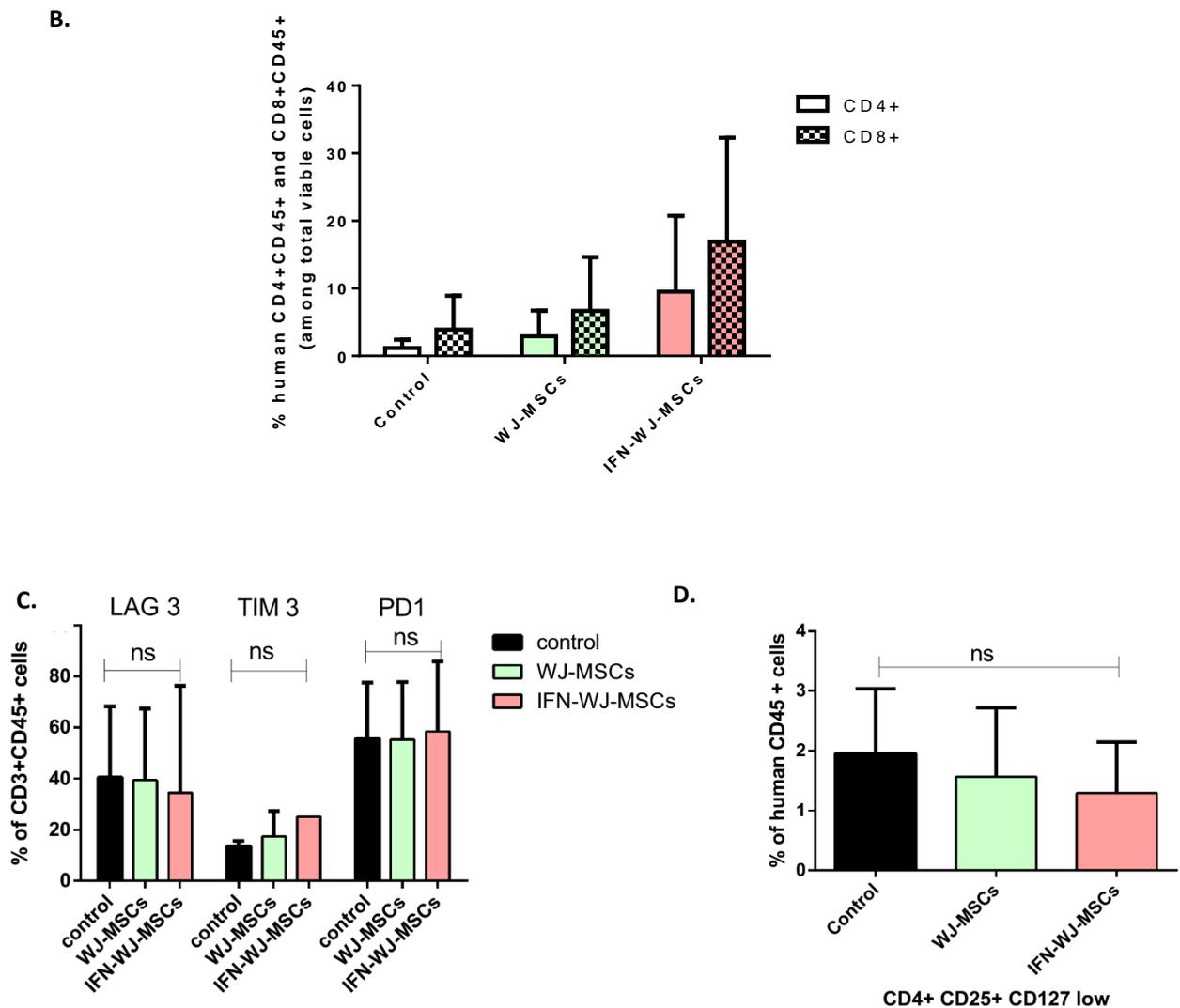


Figure 35. Les CSM-GW-IFN injectées à J7, J14 et J21 améliorent la survie des souris NSG xéno greffées par des PBMC humaines.

A. Courbes de Kaplan-Meier de la survie des souris NSG greffées avec des PBMC humaines ayant reçu 3 injections (flèches) de PBS (témoins, $n=19$, en bleu), comparativement aux souris NSG ayant reçu 3 injections de CSM-GW (courbe verte, $n=15$), et aux souris NSG ayant reçu 3 injections de CSM-GW-IFN (courbe rouge, $n=13$). Il existe une différence significative ($p=0.0025$, par le test du log-rank) entre les courbes de survie des souris ayant reçu des CSM-GW-IFN par rapport aux témoins ayant reçu du PBS. B. Chimérisme dans le sang des lymphocytes T CD45 humain, CD4+ et CD8+, à J21. Les souris ayant reçu 3 injections de CSM-GW-IFN ont eu une prise de greffe précoce au moins équivalente aux autres conditions (pas de différence significative, test de Student, $n=4$). C. Analyse de l'exhaustion des lymphocytes T humains entre J30 et J45 ($n=4$, test de Student) par l'expression de LAG-3, TIM-3 et PD-1. D. Pourcentage de Tregs définis par l'expression de CD3, CD4, CD25 et la faible expression de CD127, parmi les cellules CD45 humaines dans le sang des souris NSG, entre J30 et J45 ($n=4$, test de Student).

L'analyse histologique et immunohistochimique des tissus murins a mis en évidence (Figure 36) :

- de la GVH cutanée : infiltrat inflammatoire mononucléé du derme (autour des follicules pileux en particulier) avec figures de spongiose, d'exocytose et d'apoptose kératinocytaire (Figure 36 A).

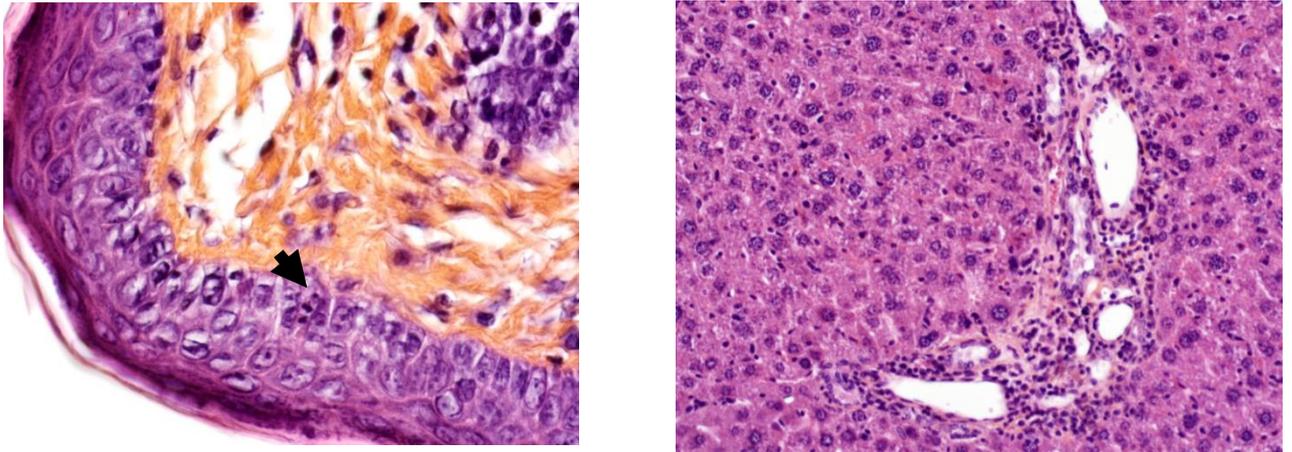
- de la GVH au niveau hépatique (Figure 36 B) : infiltration mononucléée dans les espaces portes et dans la zone centrolobulaire. L'analyse immunohistochimique a révélé qu'il s'agissait en grande majorité de lymphocytes T (exprimant le CD3 humain), et que seuls quelques lymphocytes B et cellules mono-macrophagiques étaient visualisées (Figure 36 C).

- une infiltration mononucléée splénique massive (non montrée).

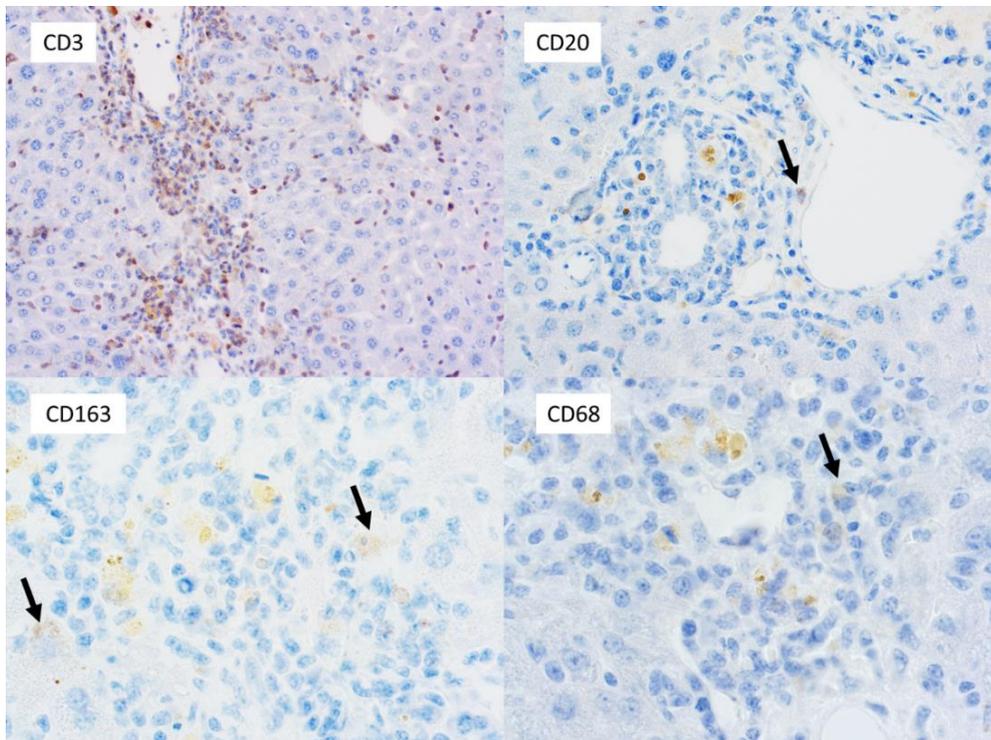
- l'absence de signe de GVH digestive sur le colon et le grêle (non montré).

Une gradation des signes histologiques de GVH a été faite en additionnant les scores du foie et de la peau (en l'absence de GVH digestive) (183). Le score de GVH histologique obtenu tend à être inférieur dans le groupe CSM-GW-IFN (score médian à 2, IQR 1,25, 2,37) par rapport aux souris témoins (score médian à 4, IQR 2-5,5), mais cette différence n'est pas significative ($p=0.08$), probablement en rapport avec le manque de puissance ($n=4$ souris dans chaque groupe, Figure 36 D)

A



C



D

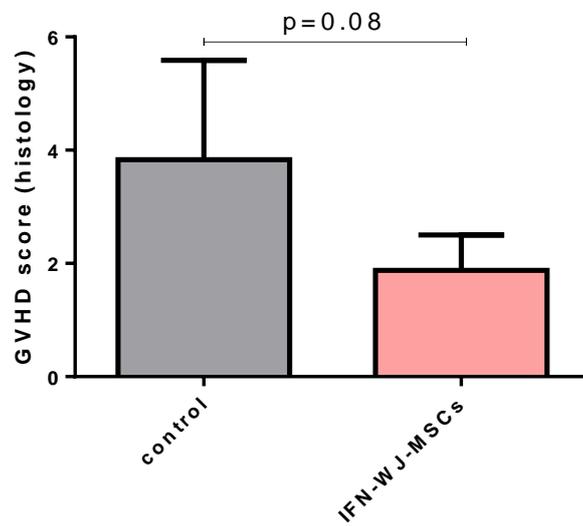


Figure 36. Aspects histologiques de GVH cutanée et hépatique, et immunohistochimiques.

A. Coupe cutanée après coloration HES, la flèche montre des images d'apoptose kératinocytaire B. Coupe hépatique après coloration HES où l'on observe l'infiltrat mononucléé. C Immunohistochimie dans des coupes hépatiques avec marquage CD3, CD20, CD68 et CD163 (anticorps dirigés contre les antigènes humains). L'infiltrat périportal est composé majoritairement de cellules lymphocytes T (CD3+). De très rares cellules B CD20+ ont été visualisées, ainsi que des cellules mono-macrophagiques humaines exprimant le CD163 et CD68. D. Le score de GVH histologique tend à être inférieur dans le groupe CSM-GW-IFN (score médian à 2, IQR 1,25- 2,37) par rapport aux souris témoins (score médian à 4, IQR 2-5,5), mais cette différence n'est pas significative ($p=0.08$), probablement en rapport avec le manque de puissance ($n=4$ souris dans chaque groupe).

3.2 Les CSM-GW-IFN entrent en contact avec les lymphocytes T au niveau des poumons, de la peau mais ne persistent pas dans ces organes au-delà de 24h

Nous avons essayé à diverses reprises de suivre le devenir des CSM-GW *in vivo* après injection intraveineuse chez la souris NSG greffée de PBMC.

- Une première tentative a consisté en un marquage par Zirconium-Oxine des CSM-GW (grâce à la compétence de l'équipe de NancycloTEP, CHRU de Nancy). Le marquage a été mis au point, mais l'injection intraveineuse des CSM contenant le Zirconium-oxine a été suivie par la mort immédiate de toutes les souris ($n=6$). La cause de ces décès à l'injection n'est pas connue et le coût de ce marquage nous a fait suspendre (transitoirement) cette voie de recherche.

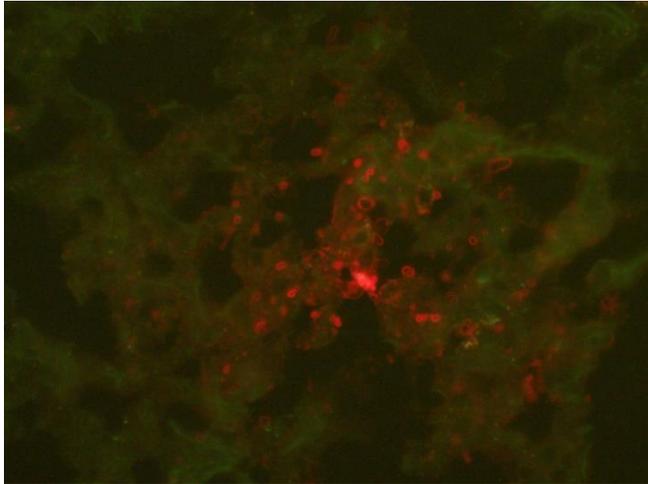
- Une deuxième tentative a consisté en la recherche en cytométrie de flux, par les marqueurs CD90, CD105 et CD73 des CSM dans le sang, la moelle osseuse, et même le foie et la rate, à 4h puis 24h de l'injection. Aucune détection n'a pu être faite par cette technique.

- Enfin, nous avons marqué des CSM-GW-IFN avec un Celltracker Deep Red Dye. Nous avons, après injection intraveineuse d'un million de CSM-GW-IFN, sacrifié les souris à H24 et H48 de l'injection. Les coupes des organes cryopréservés ont été analysées en microscopie à fluorescence.

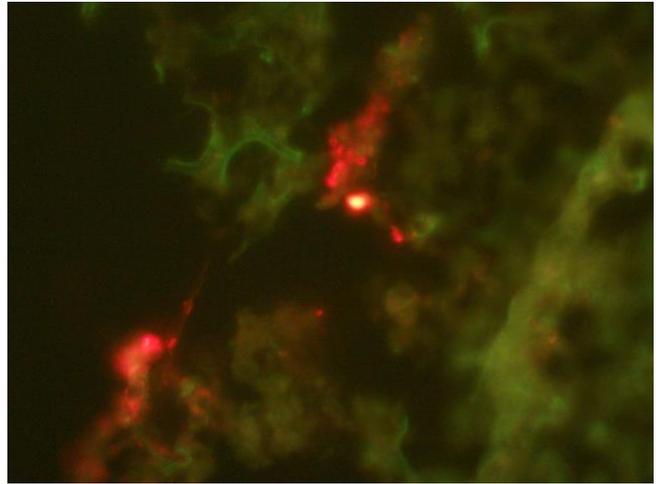
Nous avons mis en évidence les CSM-GW-IFN majoritairement au niveau pulmonaire (disposées en clusters, dans des zones plutôt pérbronchiques ou périvasculaires) et en faible

quantité au niveau du derme à H24 (Figure 37), ainsi qu'au niveau de la rate. Aucune CSM-GW n'a été visualisée dans le foie à H24. A partir de H48, aucune cellule n'a pu être visualisée dans aucun organe (n=3).

A



B



C



Figure 37. Visualisation des CSM-GW-IFN en microscopie à fluorescence à 24h de l'injection IV chez la souris NSG.

Visualisation des CSM marquées en rouge A et B : au niveau pulmonaire (en clusters plutôt périvasculaires ou péribronchiques), C : au niveau cutané.

3.3 Le plasma humain modifie l'aspect des CSM-GW *in vitro* et pourrait participer à leur clairance rapide *in vivo*.

L'une de nos hypothèses pour expliquer la clairance rapide des CSM-GW *in vivo* est que les CSM seraient phagocytées par des macrophages, ou subiraient la cytotoxicité de lymphocytes NK ou T, rapidement après leur injection intraveineuse et leur captation au niveau pulmonaire. Pourtant, elles expriment le signal « don't eat me » CD47 à leur surface, et elles ne sont pas immunogènes *in vitro*.

Puisque la voie d'administration a été incriminée par d'autres équipes dans le destin des CSM après injection, nous avons donc cherché à voir si l'injection dans le sang pouvait être responsable de cette clairance. Pour cela, nous avons analysé l'impact du plasma et de la normoxie sur les CSM-GW *in vitro*.

Le plasma humain a été ajouté à l' α -MEM (sans SVF) à différentes concentrations. L'ajout d'Hepes 1% permettait de maintenir le pH du milieu pendant les 3 premiers jours de culture.

Nous avons noté une modification de l'aspect en microscopie optique des CSM-GW dès J2 de la culture lorsque le milieu contenait au minimum 25% de plasma par rapport aux conditions basales de culture avec 5% de lysat plaquettaire. En normoxie, les CSM-GW devenaient plus rondes et plus grosses qu'en hypoxie (Figures 38A et B). Nous avons alors analysé la prolifération des CSM-GW en normoxie et en hypoxie (marquage Edu), et avons cherché des marqueurs immuno-histochimiques de sénescence (expression de β -galactosidase). Nous avons noté une très forte proportion de sénescence (jusqu'à 39% des cellules étaient β -galactosidase+ dès le 2^{ème} jour de culture) et une nette diminution de la prolifération (diminution d'Edu) lorsque les cellules étaient cultivées avec 25% de plasma en normoxie, ce qui était significativement différent des conditions de culture en normoxie sans plasma et en hypoxie avec ou sans plasma (Figure 38C et D). Pourtant, les cellules sénescents étaient bien vivantes, et étaient très immunosuppressives *in vitro* (Figure 38E).

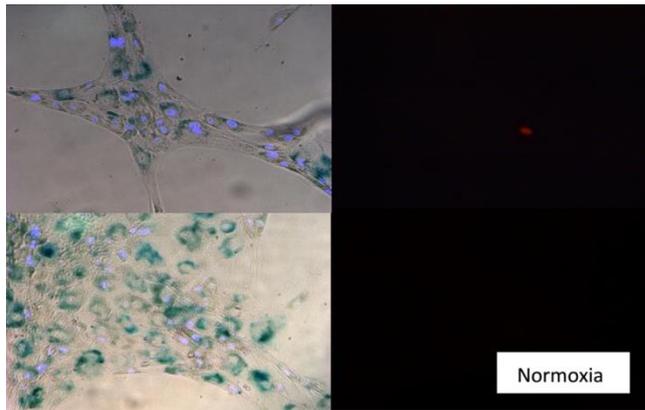
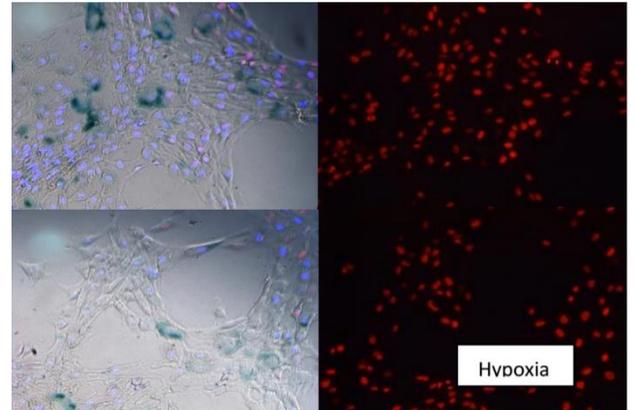
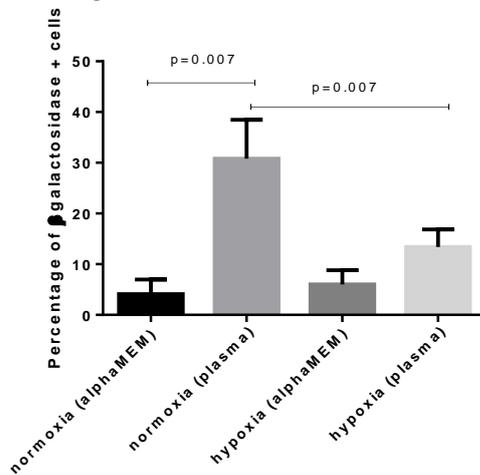
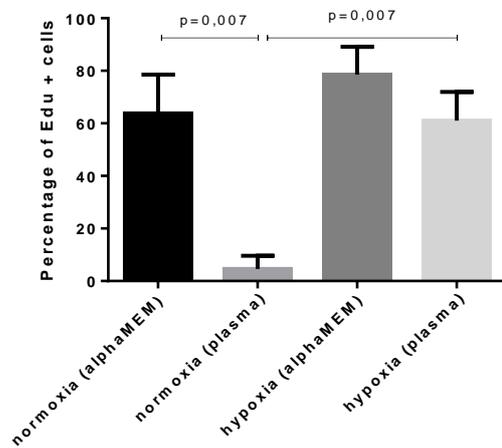
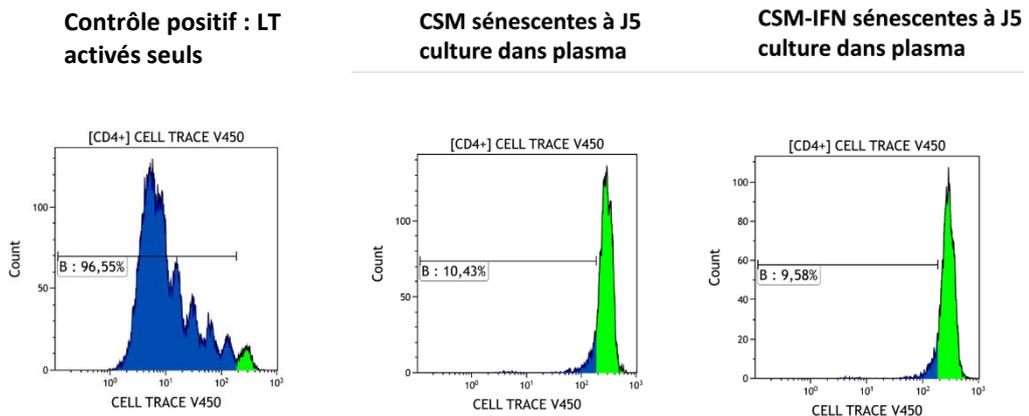
A**B****C****D****E**

Figure 38. Effet du plasma humain sur les CSM-GW.

A. Les CSM en culture dans le plasma en normoxie ont une plus forte expression de β-galactosidase (bleue), et une moins forte expression d'EdU (rouge). B. En hypoxie, l'expression de β-galactosidase est moins forte qu'en normoxie, et la prolifération des CSM-GW est conservée (analysée par l'expression d'EdU). C. En normoxie et

dans le plasma, en médiane 27% (IQR 24,5-39) des CSM-GW expriment la β -galactosidase, contre 4% des CSM-GW (IQR 1,5-6,75) dans le milieu α -MEM ($p=0,007$, test de Mann Whitney). En hypoxie, en médiane 12% (IQR 11-16,5) des CSM-GW cultivées dans le plasma expriment la β -galactosidase, contre 6% des CSM-GW (IQR 4-8) cultivées dans l' α -MEM. La différence entre normoxie et hypoxie pour les CSM cultivées dans le plasma est significative ($p=0,007$, test de Mann Whitney). D. Le pourcentage de noyaux positifs à Edu est en médiane de 2% (IQR 0,5-10) pour les CSM-GW en normoxie dans le plasma versus 63% (IQR 50-78) pour les CSM-GW cultivées dans l' α -MEM ($p=0,007$). En hypoxie, le pourcentage des noyaux positifs à Edu est en médiane de 65% (IQR 49,5-70,5) des CSM-GW dans le plasma versus 78,5% (IQR 71-86) des CSM-GW dans l' α -MEM. La différence entre normoxie et hypoxie pour les CSM cultivées dans le plasma est significative ($p=0,007$). E. Analyse de la prolifération en cytométrie des lymphocytes T activés par anti CD3 et CD28 (témoin positif), des lymphocytes T activés après 5 jours de culture avec les CSM-GW cultivées préalablement dans α -MEM + plasma humain 50% (avec phénotype de sénescence), et des lymphocytes T activés après 5 jours de culture avec les CSM-GW-IFN cultivées préalablement dans α -MEM + plasma humain 50% (avec phénotype de sénescence).

DISCUSSION

1. Synthèse des résultats

Notre étude a exploré les mécanismes immunomodulateurs des CSM-GW produites à grade clinique au CHRU de Nancy *in vitro* et sur leur devenir *in vivo* dans un modèle murin de GVH.

L'effet antiprolifératif des CSM-GW sur les lymphocytes T dépend de l'IFN- γ dans le milieu. Les CSM-GW entraînent un arrêt de la prolifération des lymphocytes T activés avec une exacerbation de leur apoptose.

La pré-incubation des CSM-GW par l'IFN- γ majeure *in vitro* l'effet antiprolifératif et pro-apoptotique des CSM-GW, par l'augmentation de l'activité d'IDO. Ce « *priming* » apporte également un avantage *in vivo*, à condition que les CSM-GW soient injectées de façon répétée dans le modèle murin de xéno-GVH.

L'activité d'IDO va entraîner une diminution du tryptophane dans le milieu, et une production, entre autres, de kynurénine et d'acide kynurénique. L'activité d'IDO est nécessaire pour bloquer la prolifération des lymphocytes T, comme le confirme la réversion complète de l'ajout de 1L-méthyltryptophane.

Pourtant, l'activité d'IDO, bien que nécessaire, n'est pas suffisante *in vitro*. Les CSM-GW doivent être en contact avec les lymphocytes T pour bloquer leur prolifération. Lors du contact, un transfert de mitochondries spécifiquement des CSM-GW vers les lymphocytes T activés a été observé, de l'ordre de 40%, dans les premières heures suivant le contact. L'absence de contact prévient le transfert mitochondrial. Le priming par IFN- γ des CSM-GW ne modifie le pourcentage de lymphocytes T ayant reçu des mitochondries.

Les lymphocytes T ayant reçu des mitochondries vont moins proliférer que ceux n'en ayant pas reçu. Il semble donc que le transfert ait un rôle immunomodulateur bloquant la prolifération des T activés.

L'ajout de 1L-méthyltryptophane ne modifie pas le taux de transfert mitochondrial vers les CSM-GW-IFN. Cependant, il a un impact à la fois sur les lymphocytes T qui n'ont pas reçu de mitochondries, qui prolifèrent davantage, mais également sur les lymphocytes T qui ont reçu des mitochondries, en restaurant leur prolifération, en particulier à 5 jours de co-culture.

Le contact cellulaire des CSM-GW avec les LT, et l'activité d'IDO, modifient le métabolisme des LT vers un métabolisme de phosphorylation oxydative, avec une production d'ATP accrue et une capacité respiratoire maximale augmentée. L'ajout d'un transwell et l'ajout de 1L-MT vont chacun inhiber de façon partielle le métabolisme de phosphorylation oxydative des LT induit par les CSM-GW au profit de la glycolyse. Il semble donc que les 2 éléments de contact et d'IDO soient au minimum additifs sur l'impact métabolique des LT. Cette observation n'a jamais été rapportée jusqu'à présent.

In vivo, les CSM-GW primées par IFN- γ diminuent significativement la mortalité en lien avec une xeno-GVH sévère lorsqu'elles sont injectées à J7, J14 et J21 chez la souris NSG. Les CSM-GW sont observées dans les poumons et la peau (quelques cellules) à 24 h de l'injection, puis ne sont plus retrouvées. Elles ont la possibilité d'entrer en contact avec les cellules mononucléées humaines dont les lymphocytes T au niveau pulmonaire. Elles n'empêchent pas la prise de greffe, ni la prolifération sanguine de lymphocytes T CD8 précocement après la greffe, mais diminuent l'infiltration lymphocytaire dans les organes cibles tels que le foie, et la peau et ainsi les manifestations histologiques de GVH.

Leur rapide clairance *in vivo* pourrait être expliquée par leur entrée en sénescence répliquative dans un milieu riche en plasma et en normoxie, mais notre étude est encore très préliminaire sur ce point.

2. Discussion des mécanismes immuno-régulateurs des CSM-GW *in vitro*, focus sur IDO, le transfert mitochondrial et le métabolisme des lymphocytes T

2.1 Mécanismes immuno-modulateurs d'IDO

Dans notre étude, IDO est un mécanisme majeur de l'immunomodulation des CSM-GW. Ceci est corroboré par les rapports de plusieurs équipes (184–187).

Nous avons montré que le *priming* par IFN- γ entraîne une activation d'IDO et améliore par ce mécanisme l'effet immunomodulateur des CSM-GW. Cette démonstration rejoint les conclusions d'autres équipes ayant montré l'impact de l'IFN- γ dans le potentiel

immunomodulateur des CSM, *in vitro* et *in vivo*, en lien avec l'activation spécifique d'IDO (178,186).

Si cette conclusion est plutôt unanime, les mécanismes d'immunorégulation d'IDO sont complexes et encore incomplètement connus au niveau du lymphocyte T. Cette méconnaissance se traduit par des éléments épars de voies d'activation induits par IDO elle-même (100), par la diminution du tryptophane (103), et par l'augmentation des métabolites tels que la kynurénine (105).

Notre étude apporte une confirmation de l'inhibition de la glycolyse par IDO dans les lymphocytes T. D'autres équipes ont déjà rapporté cet effet (100,101,103,106) :

Les mécanismes à l'origine de l'inhibition de glycolyse par IDO décrits jusqu'à présent sont les suivants : IDO activerait directement TP53, un des gènes régulant la glycolyse (106). De plus, la diminution du tryptophane inhiberait mTOR, et inhiberait en conséquence C-myc et HIF-1 α , diminuant la glycolyse (et majorant l'autophagie) (100).

Nous avons aussi observé que l'inhibition d'IDO diminue la production d'ATP par les lymphocytes T, et diminue la capacité respiratoire mitochondriale. Les mécanismes décrits d'activation de la phosphorylation oxydative sont les suivants : la diminution du tryptophane active l'enzyme *cpt1a* et entraîne l'oxydation des acides gras dans les LT CD4+ (103). La kynurénine induit *via* sa dégradation métabolique en acide 3-OH-anthranilique (3HAA) une production directe de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)+ (188). Enfin, l'acide kynurénique (dérivé métabolique de la kynurénine sous l'action de la kynurénine aminotransférase KAT), est un ligand du récepteur aryl hydrocarbène (AhR), qui induit la β -oxydation des acides gras (105).

Cependant, ces différents mécanismes ne nécessitent pas à priori de contact entre les lymphocytes T et les CSM-GW.

Nous rapportons une nécessité de contact cellulaire entre CSM-GW et lymphocytes T pour observer l'effet anti-prolifératif des CSM-GW et CSM-GW-IFN. Pourtant, nous avons montré que l'absence de contact entre LT et CSM-GW ne changeait rien à l'activité d'IDO dans les CSM-GW, et à la modification des métabolites de l'environnement. Ce qui sous-tend la

nécessité, d'un mécanisme contact-dépendant, pour que l'activité d'IDO soit suivie d'un effet inhibiteur de la prolifération des T.

Plusieurs hypothèses sont possibles :

- La déplétion de tryptophane, et l'excrétion de kynurénine et d'acide kynurénique par les CSM-GW pourraient se répartir dans le milieu selon un gradient, avec une diminution de la concentration à mesure que l'on s'éloigne des CSM : cette hypothèse n'est pas corroborée par le dosage des métabolites dans les surnageants avec transwell.

- La synthèse de NAD⁺ à partir de la kynurénine et du 3HAA peut faire poser une autre hypothèse, celle d'une coopération entre IDO et un autre acteur : l'ectonucléotidase CD73, à la surface des CSM, coupe le NAD en AMP et NMM (nicotinamide mononucléotide) pour former de l'adénosine, un inhibiteur de la glycolyse, modulateur des lymphocytes T (189). Il est envisageable que le gradient d'adénosine soit par contre très dépendant de la proximité de la surface membranaire, et que par ce biais les LT doivent être en contact avec les CSM-GW pour être inhibés. Cependant, cela sous tendrait que les actions directes des autres métabolites du tryptophane sont minoritaires face à l'action de l'adénosine.

- la voie PD1 est activée par AhR, dont le ligand est l'acide kynurénique. Elle pourrait être nécessaire à l'apoptose des LT. La nécessité d'un contact entre lymphocytes T et CSM a déjà été décrite, rendant ambigu le rôle d'IDO, par une équipe qui a récemment rapporté le rôle prépondérant de la voie PDL1/PD1 pour expliquer cette dépendance au contact cellulaire, et l'inhibition de la glycolyse aérobie des lymphocytes T, par inhibition de l'activité hexokinase II (102). Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de rôle de PD1 dans l'effet antiprolifératif des CSM-GW dans nos conditions *in vitro*.

- Le rôle de CD40 a été proposé comme un facteur clef avec IDO du potentiel immunosuppresseur des CSM issues des amygdales (190). La liaison CD40/CD40L a même été proposée comme un facteur activateur d'IDO, et CD40 est exprimé en particulier sur les CSM-GW-IFN. Cependant, l'ajout de CD40 ligand soluble dans les conditions de co-culture avec transwell n'a pas restauré l'effet inhibiteur des CSM-GW sur les lymphocytes T (expérimentation non rapportée dans les résultats). De plus, l'activité d'IDO ne semble pas être impactée par la présence d'un transwell, ce qui n'est pas en faveur de cette hypothèse.

- Le transfert mitochondrial a été évoqué dans cet effet contact dépendant d'IDO, car le transfert requiert un contact avec les LT, prédomine vers les T CD4+, (or nous avons constaté une inhibition préférentielle des LT CD4+ *in vitro*), et impacte le métabolisme des LT. Nous avons démontré qu'IDO inhibe à la fois les lymphocytes T n'ayant pas reçu de mitochondries, et les lymphocytes T ayant reçu des mitochondries. Les LT ayant reçu des mitochondries et en présence d'IDO voient leur prolifération la plus réduite, ce qui va en faveur d'un effet additif des 2 mécanismes. L'inhibition d'IDO réverse partiellement l'effet des CSM sur les LT mito+, mais complètement l'effet des CSM sur les LT mito-, ce qui laisse penser qu'IDO est la voie exclusive d'inhibition des LT non transférés, induisant un changement métabolique des LT non transférés *per se*. Les CSM-GW inhibent directement par IDO en moyenne environ 30% des LT activés mito-, et les CSM-GW-IFN, ayant une activité IDO augmentée, vont inhiber près de 70% des LT mito- en moyenne.

Le transfert de mitochondries a lui aussi un effet isolé sur le métabolisme des LT, sans IDO, même s'il est modeste (entre 15 et 20% d'inhibition en moyenne).

Nous avons montré que l'association d'IDO et du transfert de mitochondries est au minimum additif sur l'impact métabolique des LT. De surcroît, l'inhibition d'IDO restaure la prolifération des LT mito+ en culture avec CSM-GW-IFN de 60,3% en moyenne contre 47% en moyenne pour les LT mito+ en culture avec les CSM-GW. Ainsi, nous pourrions même soupçonner un effet synergique des 2 mécanismes.

Cette addition ou synergie entre les 2 mécanismes n'explique peut-être pas totalement le rôle du contact entre CSM et LT pour l'effet d'IDO : en effet, le transwell ne devrait réverser que partiellement l'effet des CSM-GW, dans la mesure où seuls 40 % des LT sont transférés, et qu'il existe un effet d'IDO sur les LT mito-. Néanmoins, nous avons constaté que l'effet du transwell sur l'inhibition des CSM-GW-IFN était plus variable que l'effet du transwell sur les CSM-GW. Ainsi, l'effet des CSM-GW-IFN ne serait pas totalement contact-dépendant (selon les cordons), et cet effet non dépendant du contact pourrait correspondre à la plus forte inhibition des LT mito- par les CSM-GW-IFN *via* IDO (en comparaison aux CSM-GW).

2.2 Impact immunomodulateur du transfert mitochondrial

Les mitochondries transférées, semblent également entraîner un switch vers un métabolisme de phosphorylation oxydative (rôle du transwell dans l'étude du métabolisme par seahorse), bien que nous ne l'ayons pas totalement démontré. Pour le moment, nous ne sommes pas parvenus à trier les LT mito+ et mito- pour analyser leur métabolisme séparément. Mais cette analyse sera importante à réaliser pour affiner la compréhension du rôle du transfert mitochondrial.

Le transfert mitochondrial des CSM-GW vers les PBMC a été décrit par Court et al. (126) Ce transfert, suivi par cytométrie de flux *in vitro*, survient chez environ 40% des cellules CD45+, de donneurs sains, quel que soit le donneur de PBMC ou de CSM-GW. Ces observations sont très proches de nos résultats en termes de taux de transfert, mais cette équipe rapporte un transfert ne dépendant pas de l'activation des lymphocytes T, tandis que nous avons noté un transfert mitochondrial exclusivement vers les lymphocytes T activés. Le transfert avait lieu vers les lymphocytes T, les lymphocytes B et les NK. Parmi les T, ce sont surtout les T helper CD4+ qui reçoivent des mitochondries, en comparaison avec les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Le pourcentage de lymphocytes recevant des mitochondries augmentait avec le ratio cellulaire CSM/T. Le pic de transfert avait lieu dès 5 heures après la mise en contact des CSM avec les T. Ce transfert était abrogé en cas de température à 4°C et en cas d'absence de contact cellulaire. Il n'y avait pas de transfert entre CSM, ni des PBMC vers les CSM dans ces conditions. Un traitement anti-oxydant par pterostilbène ne modifiait pas le transfert mitochondrial vers les lymphocytes T. Le licensing des CSM-GW par IFN- γ ne modifiait pas le taux de transfert mitochondrial, comme c'est aussi le cas dans notre étude.

La même équipe a également montré que le transfert avait lieu *in vivo*, dans les ganglions mésentériques et dans la rate, lorsque des CSM-GW humaines étaient administrées à des souris Balb/c, par injection intra-péritonéale.

Une autre équipe a montré une stabilisation de FOXP3 et des fonctions suppressives des T regs induits (127) après transfert mitochondrial.

Une équipe Chinoise a rapporté l'inhibition de l'autophagie des lymphocytes T de patients atteints de lupus érythémateux systémique (*in vitro*) grâce au transfert de mitochondries de CSM-GW (191).

De façon intéressante, l'équipe de Court et al. a montré que les lymphocytes T étaient perméables à la « mitoception » c'est-à-dire l'endocytose de mitochondries artificielles (126).

Les lymphocytes T ainsi transférés voyaient une augmentation des ARN messagers impliqués dans la différenciation des T regs (FOXP3, CTLA4, GITR), et avaient un phénotype de Tregs activés (CD25+, ICOS+ avec une diminution de CCR7). Ils avaient en outre une augmentation de leur capacité migratoire. Les PBMC transférées par mitoception induisaient moins de GVH dans le modèle de xénoGVH que nous avons utilisé que les PBMC contrôles.

De façon surprenante et à l'opposé de nos résultats, dans ce cas d'endocytose de mitochondries artificielles, il y avait une augmentation de la glycolyse et une diminution de la respiration maximale observée. L'augmentation du ratio ECAR (extracellular acidification rate)/OCR (oxygen consumption rate) suggérait une bascule métabolique vers un état lymphocytaire activé.

Nous pouvons donc supposer que le transfert mitochondrial seul n'est pas synonyme d'un changement métabolique donné dans les lymphocytes T. « L'état » mitochondrial des CSM pourrait importer dans l'impact fonctionnel du transfert de leurs mitochondries. On pourrait notamment supposer que l'inflammation, ou l'« activation » des CSM-GW, (et pourquoi pas l'activité d'IDO), sans modifier le taux de transfert, impacte la capacité fonctionnelle des mitochondries transférées. Un argument est le fait que les mitochondries de fibroblastes n'induisent pas de différenciation T regs contrairement aux mitochondries issues des CSM dans cette étude, ce qui signifie que la source des mitochondries impacte leur effet dans les lymphocytes T.

2.3 Interaction entre transfert de mitochondries et IDO

Notre étude montre pour la première fois le rôle au minimum additif, voire synergique, d'IDO et du transfert mitochondrial.

Si l'effet d'IDO et du transfert mitochondrial est additif, cela laisse supposer que les effets métaboliques d'IDO sur les LT activés ont lieu de façon indépendante au transfert de mitochondries, *via* l'inhibition de mTOR et AhR notamment, directement dans les LT.

Si l'effet d'IDO est synergique avec le transfert mitochondrial, nous pourrions poser l'hypothèse d'une action d'IDO sur les mitochondries avant même leur transfert aux LT activés : est-ce que l'activité d'IDO modifie le phénotype ou l'activité des mitochondries dans les CSM-GW ? Dans ce cas, leur impact immunomodulateur après transfert aux LT pourrait être exacerbé.

Une hypothèse intéressante serait l'activation enzymatique d'une enzyme impliquée dans le métabolisme de la kynurénine, alpha-aminoacide aminotransférase (AADAT), par l'activité d'IDO. AADAT s'avère être une enzyme mitochondriale, récemment décrite comme ayant un rôle immunosuppresseur (192).

De récents rapports ont également fait le lien entre les fusions et fissions mitochondriales, décrites ci-dessus comme impliquées dans l'activation des lymphocytes T, et le métabolisme du tryptophane (188).

Pour tester cette hypothèse d'impact mitochondrial d'IDO, nous pourrions comparer les mitochondries des LT activés mito+ et mito- en microscopie électronique (est-ce que les mitochondries sont plutôt en fusion ou en fission ?), et tester leur transcriptome. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'activité d'IDO va impacter l'état mitochondrial des CSM-GW, et donc la fonctionnalité de leur transfert dans les lymphocytes T.

2.4 Hétérogénéité des sources de CSM-GW

Nous avons mis en évidence une très grande hétérogénéité des CSM-GW selon leur source (le cordon ombilical dont elles sont issues). Le licensing par IFN- γ permet une majoration de l'effet immunomodulateur des CSM-GW ayant le potentiel le plus faible *in vitro*, mais il n'annule pas totalement l'hétérogénéité des sources de CSM-GW.

Cette hétérogénéité rend l'étude de leur mécanisme immuno-modulateur difficile, puisque la reproductibilité d'un cordon à l'autre n'est pas toujours obtenue. Cependant, la réversion complète de leur effet *in vitro* par 1L-MT a été reproduite sur tous les cordons, de même que le transfert mitochondrial.

Cette hétérogénéité a déjà été mise en évidence, en particulier pour les CSM de moelle osseuse. L'étiologie de cette hétérogénéité n'est pas connue, même s'il semble que des facteurs obstétricaux pourraient être en cause (86). L'équipe de Peter Bader, en Allemagne, a démontré que le fait de pooler les CSM issues de plusieurs donneurs sains de moelle osseuse (8 au total), lors de la mise en culture, entraînait l'obtention d'un produit cellulaire au potentiel immuno-modulateur supérieur au potentiel de chaque source. C'est ainsi qu'ils ont développé un produit de thérapie cellulaire, utilisé dans le cadre d'une autorisation de mise sur le marché en Allemagne, correspondant à un pool de CSM issues de 8 donneurs sains. Cela a permis d'abroger l'hétérogénéité fonctionnelle des produits cellulaires banqués (49,193).

Il pourrait donc être considéré d'analyser l'impact d'un pool de CSM-GW dans un objectif de réduction d'hétérogénéité de leur potentiel immuno-modulateur. Cette hypothèse a récemment été testée par une équipe indienne, qui rapporte un intérêt dans le fait de pooler les CSM-GW, *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde (194).

Cependant, si l'effet *in vitro* et *in vivo* est supérieur, il faudra encore prouver que ce pool n'induit pas une allo-immunisation supérieure, ce qui réduirait l'efficacité d'injections répétées. Nous n'avons que peu de données sur l'immunisation anti-HLA après injections répétées chez l'Homme d'une seule source de CSM-GW. L'essai clinique CSM-COVID19, en cours d'analyse, permettra d'apporter quelques éléments de réponse sur ce sujet.

2.5 Production de cytokines inflammatoires et de chimiokines

Nous avons mis en évidence une concentration supérieure d'IL-6, IL-8 et MCP-1 en fin de co-culture des lymphocytes T avec les CSM-GW-IFN. Ce constat est déroutant, dans la mesure où l'IL-6 peut induire une polarisation des T vers un profil Th17, et où l'IL-8 est connue pour attirer les polynucléaires neutrophiles, renforçant donc la réaction inflammatoire.

Donders et al., en analysant la synthèse d'ARNm par les CSM-GW et les CSM de moelle osseuse, ont également montré une synthèse supérieure d'IL-1 β , d'IL-8 et de CCL-2 par les CSM-GW (80).

Cependant, ces cytokines et chimiokines vont pouvoir attirer les neutrophiles et monocytes *via* IL-8 (195), mais également les lymphocytes T, en particulier *via* MCP-1 (196–199), et peut-être *in vivo* augmenter le contact avec les CSM-GW-IFN.

Par ailleurs, il est intéressant de constater que ces 3 molécules, impliquées dans l'inflammation, ont été décrites comme sécrétées en particulier par les fibroblastes associés aux tumeurs promouvant la polarisation des macrophages M2 (200).

2.6 Limites de l'étude *in vitro*

Nous avons tenté de déterminer les mécanismes immunosuppresseurs des CSM-GW produites en grade clinique sur les lymphocytes T, *in vitro*.

Nous avons rapporté le rôle d'IDO, prépondérant, et la dépendance à un contact cellulaire entre CSM-GW et lymphocytes T. Cette dépendance est également valable pour le transfert de mitochondries vers les lymphocytes T, tandis que le transfert mitochondrial est lié à une moindre prolifération des T activés. Nous avons tenté de relier ces mécanismes d'IDO et de transfert mitochondrial par leur impact sur le métabolisme des T.

Cependant, nous n'avons pas établi de lien de causalité entre IDO et le transfert mitochondrial.

Il serait donc nécessaire de poursuivre cette étude en analysant individuellement le métabolisme des LT mito+ et mito-, après tri, ou par cytométrie de flux. Il serait aussi intéressant d'analyser le transcriptome mitochondrial des LT mito+ et mito-, avec et sans IDO, ainsi que la disposition des mitochondries en microscopie électronique.

3. Discussion sur le devenir des CSM-GW après injection intraveineuse, et sur les modalités d'administration des CSM-GW

3.1 Nécessité d'injections itératives

La nécessité de recours à plusieurs injections a déjà été rapportée par d'autres équipes avant notre étude : Jang et al. ont montré que 3 injections, espacées de 3 jours, après les premiers symptômes de GVH dans ce modèle de xénogreffe chez la souris NSG permettaient un gain de survie (201). Kim et al. ont rapporté l'efficacité supérieure des CSM-GW primées par

IFN- γ , lorsqu'injectées à 2 reprises à J0 et J7 (178). La nécessité de répéter les injections peut être liée à la clairance rapide des CSM-GW *in vivo* après leur injection intraveineuse.

Cependant, sans pré-incubation par IFN- γ , les CSM-GW, même injectées de façon hebdomadaire à 3 reprises, n'ont aucun effet sur la survie des souris, ce qui corrobore d'autres études montrant l'absence de prévention de la mortalité par GVH dans ce modèle (140) et dans d'autres modèles murins avec injections de CSM allogéniques (202).

Par ailleurs, la chronologie des injections est importante. En particulier, l'injection à J0 ne semble pas suffisante pour éviter la mortalité par GVH. Il semble que les injections doivent avoir lieu lors des premiers symptômes cliniques (J20), ou au minimum à J7 (171,178,201). Ceci pourrait être lié à la nécessité d'un environnement pro-inflammatoire, contenant de l'IFN- γ , comme démontré *in vitro*. Il serait cependant nécessaire pour l'affirmer de doser la cinétique de l'IFN- γ dans le sang des souris après greffe, et d'inhiber *in vivo* l'IFN- γ .

3.2 Devenir des CSM-GW après injection

Nous avons pu observer les CSM-GW-IFN 24h après leur injection intraveineuse dans les poumons mais quasiment pas dans les autres organes. Au-delà de 24h, nous n'avons pas été en mesure de les observer. Cette clairance rapide et ce trapping pulmonaire va dans le sens des publications sur la distribution des CSM, quelle que soit leur source, et quelle que soit leur caractère autologue ou allogénique, après injection intraveineuse.

En effet, le devenir des CSM après injection chez l'animal ou chez l'homme a été décrit par diverses techniques. Ce sont essentiellement les CSM de moelle osseuse qui ont été suivies *in vivo*.

La distribution des CSM après injection a été explorée par maintes équipes. Une méta-analyse récente a détaillé le fait que la biodistribution des CSM dépend de leur voie d'administration (203) :

-Après injection intra-veineuse chez la souris, le chien (204), le babouin (205), les CSM de moelle osseuse, qu'elles soient autologues ou allogéniques, sont retenues initialement dans les poumons, qui sont le premier filtre capillaire. Elles sont ensuite redistribuées plus tard

dans les autres organes, principalement le foie, la rate et les reins, même si dans certaines études en particulier chez la souris, cette redistribution est absente (206). Cette redistribution a été mise en évidence le plus souvent par PCR, et ne permet donc pas de connaître la viabilité cellulaire. Cette redistribution peut donc être expliquée par la phagocytose des CSM (148,207). Chez l'Homme, aucune CSM n'est détectée dans le sang 1 h après l'injection (208). La distribution est rapidement et majoritairement pulmonaire dans les 24 premières heures, avec une distribution secondaire dans le foie et la rate, et faiblement dans la moelle osseuse, jusqu'à 6 jours après l'injection (209).

- après injection intra-artérielle, les CSM sont moins retenues dans les poumons, et sont distribuées plus largement dans le foie, la rate et les reins, et même le système nerveux central (du côté homolatéral à une injection carotidienne, et seulement avec l'aide d'un perméabilisant tel que le mannitol) (210–212). Cependant, si la distribution est plus générale, la persistance des CSM dans les organes ne semble pas supérieure à la voie intraveineuse.

-après injection intra-musculaire, les CSM restent dans le site d'injection et n'ont pas de distribution systémique. Elles ont été retrouvées par PCR dans le site d'injection 3 mois après l'administration (213)

-après injection intra-osseuse, la plupart des études ne montre pas de redistribution systémique. Par contre, il semble y avoir une persistance des CSM (de moelle osseuse) plus longue que lors des injections intravasculaires, puisque les CSM ont été retrouvées dans l'os à 6 semaines de la greffe (214,215).

-après injection intra-péritonéale, les CSM soit font des amas péritonéaux avec les macrophages et ne migrent pas (216) dans un modèle murin de xénogreffe, soit semblent essaimer surtout vers les organes abdominaux. Une étude cependant sur les CSM-GW allogéniques mais issues de porcs injectées chez des porcelets a montré une redistribution très large dans l'ensemble des organes de CSM viables (217).

-après injection intra-hépatique, les CSM restent dans le foie et ont une clairance rapide après leur injection. Cette clairance serait liée à l'activation des NK (218,219).

-après injection sous-cutanée, les CSM semblent rester dans la zone d'injection, entre 1 semaine et 3 mois après l'injection, avec une possible migration vers les ganglions lymphatiques dans la zone de drainage de l'injection, sans redistribution systémique (220).

-après injection intrathécale ou intra-cérébrale, les CSM n'ont pas de redistribution systémique et les études sont contradictoires sur leur possibilité de migration large intracérébrale. Certaines études voient une disparition des CSM *in situ* dès 1 à 3 semaines (221,222) et une possible différenciation minoritaire en astrocytes (223), tandis que d'autres rapportent la persistance des CSM en bioluminescence dans le cortex cérébral jusqu'à 7 semaines après l'injection (224).

Ainsi, dans la plupart des rapports, les CSM disparaissent rapidement après injection intravasculaire. Cependant, leur clairance paraît moins rapide en cas d'injection intratissulaire, bien que leur redistribution systémique semble alors compromise. Par exemple, elles ne sont pas retrouvées au-delà de 24 heures après injection intra-veineuse, mais persistent jusqu'à 5 jours dans le péritoine (225). Une hypothèse serait donc que les CSM doivent pouvoir s'ancrer *in vivo* comme *in vitro* pour rester vivantes. Une autre hypothèse est que le plasma pourrait être un milieu délétère qui transformerait leur phénotype, les rendant susceptibles à la phagocytose.

Le doute sur la compatibilité entre sang et CSM a déjà été formulé il y a 10 ans, lorsque Moll et al. rapportaient l'action prothrombotique et activatrice plaquettaire (induction de thrombine, facteurs VIa, XIa, et XIIa et formation de caillots plaquettaires) des CSM lors d'une injection vasculaire, *in vitro* et *in vivo* chez des patients (226). Les CSM *in vitro* activent faiblement le complément, mais sont résistantes à la lyse directe de celui-ci, probablement par la synthèse de facteur H dans leur environnement natif, qui les protège de cette lyse (227). Dans le sang, cette synthèse pourrait être insuffisante pour prévenir la lyse. Le plus surprenant est qu'une équipe a rapporté le rôle de l'activation du complément dans l'effet immunomodulateur des CSM (228) : le dépôt de dérivés de la fraction C3 (iC3b et C3dg), et la génération des anaphylatoxines solubles C3a et C5 entraînent l'activation des cellules effectrices, triggée par CD11b/CD18. Ces propriétés activatrices étaient corrélées à l'effet immunosuppresseur des CSM *in vitro*.

Concernant l'hypothèse du rôle du plasma dans le changement de phénotype des CSM, une équipe danoise a publié en 2016 un rapport décrivant le fait que des CSM de cordon ombilical de cheval, lorsque cultivées avec du lysat plaquettaire, arrêtaient de proliférer (tout en restant vivantes) à partir d'une concentration de LP de 30%, alors que comparativement, le SVF à 30% et jusqu'à 60% n'inhibait pas la prolifération des cellules (229). Aucune mécanistique n'a été explorée par cette équipe. Ce rapport est donc proche de nos observations : le plasma humain, à partir de 25% de concentration dans le milieu, interfère avec la prolifération des CSM-GW en normoxie *in vitro*, et pourrait induire un phénotype de sénescence. Il serait donc intéressant de savoir si les CSM-GW ayant ce phénotype sont plus susceptibles à la lyse du complément, à la lyse par les NK, ou à la phagocytose.

Pourquoi les CSM disparaissent-elles ?

L'équipe de De Witte et al. a publié un très intéressant travail de suivi des CSM *in vivo* par un double marquage : des billes uniquement maintenues dans les cellules vivantes, et un marquage de l'ADN permettant de détecter toutes les cellules y compris mortes (148). Ils ont grâce à ce suivi particulier pu démontrer que les CSM, issues de la gelée de Wharton, étaient rapidement phagocytées après leur injection chez la souris C57BL/6 dans la veine caudale. Après un piégeage initial dans les poumons, dans les 24 premières heures, les CSM étaient phagocytées puis redistribuées par les cellules immunitaires innées dans le foie en particulier. Les monocytes ayant phagocyté les CSM étaient polarisés vers un phénotype régulateur (CD14⁺⁺, CD16⁺, CD206⁺, PDL-1⁺, IL-10⁺), qui induisait une augmentation des Tregs. Dans cette étude, c'est donc la phagocytose des CSM-GW qui induit leur effet immunorégulateur *in vivo*.

Une autre équipe a rapporté l'intérêt de la clairance des CSM dans leur effet immunomodulateur (230): dans cette étude, les CSM sont rendues apoptotiques par des lymphocytes T cytotoxiques *via* un mécanisme perforine-dépendant. Les CSM apoptotiques vont être phagocytées. Les cellules phagocytaires produisent alorsIDO et être à l'origine de l'immunomodulation.

Enfin, dans d'autres modèles, des équipes ont rapporté le transfert de mitochondries des CSM vers les macrophages, *via* des exosomes ou des nanotunnels, et ce transfert semble augmenter le potentiel de phagocytose et la phosphorylation oxydative des macrophages (129,231).

3.3 Limites de l'étude *in vivo*

Nous n'avons pas mis en évidence de mécanisme permettant d'expliquer *in vivo* l'effet des CSM-GW dans notre modèle. Le fait que seules les CSM-GW-IFN ont montré un intérêt dans la survie des souris pourrait être en faveur, par extrapolation des observations *in vitro*, d'un rôle d'IDO, et peut-être d'un rôle dans la capacité d'attraction chimiotactique des lymphocytes T *in vivo*. La nécessité de répéter les injections est probablement corrélée à la clairance rapide des cellules après injection.

Cependant, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation des Tregs dans le sang (ou dans les tissus hépatiques et spléniques). L'un des manques de cette étude est de ne pas avoir dosé les cytokines sériques après injection des CSM-GW. Cependant, il se pourrait que le modèle de xéno-GVH chez la souris NSG ne soit pas le modèle idéal pour étudier une modification dans les sous-types cellulaires lymphocytaires T, du fait de la faible activité inter-espèces des interleukines murines sur les leucocytes humains. Un modèle de NSG avec *knock-in* de cytokines humanisées serait probablement plus adapté pour étudier la polarisation des lymphocytes T humains après greffe (232).

Outre la polarisation des lymphocytes T, ce modèle de souris NSG ne permet pas la survie des cellules myéloïdes humaines, du fait de l'absence de facteurs de croissance myéloïdes humains. Ainsi, même si nous avons mis en évidence quelques cellules mono-macrophagiques humaines dans le foie, nous n'avons pas pu mettre en évidence le rôle de la phagocytose dans l'immunomodulation. Là encore, des souris humanisées exprimant des cytokines humaines (myéloïdes) pourraient constituer un modèle plus pertinent (232).

Enfin, nous n'avons pas démontré de transfert mitochondrial *in vivo* dans cette étude, ni le rôle d'IDO. Il serait intéressant de réaliser un suivi en microscopie confocale des lymphocytes T co-injectés avec des CSM-GW, marquées préalablement par un Mitotracker. Ainsi, nous pourrions tenter de mettre en évidence ce transfert s'il existe, en particulier dans les zones de

contact entre lymphocytes T et CSM. Le dosage des métabolites d'IDO dans le sérum des souris serait également informatif.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

Pour conclure, ce travail de thèse aura permis de mieux comprendre les propriétés immunosuppressives des CSM-GW et d'apporter un rationnel pré-clinique de l'effet immunomodulateur des CSM-GW en prophylaxie de la GVH aiguë.

Depuis plusieurs années, les CSM-GW sont cultivées, contrôlées et congelées au sein du département de Médicament de Thérapie Innovante (MTI) du CHRU de Nancy selon un procédé publié et autorisé par l'ANSM. Ce procédé a permis de mener plusieurs études pré-cliniques. La première, dans un modèle murin de sepsis, a permis de démontrer l'efficacité d'action des CSM issues de la gelée de Wharton (CSM-GW) comparativement aux CSM issues de la MO. Par cette étude, il a été mis en évidence l'impact au moins aussi bénéfique des CSM-GW que les CSM-MO sur la survie, la défaillance d'organes, la bactériémie mais également l'afflux leucocytaire. La deuxième étude pré-clinique a évalué l'impact des CSM-GW dans un modèle porcin de sepsis, le cochon étant l'un des animaux les plus proches de l'homme en termes de physiologie cardiovasculaire et de poids (40-60kg). Cette étude, a permis de mettre en évidence l'amélioration des paramètres hémodynamiques, des défaillances d'organes notamment pulmonaire avec une amélioration du rapport PaO₂/FiO₂ et de la survie des animaux traités par des CSM-GW. L'ensemble de ces travaux a permis à l'unité de thérapie cellulaire et au service de réanimation du CHRU de Nancy d'obtenir l'autorisation de mener une étude clinique de phase IIa visant à évaluer l'efficacité d'action des CSM-GW chez des patients en choc septique (N° Eudract : 2017-004123-67) et dans la phase aiguë d'une infection par le SARS-CoV-2 (N° Eudract : 2020-002772-12).

Nos travaux préliminaires dans un modèle murin pré-clinique dans l'allogreffe de CSH ont permis de décortiquer les mécanismes immunorégulateurs des CSM en contexte d'alloréactivité et de mettre en évidence une amélioration significative de l'incidence de la GVH aiguë lorsqu'un minimum de 3 injections sont réalisées à une semaine d'intervalle, en post-greffe immédiat. Dans le contexte actuel d'augmentation des allogreffes haplo-identiques, chez des sujets souvent âgés, atteints d'hémopathie maligne à haut risque de rechute, nous souhaitons donc proposer les CSM-GW en prophylaxie de la GVH dans un contexte d'allogreffe de CSP haplo-identiques après conditionnement non myélo-ablatif. Les patients inclus dans l'étude recevront en complément de la prise en charge standard, le traitement par voie intra-veineuse de CSM-GW. Il s'agira d'un essai de phase I,

multicentrique, qui a d'ores et déjà reçu un financement « GIRCI-Est ». Actuellement, les démarches administratives d'autorisation sont en cours. L'objectif sera de déterminer une dose maximale tolérée de CSM-GW, injectées à 3 reprises à J7 J14 et J21 conformément aux données précliniques chez la souris, en prévention de la GVH, chez des patients recevant une allogreffe haploidentique. De plus, récemment (de janvier 2022 à avril 2022), un patient du CHRU de Nancy, atteint de GVH chronique réfractaire (à type de myosite et polyneuropathies), a reçu à titre « compassionnel » des injections de CSM-GW mensuelles (4 injections). Ce patient a bénéficié d'une surveillance biologique afin de déterminer les éventuelles modifications des métabolites du tryptophane au décours des injections (analyse en cours).

REFERENCES

1. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 12 sept 1957;257(11):491-6.
2. Simpson E, Dazzi F. Bone Marrow Transplantation 1957-2019. *Front Immunol*. 5 juin 2019;10:1246.
3. Negrin RS. Graft-versus-host disease versus graft-versus-leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015:225-30.
4. MacMillan ML, Robin M, Harris AC, DeFor TE, Martin PJ, Alousi A, et al. A refined risk score for acute GVHD that predicts response to initial therapy, survival and transplant-related mortality. *Biol Blood Marrow Transplant*. avr 2015;21(4):761-7.
5. El Jurdi N, Rayes A, MacMillan ML, Holtan SG, DeFor TE, Witte J, et al. Steroid-dependent acute GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation: risk factors and clinical outcomes. *Blood Adv*. 9 mars 2021;5(5):1352-9.
6. Lee SE, Cho BS, Kim JH, Yoon JH, Shin SH, Yahng SA, et al. Risk and prognostic factors for acute GVHD based on NIH consensus criteria. *Bone Marrow Transplant*. avr 2013;48(4):587-92.
7. D'Aveni-Piney M, Notarantonio AB, Pochon C, Rubio MT. Immunology of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: Rezaei N, éditeur. *Encyclopedia of Infection and Immunity* [Internet]. Oxford: Elsevier; 2022 [cité 18 mai 2022]. p. 571-85. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128187319002299>
8. Introna M, Golay J. Tolerance to Bone Marrow Transplantation: Do Mesenchymal Stromal Cells Still Have a Future for Acute or Chronic GvHD? *Front Immunol*. 2020;11:609063.
9. Zeiser R. Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. *British Journal of Haematology*. 2019;187(5):563-72.
10. Schwab L, Goroncy L, Palaniyandi S, Gautam S, Triantafyllopoulou A, Mocsai A, et al. Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat Med*. juin 2014;20(6):648-54.
11. Koehn BH, Zeiser R, Blazar BR. Inflammasome effects in GvHD. *Oncotarget*. 11 nov 2015;6(36):38444-5.
12. Hülsdünker J, Ottmüller KJ, Neeff HP, Koyama M, Gao Z, Thomas OS, et al. Neutrophils provide cellular communication between ileum and mesenteric lymph nodes at graft-versus-host disease onset. *Blood*. 19 avr 2018;131(16):1858-69.
13. Hill GR, Koyama M. Cytokines and costimulation in acute graft-versus-host disease. *Blood*. 23 juill 2020;136(4):418-28.
14. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. mars 2015;21(3):389-401.e1.
15. Lee SJ. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 5 janv 2017;129(1):30-7.

16. Martires KJ, Baird K, Steinberg SM, Grkovic L, Joe GO, Williams KM, et al. Sclerotic-type chronic GVHD of the skin: clinical risk factors, laboratory markers, and burden of disease. *Blood*. 13 oct 2011;118(15):4250-7.
17. Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S, Hakim FT, Jagasia M, Fowler DH, et al. The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. févr 2017;23(2):211-34.
18. Wu T, Young JS, Johnston H, Ni X, Deng R, Racine J, et al. Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*. 1 juill 2013;191(1):488-99.
19. McManigle W, Youssef A, Sarantopoulos S. B cells in chronic graft-versus-host disease. *Hum Immunol*. juin 2019;80(6):393-9.
20. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. mars 2012;122(3):787-95.
21. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. janv 2013;229(2):176-85.
22. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *N Engl J Med*. 28 déc 2017;377(26):2565-79.
23. Mickelson EM, Petersdorf EW, Hansen JA. HLA matching and hematopoietic cell transplant outcome. *Clin Transpl*. 2002;263-71.
24. Pochon C, Detrait M, Dalle JH, Michel G, Dhédin N, Chalandon Y, et al. Improved outcome in children compared to adolescents and young adults after allogeneic hematopoietic stem cell transplant for acute myeloid leukemia: a retrospective study from the Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy (SFGM-TC). *J Cancer Res Clin Oncol*. 4 sept 2021;
25. Martinez-Cibrian N, Zeiser R, Perez-Simon JA. Graft-versus-host disease prophylaxis: Pathophysiology-based review on current approaches and future directions. *Blood Rev*. juill 2021;48:100792.
26. Gooptu M, Antin JH. GVHD Prophylaxis 2020. *Front Immunol*. 2021;12:605726.
27. Perkins J, Field T, Kim J, Kharfan-Dabaja MA, Fernandez H, Ayala E, et al. A randomized phase II trial comparing tacrolimus and mycophenolate mofetil to tacrolimus and methotrexate for acute graft-versus-host disease prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant*. juill 2010;16(7):937-47.
28. Ali R, Ramdial J, Algaze S, Beitinjaneh A. The Role of Anti-Thymocyte Globulin or Alemtuzumab-Based Serotherapy in the Prophylaxis and Management of Graft-Versus-Host Disease. *Biomedicines*. 29 nov 2017;5(4):E67.
29. Gooptu M, Romee R, St Martin A, Arora M, Al Malki M, Antin JH, et al. HLA-haploidentical vs matched unrelated donor transplants with posttransplant cyclophosphamide-based prophylaxis. *Blood*. 22 juill 2021;138(3):273-82.
30. Lutz M, Mielke S. New perspectives on the use of mTOR inhibitors in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation and graft-versus-host disease. *Br J Clin Pharmacol*. nov 2016;82(5):1171-9.

31. Toubai T, Magenau J. Immunopathology and biology-based treatment of steroid-refractory graft-versus-host disease. *Blood*. 23 juill 2020;136(4):429-40.
32. Mohty M, Holler E, Jagasia M, Jenq R, Malard F, Martin P, et al. Refractory acute graft-versus-host disease: a new working definition beyond corticosteroid refractoriness. *Blood*. 22 oct 2020;136(17):1903-6.
33. Przepiorka D, Luo L, Subramaniam S, Qiu J, Gudi R, Cunningham LC, et al. FDA Approval Summary: Ruxolitinib for Treatment of Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease. *Oncologist*. févr 2020;25(2):e328-34.
34. Shapiro RM, Antin JH. Therapeutic options for steroid-refractory acute and chronic GVHD: an evolving landscape. *Expert Rev Hematol*. mai 2020;13(5):519-32.
35. Gergis U, van Besien K. Tocilizumab, in search for a role in acute GVHD. *Leuk Lymphoma*. sept 2019;60(9):2101-3.
36. Danylesko I, Bukauskas A, Paulson M, Peceliunas V, Gedde-Dahl D Y T, Shimoni A, et al. Anti- α 4 β 7 integrin monoclonal antibody (vedolizumab) for the treatment of steroid-resistant severe intestinal acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. juill 2019;54(7):987-93.
37. Magenau JM, Goldstein SC, Peltier D, Soiffer RJ, Braun T, Pawarode A, et al. α 1-Antitrypsin infusion for treatment of steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Blood*. 22 mars 2018;131(12):1372-9.
38. Ehx G, Fransolet G, de Leval L, D'Hondt S, Lucas S, Hannon M, et al. Azacytidine prevents experimental xenogeneic graft-versus-host disease without abrogating graft-versus-leukemia effects. *Oncoimmunology*. 2017;6(5):e1314425.
39. Kitko CL, Levine JE. Extracorporeal photopheresis in prevention and treatment of acute GVHD. *Transfus Apher Sci*. avr 2015;52(2):151-6.
40. Crocchiolo R, Cesana C, Girgenti D, Bertani G, Barba C, Liga G, et al. Tregs and GvHD prevention by extracorporeal photopheresis: observations from a clinical trial. *Exp Hematol Oncol*. 16 févr 2021;10(1):14.
41. Payen M, Nicolis I, Robin M, Michonneau D, Delannoye J, Mayeur C, et al. Functional and phylogenetic alterations in gut microbiome are linked to graft-versus-host disease severity. *Blood Adv*. 12 mai 2020;4(9):1824-32.
42. van Lier YF, Davids M, Haverkate NJE, de Groot PF, Donker ML, Meijer E, et al. Donor fecal microbiota transplantation ameliorates intestinal graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Sci Transl Med*. 12 août 2020;12(556):eaaz8926.
43. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilah J, et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*. 15 août 2006;108(4):1291-7.
44. Safinia N, Leech J, Hernandez-Fuentes M, Lechler R, Lombardi G. Promoting transplantation tolerance; adoptive regulatory T cell therapy. *Clin Exp Immunol*. mai 2013;172(2):158-68.
45. Coman T, Rossignol J, D'Aveni M, Fabiani B, Dussiot M, Rignault R, et al. Human CD4- invariant NKT lymphocytes regulate graft versus host disease. *Oncoimmunology*. 2018;7(11):e1470735.

46. Rubio MT, Moreira-Teixeira L, Bachy E, Bouillié M, Milpied P, Coman T, et al. Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival. *Blood*. 6 sept 2012;120(10):2144-54.
47. D'Aveni M, Rossignol J, Coman T, Sivakumaran S, Henderson S, Manzo T, et al. G-CSF mobilizes CD34+ regulatory monocytes that inhibit graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. 1 avr 2015;7(281):281ra42.
48. D'Aveni M, Notarantonio AB, Bertrand A, Boulangé L, Pochon C, Rubio MT. Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Context of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2020;11:989.
49. Bonig H, Kuçi Z, Kuçi S, Bakhtiar S, Basu O, Bug G, et al. Children and Adults with Refractory Acute Graft-versus-Host Disease Respond to Treatment with the Mesenchymal Stromal Cell Preparation « MSC-FFM »-Outcome Report of 92 Patients. *Cells*. 5 déc 2019;8(12).
50. Cutler CS, Koreth J, Ritz J. Mechanistic approaches for the prevention and treatment of chronic GVHD. *Blood*. 5 janv 2017;129(1):22-9.
51. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
52. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. oct 1970;3(4):393-403.
53. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. avr 2006;24(4):150-4.
54. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. sept 2009;88(9):792-806.
55. Griffiths MJD, Bonnet D, Janes SM. Stem cells of the alveolar epithelium. *Lancet*. 16 juill 2005;366(9481):249-60.
56. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 19 sept 2003;114(6):763-76.
57. Rossignoli F, Caselli A, Grisendi G, Piccinno S, Burns JS, Murgia A, et al. Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood. *Biomed Res Int*. 2013;2013:901821.
58. Fong CY, Richards M, Manasi N, Biswas A, Bongso A. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. *Reprod Biomed Online*. déc 2007;15(6):708-18.
59. McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, McLean WH. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem Soc Trans*. févr 1991;19(1):29S.
60. Davies JE, Walker JT, Keating A. Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Transl Med*. 10 mai 2017;6(7):1620-30.

61. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 11 sept 2008;3(3):301-13.
62. N GC, P C, Y S, T MM, Y G, Nd D, et al. Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo. *Cell stem cell* [Internet]. 3 févr 2017 [cité 9 avr 2022];20(3). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28111199/>
63. Bharti D, Shivakumar SB, Park JK, Ullah I, Subbarao RB, Park JS, et al. Comparative analysis of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells derived from different parts of the same umbilical cord. *Cell Tissue Res*. avr 2018;372(1):51-65.
64. Subramanian A, Fong CY, Biswas A, Bongso A. Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*. 2015;10(6):e0127992.
65. Sarugaser R, Hanoun L, Keating A, Stanford WL, Davies JE. Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PLoS One*. 4 août 2009;4(8):e6498.
66. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. janv 2018;93(1):19-31.
67. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*. août 2006;91(8):1017-26.
68. Reppel L, Margossian T, Yaghi L, Moreau P, Mercier N, Leger L, et al. Hypoxic culture conditions for Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's jelly: a critical parameter to consider in a therapeutic context. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014;9(4):306-18.
69. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. mai 2006;24(5):1294-301.
70. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells*. nov 2008;26(11):2865-74.
71. Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, Phillips N, Kay MA, Eiermann T, et al. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(5):655-67.
72. Somal A, Bhat IA, B I, Pandey S, Panda BSK, Thakur N, et al. A Comparative Study of Growth Kinetics, In Vitro Differentiation Potential and Molecular Characterization of Fetal Adnexa Derived Caprine Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156821.
73. Laroye C, Gauthier M, Antonot H, Decot V, Reppel L, Bensoussan D. Mesenchymal Stem/Stromal Cell Production Compliant with Good Manufacturing Practice: Comparison between Bone Marrow, the Gold Standard Adult Source, and Wharton's Jelly, an Extraembryonic Source. *J Clin Med*. 14 déc 2019;8(12):E2207.
74. Laroye C, Lemarié J, Boufenzer A, Labroca P, Cunat L, Alauzet C, et al. Clinical-grade mesenchymal stem cells derived from umbilical cord improve septic shock in pigs. *Intensive Care Med Exp*. 8 août 2018;6(1):24.

75. Laroye C, Boufenger A, Jolly L, Cunat L, Alauzet C, Merlin JL, et al. Bone marrow vs Wharton's jelly mesenchymal stem cells in experimental sepsis: a comparative study. *Stem Cell Res Ther.* 27 juin 2019;10(1):192.
76. Pochon C, Notarantonio AB, Laroye C, Reppel L, Bensoussan D, Bertrand A, et al. Wharton's jelly-derived stromal cells and their cell therapy applications in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *J Cell Mol Med.* mars 2022;26(5):1339-50.
77. Manochantr S, U-pratya Y, Kheolamai P, Rojphisan S, Chayosumrit M, Tantrawatpan C, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord. *Intern Med J. avr 2013;43(4):430-9.*
78. Najar M, Raicevic G, Boufker HI, Kazan HF, Bruyn CD, Meuleman N, et al. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cellular Immunology.* 1 janv 2010;264(2):171-9.
79. Najar M, Raicevic G, Boufker HI, Fayyad-Kazan H, De Bruyn C, Meuleman N, et al. Adipose-tissue-derived and Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells suppress lymphocyte responses by secreting leukemia inhibitory factor. *Tissue Eng Part A.* nov 2010;16(11):3537-46.
80. Donders R, Bogie JFJ, Ravanidis S, Gervois P, Vanheusden M, Marée R, et al. Human Wharton's Jelly-Derived Stem Cells Display a Distinct Immunomodulatory and Proregenerative Transcriptional Signature Compared to Bone Marrow-Derived Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 15 janv 2018;27(2):65-84.
81. Munir H, Luu NT, Clarke LSC, Nash GB, McGettrick HM. Comparative Ability of Mesenchymal Stromal Cells from Different Tissues to Limit Neutrophil Recruitment to Inflamed Endothelium. *PLoS One.* 2016;11(5):e0155161.
82. Shin S, Lee J, Kwon Y, Park KS, Jeong JH, Choi SJ, et al. Comparative Proteomic Analysis of the Mesenchymal Stem Cells Secretome from Adipose, Bone Marrow, Placenta and Wharton's Jelly. *Int J Mol Sci.* 15 janv 2021;22(2):E845.
83. Deng Y, Zhang Y, Ye L, Zhang T, Cheng J, Chen G, et al. Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Monocytes Towards an IL10-producing Phenotype by Secreting IL6 and HGF. *Sci Rep.* 5 déc 2016;6:37566.
84. Noone C, Kihm A, English K, O'Dea S, Mahon BP. IFN- γ stimulated human umbilical-tissue-derived cells potently suppress NK activation and resist NK-mediated cytotoxicity in vitro. *Stem Cells Dev.* 15 nov 2013;22(22):3003-14.
85. Chao K, Zhang S, Qiu Y, Chen X, Zhang X, Cai C, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells protect against experimental colitis via CD5(+) B regulatory cells. *Stem Cell Res Ther.* 11 août 2016;7(1):109.
86. Avercenc-Léger L, Guerci P, Virion JM, Cauchois G, Hupont S, Rahouadj R, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells: predictive obstetric factors for cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Stem Cell Res Ther.* 5 juill 2017;8(1):161.
87. Wobma HM, Kanai M, Ma SP, Shih Y, Li HW, Duran-Struuck R, et al. Dual IFN- γ /hypoxia priming enhances immunosuppression of mesenchymal stromal cells through regulatory proteins and metabolic mechanisms. *J Immunol Regen Med.* mars 2018;1:45-56.

88. Lu Z, Chang W, Meng S, Xu X, Xie J, Guo F, et al. Mesenchymal stem cells induce dendritic cell immune tolerance via paracrine hepatocyte growth factor to alleviate acute lung injury. *Stem Cell Res Ther.* 4 déc 2019;10:372.
89. Bernardo ME, Cometa AM, Locatelli F. Mesenchymal stromal cells: a novel and effective strategy for facilitating engraftment and accelerating hematopoietic recovery after transplantation? *Bone Marrow Transplant.* mars 2012;47(3):323-9.
90. Markov A, Thangavelu L, Aravindhan S, Zekiy AO, Jarahian M, Chartrand MS, et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a valuable source for the treatment of immune-mediated disorders. *Stem Cell Research & Therapy* [Internet]. 2021 [cité 30 janv 2022];12. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7971361/>
91. Xu K, Yin N, Peng M, Stamatiades EG, Shyu A, Li P, et al. Glycolysis Fuels Phosphoinositide 3-Kinase Signaling to Bolster T Cell Immunity. *Science.* 22 janv 2021;371(6527):405-10.
92. Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR, et al. The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism. *Immunity.* 1 juin 2002;16(6):769-77.
93. Böttcher M, D. Hofmann A, Bruns H, Haibach M, Loschinski R, Saul D, et al. Mesenchymal Stromal Cells Disrupt mTOR-Signaling and Aerobic Glycolysis During T-Cell Activation. *STEM CELLS.* 2016;34(2):516-21.
94. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Chhang, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, et al. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity.* 23 déc 2011;35(6):871-82.
95. MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic Regulation of T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 21 mars 2013;31:259-83.
96. Hough KP, Chisolm DA, Weinmann AS. Transcriptional regulation of T cell metabolism. *Mol Immunol.* déc 2015;68(2 0 0):520-6.
97. Sukumar M, Liu J, Ji Y, Subramanian M, Crompton JG, Yu Z, et al. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. *J Clin Invest.* oct 2013;123(10):4479-88.
98. Buck MD, O'Sullivan D, Klein Geltink RI, Curtis JD, Chang CH, Sanin DE, et al. Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell.* 30 juin 2016;166(1):63-76.
99. Wang G, Cao K, Liu K, Xue Y, Roberts AI, Li F, et al. Kynurenic acid, an IDO metabolite, controls TSG-6-mediated immunosuppression of human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* juill 2018;25(7):1209-23.
100. Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Indoleamine 2,3-dioxygenase depletes tryptophan, activates general control non-derepressible 2 kinase and down-regulates key enzymes involved in fatty acid synthesis in primary human CD4+ T cells. *Immunology.* oct 2015;146(2):292-300.
101. Metz R, Rust S, Duhadaway JB, Mautino MR, Munn DH, Vahanian NN, et al. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncoimmunology.* 1 déc 2012;1(9):1460-8.
102. Kawasaki Y, Sato K, Mashima K, Nakano H, Ikeda T, Umino K, et al. Mesenchymal Stromal Cells Inhibit Aerobic Glycolysis in Activated T Cells by Negatively Regulating Hexokinase II Activity Through PD-1/PD-L1 Interaction. *Transplant Cell Ther.* mars 2021;27(3):231.e1-231.e8.

103. Eleftheriadis T, Pissas G, Sounidaki M, Tsogka K, Antoniadis N, Antoniadis G, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase, by degrading L-tryptophan, enhances carnitine palmitoyltransferase I activity and fatty acid oxidation, and exerts fatty acid-dependent effects in human alloreactive CD4⁺ T-cells. *Int J Mol Med*. nov 2016;38(5):1605-13.
104. Bauer TM, Jiga LP, Chuang JJ, Randazzo M, Opelz G, Terness P. Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo. *Transplant International*. 2005;18(1):95-100.
105. Siska PJ, Jiao J, Matos C, Singer K, Berger RS, Dettmer K, et al. Kynurenine induces T cell fat catabolism and has limited suppressive effects in vivo. *EBioMedicine*. déc 2021;74:103734.
106. Eleftheriadis T, Pissas G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Indoleamine 2, 3-dioxygenase Up-regulates Hypoxia-inducible Factor-1 α Expression by Degrading L-tryptophan but Not Its Activity in Human Alloreactive T-cells. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. févr 2018;17(1):56-67.
107. Li Y, Eskelund AR, Zhou H, Budac DP, Sánchez C, Gulinello M. Behavioral Deficits Are Accompanied by Immunological and Neurochemical Changes in a Mouse Model for Neuropsychiatric Lupus (NP-SLE). *International Journal of Molecular Sciences*. juill 2015;16(7):15150-71.
108. Crain SK, Robinson SR, Thane KE, Davis AM, Meola DM, Barton BA, et al. Extracellular Vesicles from Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Suppress CD4 Expressing T Cells Through Transforming Growth Factor Beta and Adenosine Signaling in a Canine Model. *Stem Cells Dev*. 1 févr 2019;28(3):212-26.
109. Chinnadurai R, Copland IB, Patel SR, Galipeau J. IDO-Independent Suppression of T Cell Effector Function by IFN- γ -Licensed Human Mesenchymal Stromal Cells. *The Journal of Immunology*. 15 févr 2014;192(4):1491-501.
110. 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*. 27 sept 2016;
111. Corsello T, Amico G, Corrao S, Anzalone R, Timoneri F, Lo Iacono M, et al. Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord: a Close-up on Immunomodulatory Molecules Featured In Situ and In Vitro. *Stem Cell Rev Rep*. déc 2019;15(6):900-18.
112. Yan W, Diao S, Fan Z. The role and mechanism of mitochondrial functions and energy metabolism in the function regulation of the mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 17 févr 2021;12:140.
113. Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, Prockop DJ. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 31 janv 2006;103(5):1283-8.
114. Levoux J, Prola A, Lafuste P, Gervais M, Chevallier N, Koumaiha Z, et al. Platelets Facilitate the Wound-Healing Capability of Mesenchymal Stem Cells by Mitochondrial Transfer and Metabolic Reprogramming. *Cell Metab*. 2 févr 2021;33(2):283-299.e9.
115. Vallabhaneni KC, Haller H, Dumler I. Vascular smooth muscle cells initiate proliferation of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer via tunneling nanotubes. *Stem Cells Dev*. 20 nov 2012;21(17):3104-13.
116. Jackson MV, Morrison TJ, Doherty DF, McAuley DF, Matthay MA, Kissenpfennig A, et al. Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells*. août 2016;34(8):2210-23.

117. Chu PPY, Bari S, Fan X, Gay FPH, Ang JML, Chiu GNC, et al. Intercellular cytosolic transfer correlates with mesenchymal stromal cell rescue of umbilical cord blood cell viability during ex vivo expansion. *Cytotherapy*. oct 2012;14(9):1064-79.
118. Mohammadalipour A, Dumbali SP, Wenzel PL. Mitochondrial Transfer and Regulators of Mesenchymal Stromal Cell Function and Therapeutic Efficacy. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:603292.
119. Burt R, Dey A, Aref S, Aguiar M, Akarca A, Bailey K, et al. Activated stromal cells transfer mitochondria to rescue acute lymphoblastic leukemia cells from oxidative stress. *Blood*. 24 oct 2019;134(17):1415-29.
120. Kumar PR, Saad M, Hellmich C, Mistry JJ, Moore JA, Conway S, et al. PGC-1 α induced mitochondrial biogenesis in stromal cells underpins mitochondrial transfer to melanoma. *Br J Cancer*. 26 mars 2022;
121. Matula Z, Mikala G, Lukácsi S, Matkó J, Kovács T, Monostori É, et al. Stromal Cells Serve Drug Resistance for Multiple Myeloma via Mitochondrial Transfer: A Study on Primary Myeloma and Stromal Cells. *Cancers (Basel)*. 10 juill 2021;13(14):3461.
122. Feng Y, Zhu R, Shen J, Wu J, Lu W, Zhang J, et al. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Rescue Endothelial Cells Experiencing Chemotherapy Stress by Mitochondrial Transfer Via Tunneling Nanotubes. *Stem Cells Dev*. 15 mai 2019;28(10):674-82.
123. Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Vasileva AK, Marey MV, Galkina SI, Isaev NK, et al. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. *J Cell Mol Med*. oct 2008;12(5A):1622-31.
124. Tseng N, Lambie SC, Huynh CQ, Sanford B, Patel M, Herson PS, et al. Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells improves neuronal metabolism after oxidant injury in vitro: The role of Miro1. *J Cereb Blood Flow Metab*. avr 2021;41(4):761-70.
125. Jiang D, Gao F, Zhang Y, Wong DSH, Li Q, Tse HF, et al. Mitochondrial transfer of mesenchymal stem cells effectively protects corneal epithelial cells from mitochondrial damage. *Cell Death Dis*. 10 nov 2016;7(11):e2467.
126. Court AC, Le-Gatt A, Luz-Crawford P, Parra E, Aliaga-Tobar V, Bátiz LF, et al. Mitochondrial transfer from MSCs to T cells induces Treg differentiation and restricts inflammatory response. *EMBO Rep*. 5 févr 2020;21(2):e48052.
127. Do JS, Zwick D, Kenyon JD, Zhong F, Askew D, Huang AY, et al. Mesenchymal stromal cell mitochondrial transfer to human induced T-regulatory cells mediates FOXP3 stability. *Sci Rep*. 21 mai 2021;11(1):10676.
128. Ahmad T, Mukherjee S, Pattnaik B, Kumar M, Singh S, Kumar M, et al. Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO J*. 2 mai 2014;33(9):994-1010.
129. Morrison TJ, Jackson MV, Cunningham EK, Kissenpfennig A, McAuley DF, O’Kane CM, et al. Mesenchymal Stromal Cells Modulate Macrophages in Clinically Relevant Lung Injury Models by Extracellular Vesicle Mitochondrial Transfer. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 nov 2017;196(10):1275-86.
130. Wang J, Liu X, Qiu Y, Shi Y, Cai J, Wang B, et al. Cell adhesion-mediated mitochondria transfer contributes to mesenchymal stem cell-induced chemoresistance on T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Hematol Oncol*. 22 janv 2018;11(1):11.

131. Piekarska K, Urban-Wójciuk Z, Kurkowiak M, Pelikant-Matecka I, Schumacher A, Sakowska J, et al. Mesenchymal stem cells transfer mitochondria to allogeneic Tregs in an HLA-dependent manner improving their immunosuppressive activity. *Nat Commun.* 14 févr 2022;13(1):856.
132. Giallongo C, Dulcamare I, Tibullo D, Del Fabro V, Vicario N, Parrinello N, et al. CXCL12/CXCR4 axis supports mitochondrial trafficking in tumor myeloma microenvironment. *Oncogenesis.* 21 janv 2022;11(1):6.
133. Mahrouf-Yorgov M, Augeul L, Da Silva CC, Jourdan M, Rigolet M, Manin S, et al. Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties. *Cell Death Differ.* juill 2017;24(7):1224-38.
134. Agrawal M, Rasiah PK, Bajwa A, Rajasingh J, Gangaraju R. Mesenchymal Stem Cell Induced Foxp3(+) Tregs Suppress Effector T Cells and Protect against Retinal Ischemic Injury. *Cells.* 4 nov 2021;10(11):3006.
135. Kim SN, Lee HJ, Jeon MS, Yi T, Song SU. Galectin-9 is Involved in Immunosuppression Mediated by Human Bone Marrow-derived Clonal Mesenchymal Stem Cells. *Immune Netw.* oct 2015;15(5):241-51.
136. Dunavin N, Li M, Atay S, Mitchell J, Soder R, Abhyankar S, et al. CRISPR/Cas9-Mediated Disruption of PD-L1 Reduces the T Cell Suppressive Effect of Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles. *Blood.* 29 nov 2018;132(Supplement 1):5095.
137. Song JY, Kang HJ, Hong JS, Kim CJ, Shim JY, Lee CW, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell extracts reduce colitis in mice by re-polarizing intestinal macrophages. *Sci Rep.* 25 août 2017;7(1):9412.
138. Liu J, Xu W, Xu H, Zhang S, Jin J. Therapeutic Potential of Umbilical Cord MSC in Crohn's Disease Is Related to Regulation of the Relative Content and Function of Th17 Lymphocytes. *Bull Exp Biol Med.* mars 2022;172(5):658-63.
139. Darlan DM, Munir D, Putra A, Jusuf NK. MSCs-released TGFβ1 generate CD4+CD25+Foxp3+ in T-reg cells of human SLE PBMC. *J Formos Med Assoc.* janv 2021;120(1 Pt 3):602-8.
140. Grégoire C, Ritacco C, Hannon M, Seidel L, Delens L, Belle L, et al. Comparison of Mesenchymal Stromal Cells From Different Origins for the Treatment of Graft-vs.-Host-Disease in a Humanized Mouse Model. *Front Immunol.* 2019;10:619.
141. Wang D, Huang S, Yuan X, Liang J, Xu R, Yao G, et al. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus. *Cell Mol Immunol.* mai 2017;14(5):423-31.
142. Chun W, Tian J, Zhang Y. Transplantation of mesenchymal stem cells ameliorates systemic lupus erythematosus and upregulates B10 cells through TGF-β1. *Stem Cell Res Ther.* 25 sept 2021;12(1):512.
143. Kim JH, Jo CH, Kim HR, Hwang YI. Comparison of Immunological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from the Periodontal Ligament, Umbilical Cord, and Adipose Tissue. *Stem Cells Int.* 2018;2018:8429042.
144. Stubbendorff M, Deuse T, Hua X, Phan TT, Bieback K, Atkinson K, et al. Immunological properties of extraembryonic human mesenchymal stromal cells derived from gestational tissue. *Stem Cells Dev.* 1 oct 2013;22(19):2619-29.

145. Sioud M. New Insights into Mesenchymal Stromal Cell-Mediated T-Cell Suppression Through Galectins. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2011;73(2):79-84.
146. Yang S, Liang X, Song J, Li C, Liu A, Luo Y, et al. A novel therapeutic approach for inflammatory bowel disease by exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells to repair intestinal barrier via TSG-6. *Stem Cell Res Ther*. 29 mai 2021;12:315.
147. Luz-Crawford P, Hernandez J, Djouad F, Luque-Campos N, Caicedo A, Carrère-Kremer S, et al. Mesenchymal stem cell repression of Th17 cells is triggered by mitochondrial transfer. *Stem Cell Res Ther*. 1 août 2019;10(1):232.
148. de Witte SFH, Luk F, Sierra Parraga JM, Gargasha M, Merino A, Korevaar SS, et al. Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. *Stem Cells*. avr 2018;36(4):602-15.
149. Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia*. sept 2007;21(9):1992-9.
150. Chiesa S, Morbelli S, Morando S, Massollo M, Marini C, Bertoni A, et al. Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 oct 2011;108(42):17384-9.
151. Amable PR, Teixeira MVT, Carias RBV, Granjeiro JM, Borojevic R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther*. 16 avr 2014;5(2):53.
152. Kurtzberg J, Abdel-Azim H, Carpenter P, Chaudhury S, Horn B, Mahadeo K, et al. A Phase 3, Single-Arm, Prospective Study of Remestemcel-L, Ex Vivo Culture-Expanded Adult Human Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Pediatric Patients Who Failed to Respond to Steroid Treatment for Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. mai 2020;26(5):845-54.
153. Kebriaei P, Hayes J, Daly A, Uberti J, Marks DI, Soiffer R, et al. A Phase 3 Randomized Study of Remestemcel-L versus Placebo Added to Second-Line Therapy in Patients with Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. mai 2020;26(5):835-44.
154. Liu X, Wu M, Peng Y, Chen X, Sun J, Huang F, et al. Improvement in poor graft function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation upon administration of mesenchymal stem cells from third-party donors: a pilot prospective study. *Cell Transplant*. 2014;23(9):1087-98.
155. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. mai 2005;11(5):389-98.
156. Taghavi-Farahabadi M, Mahmoudi M, Rezaei N, Hashemi SM. Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Exosomes and Conditioned Media Increased Neutrophil Lifespan and Phagocytosis Capacity. *Immunol Invest*. nov 2021;50(8):1042-57.
157. Mao F, Wu Y, Tang X, Kang J, Zhang B, Yan Y, et al. Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Relieve Inflammatory Bowel Disease in Mice. *Biomed Res Int*. 2017;2017:5356760.
158. Harrell CR, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Other Extracellular Vesicles as New Remedies in the Therapy of Inflammatory Diseases. *Cells*. 11 déc 2019;8(12).

159. Soder RP, Dawn B, Weiss ML, Dunavin N, Weir S, Mitchell J, et al. A Phase I Study to Evaluate Two Doses of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of De Novo High-Risk or Steroid-Refractory Acute Graft Versus Host Disease. *Stem Cell Rev Rep.* oct 2020;16(5):979-91.
160. Wu QL, Liu XY, Nie DM, Zhu XX, Fang J, You Y, et al. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells ameliorate graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation through multiple immunoregulations. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* août 2015;35(4):477-84.
161. Zhu L, Wang Z, Zheng X, Ding L, Han D, Yan H, et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplant with umbilical cord-derived multipotent mesenchymal cell infusion for the treatment of high-risk acute leukemia in children. *Leuk Lymphoma.* mai 2015;56(5):1346-52.
162. Wu Y, Wang Z, Cao Y, Xu L, Li X, Liu P, et al. Cotransplantation of haploidentical hematopoietic and umbilical cord mesenchymal stem cells with a myeloablative regimen for refractory/relapsed hematologic malignancy. *Ann Hematol.* déc 2013;92(12):1675-84.
163. Gao L, Zhang Y, Hu B, Liu J, Kong P, Lou S, et al. Phase II Multicenter, Randomized, Double-Blind Controlled Study of Efficacy and Safety of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells in the Prophylaxis of Chronic Graft-Versus-Host Disease After HLA-Haploidentical Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol.* 20 août 2016;34(24):2843-50.
164. Wang H, Wang Z, Zheng X, Ding L, Zhu L, Yan H, et al. Hematopoietic stem cell transplantation with umbilical cord multipotent stromal cell infusion for the treatment of aplastic anemia--a single-center experience. *Cytotherapy.* sept 2013;15(9):1118-25.
165. Li XH, Gao CJ, Da WM, Cao YB, Wang ZH, Xu LX, et al. Reduced intensity conditioning, combined transplantation of haploidentical hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells in patients with severe aplastic anemia. *PLoS One.* 2014;9(3):e89666.
166. Wang Z, Zheng X, Yan H, Li D, Wang H. Good outcome of haploidentical hematopoietic SCT as a salvage therapy in children and adolescents with acquired severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant.* déc 2014;49(12):1481-5.
167. Wu KH, Tsai C, Wu HP, Sieber M, Peng CT, Chao YH. Human application of ex vivo expanded umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: enhance hematopoiesis after cord blood transplantation. *Cell Transplant.* 2013;22(11):2041-51.
168. Wu Y, Cao Y, Li X, Xu L, Wang Z, Liu P, et al. Cotransplantation of haploidentical hematopoietic and umbilical cord mesenchymal stem cells for severe aplastic anemia: successful engraftment and mild GVHD. *Stem Cell Res.* janv 2014;12(1):132-8.
169. Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One.* 2 févr 2010;5(2):e9016.
170. Redondo-Castro E, Cunningham CJ, Miller J, Brown H, Allan SM, Pinteaux E. Changes in the secretome of tri-dimensional spheroid-cultured human mesenchymal stem cells in vitro by interleukin-1 priming. *Stem Cell Res Ther.* 17 janv 2018;9(1):11.
171. Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol.* juin 2008;38(6):1745-55.

172. Wheelock EF, Sibley WA. CIRCULATING VIRUS, INTERFERON AND ANTIBODY AFTER VACCINATION WITH THE 17-D STRAIN OF YELLOW-FEVER VIRUS. *N Engl J Med.* 22 juill 1965;273:194-8.
173. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* févr 2006;24(2):386-98.
174. Sheng H, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y, Wang L, et al. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res.* août 2008;18(8):846-57.
175. English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett.* 15 juin 2007;110(2):91-100.
176. Vigo T, Procaccini C, Ferrara G, Baranzini S, Oksenberg JR, Matarese G, et al. IFN- γ orchestrates mesenchymal stem cell plasticity through the signal transducer and activator of transcription 1 and 3 and mammalian target of rapamycin pathways. *J Allergy Clin Immunol.* mai 2017;139(5):1667-76.
177. Yang R, Huang H, Cui S, Zhou Y, Zhang T, Zhou Y. IFN- γ promoted exosomes from mesenchymal stem cells to attenuate colitis via miR-125a and miR-125b. *Cell Death Dis.* 30 juill 2020;11(7):603.
178. Kim DS, Jang IK, Lee MW, Ko YJ, Lee DH, Lee JW, et al. Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- γ . *EBioMedicine.* févr 2018;28:261-73.
179. Badillo AT, Beggs KJ, Javazon EH, Tebbets JC, Flake AW. Murine Bone Marrow Stromal Progenitor Cells Elicit an In Vivo Cellular and Humoral Alloimmune Response. *Biol Blood Marrow Transplant.* avr 2007;13(4):412-22.
180. Boyt DT, Boland LK, Burand AJ, Brown AJ, Ankrum JA. Dose and duration of interferon γ pre-licensing interact with donor characteristics to influence the expression and function of indoleamine-2,3-dioxygenase in mesenchymal stromal cells. *J R Soc Interface.* juin 2020;17(167):20190815.
181. François M, Copland IB, Yuan S, Romieu-Mourez R, Waller EK, Galipeau J. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing. *Cytotherapy.* févr 2012;14(2):147-52.
182. Lefèvre A, Mavel S, Nadal-Desbarats L, Galineau L, Attucci S, Dufour D, et al. Validation of a global quantitative analysis methodology of tryptophan metabolites in mice using LC-MS. *Talanta.* 1 avr 2019;195:593-8.
183. Blazar BR, Taylor PA, McElmurry R, Tian L, Panoskaltsis-Mortari A, Lam S, et al. Engraftment of severe combined immune deficient mice receiving allogeneic bone marrow via In utero or postnatal transfer. *Blood.* 15 nov 1998;92(10):3949-59.
184. He H, Nagamura-Inoue T, Takahashi A, Mori Y, Yamamoto Y, Shimazu T, et al. Immunosuppressive properties of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells in vitro. *Int J Hematol.* 1 sept 2015;102(3):368-78.
185. Li X, Xu Z, Bai J, Yang S, Zhao S, Zhang Y, et al. Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce T Lymphocyte Apoptosis and Cell Cycle Arrest by Expression of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase. *Stem Cells Int.* 2016;2016:7495135.

186. Wang D, Feng X, Lu L, Konkel JE, Zhang H, Chen Z, et al. A CD8 T cell/indoleamine 2,3-dioxygenase axis is required for mesenchymal stem cell suppression of human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* août 2014;66(8):2234-45.
187. Burnham AJ, Foppiani EM, Horwitz EM. Key Metabolic Pathways in MSC-Mediated Immunomodulation: Implications for the Prophylaxis and Treatment of Graft Versus Host Disease. *Front Immunol.* 7 déc 2020;11:609277.
188. Castro-Portuguez R, Sutphin GL. Kynurenine pathway, NAD⁺ synthesis, and mitochondrial function: targeting tryptophan metabolism to promote longevity and healthspan. *Exp Gerontol.* avr 2020;132:110841.
189. Gasparrini M, Sorci L, Raffaelli N. Enzymology of extracellular NAD metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(7):3317-31.
190. Lee HJ, Jung H, Kim DK. IDO and CD40 May Be Key Molecules for Immunomodulatory Capacity of the Primed Tonsil-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 28 mai 2021;22(11):5772.
191. Chen J, Wang Q, Feng X, Zhang Z, Geng L, Xu T, et al. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Suppress Autophagy of T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus via Transfer of Mitochondria. *Stem Cells Int.* 2016;2016:4062789.
192. Zhang X, Sreekumar A. Rewired Metabolism Regulates Vessel Normalization and Immunosuppression. [cité 18 avr 2022]; Disponible sur: <https://grantome.com/grant/NIH/R01-CA227904-02>
193. Bader P, Kuçi Z, Bakhtiar S, Basu O, Bug G, Dennis M, et al. Effective treatment of steroid and therapy-refractory acute graft-versus-host disease with a novel mesenchymal stromal cell product (MSC-FFM). *Bone Marrow Transplant.* juill 2018;53(7):852-62.
194. Kannan S, Viswanathan P, Gupta PK, Kolkundkar UK. Characteristics of Pooled Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells (WJ-MSCs) and their Potential Role in Rheumatoid Arthritis Treatment. *Stem Cell Rev Rep.* 3 févr 2022;
195. Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, et al. IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol.* juin 1994;96(3):432-6.
196. Kunstfeld R, Lechleitner S, Wolff K, Petzelbauer P. MCP-1 and MIP-1alpha are most efficient in recruiting T cells into the skin in vivo. *J Invest Dermatol.* déc 1998;111(6):1040-4.
197. Brown CE, Vishwanath RP, Aguilar B, Starr R, Najbauer J, Aboody KS, et al. Tumor-derived chemokine MCP-1/CCL2 is sufficient for mediating tumor tropism of adoptively transferred T cells. *J Immunol.* 1 sept 2007;179(5):3332-41.
198. Huffnagle GB, Strieter RM, Standiford TJ, McDonald RA, Burdick MD, Kunkel SL, et al. The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4⁺ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol.* 15 nov 1995;155(10):4790-7.
199. Valença-Pereira F, Fang Q, Marié IJ, Giddings EL, Fortner KA, Yang R, et al. IL-6 enhances CD4 cell motility by sustaining mitochondrial Ca²⁺ through the noncanonical STAT3 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 sept 2021;118(37):e2103444118.

200. Higashino N, Koma YI, Hosono M, Takase N, Okamoto M, Kodaira H, et al. Fibroblast activation protein-positive fibroblasts promote tumor progression through secretion of CCL2 and interleukin-6 in esophageal squamous cell carcinoma. *Lab Invest.* juin 2019;99(6):777-92.
201. Jang YK, Kim M, Lee YH, Oh W, Yang YS, Choi SJ. Optimization of the therapeutic efficacy of human umbilical cord blood-mesenchymal stromal cells in an NSG mouse xenograft model of graft-versus-host disease. *Cytotherapy.* mars 2014;16(3):298-308.
202. Prigozhina TB, Khitrin S, Elkin G, Eizik O, Morecki S, Slavin S. Mesenchymal stromal cells lose their immunosuppressive potential after allotransplantation. *Exp Hematol.* oct 2008;36(10):1370-6.
203. Sanchez-Diaz M, Quiñones-Vico MI, Sanabria de la Torre R, Montero-Vílchez T, Sierra-Sánchez A, Molina-Leyva A, et al. Biodistribution of Mesenchymal Stromal Cells after Administration in Animal Models and Humans: A Systematic Review. *J Clin Med.* 29 juin 2021;10(13):2925.
204. Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, Ishimori T, Kedziorek D, Walczak P, et al. Dynamic Imaging of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Trafficking to Myocardial Infarction. *Circulation.* 6 sept 2005;112(10):1451-61.
205. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood.* 15 avr 2003;101(8):2999-3001.
206. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell.* 2 juill 2009;5(1):54-63.
207. Chinnadurai R, Copland IB, Garcia MA, Petersen CT, Lewis CN, Waller EK, et al. Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Are Susceptible to T-Cell Mediated Apoptosis Which Is Partly Rescued by IFN γ Licensing. *Stem Cells.* sept 2016;34(9):2429-42.
208. Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol.* janv 2000;18(2):307-16.
209. Sokal EM, Lombard CA, Roelants V, Najimi M, Varma S, Sargiacomo C, et al. Biodistribution of Liver-Derived Mesenchymal Stem Cells After Peripheral Injection in a Hemophilia A Patient. *Transplantation.* août 2017;101(8):1845-51.
210. Mäkelä T, Takalo R, Arvola O, Haapanen H, Yannopoulos F, Blanco R, et al. Safety and biodistribution study of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and mononuclear cells and the impact of the administration route in an intact porcine model. *Cytotherapy.* avr 2015;17(4):392-402.
211. Tögel F, Yang Y, Zhang P, Hu Z, Westenfelder C. Bioluminescence imaging to monitor the in vivo distribution of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* juill 2008;295(1):F315-321.
212. Cerri S, Greco R, Levandis G, Ghezzi C, Mangione AS, Fuzzati-Armentero MT, et al. Intracarotid Infusion of Mesenchymal Stem Cells in an Animal Model of Parkinson's Disease, Focusing on Cell Distribution and Neuroprotective and Behavioral Effects. *Stem Cells Transl Med.* sept 2015;4(9):1073-85.

213. Hamidian Jahromi S, Davies JE. Concise Review: Skeletal Muscle as a Delivery Route for Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Transl Med.* 5 févr 2019;8(5):456-65.
214. Léotot J, Lebouvier A, Hernigou P, Bierling P, Rouard H, Chevallier N. Bone-Forming Capacity and Biodistribution of Bone Marrow-Derived Stromal Cells Directly Loaded Into Scaffolds: A Novel and Easy Approach for Clinical Application of Bone Regeneration. *Cell Transplant.* 2015;24(10):1945-55.
215. Lebouvier A, Poignard A, Cavet M, Amiaud J, Leotot J, Hernigou P, et al. Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: study of their biodistribution in the early time points after injection. *Stem Cell Res Ther.* 13 avr 2015;6:68.
216. Bazhanov N, Ylostalo JH, Bartosh TJ, Tiblow A, Mohammadipoor A, Foskett A, et al. Intraperitoneally infused human mesenchymal stem cells form aggregates with mouse immune cells and attach to peritoneal organs. *Stem Cell Res Ther.* 10 févr 2016;7:27.
217. Packthongsuk K, Rathbun T, Troyer D, Davis DL. Porcine Wharton's jelly cells distribute throughout the body after intraperitoneal injection. *Stem Cell Res Ther.* 14 févr 2018;9:38.
218. Xie P, Hu X, Li D, Xie S, Zhou Z, Meng X, et al. Bioluminescence Imaging of Transplanted Mesenchymal Stem Cells by Overexpression of Hepatocyte Nuclear Factor4 α : Tracking Biodistribution and Survival. *Mol Imaging Biol.* févr 2019;21(1):44-53.
219. Liu JJ, Hu XJ, Li ZR, Yan RH, Li D, Wang J, et al. In Vivo Bioluminescence Imaging of Transplanted Mesenchymal Stromal Cells and Their Rejection Mediated by Intrahepatic NK Cells. *Mol Imaging Biol.* févr 2017;19(1):31-40.
220. Tappenbeck N, Schröder HM, Niebergall-Roth E, Hassinger F, Dehio U, Dieter K, et al. In vivo safety profile and biodistribution of GMP-manufactured human skin-derived ABCB5-positive mesenchymal stromal cells for use in clinical trials. *Cytotherapy.* mai 2019;21(5):546-60.
221. Mastro-Martínez I, Pérez-Suárez E, Melen G, González-Murillo Á, Casco F, Lozano-Carbonero N, et al. Effects of local administration of allogenic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery in experimental traumatic brain injury. *Brain Inj.* 2015;29(12):1497-510.
222. Geng K, Yang ZX, Huang D, Yi M, Jia Y, Yan G, et al. Tracking of mesenchymal stem cells labeled with gadolinium diethylenetriamine pentaacetic acid by 7T magnetic resonance imaging in a model of cerebral ischemia. *Mol Med Rep.* févr 2015;11(2):954-60.
223. Duan X, Lu L, Wang Y, Zhang F, Mao J, Cao M, et al. The long-term fate of mesenchymal stem cells labeled with magnetic resonance imaging-visible polymersomes in cerebral ischemia. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:6705-19.
224. Mezzanotte L, Iljas JD, Que I, Chan A, Kaijzel E, Hoeben R, et al. Optimized Longitudinal Monitoring of Stem Cell Grafts in Mouse Brain Using a Novel Bioluminescent/Near Infrared Fluorescent Fusion Reporter. *Cell Transplant.* déc 2017;26(12):1878-89.
225. Marquina M, Collado JA, Pérez-Cruz M, Fernández-Pernas P, Fafián-Labora J, Blanco FJ, et al. Biodistribution and Immunogenicity of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells in a Rat Model of Intraarticular Chondrocyte Xenotransplantation. *Front Immunol.* 6 nov 2017;8:1465.
226. Moll G, Rasmusson-Duprez I, von Bahr L, Connolly-Andersen AM, Elgue G, Funke L, et al. Are therapeutic human mesenchymal stromal cells compatible with human blood? *Stem Cells.* juill 2012;30(7):1565-74.

227. Tu Z, Li Q, Bu H, Lin F. Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H. *Stem Cells Dev.* nov 2010;19(11):1803-9.
228. Moll G, Jitschin R, von Bahr L, Rasmusson-Duprez I, Sundberg B, Lönnies L, et al. Mesenchymal Stromal Cells Engage Complement and Complement Receptor Bearing Innate Effector Cells to Modulate Immune Responses. *PLoS One.* 1 juill 2011;6(7):e21703.
229. Russell KA, Koch TG. Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture - too much of a good thing? *Equine Vet J.* mars 2016;48(2):261-4.
230. Galleu A, Riffo-Vasquez Y, Trento C, Lomas C, Dolcetti L, Cheung TS, et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Sci Transl Med.* 15 nov 2017;9(416):eaam7828.
231. Jackson MV, Krasnodembskaya AD. Analysis of Mitochondrial Transfer in Direct Co-cultures of Human Monocyte-derived Macrophages (MDM) and Mesenchymal Stem Cells (MSC). *Bio Protoc.* 5 mai 2017;7(9):e2255.
232. Wunderlich M, Chou FS, Sexton C, Presicce P, Chougnet CA, Aliberti J, et al. Improved multilineage human hematopoietic reconstitution and function in NSGS mice. *PLoS One.* 2018;13(12):e0209034.

ANNEXES

ANNEXE 1 : chapitre de livre

Immunology of Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Maud D'Aveni-Piney^{a,b}, Anne Béatrice Notarantonio^{a,b}, Cécile Pochon^{a,b}, and Marie-Thérèse Rubio^{a,b}, ^aClinical Hematology and BMT Department, Brabois Hospital, University Hospital of Nancy, Nancy, France; ^bCNRS UMR 7365, Lorraine University, Nancy, France

© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

This is an update of M.T. Rubio, T. Coman, J. Rossignol, M. D'Aveni, M. Bouillié, O. Hermine, Immunology of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Reference Module in Biomedical Sciences, 2014, ISBN 9780128012383, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00126-4>.

Introduction	572
Post-transplant immune reconstitution	573
The graft versus leukemia (GVL) effect	573
Proof of concept	573
Immunological mechanisms	574
Antigen presenting cells	574
T cells	575
NK cells	575
Immune evasion	576
Graft versus host disease	576
Immunobiology of acute GVHD	576
The "3 phases"	576
Role of conditioning, danger signals and microbiota	577
Role and origin of antigen presenting cells	577
Role of T cell subsets	578
Role of homing molecules and tissue specific receptors	578
Role of immunoregulatory cells	578
Immunology of chronic GVHD	581
Therapeutic immune modulation	582
Conventional immunosuppressive agents	582
Novel immunomodulatory approaches	583
Tyrosine kinase inhibitors	583
Belumosudil	583
5-Azacytidin	583
Anti-BCL2	583
Cellular immunotherapy	583
Adaptive lymphoid cells: Regulatory T cells	583
Innate lymphoid cells	584
Myeloid cells: MDSCs	584
Non hematopoietic cells MSCs	584
Conclusion	584
References	584

Abbreviations

ALL	Acute lymphocytic leukemia
APC	Antigen presenting cell
ATG	Anti-thymoglobuline
B reg	Regulatory B lymphocyte
BAFF	B-cell Activating Factor of the TNF family
BM	Bone marrow
CLA	Cutaneous lymphocyte-associated antigen
CMV	Cytomegalovirus
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DAMPs	Damage-associated molecular pattern molecules
DC	Dendritic cell
DLI	Donor lymphocyte infusion
DNA	Deoxyribonucleic acid

EBV	Epstein-Barr virus
ECP	Extracorporeal photopheresis
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
GI	Gastro intestinal
GVHD	Graft-versus-host disease
GVL	Graft-versus-leukemia
HHV6	Human herpes Virus 6
HLA	Human leucocyte antigen
HSC	Hematopoietic stem cells
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation
HSV	Herpes simplex virus
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN γ	Interferon gamma
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
Jak	Janus kinases
KIR	Killer-cell immunoglobulin-like receptor
LC	Langerhans cell
LN	Lymph node
LPS	Lipopolysaccharide
Mad-CAM	Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell
mHa	Minor histocompatibility antigens
MHC	Major histocompatibility complex
MMF	Mycophenolate mofetil
MSC	Mesenchymal stem cells
mTor	Mammalian Target of rapamycin
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NF-kB	Nuclear factor-kB
NK	Natural killer
NLR	NOD-like receptors
NO	Azote monoxide
NPM1	Nucleophosmin
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBSC	Peripheral blood stem cells
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
T reg	Regulatory T lymphocyte
TAA	Tumor associated antigen
TGF- β	Tumor growth factor
TLRs	Toll-like receptors
TNF α	Tumor necrosis factor
VZV	Varicella-zoster virus
WT1	Wilms tumor 1

Introduction

The principle of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) was first explored in the mid of the 1950s to overcome the aplasia induced by lethal radiation accidents. Experiments in mice rapidly showed that transplanting lethally irradiated mice with allogeneic hematopoietic stem cells (HSC) not only allowed engraftment of hematopoietic cells but was also associated, when leukemic cells were injected with the stem cell graft, with the development of an anti-leukemic effect called "graft versus leukemic effect" (GVL effect). However, allografted mice developed an immune mediated «secondary disease» called "graft-versus-host disease" (GVHD) (Granot and Storb, 2020).

In humans, the first case of leukemia cured by an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) performed between syngeneic brothers was reported by Donnall Thomas in 1957. Then this procedure had been expanded with the discovery of the HLA system at the end of the 1950s and the better knowledge of how to use it in the context of allo-HSCT in the aim to decrease the risk of GVHD. Because of the GVL effect, allogeneic HSCT is being used as curative treatment of leukemias since the beginning of the 1970s (Granot and Storb, 2020).

Nowadays, allo-HSCT is still the only potential curative treatment for some hematopoietic malignant and non-malignant diseases. Because the success of this therapy is still compromised by the development of the life-threatening GVHD, various immunosuppressive and immunomodulatory therapies are associated to prevent GVHD. However, cumulating these therapies with

long-lasting immunosuppressive effects may increase the incidence of malignancy recurrence and infections. Therefore, cellular strategies allowing more transient modulation of alloreactivity with regulatory cells are gaining interest in the field.

Post-transplant immune reconstitution

Immune reconstitution after allogeneic HSCT is a slow process requiring the development of a new immune system from the donor cells. If myeloid lineage reconstitutes in the first weeks following transplantation, the recovery of lymphoid cell subtypes, particularly of T and B cells, is affected by the use of immunocompromising drugs, affecting both recipient and donor immunity. These latter include the chemotherapy and/or total body irradiation of the conditioning regimen as well as in vivo T cell depleting agents such as anti-thymocyte globulin (ATG) or post-transplantation cyclophosphamide, that are required to allow HSC engraftment and prevent lethal GVHD. The deepness and length of these secondary humoral and cellular deficiencies are influenced by several factors such as the age of recipient, the source of HSC, the level of HLA disparity between donor and recipient, the intensity of conditioning regimen, the use and type of T cell depletion but also the occurrence of GVHD and the duration of immunosuppressive treatments (Ogonek et al., 2016).

With respect to lymphocyte deficiency, while the NK cell population reconstitution occurs within the first weeks after HSCT, T lymphocytes remain quantitatively and qualitatively deficient during the first 6–12 months post-transplant. The lymphocyte quantitative defect mainly concerns naive and CD4⁺ T cells with a prolonged inversion of the CD4/CD8 ratio. Indeed, CD8⁺ T cells recover within the first 3–6 months. In addition, during the first year post-HSCT, T cell expansion is usually oligoclonal and the T cell repertoire diversity is poor and particularly affected in the case of the development of acute GVHD.

Recipient antigen presenting cells (APC) disappear during the first 6 months post-transplant while donor APCs have distinct recovery patterns. While monocytes reconstitution occurs in the first weeks post-transplant, dendritic cells (DCs) recover between 6 and 12 months after HSCT. A slow B cell reconstitution associated with severe and prolonged hypogammaglobulinemia is frequently observed during the first 6–12 months after transplantation (Fig. 1) (Ogonek et al., 2016).

Despite granulocyte recovery, the lymphocyte immune deficiency is responsible for a susceptibility towards infectious agents mainly viruses (HSV, CMV, VZV, EBV, HHV6, BK, Polyomavirus Enterovirus, Respiratory viruses, Adenovirus), fungi (*Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis jirovecii*, *Cryptococcus*, *cryptosporidium*), some encapsulated bacteria (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus*, mycobacterias) and parasites (*Toxoplasma gondii*) (Fig. 2A). The risk of infection or reactivation is increased in case of occurrence of GVHD requiring prolonged immunosuppressive therapies and is dependent on the level of CD4 T cell recovery (Fig. 2B) (Ogonek et al., 2016).

The graft versus leukemia (GVL) effect

Proof of concept

The demonstration of the role of donor T cells in the generation of the life threatening GVHD led to perform T cell depleted allogeneic HSCT. If this approach could effectively reduce the risk of acute GVHD, the strategy was also associated with higher incidence of disease relapse. The anti-leukemic effect of allogeneic HSCT was also suggested by higher leukemia response rates observed in patients receiving an allogeneic HSCT rather than a syngeneic HSCT. In addition, the possibility of achieving disease control after administration of donor lymphocyte infusions (DLI) in patients relapsing with chronic myeloid leukemia following allogeneic HSCT confirmed the role of donor T cells in the induction of the GVL effect (Dickinson et al., 2017).

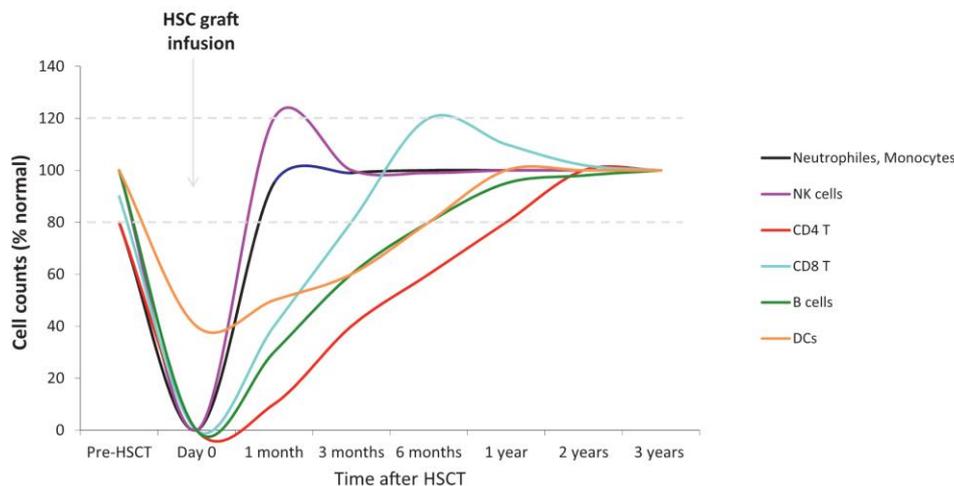
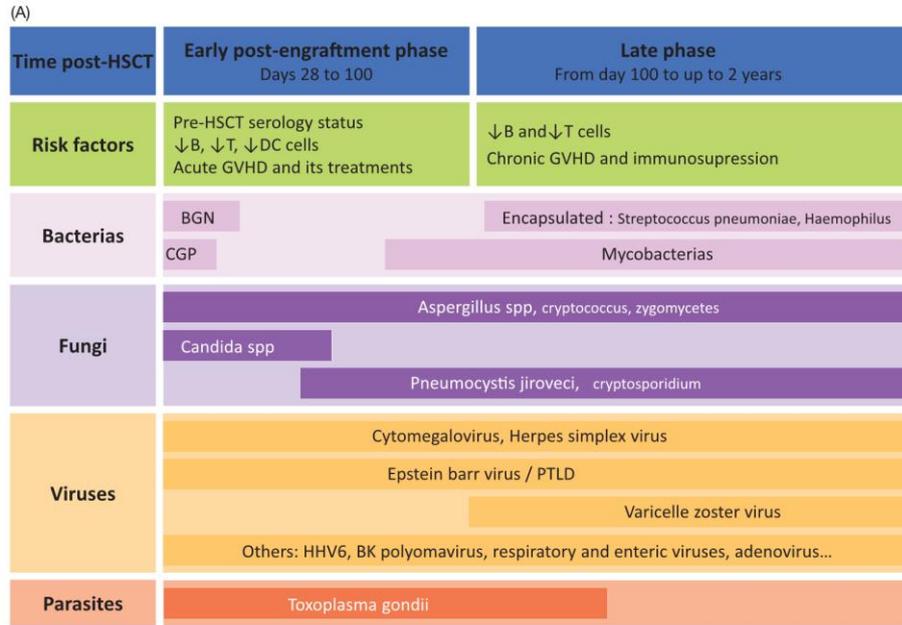


Fig. 1 Immune cell recovery after allogeneic HSCT.



DC: dendritic cells, BGN: Bacille Gram negative, CGP: Cocci gram positive, PTLD: post-tranplant lymphoproliferative disease

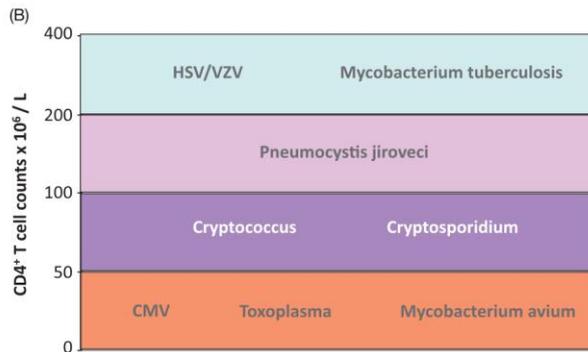


Fig. 2 (A) Potential infections after allogeneic HSCT. (B) Risk of infection/reaktivation according to CD4 T cell counts after allogeneic HSCT.

Initially demonstrated in leukemias, the GVL effect has also been shown in other hematological malignancies. Therefore, pre-emptive DLI (performed in case of detectable minimal residual disease (MRD) and/or of mixed chimerism status) have been well studied to improve patient outcomes. This approach induces a high rate of conversion from mixed chimerism to complete chimerism and allows durable remissions with a risk of developing GVHD (Dickinson et al., 2017).

Immunological mechanisms

Several subsets of immune cells and immunological mechanisms are involved in the graft versus leukemia/tumor effect (Dickinson et al., 2017).

Antigen presenting cells

A large pool of potential APCs can be considered including normal subsets of DCs, leukemia-derived DCs, B cells, macrophages and leukemic cells themselves. It has been demonstrated in mice that host APCs can present allo-antigens and tumor associated antigens and thus are able to trigger naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cell primed and licensed to kill (Fig. 3). Moreover, donor-derived APCs are able to take over the GVL effect by inducing long term anti-tumor responses, particularly if the tumor burden is low.

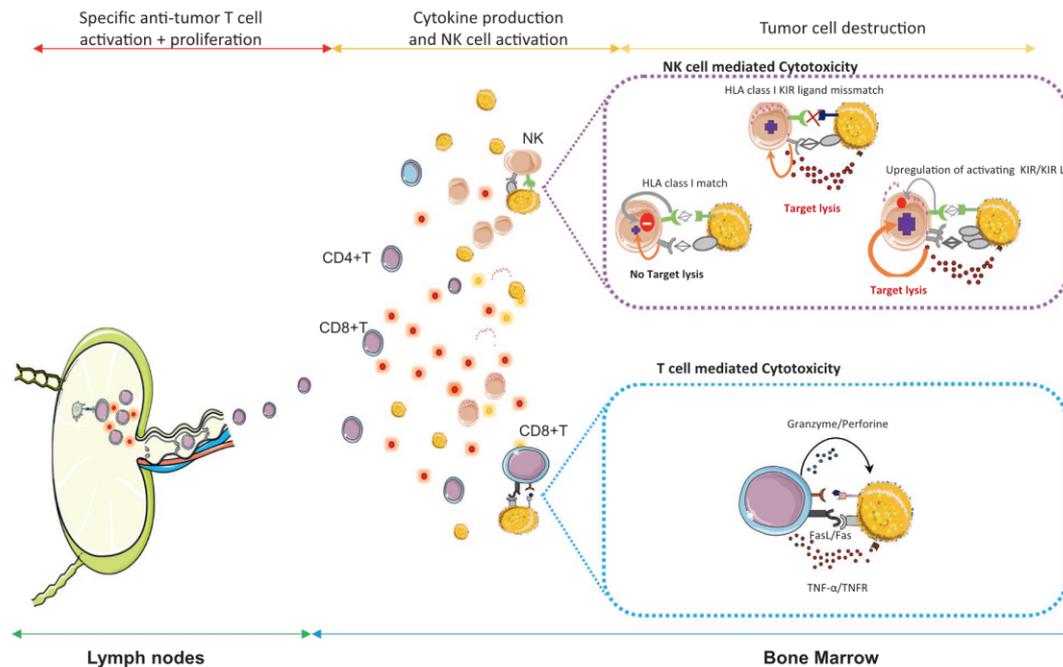


Fig. 3 Mechanisms of graft versus Leukemia effect.

T cells

Both donor CD4⁺ and CD8⁺ T cells are required for the GVL response. This observation led to investigate which allo-antigens could be involved in the immunotherapeutic effect of allogeneic HSCT. Gene polymorphisms between donor and recipient induce differences in sequences of homologous peptide derived proteins that are called minor histocompatibility antigens (mHa). These class I or class II MHC-restricted epitopes can be recognized by donor CD8⁺ or CD4⁺ specific T cells and can eradicate leukemic cells after experimental adoptive transfer. Currently, three classes of allo-antigen are described:

- First, tissue restricted mHAs like HA-1, HA-2, HB-1, BCL2A1 or LRH-1. These antigens are only expressed on hematopoietic cells and should not induce GVHD. Specific CTLs for these antigens have been found in patients after allo-HSCT or DLI in correlation with responses against leukemic cells. Moreover, HB-1 and BCL2A1 alloantigen specific CTLs can induce in vitro the lysis of leukemic cells.
- Second, ubiquitously expressed mHAs. These antigens, such as HA-8 and UGT2B17 can be involved in the GVHD and/or GVL effects depending on their tissue expression. LRH-1 represents an interesting target due to its preferential expression on CD34⁺ leukemic cells, which might explain the low incidence of GVHD in patients with LRH-1 specific CTLs.
- Third, tumor associated antigens (TAAs). These antigens can be proteins aberrantly expressed on tumor cells such as WT1, Proteinase 3 or Survivin. Despite their expression in normal tissues, TAAs overexpression could allow T cells to discriminate between normal and tumor cells, and bypass natural tolerance to self-antigens, which explains that TAA specific CTL generation correlates with a better outcome. Some trials of WT1-based vaccination have reported vaccine-induced immunological and clinical responses. Other tumor antigens are malignant-cell-restricted proteins generated either from chromosome translocations or gene mutations, for instance NPM1 or internal tandem duplication of FLT3. Such tumor specific mutated proteins can also be recognized by the immune system. These allo-antigens are interesting targets because they can induce specific CTLs in vitro with cytolytic activity against leukemic but not normal CD34⁺ cells in patients.

Different cytotoxic mechanisms leading target cell killing by T cells have been recognized: CD8⁺ cytotoxic T-cells (CTL) mainly use perforin/granzyme degranulation following TCR-mHa/MHC Class I binding. CD4⁺ T cells, besides their helper function in producing IL-2 (interleukin 2) and IFN- γ (Interferon gamma), can also act as CTLs by the release of perforin. Other cytotoxic pathways have been reported such as Fas/FasL or membrane-anchored or soluble TNF α via TNF-receptors but their implication in the induction of the GVL effect in humans remains to be demonstrated (Fig. 3).

NK cells

Natural Killer (NK) cells are characterized by their capacity to kill target cells such as tumor cells depending on their expression of killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs), which recognize activating or inhibitory ligands expressed on target cells.

The signal induced by the recognition of inhibitory KIRs (for instance CD94/NKG2A) by inhibitory ligands, mainly HLA class I molecules, leads to the inhibition of the cytotoxicity of the NK cell. After specific ligand recognition, the signaling through activating KIRs (for instance CD94/NKG2C and NKG2D recognize the stress induced MIC-A and MIC-B molecules on tumor or infected cells) induce the lysis of the target cell. The expression of activating receptors and ligands can be upregulated in the context of inflammation or stress such as in viral infections or in tumors. NK cells will kill a target cell either in the absence of inhibitory signals (HLA class I missing) or in the presence of a relative higher expression of activating ligands (inflammation/stress) (Fig. 3).

The implication of NK cells in the GVL effect was first suggested in the context of haplo-identical HSCT in the presence of HLA class I mismatch. The main HLA epitopes involved in cytotoxicity are HLA-C1, C2 and Bw4. In this setting, the GVL is driven by donor NK-cell expressing KIRs not inhibited by the recipient HLA class I molecules (recipient missing the inhibitory KIR ligands). In this context, KIR mismatched NK cells might also kill recipient APCs and hematopoietic stem cells and thus reduce the risk of GVHD and facilitate engraftment (Ruggeri et al., 2002).

Because KIR and HLA genes are localized in distinct chromosomes (chromosome 19q13.4 and 6p21, respectively) and thus segregate independently, an HLA matched donor-recipient pair can be KIR-mismatched. More recent studies exploring NK alloreactivity on transplant outcomes has then been performed in matched unrelated HSCT (MUD). However, in this setting, the role of the KIR-ligand mismatches on the risk of disease relapse is still controversial.

Immune evasion

Accumulating evidence recently suggest that disease relapse after allo-HSCT is mediated by tumor cell escape to the alloreactive immune response (Zeiser and Vago, 2019). Because donor cell exhaustion has been observed in relapsing patients, immune checkpoint blockade has been shown to be able to improve the antitumor effect of allo-HSCT with a risk of inducing severe acute GVHD. Recent studies have demonstrated that relapse post-HSCT is associated with dysregulation of adaptive and innate immunity, including down-regulation of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules inducing a permissive environment to promote T cell immune evasion in myeloid and lymphoid malignancies. Higher proportion of early-differentiated Memory Stem (T_{SCM}) and Central Memory T cells expressing multiple inhibitory receptors on their cell surface (PD1, Tim3, LAG3...) with impaired functions have been observed in patients relapsing after allo-HSCT. Reduced cytotoxic capacities of anti-leukemic effector T cells have been correlated with metabolic alterations such as decrease in glycolytic and oxidative metabolisms associated with impaired effector cytokine production (such as IFN- γ and TNF- α) (Zeiser and Vago, 2019).

Graft versus host disease

Two distinct clinical presentations of graft versus host disease are described (Ferrara et al., 2009). Acute graft versus host-disease usually occurs in the 3–6 first months post-transplantation and is characterized by acute organ toxicity mainly involving the skin, the gastro-intestinal tract and the liver. Chronic GVHD classically develops after 3 months post-transplant and presents features of auto-immune diseases with inflammatory and fibrotic features. The chronic form of the disease can affect multiple organs most frequently the skin and subcutaneous connective tissues, lacrimal and salivary glands, oral mucosa, lungs, gastrointestinal tract, liver and joints.

Immunobiology of acute GVHD

The “3 phases”

The immunopathophysiology of GVHD has been essentially explored in mouse models in which it has been classically described in 3 phases (Fig. 4) (Zeiser and Blazar, 2018).

In the first phase, the chemotherapy and radiation used for transplant conditioning induce tissue damages, particularly in the gut, associated with epithelial cell destruction and endothelial inflammation leading to the release of inflammatory signals (cytokines such as TNF α , damaged tissue release DAMPs, microbial flora release PAMPs including LPS and CpG). Such inflammatory signals induce the maturation and activation of recipient APCs, characterized by the up regulation of surface co-stimulatory molecules, the production of cytokines and the capacity to migrate to secondary lymphoid organs.

The second phase takes place in secondary lymphoid organs where fully mature recipient APCs present a broad spectrum of antigens (major or minor histocompatibility antigens) to donor T lymphocytes. Activated APCs and T lymphocytes produce pro-inflammatory cytokines that include IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12, IL-18, IL-21 and IL-17. This “cytokine storm” induces the activation of a large spectrum of other immune cells (NK, monocytes, macrophages). Alloreactive T cells can acquire the expression of specific tissue homing molecules and migrate towards inflamed GVHD target tissues (skin, GI, liver).

In the third phase, inflamed GVHD target tissues attract polynuclear cells, monocytes, mast cells, macrophages, and activated donor T cells that release several inflammatory cytokines enhancing the immune response. Host epithelial and endothelial cells can be attacked and destroyed by cytotoxic molecules released by activated macrophages and T cells, such as TNF- α , IFN- γ , IL-1 and azote monoxide (NO) and by alloreactive cytotoxic T cells expressing or secreting death molecules (Fas-L, Perforin).

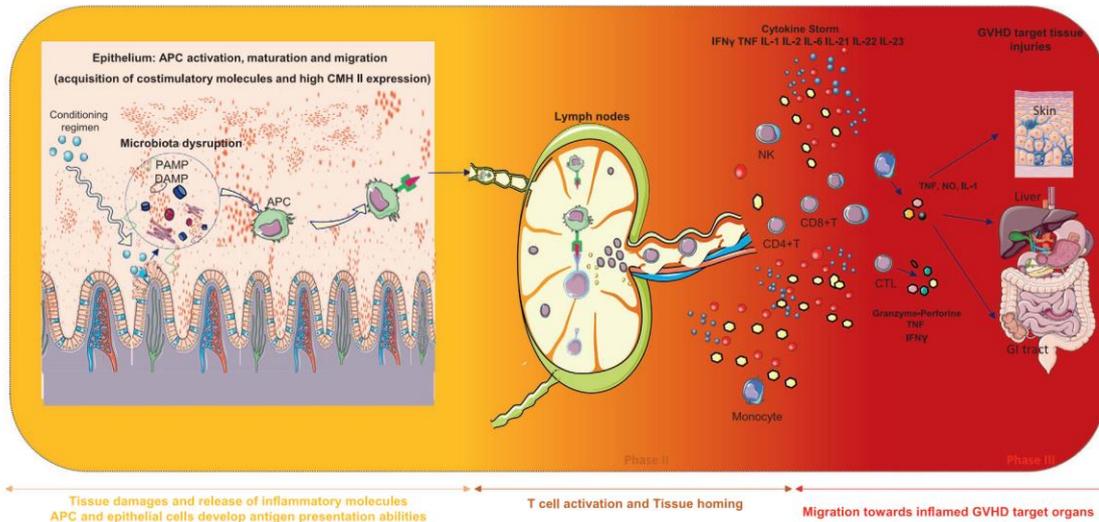


Fig. 4 Pathophysiology of acute GVHD.

Role of conditioning, danger signals and microbiota

The conditioning regimen performed to allow the engraftment of donor allogeneic stem cells is usually based on chemotherapy or radio-chemotherapy, both of which induce tissue damages and the release of “danger signals.” This phenomenon is classically attributed to the release of inflammatory cytokines, tissue and microbial release proteins (DAMPs and PAMPs such as CpG and LPS) from injured, stressed, or dying cells and bacteria, in particular in the gastrointestinal tract. Those bacterial-derived and cellular danger components signal via toll-like receptors (TLRs) or NOD-like receptors (NLR) expressed on APCs. Gut microbiota play an important role in the regulation of GVHD (Fredricks, 2019). Microbiota diversity can be strongly impaired after allo-HSCT secondary to conditioning regimen and the frequent use of broad-spectrum antibiotics. A disequilibrium with loss of butyrate producing bacteria and other beneficial commensals associated with a relative increase in pathogenic bacterial such as *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Staphylococcus* and *Streptococcus* has been described in allografted mice and patients. Colonization, before allo-HSCT, by multi-drug resistant bacteria and *Clostridium difficile* have been correlated with a higher risk of developing acute GVHD. Enterococcal expansion has been described in patients developing acute GI GVHD. Reduction of *blautia*, a clostridial specie producing butyrate, has been associated with increased mortality due to GVHD. This microbiota disequilibrium induces the activation of APCs through TLRs increasing T cell stimulation and innate cell recruitment but also reduces GI epithelium integrity (loss of protection by butyrate, reduction of protective mucus . . .) and enhances the destruction of Paneth cells explaining the sera increase in antimicrobial peptides (AMPs), such as Reg3 α , that play a crucial role in the regulation of the equilibrium between activated and regulatory T cells in the mucosa (Fredricks, 2019).

Role and origin of antigen presenting cells

There are multiple types of APCs in diverse anatomic locations and with various recirculatory patterns that could be implicated in activating allogeneic T cells.

Professional APCs include dendritic cells, macrophages and B lymphocytes and have the capacity of antigen uptake, processing, and so-called direct presentation of peptides on major histocompatibility complex (CMH) class II to CD4⁺ T lymphocytes. Among those, DCs are not only the most efficient in direct presentation but also have the specific ability to cross present soluble antigens on CMH class I to CD8⁺ T lymphocytes.

DCs represent a heterogeneous population, schematically composed of two main distinct subtypes: conventional and plasmacytoid DC.

Conventional lymphoid DCs reside in lymphoid organs such as lymph nodes, spleen and thymus and lack migratory properties. By contrast, some conventional migratory dendritic cells are found in peripheral tissues such as skin, lung, intestinal tract, liver, and kidney. They are characterized by their unique ability to acquire antigens and subsequently migrate to the draining lymph nodes, where they interact with T cells. Among those, within the skin, Langerhans cells (LCs) and dermal DCs have a particular slow turnover and prolonged half-life.

Plasmacytoid DCs (pDCs) comprise a distinct DC subset found both in lymphoid and non-lymphoid organs and are characterized by rapid production of type I interferon in response to viral infections and the ability to differentiate into mature DC with high T cell stimulatory activity.

Several studies have been performed to determine which subsets of APCs are implicated in the activation of allogeneic T cells. In terms of subsets of APCs, circulating DCs and pDCs rapidly acquire a full donor chimerism, suggesting that circulating recipient's APCs are rapidly replaced by donor's ones. By contrast, a consistent pool of recipient LC and dermal DC can survive within weeks after allogeneic HSCT, even after myeloablative conditioning regimen, in humans and animal models. These different DC subsets have been reported from murine models to be the main players, rather than B cells and macrophages, in the induction of GVHD. A role of pDCs has been suggested in humans since patients with skin or intestinal acute GVHD have an increased infiltration of pDCs in those GVHD target organs.

In terms of origin of APCs, there is strong evidence in murine models for a crucial role of host's APCs in donor T cell allogeneic activation and effector differentiation, essentially via the direct presentation of recipient antigens to donor T cells. Other experimental data have also demonstrated a minor role for donor APCs cross presenting host antigens in initiating acute GVHD. However, these could drive further tissue injuries and exacerbate GVHD or pave the way for the installation of chronic GVHD (cGVHD).

Besides professional APC, there is growing evidence that non-hematopoietic cells can acquire a significant role in antigen presentation and the capacity to trigger alloreactivity, especially in an inflammatory context such as in the allogeneic HSC transplant setting. Among candidates, MHC II⁺ myofibroblasts and epithelial cells within the gastrointestinal tract, stellate cells within liver, especially intra-hepatic Ito cells and endothelial cells seem to be involved even if the extent of their implications in GVHD remains to be fully characterized.

To increase the complexity of the process, in some cytokine environment, some tolerogenic DCs can emerge. Those can present antigens without co-stimulatory molecules or deliver inhibitory signals driving immune tolerance. Indeed, they can produce T-cell inhibitory cytokines such as IL-10 and TGF- β , induce T cell anergy and/or generate regulatory T cells. Although induced regulatory/tolerogenic DCs can control GVHD in mice, their physiological role in the context of human allogeneic HSCT is unknown (Stenger et al., 2012).

Role of T cell subsets

Both the CD4⁺ and CD8⁺ T cells are involved in the pathobiology of acute GVHD. The CD4⁺ counterpart has a predominantly helper function but can also become cytotoxic, while the CD8⁺ counterpart is mainly cytotoxic.

In murine experimental models, naive CD3⁺CD44⁻ or CD62L⁺ and CCR7⁺ T cells exacerbate acute GVHD lethality while memory CD3⁺CD44⁺ or CD62L⁻CCR7⁻ protect mice from GVHD. In humans, a relative higher proportion of CCR7⁺ naive CD3⁺T cells in the stem cell graft has been associated with an increased risk of acute GVHD.

Depending on the cytokine context, murine and humans CD4⁺ T cells can differentiate into Th1, Th2, Th-9, Th17, Th22 or T regulatory cells. In experimental murine models of GVHD, naive alloreactive CD4⁺ T cells predominantly differentiate into Th1 cells, but a portion of them also differentiate into Th2 or Th17 cells. Th1 differentiation leads to tissue damage in the gut and liver, while Th2 and Th17 differentiation induces tissue damage in lung (mainly Th2) and skin (predominantly Th17). Down regulation of Th1 differentiation induces an increase in Th2 and Th17 responses responsible for an exacerbation of lung and skin GVHD while sparing the gut and vice versa. In addition, IL-22 producing T cells have been shown to protect mice from gut GVHD. In humans, the respective role of CD4⁺ Th differentiation remains poorly explored. Th1 and Th17 signatures have been observed in acute GVHD, while increased Th2 T cells in the stem cell graft is associated with a reduced risk of aGVHD.

Role of homing molecules and tissue specific receptors

Grafted T cells first transit through secondary lymphoid organs where they encounter APC before taking a direction to a specific target organ. In that context, lymph node homing markers (CCR7 and CD62L) are of major importance. Murine models of ASCT confirmed that CCR7^{-/-} T cells were not competent to induce GvHD and blockage of CD62L could reduce GvHD. In humans, adoptive transfer of CD62L⁻ T cells in MHC-mismatched recipients could reduce the risk of GvHD.

CCR5, a chemokine involved in migration to both lymph nodes and target organs including gastro-intestinal tract, has been extensively studied in murine models of ASCT. CCR5 polymorphisms have been shown to influence the risk of GvHD in patients.

Many selectins, integrins and chemokine receptors have been described in the migration of T cells towards peripheral tissues. Migration of donor T cells to gut-associated lymphoid tissues is dependent on the integrin α 4 β 7 and its ligand Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule (Mad-CAM). The integrin CD103 (the ligand of epithelial cell-specific E-Cadherin) has been implicated in the migration and cytolytic function of gut-infiltrating CD8⁺ lymphocytes during GvHD. Migration of lymphocytes to skin is directed by CLA, a ligand of E-selectin which is constitutively expressed on human dermal microvasculature and further increased by inflammation. The molecular effectors of lymphocyte migration to the liver in acute GVHD is more obscure although some evidence suggest the implication of integrin α 4 β 1 (VLA4), CCR5, and CD44.

Role of immunoregulatory cells

Allogeneic activation of donor T cells can be controlled by several immunosuppressive cell subsets (Fig. 5).

Regulatory T lymphocytes

A subset of CD4⁺T cells deriving from the thymus, named the natural T CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory lymphocytes (T regs), can inhibit the proliferation of alloreactive T cells in vitro and can separate GVH and GVT in mouse models of allogeneic HSCT. T regs inhibit the interaction between APCs and T cells by different mechanisms: (i) by contact dependent-means mainly via their expression of CTLA4, which inhibits the interactions APC/T and induces indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), an inhibitor of T

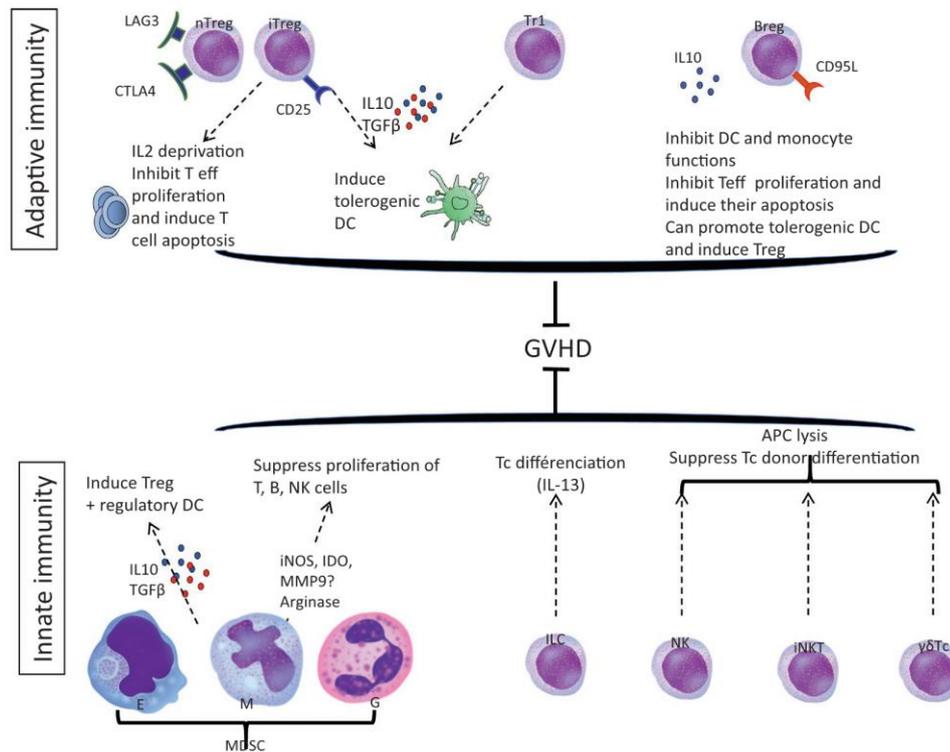


Fig. 5 Immunoregulatory cells implicated in the regulation of GVHD.

cell activation and proliferation, (ii) by competitive uptake of IL-2 and (iii) by the production of immunosuppressive cytokines such as IL-10 and TGF-β.

In humans, natural T regs are defined as CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low} T cells. Inducible T regulatory type 1 (Tr1) cells are characterized by the co-expression of CD49b and lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) and the ability to secrete IL-10, TGF-β, and granzyme B, in the absence of IL-4 and IL-17. The chief mechanisms by which Tr1 cells control immune responses are secretion of IL-10 and TGF-β and killing of myeloid cells via Granzyme B. The possibility to generate and expand Tr1 cells in vitro in an Ag-specific manner has led to their clinical use as cell therapy in patients.

A subgroup of CD4⁻CD8⁻CD3⁺TCRαβ⁺ T cells can inhibit alloreactive T cell functions in mice and humans by trogocytosis of APCs' alloantigens, reduction of the expression of co-stimulation molecules CD80/CD86 on DCs and induction of CD8 T cell apoptosis by Fas/FasL. They can control experimental GVHD in mice. Their role in human GVHD is unknown (Hefazi et al., 2021).

γδ T cells

They represent a subgroup of T cells expressing a γδ-TCR specialized in the recognition of heat shock proteins from tumor cells and some non-peptidic ligands. They are present in epithelial tissues and implicated in the innate anti-infectious and tumor immunity by their production of high amounts of IFN-γ and TNF. They also express some KIR, which enable them to kill target cells.

Some experimental data suggest a beneficial role of γδ T cells on the separation of GVH/GVL. An improved post-transplant reconstitution of γδ T cells in patients has been associated to a significant reduced risk of relapse without increasing the risk of GVHD but the mechanisms involved in their regulatory functions are unknown.

Invariant NKT lymphocytes (iNKT)

iNKT cells represent another immunoregulatory T cell population characterized by the expression of a TCR molecule composed of an invariant Vα chain (mVα14/hVα24Jα18) associated to a limited repertoire of Vβ chains. These cells recognize glycolipids presented by the CD1d molecule. They can produce, upon stimulation either by their TCR signal or in response to inflammatory cytokines (IL-12, IL-18, IL-33), important amounts of cytokines (Th-1, Th-2 or Th-17) and drive the immune response towards

tolerance or the elimination of pathogens or the removal of tumor cells. iNKT cells can also separate GVH et GVT in mouse models by the induction of Th-2 immune responses and the expansion of T regs (Kohrt et al., 2010).

An enhanced early post-transplantation recovery of total iNKT cells has been associated with reduced risk of acute GVHD while sparing the GVL effect (Rubio et al., 2012). A higher content of the stem cell graft in CD4⁺ iNKT cells has been reported to be associated with a reduced risk of acute GVHD (Chaidos et al., 2012). Altogether, these data argue for a regulatory role of iNKT cells in the control of GVHD. In a preclinical model of xeno-GVHD, CD4⁺ iNKT cells have been shown to be able to regulate GVHD by killing recipient APCs and therefore reducing alloreactive T cell activation (Rubio et al., 2012). In T cell depleted haplo-identical HSCT in pediatric ALL, the reconstitution of iNKT cells was inversely correlated with the risk of relapse suggesting a role for iNKT in the GVL effect.

Mesenchymal stem cells (MSC)

MSCs are a heterogeneous population of multipotent, self-renewing progenitors, that can be differentiated in adipocytes, chondrocytes, and osteocytes. They may be isolated from many adult and fetal tissues, particularly bone marrow (BM-MSCs), adipose tissue, dental pulp, amniotic fluid, embryonic placenta, umbilical cord, and other tissues. MSCs from various origins can suppress the activation and functions of most of the immune cells involved in the pathophysiology of GVHD (T cells, B cells, NK cells, monocytes, DCs). They display low immunogenicity in vitro, reason why they are studied as allogeneic adoptive cell therapy.

MSCs can inhibit T cells by cell contact interaction involving several molecules expressed on MSCs (particularly programmed death ligand 1 and 2, HLA-G, Galectin-1), and by the production of immunosuppressive mediators and metabolic changes (particularly tryptophan depletion and tryptophan metabolites via indoleamine 2,3 deoxygenase (IDO) activation, Transforming Growth Factor TGF- β , Hepatocyte Growth Factor, Prostaglandin E2, heme-oxygenase-1, leukemia inhibitory factor, and adenosine).

In addition, MSCs can modulate T cell functions by skewing Th-1 T-cell responses towards Th-2 T-cell responses, but also by the induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells (T regs) and the inhibition of naive CD4⁺ T differentiation into Th-17 cells. Moreover, MSCs impair the differentiation and maturation of monocytes and DCs and induce the generation of regulatory DCs such as plasmacytoid DCs. In vivo, allogeneic MSCs probably do not live long and could be killed by cytotoxic CD8⁺ T cells, and quickly phagocytosed. Their phagocytosis could lead to a key mechanism of immune modulation in vivo, by the development of anti-inflammatory monocytes which produce IDO. In patients, BM-MSCs have shown promising results to treat severe acute GVHD in children and adults. Other sources of MSCs (placenta and umbilical cord notably) are on clinical development to prevent or treat GVHD (Zhao et al., 2019).

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)

In the late 1970s, a suppressive cell population, called "natural suppressor cells, was first identified in murine and rat bone marrow, spleen, and lymphatic tissues. These cells displayed an ability to suppress T-cell responses in vivo and in vitro without regard to the typical restrictions imposed by the major histocompatibility complex (MHC). Nowadays, MDSCs represent a heterogeneous group of cells. Based on the expression of CD49d, two distinct subpopulations have been described in mice: the first was the monocytic CD49d⁺ subpopulation, which also displayed CD11b⁺ Ly6C⁺ Ly6G^{low} CD115⁺ and the second was the granulocytic CD49d⁻ counterpart, which displayed CD11b⁺ Ly6C⁻ Ly6G^{high} CD115⁻. In humans, three distinct MDSC subsets have been described, based on monocytic, granulocytic, and early-stage characteristics. They commonly do not express markers of mature myeloid and lymphoid cells (lineage negative). Thus, monocytic human MDSCs (M-MDSCs) are defined as: CD11b⁺CD33⁺ HLA-DR^{low/-} and CD14⁺; granulocytic MDSCs (G-MDSCs) are defined as: CD11b⁺ CD33⁺ HLA-DR^{low/-} CD15⁺ but CD14⁻; and early-stage MDSCs (called e- or P-MDSCs) are defined as: CD33⁺ CD11b^{low} HLA-DR^{low/-} CD14⁻ CD15⁻. MDSCs are mainly defined by their capacity to inhibit the proliferation of allogeneic T cells. To date, these immunosuppressive properties have been attributed to five main mechanisms demonstrated in vitro and in vivo, including: NO production; arginase 1-mediated L arginine depletion; indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-mediated tryptophan (an essential amino acid) conversion; and T regulatory lymphocyte (Treg) induction and reactive oxygen species (ROS) production. MDSCs can prevent GVHD while preserving the GVH effect in mouse models. Their role and potential impact on the GVL effect in humans is still debated (D'Aveni et al., 2020).

Regulatory B lymphocytes (B regs)

B cells derived from precursor cells that mature in the bone marrow. Briefly, immature B cells acquire B-cell receptors (BCRs) on their surfaces and undergo negative selection to delete or edit self-reactive B cells. Nonreactive immature B cells proceed through the circulation to the spleen and become transitional B cells, retaining high levels of immunoglobulin M (IgM) on their surfaces. In the spleen B-cell follicle, transitional B cells change into mature B cells and translate to the peripheral blood. B cells that have not encountered antigens are called naive B cells. In blood circulation, mature B cells receive stimulation from exogenous antigens and migrate towards lymphoid follicles as a result of germinal centre (GC) formation. In the GC, B cells interact with antigens presented by follicular dendritic cells, and B cells with low affinity move towards apoptosis, while high-affinity B cells proceed to plasma cells or memory B cells. This process is called positive selection. A subset of human and mouse B lymphocytes producing IL-10, named B-regs, has been reported to downregulate innate and adaptive immunity, inflammation, and autoimmunity. Since the first description, multiple subsets of B-regs, often with overlapping surface markers but diverse functions, have been reported. Among them, we can cite:

- CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} B cells play immunosuppressive roles by retaining Tregs as well as limiting T-helper type 1 (Th1) and Th17 differentiation.
- CD24^{high}CD27⁺ and CD27^{high}CD38^{high} plasmablast B-cell compartments play roles in inhibiting monocyte activation and cytokine production from CD4⁺ T cells.
- CD73⁻CD25⁺CD71⁺ human B regulatory could produce IL10.

In mouse models, B-reg reduction are observed in sclerodermic chronic GVHD and decreased numbers of lymphoid progenitors and immature B cells in bone marrow are observed in the bronchiolitis obliterans syndrome (BOS). In patients with chronic GVHD, significant differences in their B-cell subsets are described. Circulating pre-GC B cells (IgD⁺CD38^{high}CD27⁺) and post-GC “plasmablast-like” cells (IgD^{low}CD38^{high}CD27⁺) increase along with elevated BAFF in a BAFF-dependent way and can produce antibodies without the help of BCR or secondary signal stimulation (Li et al., 2019).

Immunology of chronic GVHD

The pathophysiology of chronic GVHD (cGVHD) has been also described in 3 phases (Fig. 6) (Chaidos et al., 2012). During the first phase, the conditioning regimen induces the destruction of epithelial thymic cells. Thymic damage leads to both defective negative selection of auto- and allo-reactive T cells that can support a reduction in the number or function of regulatory cells such as Tregs and a pathogenic B-cell development. In addition, thymic damages and reduction in regulatory cells are aggravated by the emergence of alloreactive T cells in case of acute GVHD occurrence. In the second phase, B cells become potent antigen-presenting cells, mature, and gain the functional capacity to process and present minor histocompatibility antigens for HLA-matched donor-recipient pairs to donor CD4 T cells. The induction of CD4⁺ T cell polarized towards TH2/TH17 subsets triggers B-cell maturation and production of B-cell survival cytokines (IL-21). During the third phase, T and B cells clonally expanded and resistant to apoptosis, traffic to chronic GVHD target organ sites where IL-13, IL-22, and IL-33 are released. They create a chronic inflammatory environment that can recruit macrophages which produce platelet-derived growth factor alpha (PDGF-α) and transforming growth factor beta (TGF-β) leading to fibrosis. The analysis of peripheral blood in patients suffering from chronic GVHD has shown an increase of (i) a factor implicated in the activation and survival of B cells (B cell activating factor of the tumor necrosis family, BAFF), (ii) high plasma BAFF levels and high BAFF/B-cell levels result in increased numbers of circulating pre-germinal center (GC) B cells and post-GC plasmablast-like cells, capable of producing donor-derived alloantibodies without antigen restimulation (iii) and a delay in reconstitution of naïve B cells (Zeiser and Blazar, 2017).

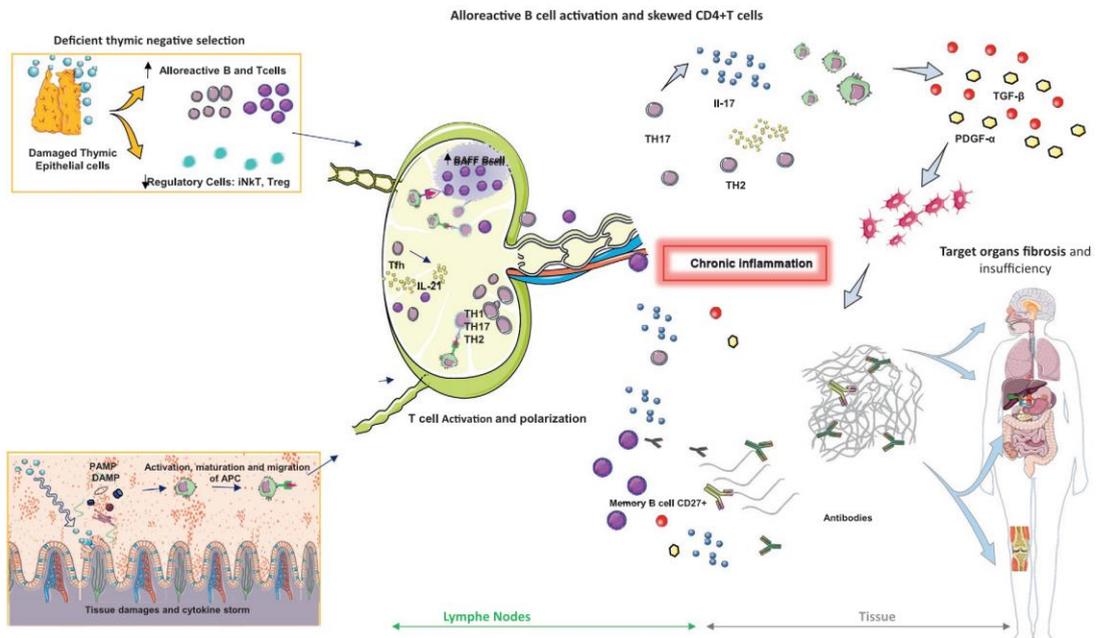


Fig. 6 Pathophysiology of chronic GVHD.

Therapeutic immune modulation

In clinical practice, the prevention and treatment of GVHD is based on the use of pharmacological agents mainly interacting with the activation of T cells by APCs (Penack et al., 2020). Such approaches have reduced the risk of developing acute and chronic GVHD and have allowed the development of mismatched allogeneic HSCT such as with partially matched cord blood units or haplo-identical HSC.

Conventional immunosuppressive agents

Immunosuppressive agents can interfere with at least one of the three signals implicated in the activation and proliferation of T cells following their interaction with APCs (Fig. 7). The first signal (signal 1) is mediated by the TCR stimulation which induces a cascade of intracellular protein phosphorylation leading to the activation of the serine threonine phosphatase calcineurin. This latter allows the dephosphorylation and activation of the transcriptional factor NFAT (nuclear factor of activated T cells). The NF- κ B pathway is also activated following TCR activation leading to the translocation to the nucleus of a transcription component. The latter induces the transcription of cytokines (predominantly IL-2), cytokine receptors (CD25 or IL-2R) and co-stimulation molecules (CD40L). The second signal (signal 2) is mediated by co-stimulation molecules expressed on APCs (CD80/86 and CD40) and their ligands expressed on activated T cells (CD28 and CD40L, respectively). The third signal (signal 3) is the consequence of the interactions between cytokines (IL-2, IL-15, IL-7) and their cognate receptors expressed on T cells. The stimulation of CD25 activates some janus kinases (Jak3/Stat5) and the mTOR protein (mammalian Target of rapamycin), both of which regulate the progression from the G1 to the S phase of the cell cycle leading to T cell proliferation, which also requires functional *de novo* DNA synthesis.

Commonly used immunosuppressive drugs to prevent and treat GVHD are: inhibitors of calcineurin (cyclosporin and tacrolimus), inhibitors of the cell cycle or DNA synthesis (MMF, Methotrexate), inhibitors of mTOR (sirolimus or everolimus), steroids (inhibiting APC/T cell interaction and cytokine production by T cells as well as T cell homing to inflamed tissues), anti-JAK (ruxolitinib, itacitinib) and ibrutinib that inhibits the Bruton's tyrosine kinase.

In addition to pharmacological agents targeting T cell activation, there are monoclonal antibodies and immunosuppressive strategies. They include T and B cell depleting antibodies including anti-thymocyte globulin (ATG), anti-CD52 (mabcampath), anti-CD20 (rituximab), anti-IL2 receptor or anti-CD25, and extracorporeal photopheresis (ECP), an *ex vivo* therapy of leukapheresis collected lymphocytes by a psoralen sensitizer exposed to ultraviolet light and subsequently re-infused to the patient. This procedure induces apoptotic T cells, tolerogenic DCs and increased T regs.

In addition, cyclophosphamide, an alkylating agent, that triggers the apoptosis of activated T cells while sparing Tregs has more recently introduced into the different strategies of GVHD prevention.

Indeed, all patients receiving allo-HSCT will receive a combination of immunosuppressive drugs to prevent acute and chronic GVHD. A combination of two pharmacological inhibitors is usually used in *ex vivo* non-T cell depleted allo-HSCT: a calcineurin inhibitor targeting signal 1 (cyclosporin A or tacrolimus) in association with an inhibitor of signal 3 (either the anti-metabolite methotrexate or the inhibitor of purines mycophenolate mofetyl (MMF) or the mTOR inhibitor rapamycin/Sirolimus).

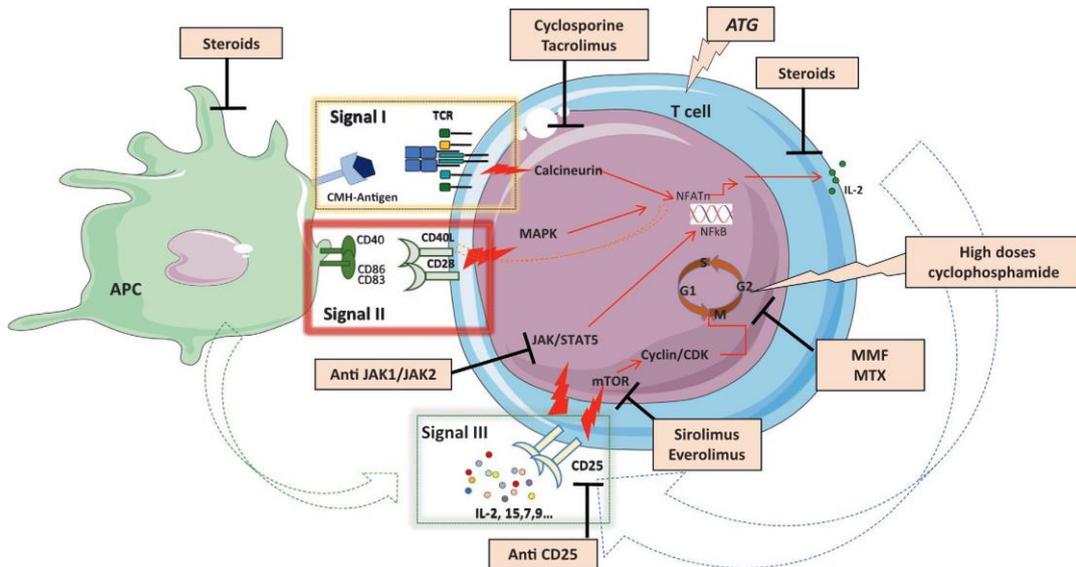


Fig. 7 Mechanisms of action of usual pharmacological immunosuppressive drugs.

In addition, administration of ATG before HSCT has been shown to prevent severe acute and chronic GVHD and is recommended in matched or mismatched unrelated or related donors. In haploidentical allo-HSCT, different GVHD prevention are used but the most developed is the administration of high doses of cyclophosphamide in a narrow window after transplantation (days 3 and 4 or 5) instead or in combination with ATG (Penack et al., 2020).

The first line treatment of acute or chronic GVHD is based on the use of steroids. Currently, ruxolitinib (JAK2 inhibitor) is the only approved drug for the treatment of steroid refractory acute and chronic GvHD (Zeiser et al., 2020). In third line, there is no consensus of treatment. None of the immunosuppressive drugs previously cited have significantly improved the poor prognosis of steroid resistant acute GVHD (OS <40% at 1 year) or steroid resistant severe chronic GVHD (30–50% mortality at 5 years) (Toubai and Magenau, 2020).

Novel immunomodulatory approaches

The challenge of allogeneic HSCT is the development of novel immunomodulatory agents that can specifically target alloreactivity without impairing graft versus tumor beneficial effect. Maintenance therapies after allo-HSCT that specifically target the hematological malignancy to prevent their relapses can also prevent GVHD.

Tyrosine kinase inhibitors

- (i) Imatinib: Imatinib, the first tyrosine-kinase inhibitor developed to treat chronic myelogenous leukemia, is a potent dual inhibitor of both transforming growth factor- β and platelet-derived growth factor receptor (PDGF-R) pathways, 2 cytokines involved in the fibrogenic and inflammatory processes of chronic GVHD with systemic sclerosis.
- (ii) Ibrutinib: Bruton's tyrosine kinase (BTK) activation is critical for B-cell survival, proliferation, and migration. Ibrutinib was designed as a selective and irreversible inhibitor of the BTK protein and inhibits B-cell tumor growth such as chronic lymphocytic leukemia and B-cell lymphomas. In addition to inhibiting BTK, ibrutinib is an irreversible inhibitor of interleukin-2 inducible kinase (ITK) and is FDA-approved for the treatment of chronic GVHD.
- (iii) Itacitinib: A JAK1 inhibitor that reduces inflammatory cytokines and T cell proliferation. In a phase II trial, itacitinib seemed promising for the prevention of acute GVHD in addition to conventional GVHD prevention. A phase III in first line treatment of acute GVHD failed however to demonstrate an interest over steroids alone.

Belumosudil

An oral rho-associated coiled-coil-containing protein kinase-2 (ROCK2) inhibitor has been shown to reduce the Th-17 alloreactive response, increase T regs and control fibrotic pathways. Belumosudil treatment in a phase II randomized trial resulted in high response rates in steroid refractory chronic GVHD, improvement of quality of life and high overall survival rates. Belumosudil has been recently approved by the FDA for the treatment of chronic GVHD after failure of at least two prior lines of systemic therapy.

5-Azacytidin

The demethylating agent 5-azacytidine (AZA) has proven its efficacy in the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. In mice, AZA improves both survival and GVHD severity. In humans, AZA significantly decreases human T-cell proliferation as well as IFN- γ and TNF- α serum levels, reduces the expression of Granzyme B and Perforin by cytotoxic T cells and might increase T reg proliferation therefore modulating alloreactivity (Fransolet et al., 2016).

Anti-BCL2

Venetoclax is a selective inhibitor of the anti-apoptosis factor B-cell lymphoma 2 (BCL2), which has been revealed to abundantly express in leukemia stem cells. Moreover, longitudinal analysis of T-cell transcriptomes in patients before the appearance of GVHD symptoms revealed the upregulation of anti-apoptotic regulator BCL2 at GVHD initiation. BCL2 RNA is elevated in multiple organs affected by GVHD and expression correlated with transplant-related mortality and steroid-refractory GVHD. Inhibition of BCL2 might induce apoptosis of alloreactive T cells and become a new targeted therapy in the treatment of steroid refractory GVHD.

Cellular immunotherapy

Besides pharmaceutical agents, the infusion of immunoregulatory cells appears an attractive option: they can control immune homeostasis, reduce detrimental T-cell responses to foreign antigens, facilitate tissue repair with believed short-lasting immune effects avoiding increase of relapse and infections (Voermans and Hazenberg, 2020).

Adaptive lymphoid cells: Regulatory T cells

In mice, it has been clearly demonstrated that freshly isolated donor T regs or ex vivo expanded T regs added to donor CD3⁺ T cells early after allo-HSCT reduced GVHD while maintaining the GVT effect. The ability of natural CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low}T cells to control GVHD while maintaining the GVT effect in humans is debated. The "first-in-man" infusion of in vitro expanded natural T regs were published in 2009 for the treatment of one acute and one chronic GvHD. Freshly isolated donor-derived T regs have been injected in prophylaxis of GVHD in some small series of mismatched cord-blood or haplo-identical HSCT and several clinical trials are still recruiting with diverse sources of T regs or purified Tr1 cells. There is however a concern about their possible inhibition of the GVL effect. Indeed, Treg depletion in donor lymphocytes injections (DLI) has been associated with enhanced anti-leukemic and

anti-lymphoma responses in patients relapsing after transplantation. A way of research to modulate GVHD without impairing the GVT effect by increasing natural Tregs in vivo could be obtained with α 1-Antitrypsin, a naturally abundant serine protease inhibitor, a new treatment testing in GVHD treatment, downmodulating inflammation and increasing ratios of regulatory (Tregs) to effector T cells (Teffs).

Innate lymphoid cells

Lymphoid members of the innate immune system include natural killer (NK) cells, innate lymphoid cells (ILCs), iNKT cells and $\gamma\delta$ T cells.

ILC type 2 (ILC2) and iNKT cells have been infused in preclinical models and shown to reduce GVHD. Improved iNKT reconstitution or increased iNKT cells in HSC grafts have been associated with reduced GVHD and relapse. Trials in humans with expanded iNKT cells are expected.

Donor NK cells also have been tested in preclinical models and in the clinic. Transfer of donor-activated murine NK cells reduced acute GVHD as they can eliminate host antigen-presenting cells (APCs), limiting donor T-cell expansion. In humans, however, a pilot study of patients given IL-15/4-1BB ligand-activated NK cells from HLA-matched sibling or HLA-matched unrelated donors showed that five of nine of the patients (55%) experienced aGVHD including three severe forms. Thus, NK cell therapies are mainly currently explored to treat or prevent relapse after allo-HSCT in high risk patients.

Higher donor $\gamma\delta$ T cell content in HSC grafts has been associated with increased incidence of acute GVHD. However, enhanced post-transplant $\gamma\delta$ T cell has been correlated to improved event-free survival and OS, particularly in T cell depleted haploidentical HSCT. Different strategies to enhance $\gamma\delta$ T cell recovery are used in the context of haploidentical HSCT in order to avoid GVHD while sparing the GVL effect.

Myeloid cells: MDSCs

Generating MDSCs for clinical applications might be difficult, because MDSCs represent a rare subpopulation of myeloid cells. To date, few researchers have proposed to expand MDSCs in vitro for cellular therapy. MDSCs can be expanded from cord blood unit or donor apheresis after G-CSF mobilization or steady state PBMC with a cocktail of cytokine including G-CSF \pm GM-CSF \pm SCF \pm FLT3 \pm IL-6. Few preclinical proofs of concept are available (D'Aveni et al., 2020).

Non hematopoietic cells MSCs

In humans, co-transplantation of MSCs with allogeneic HSC has been shown to prevent the development of acute or chronic GVHD. They also have been used for the treatment of high-risk and/or steroid refractory acute GVHD. Since the first successful treatment of acute GVHD by intravenous infusion of bone marrow-derived haploidentical MSC reported in a 9-year-old patient with severe resistant grade IV acute GVHD, similar results have been observed with MSCs from diverse sources (adult tissues including adipose tissue and extra-embryonic tissues such as placenta/umbilical cord and Wharton's Jelly). If no serious acute infusion-related toxicity and no serious treatment-related adverse events have been reported, controversial results on the potential of MSC to increase infection and relapse incidences have been reported. It is demonstrated that their immunosuppressive properties may vary with the donor of MSCs. To erase this high inter-individual variability some authors pool MSCs from eight voluntary donors and some teams license WJ-MSCs with pro-inflammatory cytokines, for instance IFN- γ , which improves their function to prevent GVHD (Pochon et al., 2022). We lack clinical imaging systems to determine how MSCs patrol after intravenous infusion and how long they do persist in vivo. Preclinical models demonstrated that 2 h after intravenous injection, MSC are in the lungs followed by an accumulation in the liver and spleen from 24 to 96 h following injection with a hepatobiliary and renal clearance and a probably very quick death after lung trapping, due to monocyte phagocytosis. That is why repeated infusions are now usually scheduled in clinical trial, with no data on the risk of HLA alloimmunization (Zhao et al., 2019).

Conclusion

The better understanding of the immune system regulation has provided better insight in the physiopathology of alloSCT. New therapeutic approaches for the prevention of graft versus host diseases has already led to cross the HLA barrier and expand donor availability for nearly all patients. In addition, the use of these new combined pharmaceutical and cellular approaches will allow a better control of GVHD without impairing the graft versus tumor effect, thus making allo-HSCT a safer and more efficient procedure to cure hematological and immunological disorders.

References

- Chaidos A, Patterson S, Szydlo R, Chaudhry MS, Dazzi F, Kanfer E, McDonald D, Marin D, Milojkovic D, Pavlu J, et al. (2012) Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 119(21): 5030–5036.
- D'Aveni M, Notarantonio AB, Bertrand A, Boulange L, Pochon C, and Rubio MT (2020) Myeloid-derived suppressor cells in the context of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Frontiers in Immunology* 11: 989.
- Dickinson AM, Norden J, Li S, Hromadnikova I, Schmid C, Schmetzer H, and Jochem-Kolb H (2017) Graft-versus-leukemia effect following hematopoietic stem cell transplantation for leukemia. *Frontiers in Immunology* 8: 496.

- Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, and Holler E (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet* 373(9674): 1550–1561.
- Fransolet G, Ehx G, Somja J, Delens L, Hannon M, Muller J, Dubois S, Drion P, Caers J, Humblot-Baron S, et al. (2016) Azacytidine mitigates experimental sclerodermic chronic graft-versus-host disease. *Journal of Hematology & Oncology* 9(1): 53.
- Fredricks DN (2019) The gut microbiota and graft-versus-host disease. *The Journal of Clinical Investigation* 129(5): 1808–1817.
- Granot N and Storb R (2020) History of hematopoietic cell transplantation: Challenges and progress. *Haematologica* 105(12): 2716–2729.
- Hefazi M, Bolivar-Wagers S, and Blazar BR (2021) Regulatory T cell therapy of graft-versus-host disease: Advances and challenges. *International Journal of Molecular Sciences* 22(18).
- Kohrt HE, Pillai AB, Lowsky R, and Strober S (2010) NKT cells, Treg, and their interactions in bone marrow transplantation. *European Journal of Immunology* 40(7): 1862–1869.
- Li X, Gao Q, Feng Y, and Zhang X (2019) Developing role of B cells in the pathogenesis and treatment of chronic GVHD. *British Journal of Haematology* 184(3): 323–336.
- Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, and Weissinger E (2016) Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Frontiers in Immunology* 7: 507.
- Penack O, Marchetti M, Ruutu T, Aljurf M, Bacigalupo A, Bonifazi F, Ciceri F, Cornelissen J, Malladi R, Duarte RF, et al. (2020) Prophylaxis and management of graft versus host disease after stem-cell transplantation for haematological malignancies: Updated consensus recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *The Lancet Haematology* 7(2): e157–e167.
- Pochon C, Notarantonio AB, Laroye C, Reppel L, Bensoussan D, Rubio MT, and D'Aveni M (2022) Wharton's jelly-derived stromal cells and their cell therapy applications in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, (in press).
- Rubio MT, Moreira-Teixeira L, Bachy E, Bouillie M, Milpied P, Coman T, Suarez F, Marçais A, Sibon D, Buzyn A, et al. (2012) Early post-transplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival. *Blood* 120(10): 2144–2154.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, et al. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295(5562): 2097–2100.
- Stenger EO, Turmquist HR, Mapara MY, and Thomson AW (2012) Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity. *Blood* 119(22): 5088–5103.
- Toubai T and Magenau J (2020) Immunopathology and biology-based treatment of steroid-refractory graft-versus-host disease. *Blood* 136(4): 429–440.
- Voermans C and Hazenberg MD (2020) Cellular therapies for graft-versus-host disease: A tale of tissue repair and tolerance. *Blood* 136(4): 410–417.
- Zeiser R and Blazar BR (2017) Pathophysiology of chronic graft-versus-host disease and therapeutic targets. *The New England Journal of Medicine* 377(26): 2565–2579.
- Zeiser R and Blazar BR (2018) Acute graft-versus-host disease. *The New England Journal of Medicine* 378(6): 586.
- Zeiser R and Vago L (2019) Mechanisms of immune escape after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 133(12): 1290–1297.
- Zeiser R, von Bubnoff N, Butler J, Mohty M, Niederwieser D, Or R, Szer J, Wagner EM, Zuckerman T, Mahuzier B, et al. (2020) Ruxolitinib for glucocorticoid-refractory acute graft-versus-host disease. *The New England Journal of Medicine* 382(19): 1800–1810.
- Zhao L, Chen S, Yang P, Cao H, and Li L (2019) The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: Prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Stem Cell Research & Therapy* 10(1): 182.

Wharton's jelly-derived stromal cells and their cell therapy applications in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation

Cécile Pochon^{1,2}  | Anne-Béatrice Notarantonio^{2,3} | Caroline Laroye^{1,4} | Loic Reppel^{2,4} | Danièle Bensoussan^{2,4} | Allan Bertrand² | Marie-Thérèse Rubio^{2,3} | Maud D'Aveni^{2,3}

¹Pediatric Oncohematology Department, CHRU Nancy, Université de Lorraine, Nancy, France

²UMR 7365 CNRS, IMoPA, Université de Lorraine, Nancy, France

³Hematology Department, CHRU Nancy, Université de Lorraine, Nancy, France

⁴Cell Therapy Unit, CHRU Nancy, Université de Lorraine, Nancy, France

Correspondence

Cécile Pochon, Pediatric Oncohematology Department, CHRU Nancy, Université de Lorraine, France.
Email: c.pochon@chru-nancy.fr

and

Maud D'Aveni, UMR 7365 CNRS, IMoPA, Université de Lorraine, Nancy, France.
Email: m.daveni-piney@chru-nancy.fr

Funding information

No source of funding is to be declared

Abstract

For decades, mesenchymal stromal cells (MSCs) have been of great interest in the fields of regenerative medicine, tissue engineering and immunomodulation. Their tremendous potential makes it desirable to cryopreserve and bank MSCs to increase their accessibility and availability. Postnatally derived MSCs seem to be of particular interest because they are harvested after delivery without ethical controversy, they have the capacity to expand at a higher rate than adult-derived MSCs, in which expansion decreases with ageing, and they have demonstrated immunological and haematological supportive properties similar to those of adult-derived MSCs. In this review, we focus on MSCs obtained from Wharton's jelly (the mucous connective tissue of the umbilical cord between the amniotic epithelium and the umbilical vessels). Wharton's jelly MSCs (WJ-MSCs) are a good candidate for cellular therapy in haematology, with accumulating data supporting their potential to sustain haematopoietic stem cell engraftment and to modulate alloreactivity such as Graft Versus Host Disease (GVHD). We first present an overview of their in-vitro properties and the results of preclinical murine models confirming the suitability of WJ-MSCs for cellular therapy in haematology. Next, we focus on clinical trials and discuss tolerance, efficacy and infusion protocols reported in haematology for GVHD and engraftment.

KEYWORDS

applications, cell therapy, graft versus host disease, mesenchymal stem cells, stem cell transplantation, stromal cells, Wharton's jelly

1 | INTRODUCTION

Mesenchymal stromal cells (MSCs) were first described in bone marrow and defined as non-haematopoietic, fibroblast-like, plastic-adherent cells.¹ Since their first discovery, they have been described in other adult tissues² and in foetal/perinatal tissues.³ Though derived from different

tissues, they do share some common features⁴: plastic adherence; the expression of stromal surface markers such as CD73, CD90 and CD105, and no expression of haematopoietic CD34, CD45, CD14/CD11b, CD79 α /CD19 or MHC class II (human leukocyte antigen HLA-DR); and the capacity to differentiate into several mesenchymal cell types including osteoblasts, chondroblasts and adipocyte progenitors.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* published by Foundation for Cellular and Molecular Medicine and John Wiley & Sons Ltd.

MSCs have been isolated from multiple adult tissues other than bone marrow, including skeletal muscle, adipose tissue, synovial membranes, saphenous veins, dental pulp, periodontal ligaments, lung, liver and skin. MSCs obtained from extra-embryonic tissues (such as placenta/umbilical cord, Wharton's jelly and amniotic membrane) share properties with their adult counterparts. They also retain characteristics of primitive stem cells, like the expression of the embryonic stem cell markers Oct-4, Nanog, Sox-2 and c-Kit, as well as Dnmt3b and hTERT, albeit at much lower levels than those of embryonic stem cells.⁵ They have many advantages for cellular therapy applications: available after delivery, their collection and expansion raise no ethical issues. They usually expand with a higher proliferation rate⁶ and a broader multipotency than MSCs from adult tissues, though donor age affects these characteristics in bone marrow-derived MSCs (BM-MSCs).⁷

Wharton's jelly mesenchymal stromal cells (WJ-MSCs), were first isolated in 1991.⁸ Their immunomodulatory properties and their low cellular immunogenicity⁹ make them remarkably interesting for the induction of tolerance in transplantation. A few *in vitro* studies have reported that WJ-MSCs are less immunogenic than MSCs from other sources, especially when cultivated in hypoxia.¹⁰ Amongst MSCs, WJ-MSCs have the lowest level of MHC class II expression. Moreover, they express low levels of cell-surface MHC class I and costimulatory molecules (CD40, CD80, CD86). In a comparative study of foetal adnexa-derived caprine MSCs, WJ-MCs outperformed MSCs from other sources of foetal adnexa (amniotic fluid, amniotic sac, cord blood) in terms of growth kinetics, relative messenger ribonucleic acid (mRNA) expression of surface antigens, pluripotency markers, and tri-lineage differentiation potential.¹¹

In allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), BM-MSCs were the first described cells of potential interest. They have been mainly (and widely) studied in the treatment of steroid-refractory graft versus host disease (GVHD), with results varying depending on the study and the methods used.¹²⁻¹⁴ Another topic of research has been their haematopoietic support functions since they are key players in the haematopoietic niche and can enhance haematopoietic stem cell (HSC) engraftment and function.¹⁵⁻¹⁷ However, in this area of research, their efficacy remains to be established.^{15,18}

Several studies, which we describe below, have compared MSCs isolated from the most common sources in terms of their functional differences in immune modulation and haematopoietic support.

1.1 | Immunosuppression

MSCs derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord blood elicit a similar degree of immunosuppression *in vitro* compared with that of BM-MSCs, but Manochantr et al. have demonstrated that WJ-MSCs have a higher proliferative capacity.¹⁹ MSCs derived from WJ and adipose tissue have potent

immunosuppressive effects on T cells, similar²⁰ or even superior to that observed with BM-MSCs.²¹ WJ-MSCs have a capacity to suppress neutrophil adhesion to inflamed endothelium similar to that of BM-MSCs, but conserve their immune-suppressive properties after passage 7, unlike BM-MSCs.²² In a murine model of experimental sepsis, mice treated with WJ-MSCs had a higher survival rate than mice treated with BM-MSCs.²³ In another study, by Karaöz et al, WJ-MSC co-culture with activated T cells led to a higher concentration of IL-17A, which would be of particular interest in a GVHD context.²⁴ In a recent work, Shin et al. analysed the protein secretome of four sources of MSCs: adipose tissue, bone marrow, placenta, and WJ. Each MSC secretome profile had distinct characteristics, depending on the source. The secretome of foetal-derived MSCs (placenta and WJ) had a more diverse composition than those of adipose tissue and BM-MSCs, and the authors assumed that their therapeutic potential was greater because of these properties.²⁵

1.2 | Haematopoiesis

One study found more proteins related to tissue development and the differentiation of haematopoietic cells in the secretome of WJ-MSCs compared with adipose tissue and BM-MSCs.²⁵ Moreover, CD117 (c-kit) the receptor for stem cell factor (SCF) harboured by haematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs), has been repeatedly detected in WJ-MSCs.²⁶ WJ-MSCs express osteopontin and are able to secrete hyaluronic acid.²⁷ Interestingly, both these molecules are amongst the main constituents of the HSPC niche. Osteopontin is a critical regulator of HSPC localization and proliferation.^{27,28} Human WJ-MSCs have been compared with BM-MSCs and show similar haematopoiesis-supportive functions *in vitro*, when co-cultured with CD34⁺ umbilical cord blood cells.²⁹ In a murine model, co-transplantation of either WJ-MSCs or BM-MSCs with CD34⁺ HSCPs from cord blood resulted in similarly enhanced recoveries of human platelets and CD45⁺ cells in the peripheral blood and a 3-fold higher engraftment in the bone marrow, blood, and spleen 6 weeks after transplantation when compared with transplantation of CD34⁺ cells alone.³⁰

Considering their low immunogenicity, their immunomodulatory and haematopoietic supportive properties *in vitro*, their growth kinetics, and their proteome diversity, WJ-MSCs are remarkably interesting cells for potential use in GVHD and haematopoietic engraftment (Figure 1).

2 | WJ-MSCS SUSTAIN HAEMATOPOIESIS

In the setting of sustaining haematopoiesis, MSCs from placenta and umbilical cord display interesting properties *in vitro*.³⁰ They promote growth and preserve the stemness of haematopoietic stem cells (HSCs) from autologous or allogeneic cord blood in two-dimensional cultures,^{31,32} and in three-dimensional scaffolds.³³

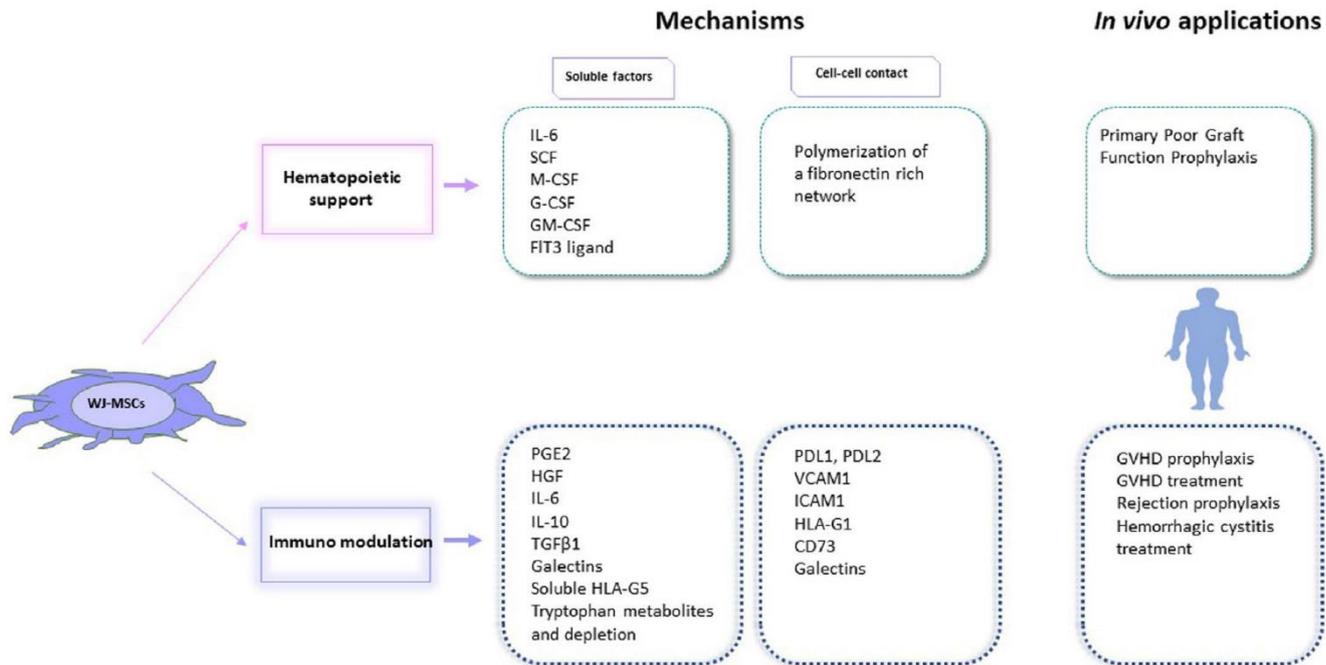


FIGURE 1 WJ-MSCs support haematopoiesis and modulate immunity via soluble factors and cell-cell contact. *Upper:* WJ-MSCs secrete growth factors that may enhance haematopoietic cell renewal or stemness, and they may create a fibronectin network that supports haematopoietic cell homeostasis. Thus, they are of interest in the treatment of poor graft function after HSCT. IL-6: Interleukin-6, SCF: stem-cell factor, M-CSF: macrophage colony-stimulating factor, G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor, GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor, Flt3: Fms-like tyrosine kinase 3; *Lower:* WJ-MSCs secrete cytokines and other molecules that decrease activated T-cell proliferation, or induce Tregs, and act on other immune cells. They also produce cytosolic IDO, an enzyme that depletes tryptophan in the medium and converts tryptophan into secreted metabolites (like kynurenine) that prevent T-cell proliferation. WJ-MSCs also express several membrane molecules that interact with activated T cells to induce exhaustion or apoptosis, or to prevent T-cell activation. The expression of soluble and membrane factors varies according to the level of inflammation in the environment. These properties make WJ-MSCs good candidates for GVHD prophylaxis or cure, for graft rejection prophylaxis, and for some disorders of uncontrolled inflammation, such as haemorrhagic cystitis. PGE2, prostaglandin E2; HGF, hepatic growth factor; IL, interleukin; TGF β1, transforming growth factor β1; HLA, human leukocyte antigen; PDL (1/2), programmed-death ligand; VCAM, vascular cell adhesion molecule; ICAM, intercellular adhesion molecule

WJ-MSCs have been recently exploited as a feeder layer to expand haematopoietic stem cells, providing secreted proteins³⁴ and cytokines involved in the regulation of haematopoiesis, including interleukin (IL)-6, SCF, Fms-like tyrosine kinase 3–ligand (Flt-3L), macrophage colony-stimulating factor, granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (Table 1).³⁵

2.1 | Preclinical studies

Studies in NOD/SCID/IL2R γ null (NSG) mice suggest that WJ-MSCs may increase haematologic recovery.³⁶ Six weeks after allogeneic stem cell transplantation, NSG mice co-transplanted with 1×10^6 WJ-MSCs demonstrated a significantly higher median number of human CD45⁺ cells engrafting in the peripheral blood and bone marrow than those transplanted without WJ-MSCs: respectively, 28.2% (range, 24.6–33.1%) versus 5.3% (range, 4.2–6.5%) and 6.9% (range, 5.9–7.3%) versus 1.7% (range, 1.5–2.3%).

2.2 | Clinical studies

Severe aplastic anaemia (SAA) is a life-threatening bone marrow failure. Allo-HSCT with alternative donors (unrelated or mismatched donors, cord blood) is usually reserved for SAA patients who do not have a matched sibling and who have not responded to immunosuppressive drug therapy first, because of the poor outcome after allo-HSCT in this context (high risk of rejection, poor graft function with haemorrhagic and infectious complications, and high GVHD incidence). The first report in SAA of co-injection of WJ-MSCs and allo-HSCT for these patients who have not responded to immunosuppressant was based on 22 patients.³⁷ Eight patients received haploidentical haematopoietic stem cells, six patients had matched related donors, and eight patients had matched unrelated donors. WJ-MSCs were obtained from umbilical cords as follows: the main vessels were removed and the jelly was digested using 1 mg/ml collagenase. Cell culture was normoxic, and cells were cryopreserved before use. WJ-MSCs were selected if they matched at least three HLA alleles with recipients, then expanded and cryopreserved a

TABLE 1 WJ-MSC infusions and clinical applications in haematology (cord blood MSCs excluded)

Indications	Authors Country	Number of patients/ Phase Trial	Infusion dose	Schedule
GVHD Treatment	Soder et al ⁵⁰ USA	N = 10, adults Phase 1	2 or 10×10^6 MSCs/kg/infusion	2 infusions: on day 0 and 7 of aGVHD treatment
	Wu et al ⁵⁴ China	N = 24 phase 2	0.6×10^6 /kg Range (0.5–1.0) $\times 10^6$ /kg	Single infusion Refractory aGVHD and cGVHD
GVHD Prophylaxis	Zhu et al ⁵¹ China	N = 25, children Phase 1–2	Mean = 1.14×10^6 MSCs/kg Range (1.03–1.39) $\times 10^6$ /kg	Single infusion 1 hour before HSCT
	Wu et al ⁵² China	N = 50 Phase 2	Mean = 5×10^5 MSCs/kg	Single infusion 4 hours before HSCT
	Gao et al ⁵³ China	N = 124 Multicentre, double-blind, randomized Phase 2	Mean = 3×10^7 /100 ml/month Range?	Repeated infusions 1/month $\times 4$ >4 months after HSCT
Engraftment and GVHD	Wang et al ³⁷ China	N = 22, SAA Phase 1–2	Mean = 1.2×10^6 MSCs/kg Range (0.27–2.5) $\times 10^6$ /kg	Single dose 4 hours before HSCT
	Li et al ³⁸ China	N = 17, SAA adults Phase 1–2	Mean = 4×10^6 MSCs/kg Range (2.87–10) $\times 10^6$ /kg	Single infusion 6 hours before HSCT
	Wang et al ³⁹ China	N = 17, SAA Children Phase 1–2	Median dose 4×10^7 (0.5–8)	Single infusion On day +1 after HSCT
	Wu et al ³⁶ China	N = 20 (8 patients in the MSC group) Cord blood transplantation Randomized phase 2	Median dose of 7.19×10^6 MSCs/kg (2.44–10.12)	Single infusion 4 hours before Cord blood
	Wu et al ⁴⁰ China	N = 21, SAA Phase 1–2	5×10^5 MSCs/kg Invariable dose	Single infusion 4 hours before HSCT

Note: Abbreviations: cGVHD, chronic GVHD; CMV, cytomegalovirus; CR, complete response; EBV, Epstein-Barr virus; GI, gastrointestinal; GVHD, graft versus host disease (aGVHD, acute GVHD; ORR, overall response; PFS, progression-free survival.; PR, partial response; SAA, severe aplastic anaemia.

³Treatment-related adverse events (TRAE) were graded using the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria for Adverse Events (CTCAE version 4.0) and commonly include oral ulcer, diarrhoea, gastrointestinal haemorrhage, haemorrhagic cystitis, interstitial pneumonia, and liver or renal dysfunction, and, rarely, relapse and GVHD.

second time. They were infused into patients immediately after thawing, at an average dose of 1.2×10^6 / kg (range, 0.27 – 2.5×10^6 / kg). None of the patients experienced graft rejection, and all had rapid engraftment (mean times for neutrophil and platelet recovery were 13.95 days and 20.27 days, respectively). No severe acute GVHD (aGVHD) and no chronic GVHD (cGVHD) were observed. With a median follow-up of 15 months, 21 patients were alive and transfusion-independent with full donor chimerism. This report has been confirmed in 17 SAA adult patients treated with haploidentical HSCT after a reduced-intensity conditioning regimen and with

co-infusion of culture-expanded third-party donor-derived WJ- MSCs 4 hours before allo-HSCT.³⁸ In this study, WJ- MSCs were obtained after the cord was sectioned, without enzymatic digestion. Cells were thawed only once, in autologous plasma from cord blood, and re-expanded before their use at day 0 of HSC transplantation. Moreover, 17 children and adolescents with SAA were treated with haploidentical HSCT after myeloablative conditioning and co-infusion of culture-expanded third-party donor-derived WJ- MSCs (obtained from cords after vessel removal and enzymatic digestion, and used fresh at passage 3) at day +1 post transplantation and

Results	Side effects
ORR 70%, CR 40%, PR 30%	No acute infusion-related toxicity No treatment-related adverse events (TRAE) ^a No ectopic tissue formation
55.6% of improvements for skin, 100% for oral mucosa, 37.5% for GI tract, no response for liver and lung	No acute infusion-related toxicity No TRAE ^a
2 patients severe late onset aGVHD 2 patients extensive cGVHD	No acute infusion-related toxicity Adverse events: CMV infection in 23 patients, bacterial and fungal infections, treatment related?
12/50 aGVHD gr II-IV 3 extensive cGVHD	No acute infusion-related toxicity TRAE ^a observed in 9 patients
3/62 severe cGVHD versus 8/62 in the control group cGVHD = 27.4% in the MSCs group versus 49% in the control group (<i>p</i> = 0.021)	No acute infusion-related toxicity No increase in adverse events ^a : infections and grade 1–2 liver dysfunction and renal impairment observed in 45 patients (72.6%) in the MSCs group and 40 patients (64.5%) in the non-MSC group
22 engraftments, no severe aGVHD nor cGVHD Long-term full donor chimerism for 21/22 patients	Two patients had slight fever immediately after cell injection, which resolved within 12 hours. No TRAE ^a
16/17 engraftments with full donor chimerism, 1/17 graft failure 4/17 grade III-IV aGVHD 6/17 cGVHD (1 severe)	No acute infusion-related toxicity Adverse events: CMV and/or EBV infections in 10 patients. Treatment related?
17/17 myeloid engraftments 16/17 platelet engraftments 1 grade III-IV aGVHD cGVHD = 21.2% 1 secondary graft failure OS = 71%	No acute infusion-related toxicity Adverse events were not related to MSC infusion: Three patients died of TRM, because of infection on day +36, severe aGVHD on day +44 and viral interstitial pneumonia on day +634
Faster recovery of ANC (<i>p</i> = 0.003) and platelets (<i>p</i> = 0.004) in the MSC group	No acute infusion-related toxicity No ectopic tissue on MRI and PET survey in the interval of 3 months after WJ-MSCs infusion. No CMV disease, septic shock, nor fungal infection. TRAE ^a observed in 5 patients (4 mild GVHD and 1 relapse). No deaths related to treatment toxicity. (2 deaths related to infections, and 2 relapses in the comparative group)
21/21 sustained engraftments 2-y PFS = 74% 5 grade III-IV aGVHD 3 extensive cGVHD	No acute infusion-related toxicity TRAE ^a observed in 4 patients

they experienced the same good outcomes.³⁹ In these two studies, 16/17 and 17/17 patients, respectively, achieved complete haematopoietic reconstitution. Median times to neutrophil count $>0.5 \times 10^9/L$ were 12 and 16 days, respectively, and to platelet count $>20 \times 10^9/L$ were 14 and 22 days, respectively. These promising preliminary data paved the way for other studies, with encouraging results.⁴⁰ A randomized phase 2 study demonstrated that a WJ-MSC (1×10^6 WJ-MSC/kg) infusion 4 hours before transplantation is correlated with a faster haematologic recovery of neutrophils and platelets in UCB transplantation.³⁶ WJ-MSCs were

isolated once again after vessel removal from the cord, enzymatic digestion, normoxic culture with foetal bovine serum and two cryo-preservations. Taken together, these data suggest that WJ-MSCs improve haematologic reconstitution by shortening the median time to neutrophil and platelet recovery. However, meta-analyses are necessary to better assess the effect of WJ-MSCs on HSC engraftment. In a recent meta-analysis of BM-MSC and WJ-MSC infusions for SAA patients in haploidentical HSCT, no improvement on overall survival nor on toxicity-related mortality was proven when MSCs were co-infused with HSCs.¹⁸

3 | WJ-MSCS AS A PROMISING THERAPY TO MODULATE GVHD

3.1 | Preclinical studies

Whilst immunomodulatory effects of BM-MSCs mainly rely on cell-to-cell contact, soluble factors with immunomodulatory effects are more frequently described for WJ-MSCs. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO) has been identified as one of the main effector molecules responsible for T-cell suppression in MSCs from all sources.⁴¹ WJ-MSCs also produce regulatory cytokines such as transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), regulatory soluble factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF); hepatocyte growth factor (HGF); galectins 1, 3, and 9; prostaglandin E2 (PGE2); soluble HLA-G5 or membrane HLA-G; and programmed-death ligands 1 and 2 (PD-L1 and PD-L2). Moreover, amongst MSCs, they express the highest levels of the adhesion markers CD29 (β 1), CD49d (α 4), and CD54 (ICAM-1),^{42,43} and produce higher amounts of IL-1R α , RANTES, IP-10, and MCP1 chemokines.⁴⁴ This might impact their homing to the inflamed tissues and their fate after injection. Indeed, it has been shown that they can be quickly phagocytosed by monocytes after their injection into mice, and that phagocytosis induces changes in monocytes (CD14⁺⁺, CD16⁺, CD206⁺, PD-L1⁺, IL-10⁺), which subsequently modulate adaptive immune cells.⁴⁵ Differences observed between these various immunomodulatory mechanisms might be due to differences in WJ-MSC plasticity depending on the isolation procedure, culture techniques, the inflammatory context of a chosen preclinical model, and variation amongst donors according to obstetrical factors^{46,47} (Table 1, Figure 2).

Since the mid-2000s, cultured/expanded WJ-MSCs have been tested for their therapeutic potential in preclinical animal models of allo-HSCT. Several studies suggest that WJ-MSCs may prevent graft-versus-host disease (GVHD) especially with repeated injections.⁴⁸ Before GVHD onset, 5×10^5 WJ-MSCs/mouse significantly improved the survival rate only when they were repeatedly injected at 3-day intervals. In contrast, a single injection of WJ-MSCs after GVHD onset is enough to significantly increase the survival rate and effectively attenuate tissue damage. Finally, in preclinical studies WJ-MSCs have also been reported to decrease the cumulative incidence and the severity of GVHD⁴⁹: 1×10^6 WJ-MSCs per mouse increased the survival rate when injected two times at 7-day intervals. This result was similar to that achieved after only one infusion of WJ-MSCs, primed by IFN- γ , 24 hours prior to injection.

3.2 | Clinical studies

3.2.1 | GVHD treatment

The first phase 1 trial published with WJ-MSC administration in the treatment of acute GVHD was performed in the USA. WJ-MSCs were used immediately after thawing but the culture conditions were not described. Ten patients with de novo high risk or steroid-refractory acute GVHD received WJ-MSCs intravenously

on days 0 and 7 (low-dose cohort, 2×10^6 /kg, $n = 5$; high-dose cohort, 10×10^6 /kg, $n = 5$). No infusion-related toxicity, treatment-related adverse events, or ectopic tissue formation was observed in either cohort. Clinical response was suggested at day 28, as the overall response rate (ORR) was 70%, with a complete response in 4 out of 10 patients, and a partial response in 3 patients. REG3 α (a serum biomarker of acute GVHD) decreased, particularly in the high-dose cohort, and this was correlated with clinical response. Overall survival rates at day 100 and day 180 post infusion were 90% and 60%, respectively.⁵⁰ This publication represents an important step forward in the treatment of acute severe steroid-refractory GVHD, with repeated injections of high-dose WJ-MSCs (10×10^6 cells/kg) that should be tested in expanded, randomized and controlled trials. Currently, repeated infusions at a dose of $1\text{--}3 \times 10^6$ /kg/week of WJ-MSC in the treatment of steroid-resistant severe acute GVHD are being explored for safety and efficacy in Europe (NCT01092026 in Belgium and NCT02032446 in Italy).

3.2.2 | GVHD prophylaxis

In the setting of prophylactic administration of WJ-MSCs against GVHD, three studies have reported the results of co-infusion with WJ-MSCs at the time of haploidentical transplantation for malignant haematological diseases. Unfortunately, none of these studies was performed with a control group. In the first study,⁵¹ 25 children 4–17 years old were enrolled: 7 patients were diagnosed with acute myeloid leukaemia (AML), 17 with acute lymphoblastic leukaemia (ALL), and one with bi-phenotypic acute leukaemia, and all were considered high risk before transplant. WJ-MSCs were given by intravenous infusion at a mean dose of 1.14×10^6 /kg (range: $1.03\text{--}1.39 \times 10^6$ /kg) over 30 minutes, followed by an infusion of haploidentical haematopoietic cells. WJ-MSCs were isolated after cord vessel removal, enzymatic digestion, culture in a medium without animal or human proteins, and used fresh before passage 5. All patients had a rapid myeloid engraftment with complete donor chimerism at 1-month post-transplant. Only three patients experienced a stage II acute GVHD, two patients presented severe late onset acute GVHD and two patients presented extensive chronic GVHD. Of note, this study highlighted a concern about high incidences of infection and relapse. Cytomegalovirus (CMV) replication was observed in 23 patients and successfully treated with ganciclovir. Eleven patients died, including six because of relapse. These high incidences of infection and relapse were not confirmed by the other studies. In the second study, 50 patients aged from 9 to 58 years old with haematologic malignancy were enrolled. Patients (23 acute myeloid leukaemia and 17 acute lymphoid leukaemia, 7 lymphomas and 3 chronic myeloid leukaemia's in blast crisis) were transplanted with haploidentical and mismatched-unrelated donors. They received a busulfan-based myeloablative conditioning regimen. Co-infusion at a lower dose of WJ-MSCs (5×10^5 /kg) was performed 4 hours prior to allo-HSCT. WJ-MSCs were isolated without enzymatic digestion and thawed in autologous plasma (from cord blood). They

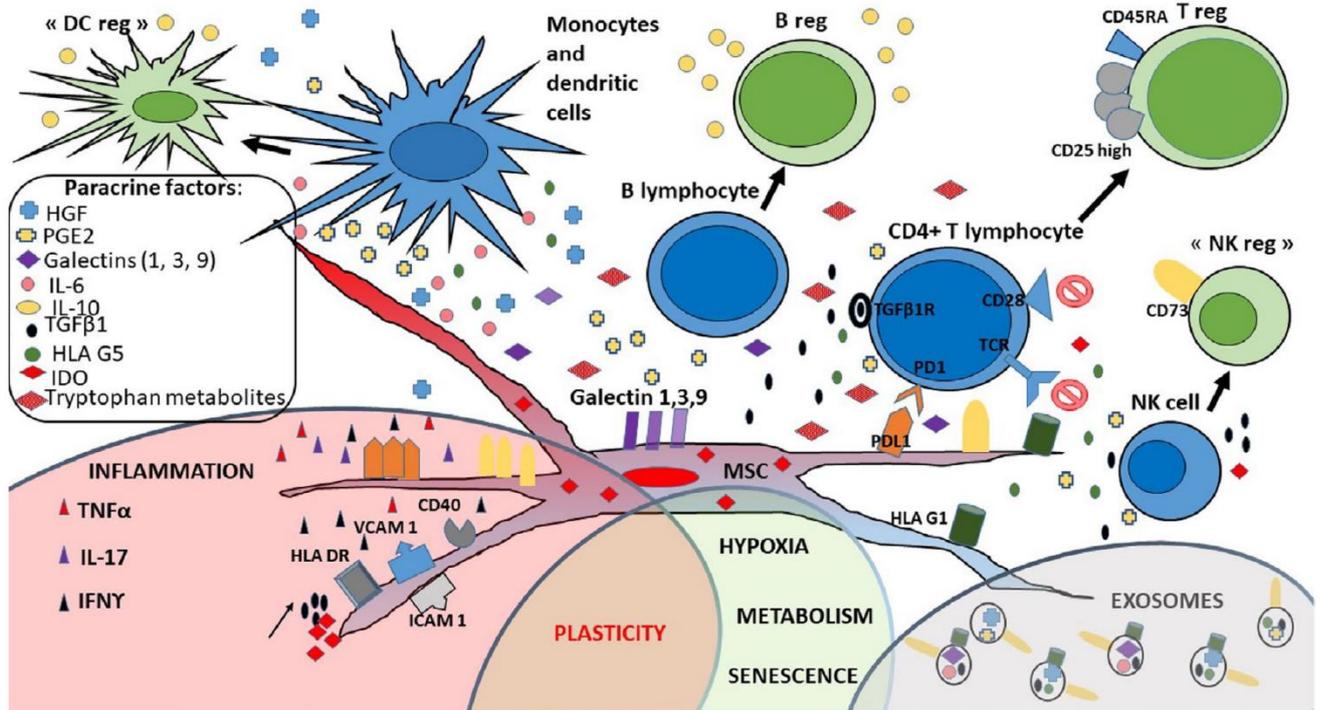


FIGURE 2 WJ-MSCs use several membrane and soluble factors to modulate the immune system. WJ-MSCs regulate immunity through cell-cell contact with T cells: PD-L1 (programmed-death ligand 1), galectins (1, 3, 9), VCAM 1 (vascular cell adhesion molecule 1), ICAM 1 (intercellular adhesion molecule 1), HLA (human leukocyte antigen)-G1, and CD73. They also express the usual HLA class I molecules and do not express costimulatory molecules. They may express CD40 and HLA class II molecules in an inflamed environment. They produce many soluble factors: PGE2 (prostaglandin E2), HGF (hepatocyte growth factor), IL (interleukins) -6 and -10, TGF β 1 (transforming growth factor β 1), soluble HLA-G5, and soluble galectins (1, 3 and 9). These soluble factors decrease T-cell proliferation, induce T-cell apoptosis and polarize T cells to become regulatory T cells (Tregs). They also prevent dendritic cell (DC) maturation and modify NK and B-cell functions, giving them a 'regulatory' phenotype. Moreover, WJ-MSCs express IDO (indoleamine 2-3 dioxygenase), in their cytosol. This enzyme is responsible of tryptophan depletion in the medium, and tryptophan-metabolite production (kynurenine, 3-hydroxykynurenine and kynurenic acid)

were infused immediately after thawing. All 50 patients achieved full donor chimerism. Twelve amongst 50 patients (24%) developed a grade II-IV aGVHD and 17 of the 45 (38%) live patients experienced cGVHD, with only 3 cases of extensive cGVHD. Five patients relapsed.⁵² The third study was a multicentre, double-blind, randomized controlled trial with a delay of more than 4 months following transplantation and with repeated infusions (at 3 monthly infusions on average) of WJ-MSCs (at a dose of 3×10^7 /per month) for cGVHD prophylaxis.⁵³ WJ-MSCs were obtained from the Stem Cell Bank of the Chinese Academy of Sciences and used thawed, but there are no data on cell culture in the article. A total of 124 patients were randomly assigned (WJ-MSCs, $n = 62$; control group, $n = 62$). Seventeen patients (27.4%) had cGVHD, of whom 14 (22.6%) exhibited mild/moderate cGVHD when cyclosporine administration was gradually reduced at the scheduled time, and 3 (4.8%) showed severe cGVHD. In the non-WJ-MSC control group, cGVHD occurred in 30 patients (48.4%), of whom 22 (35.5%) exhibited mild/moderate cGVHD, and 8 (12.9%) had severe cGVHD. The cumulative incidence of cGVHD in the WJ-MSC group was 27.4% (95% CI, 16.2% to 38.6%), compared with 49.0% (95% CI, 36.5% to 61.5%) in the non-WJ-MSC control group ($p = 0.021$). Taken together, these studies demonstrate that a single injection prior to allo-HSCT, at a dose of 5×10^5 /kg WJ-MSCs,

seems to be very safe, with no data about efficacy, and a single injection of WJ-MSCs prior to allo-HSCT at a dose of 1×10^6 /kg may be used with caution. Delayed doses of WJ-MSC to prevent cGVHD are reported to be a safe and efficient cell therapy. No data are available about a scheme of prophylactic injections administered early after allo-HSCT with post-transplantation cyclophosphamide (PTCy).

4 | WJ-MSCS MODULATE IMMUNE RECONSTITUTION AFTER TRANSPLANTATION

Only a few studies have sought to determine the impact of WJ-MSC co-injection on immune reconstitution during the few months following allo-HSCT.⁵³ In a controlled, randomized multicentre study, four monthly injections of 3×10^7 WJ-MSCs after haploidentical HSCT for chronic GVHD prevention led to a decrease in total NK cells. Although the numbers of $CD3^+CD4^+$ cells did not differ significantly between the two groups, the number of $CD4^+CD25^+CD127^{\text{low}}$ regulatory T (Treg) cells in the MSC group was higher than that in the non-MSC group. And although the numbers of $CD19^+$ B cells were not significantly different, the $CD27^+$ memory B-lymphocyte

numbers were significantly increased after MSC infusion. Moreover, during the first month post HSCT, the Th1 (interferon γ): Th2 interleukin (IL)-4⁺ cell ratio increased.⁵³ Another study of WJ-MSC injections in 24 patients with refractory GVHD treatment showed that patients had lower levels of mature dendritic cells (CD83⁺, CD86⁺, and HLA-DR⁺ cells) after MSC infusion (between days +14 and days +56) than before MSC infusion⁵⁴ (Table 1).

5 | DISCUSSION

In this review we have presented the reasons why WJ-MSCs are attracting interest in haematology (summarized in Table 1). They have been described as useful in preventing and treating GVHD, in accelerating HSC engraftment, in SAA patients at high risk of graft failure and poor haematopoietic graft function, and in transplantation procedures (haploidentical HSCT) associated with high morbidity due to GVHD. WJ-MSCs have been used mostly by Chinese teams (compared with BM- and adipose-derived MSCs in Western countries), but they are gaining interest in Europe and the USA, in haematology and other research areas (eg acute respiratory distress caused by COVID-19).

Whilst clinical trials are numerous in the setting of allo-HSCT, there are some barriers to clinical translation.

First, co-infusion of WJ-MSCs with allo-HSCT to prevent GVHD, or the administration of WJ-MSCs to cure GVHD, encompass various dosages and variable administration schedules of WJ-MSCs. As prophylaxis for GVHD, WJ-MSC dosage varies from 2×10^5 to 8×10^7 /kg in one infusion (4 hours before transplant) or even in 4 delayed infusions. To treat acute GVHD, WJ-MSC dosage can vary from 3×10^6 /kg to 10×10^6 WJ-MSC/kg in 1 to 3 infusions with an interval of 7 days between each, probably with better results at higher dosages. It is not clear whether, at an equivalent total dose, a single injection or repeated injections can provide similar efficacy. A meta-analysis found that the minimum effective dose per patient and per trial, regardless of clinical indication, never exceeded 190×10^6 MSCs per injection and that efficacy was never reported at doses lower than 70×10^6 MSCs per injection.⁵⁵ As mentioned above, WJ-MSCs outperform MSCs from other sources in terms of growth kinetics and maintain their immune-suppressive functions after a high number of passages, compared with BM-MSCs. Consequently, administering high numbers of repeated WJ-MSC injections to patients to ensure the cells' therapeutic activity is feasible, even from only one cord source. Moreover, there are no data concerning potential allo-immunization against WJ-MSCs after repeated injections. Further studies are warranted to better design the optimal scheme of treatment, particularly the timing, the modalities (eg intravenous, intramedullary, etc.), and the number and frequency of injections.

Second, WJ-MSC injections seem to be a promising means of sustaining haematologic reconstitution after allo-HSCT, though by an unknown mechanism. In SAA, WJ-MSCs may well enhance HSC

proliferation by modulating autoreactive T lymphocytes. WJ-MSCs provide a good feeder layer on which to expand HSCs in the very artificial condition of in vitro culture where HSCs are close to WJ-MSCs. The only previous work demonstrating a significantly higher median number of human CD45⁺ cells in NSG peripheral blood and bone marrow³⁶ was performed in a patient-derived xenotransplantation (PDX) model known for human lymphoid expansion. No pre-clinical study has compared CD34⁺ engraftment with co-injection of WJ-MSCs in specific PDX models developed for myeloid engraftment (eg in NSG-S or MISTGR mice).

The fate of WJ-MSCs after intravenous infusion is not well known. To date, no MSCs (whatever their sources) are detectable long term following IV injection in mice. We lack preclinical models and clinical imaging systems to determine where WJ-MSCs migrate after intravenous infusion and how long they persist in vivo. Only in a murine diabetes model and in Wistar rats do we know that umbilical cord (UC)-MSCs migrate into the lungs, liver, and spleen.⁵⁶ ⁵¹Cr-labelled UC-MSCs are found in lungs 2 hours after intravenous injection, followed by an accumulation in the liver and spleen from 24 to 96 hours following injection, with hepatobiliary and renal clearance⁵⁷ and a probably very quick death after lung trapping, due to monocyte phagocytosis.⁴⁵ The biodistribution of WJ-MSCs has been explored after ^{99m}Tc staining in a rat model of intracerebral haemorrhage. Whole-body imaging carried out 2 hours after intravenous injection of WJ-MSCs indicated activity in the lungs, liver, spleen, and kidneys. Gamma-well counting at 24 hours after WJ-MSC injection indicated higher uptake in the lungs, kidneys, spleen and liver, and very low activity in the brain.⁵⁸ WJ-MSCs may quickly disappear after intravenous infusion, at least in part because of their phagocytosis. In the mouse study by de Witte et al, intravenously injected WJ-MSCs were rapidly phagocytosed by monocytes, which subsequently migrated from the lungs to other sites in the body. The phagocytosis of WJ-MSCs-induced phenotypic and functional changes in monocytes, which subsequently modulated cells of the adaptive immune system. The authors concluded that, at least in mice, monocytes play a crucial role in mediating, distributing and transferring the immunomodulatory effects of WJ-MSCs.⁴⁵ Still, WJ-MSC tracking in humans after intravenous injection is unexplored. Recently, Galleu et al. demonstrated that BM-MSCs rapidly underwent perforin-dependent apoptosis by recipient cytotoxic cells after IV injection in vivo.⁵⁹ After infusion, recipient phagocytes engulfed these apoptotic BM-MSCs and produced IDO, which was ultimately necessary for effecting immunosuppression. Further studies with WJ-MSCs are necessary to know if they are similarly subject to cytotoxicity and phagocytosis in humans.

Considering the fact that WJ-MSCs probably disappear shortly after their injection and that some of their properties are linked to paracrine factors, it seems logical to compare their therapeutic properties with a cell-free therapy, which could bypass some potential complications, for example viral infections, strong allo-immunization or malignant transformation (even if this last event has not yet been

described in vivo reports). Extracellular vesicles (EVs), which contain lipids, RNA, proteins and even DNA when derived from apoptotic cells, have been described as sharing the same properties as living WJ-MSCs.⁶⁰

In the field of haematopoiesis, EVs from BM-MSCs and adipose-derived MSCs have been reported to promote myeloid-biased multipotent haematopoietic expansion in mice,⁶¹ and EVs from BM-MSCs have been described as cell-free biologics useful in the ex vivo expansion of HSCs,⁶² or as helping to rescue murine marrow haematopoietic cells from radiation damage.⁶³ Although EVs derived from WJ-MSCs have not been described in this area so far, the demonstration that WJ-MSCs display a higher number of proteins related to haematopoietic cell differentiation, in comparison with other sources of MSCs,²⁵ should lead to further specific research on the haematopoietic effects of EVs derived from WJ-MSCs.

In the field of inflammation and GVHD, EVs from WJ-MSCs have been reported as potent in vitro inhibitors of CD4⁺ T-cell proliferation, through TGF- β 1 and adenosine signalling.⁶⁴ In a mouse model of inflammatory bowel disease, EVs from WJ-MSCs homed to colon tissues at 12 hours after injection and significantly relieved the severity of inflammatory bowel disease, with an effect similar to that of WJ-MSCs used as controls, with a decrease of inflammatory cytokines in the colon and spleen and a modulation of IL-7 expression in colonic macrophages.⁶⁵ In a mouse model of GVHD, EVs from WJ-MSCs prevented life-threatening acute GVHD.⁶⁶ Moreover, in patients with aGVHD, EVs having surface PDL-1 have been identified after WJ-MSC injections.⁶⁷ However, three main points concerning the immune-suppressive potential of WJ-MSCs should be kept in mind: first, WJ-MSCs depend on the inflammatory environment for their own secretion of immune-suppressive soluble factors (described in Figure 1), since they may undergo polarization to either MSC1s or MSC2s according to the environment.⁶⁸ EVs do not have this plasticity, and the priming of WJ-MSCs with inflammatory cytokines should be considered before exosome collection in the field of GVHD.⁶⁹ Second, WJ-MSC phagocytosis by monocytes in vivo has been described as a key mechanism of immunomodulation,^{45,59} and nothing is known about that phenomenon in regard to MSC-derived EVs.

Third, cell preparation is an important variable that must be better defined before WJ-MSC use in human therapy. For instance, since WJ-MSCs are banked, the impact of freezing and thawing these cells before use must be carefully studied. Some authors have noted that BM-MSCs need a few days of culture after thawing to recover their full immunological properties.⁷⁰⁻⁷³ This was not confirmed in a preclinical pig model of septic shock where thawed human WJ-MSCs were immediately infused and provided significant clinical and biological improvements.⁷⁴ The culture medium⁷⁵ and culture atmospheric conditions are also correlated with WJ-MSC functions.¹⁹ Hypoxia has been described as a favourable condition in maintaining HSC stemness,⁷⁶ but its impact on WJ-MSC immune properties is not well characterized to date. The only published means of enhancing their immune capacities is to licence WJ-MSCs with pro-inflammatory cytokines,⁷⁷ for instance IFN- γ , which improves

their function in preventing GVHD in mouse models.^{49,78} In the haematopoietic support setting as well, the cell preparation protocol appears to be of great importance to full WJ-MSC potency. Three-dimensional culture of MSCs with HSCs enhances the expansion of cord blood CD34⁺ cells.⁷⁹ Ex vivo expansion of HSCs without eliminating the long-term repopulating capacity of more primitive HSCs is more feasible when haematopoietic niches are mimicked.⁸⁰ In this niche, cell contact between WJ-MSCs and HSCs seems to be preferable.³⁴ The surface structure of the microenvironment has also been shown to modify the cytokine secretion profile of MSCs.⁸¹ Even the stiffness of polydimethylsiloxane substrates for BM-MSC culture can lead to a change in HSPC phenotype.⁸² Thus, the preparatory culture of MSCs in bioreactors might change their immunosuppressive and haematopoietic supportive properties. The addition of IL-1 β in the culture medium would also increase the haematopoietic support capacity of WJ-MSCs.⁸³ Finally, the route of administration of MSCs (intravenous or intrabone) could also change the ability of MSCs to support haematopoiesis.⁸⁴

The next step to clinical translation is to produce a cellular therapy having reproducible immunosuppressive properties. The high inter-individual variability observed in adult BM-MSCs⁸⁵ has been erased by pooling MSCs from eight voluntary donors.¹⁴ One idea would be to pool WJ-MSCs from different cords to try to equalize their properties and decrease the variability of each therapeutic batch. However, the question of immunization against HLA expressed by allogeneic MSCs, especially in the case of MSCs pooled from several donors, is currently unresolved.

6 | CONCLUSION

This is an updated review focused on WJ-MSCs in haematology. It summarizes their immunosuppressive properties in vitro and in preclinical models and highlights the promise of WJ-MSCs in haematology. They are a good candidate for haematopoietic support after cord blood transplantation, after alternative HSCT for aplastic anaemia, and for GVHD prophylaxis and treatment. To improve their potential, in-vivo studies are still warranted in order to understand their biological distribution after intravenous injection in humans and their plasticity according to their preparation, and to decrease their inter-individual variability in order to enhance the reproducibility of results. For this purpose, many ongoing clinical trials are seeking the best efficacy of WJ-MSCs or their EVs in the field of allogeneic stem cell transplantation (for example, NCT01092026 in Belgium, NCT02032446 in Italy, NCT03847844 in Malaysia and NCT04738981 and NCT04213248 in China).

ACKNOWLEDGEMENTS

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Cécile POCHON: Writing – original draft (equal); Writing – review & editing (equal). **Anne-Béatrice Notarantonio:** Writing – original draft (equal). **Caroline Laroye:** Writing – original draft (equal). **Loïc Reppel:** Writing – original draft (equal). **Daniele Bensoussan:** Writing – original draft (equal); Writing – review & editing (equal). **Allan Bertrand:** Writing – review & editing (equal). **Marie-Thérèse Rubio:** Supervision (equal). **Maud D'Aveni:** Supervision (equal); Writing – original draft (equal); Writing – review & editing (equal).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Not applicable.

ORCID

Cécile Pochon  <https://orcid.org/0000-0003-0277-5611>

REFERENCES

- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17:331-340.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
- da Silva ML, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119:2204-2213.
- 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;8:315-317.
- Fong CY, Richards M, Manasi N, et al. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. *Reprod Biomed Online*. 2007;15:708-718.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24:1294-1301.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2003;33:919-926.
- McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, et al. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem Soc Trans*. 1991;19:295.
- Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells*. 2008;26:2865-2874.
- Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, et al. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20:655-667.
- Somal A, Bhat IA, Indu B, et al. A Comparative study of growth kinetics, in vitro differentiation potential and molecular characterization of fetal adnexa derived caprine mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2016;11:e0156821.
- Kurtzberg J, Abdel-Aziz H, Carpenter P, et al. A Phase 3, Single-arm, prospective study of remestemcel-l, ex vivo culture-expanded adult human mesenchymal stromal cells for the treatment of pediatric patients who failed to respond to steroid treatment for acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26:845-854.
- Kebriaei P, Hayes J, Daly A, et al. A phase 3 randomized study of remestemcel-l versus placebo added to second-line therapy in patients with steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26:835-844.
- Bonig H, Kuçi Z, Kuçi S, et al. Children and adults with refractory acute graft-versus-host disease respond to treatment with the mesenchymal stromal cell preparation "MSC-FFM"-outcome report of 92 patients. *Cells*. 2019;8:1577.
- Bernardo ME, Cometa AM, Locatelli F. Mesenchymal stromal cells: a novel and effective strategy for facilitating engraftment and accelerating hematopoietic recovery after transplantation? *Bone Marrow Transplant*. 2012;47:323-329.
- Liu X, Wu M, Peng Y, et al. Improvement in poor graft function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation upon administration of mesenchymal stem cells from third-party donors: a pilot prospective study. *Cell Transplant*. 2014;23:1087-1098.
- 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. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:389-398.
- Li R, Tu J, Zhao J, et al. Mesenchymal stromal cells as prophylaxis for graft-versus-host disease in haplo-identical hematopoietic stem cell transplantation recipients with severe aplastic anemia?—a systematic review and meta-analysis. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12:106.
- Manochantr S, U-pratya Y, Kheolamai P, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord. *Intern Med J*. 2013;43:430-439.
- Najar M, Raicevic G, Boufker HI, et al. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol*. 2010;264:171-179.
- Najar M, Raicevic G, Boufker HI, et al. Adipose-tissue-derived and Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells suppress lymphocyte responses by secreting leukemia inhibitory factor. *Tissue Eng Part A*. 2010;16:3537-3546.
- Munir H, Luu N-T, Clarke LSC, et al. Comparative ability of mesenchymal stromal cells from different tissues to limit neutrophil recruitment to inflamed endothelium. *PLoS One*. 2016;11:e0155161.
- Laroye C, Boufenger A, Jolly L, et al. Bone marrow vs Wharton's jelly mesenchymal stem cells in experimental sepsis: a comparative study. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10:192.
- Karaöz E, Çetinalp Demircan P, Erman G, et al. Comparative analyses of immunosuppressive characteristics of bone-marrow, wharton's jelly, and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells. *Turk J Haematol*. 2017;34:213-225.
- Shin S, Lee J, Kwon Y, et al. Comparative proteomic analysis of the mesenchymal stem cells secretome from adipose, bone marrow, placenta and Wharton's Jelly. *Int J Mol Sci*. 2021;22:E845.
- Anzalone R, Lo Iacono M, Corrao S, et al. New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. *Stem Cells Dev*. 2010;19:423-438.
- Lo Iacono M, Anzalone R, La Rocca G, et al. Wharton's jelly mesenchymal stromal cells as a feeder layer for the ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells: a review. *Stem Cell Rev and Rep*. 2017;13:35-49.
- Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2005;106:1232-1239.
- Lu L-L, Liu Y-J, Yang S-G, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*. 2006;91:1017-1026.
- van der Garde M, van Pel M, Millán Rivero JE, et al. Direct comparison of Wharton's Jelly and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells to enhance engraftment of cord blood CD34(+) transplants. *Stem Cells Dev*. 2015;24:2649-2659.

31. Fajardo-Orduña GR, Mayani H, Flores-Guzmán P, et al. Human mesenchymal stem/stromal cells from umbilical cord blood and placenta exhibit similar capacities to promote expansion of hematopoietic progenitor cells in vitro. *Stem Cells Int*. 2017;2017:6061729.
32. Lin HD, Fong C-Y, Biswas A, et al. Allogeneic human umbilical cord Wharton's jelly stem cells increase several-fold the expansion of human cord blood CD34+ cells both in vitro and in vivo. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11:527.
33. Darvish M, Payandeh Z, Soleimanifar F, et al. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells application in hematopoietic stem cells expansion on nanofiber three-dimensional scaffold. *J Cell Biochem*. 2019;120(7):12018-12026.
34. Lo Iacono M, Russo E, Anzalone R, et al. Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells support the expansion of cord blood-derived CD34+ cells mimicking a hematopoietic niche in a direct cell-cell contact culture system. *Cell Transplant*. 2018;27:117-129.
35. Friedman R, Betancur M, Boissel L, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:1477-1486.
36. Wu K-H, Tsai C, Wu H-P, et al. Human application of ex vivo expanded umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: enhance hematopoiesis after cord blood transplantation. *Cell Transplant*. 2013;22:2041-2051.
37. Wang H, Wang Z, Zheng X, et al. Hematopoietic stem cell transplantation with umbilical cord multipotent stromal cell infusion for the treatment of aplastic anemia—a single-center experience. *Cytotherapy*. 2013;15:1118-1125.
38. Li X-H, Gao C-J, Da W-M, et al. Reduced intensity conditioning, combined transplantation of haploidentical hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells in patients with severe aplastic anemia. *PLoS One*. 2014;9:e89666.
39. Wang Z, Zheng X, Yan H, et al. Good outcome of haploidentical hematopoietic SCT as a salvage therapy in children and adolescents with acquired severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49:1481-1485.
40. Wu Y, Cao Y, Li X, et al. Cotransplantation of haploidentical hematopoietic and umbilical cord mesenchymal stem cells for severe aplastic anemia: successful engraftment and mild GVHD. *Stem Cell Res*. 2014;12:132-138.
41. He H, Nagamura-Inoue T, Takahashi A, et al. Immunosuppressive properties of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells in vitro. *Int J Hematol*. 2015;102:368-378.
42. Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, et al. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2007;21:1992-1999.
43. Chiesa S, Morbelli S, Morando S, et al. Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:17384-17389.
44. Amable PR, Teixeira MVT, Carias RBV, et al. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5:53.
45. de Witte SFH, Luk F, Sierra Parraga JM, et al. Immunomodulation by therapeutic mesenchymal stromal cells (MSC) is triggered through phagocytosis of MSC by monocytic cells. *Stem Cells*. 2018;36:602-615.
46. Reppel L, Margossian T, Yaghi L, et al. Hypoxic culture conditions for Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton's jelly: a critical parameter to consider in a therapeutic context. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014;9:306-318.
47. Avercenc-Léger L, Guerci P, Virion J-M, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells: predictive obstetric factors for cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8:161.
48. Jang YK, Kim M, Lee Y-H, et al. Optimization of the therapeutic efficacy of human umbilical cord blood-mesenchymal stromal cells in an NSG mouse xenograft model of graft-versus-host disease. *Cytotherapy*. 2014;16:298-308.
49. Kim DS, Jang IK, Lee MW, et al. Enhanced immunosuppressive properties of human mesenchymal stem cells primed by interferon- γ . *EBioMedicine*. 2018;28:261-273.
50. Soder RP, Dawn B, Weiss ML, et al. A phase I study to evaluate two doses of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of de novo high-risk or steroid-refractory acute graft versus host disease. *Stem Cell Rev Rep*. 2020;16:979-991.
51. Zhu L, Wang Z, Zheng X, et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplant with umbilical cord-derived multipotent mesenchymal cell infusion for the treatment of high-risk acute leukemia in children. *Leuk Lymphoma*. 2015;56:1346-1352.
52. Wu Y, Wang Z, Cao Y, et al. Cotransplantation of haploidentical hematopoietic and umbilical cord mesenchymal stem cells with a myeloablative regimen for refractory/relapsed hematologic malignancy. *Ann Hematol*. 2013;92:1675-1684.
53. Gao L, Zhang Y, Hu B, et al. Phase II multicenter, randomized, double-blind controlled study of efficacy and safety of umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells in the prophylaxis of chronic graft-versus-host disease after HLA-haploidentical stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2016;34:2843-2850.
54. Wu Q-L, Liu X-Y, Nie D-M, et al. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells ameliorate graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation through multiple immunoregulations. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. 2015;35:477-484.
55. Kabat M, Bobkov I, Kumar S, et al. Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004-2018: Is efficacy optimal in a narrow dose range? *Stem Cells Transl Med*. 2020;9:17-27.
56. Yin Y, Hao H, Cheng Y, et al. The homing of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and the subsequent modulation of macrophage polarization in type 2 diabetic mice. *Int Immunopharmacol*. 2018;60:235-245.
57. Mukherjee A, Tipnis S, Sarma HD, et al. Radiolabeling of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for in vivo tracking. *Cancer Biother Radiopharm*. 2012;27:614-619.
58. Mello TG, Rosado-de-Castro PH, Campos RMP, et al. Intravenous human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cell administration in models of moderate and severe intracerebral hemorrhage. *Stem Cells Dev*. 2020;29:586-598.
59. Galleu A, Riffo-Vasquez Y, Trento C, et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Sci Transl Med*. 2017;9:eaam7828.
60. Harrell CR, Jovicic N, Djonov V, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes and other extracellular vesicles as new remedies in the therapy of inflammatory diseases. *Cells*. 2019;8:1605.
61. Goloviznina NA, Verghese SC, Yoon Y, et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles promote myeloid-biased multipotent hematopoietic progenitor expansion via toll-like receptor engagement. *J Biol Chem*. 2016;291:24607-24617.
62. Budgude P, Kale V, Vaidya A. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles as cell-free biologics for the ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Cell Biol Int*. 2020;44:1078-1102.
63. Wen S, Dooner M, Cheng Y, et al. Mesenchymal stromal cell derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia*. 2016;30:2221-2231.
64. Crain SK, Robinson SR, Thane KE, et al. Extracellular vesicles from Wharton's jelly mesenchymal stem cells suppress CD4 expressing T cells through transforming growth factor beta and adenosine signaling in a canine model. *Stem Cells Dev*. 2019;28:212-226.
65. Mao F, Wu Y, Tang X, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells relieve inflammatory bowel disease in mice. *Biomed Res Int*. 2017;2017:5356760.
66. Wang L, Gu Z, Zhao X, et al. Extracellular vesicles released from human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells prevent

- life-threatening acute graft-versus-host disease in a mouse model of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Dev.* 2016;25:1874-1883.
67. Li M, Soder R, Abhyankar S, et al. WJMSC-derived small extracellular vesicle enhance T cell suppression through PD-L1. *J Extracell Vesicles.* 2021;10:e12067.
68. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, et al. A new Mesenchymal Stem Cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One.* 2010;5:e10088.
69. Zhang Q, Fu L, Liang Y, et al. Exosomes originating from MSCs stimulated with TGF- β and IFN- γ promote Treg differentiation. *J Cell Physiol.* 2018;233:6832-6840.
70. Oja S, Kaartinen T, Ahti M, et al. The utilization of freezing steps in Mesenchymal Stromal Cell (MSC) Manufacturing: potential impact on quality and cell functionality attributes. *Front Immunol.* 2019;10:1627.
71. François M, Copland IB, Yuan S, et al. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing. *Cytotherapy.* 2012;14:147-152.
72. Moll G, Alm JJ, Davies LC, et al. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? *Stem Cells.* 2014;32:2430-2442.
73. 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;34:2429-2442.
74. Laroye C, Lemarié J, Boufenzler A, et al. Clinical-grade mesenchymal stem cells derived from umbilical cord improve septic shock in pigs. *Intensive Care Med Exp.* 2018;6:24.
75. Kong CM, Lin HD, Biswas A, et al. Manufacturing of human Wharton's jelly stem cells for clinical use: selection of serum is important. *Cytotherapy.* 2019;21:483-495.
76. Zhao D, Liu L, Chen Q, et al. Hypoxia with Wharton's jelly mesenchymal stem cell coculture maintains stemness of umbilical cord blood-derived CD34+ cells. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9:158.
77. Lee B-C, Kang K-S. Functional enhancement strategies for immunomodulation of mesenchymal stem cells and their therapeutic application. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11:397.
78. Li H, Liu Q, Gao X, et al. IFN- γ gene loaded human umbilical mesenchymal stromal cells targeting therapy for Graft-versus-host disease. *Int J Pharm.* 2021;592:120058.
79. Zhang Y, Chai C, Jiang X-S, et al. Co-culture of umbilical cord blood CD34+ cells with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 2006;12:2161-2170.
80. Costa MHG, de Soure AM, Cabral JMS, et al. Hematopoietic Niche - Exploring Biomimetic Cues to Improve the Functionality of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Biotechnol J.* 2018;13.
81. Leuning DG, Beijer NRM, du Fossé NA, et al. The cytokine secretion profile of mesenchymal stromal cells is determined by surface structure of the microenvironment. *Sci Rep.* 2018;8:7716.
82. Liu FD, Tam K, Pishesha N, et al. Improving hematopoietic recovery through modeling and modulation of the mesenchymal stromal cell secretome. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9:268.
83. Ji Y-R, Yang Z-X, Li L-N, et al. IL-1 β promotes the hematopoietic support of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2013;21:1005-1009.
84. Carrancio S, Romo C, Ramos T, et al. Effects of MSC coadministration and route of delivery on cord blood hematopoietic stem cell engraftment. *Cell Transplant.* 2013;22:1171-1183.
85. Kang I, Lee B-C, Choi SW, et al. Donor-dependent variation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in response to hypoxic preconditioning and amelioration of limb ischemia. *Exp Mol Med.* 2018;50:1-15.

How to cite this article: Pochon C, Notarantonio A-B, Laroye C, et al. Wharton's jelly-derived stromal cells and their cell therapy applications in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *J Cell Mol Med.* 2022;00:1-12. doi:[10.1111/jcmm.17105](https://doi.org/10.1111/jcmm.17105)

ANNEXE 3: article scientifique soumis dans Nature Communications

IFN- γ primed Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells inhibit T cell proliferation by synergistic IDO and mitochondrial transfer mechanisms

C.Pochon*^{1,2}, R. Perouf*¹, A. Bertrand¹, AB. Notarantonio¹, N. Charif¹, M. De Carvalho Bittencourt^{1,3}, G. Fouquet⁴, G. Cauchois¹, C. Voisin¹, D. Bensoussan^{1,5}, P. Emond⁶, H. Sartelet⁷, D. Moulin¹, N. de Isla¹, M. D'Aveni^{1,8, \S} , MT. Rubio^{1,8, \S} .

*C. Pochon and R. Perouf contributed equally to this work

\S Co-last authors

Affiliations:

1. IMoPA laboratory, UMR 7365 CNRS-UL, Team 6, 54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY, France
2. Pediatric onco-hematology Department, Nancy University Hospital, 54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY, France
3. Immunology Department, Nancy University Hospital, 54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY, France
4. Imagine Institute, Necker University Hospital, 75015 PARIS, France
5. Cell Therapy Unit, Nancy University Hospital, 54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY, France
6. INSERM 1253 Unit, iBrain, Tours University, 37032 TOURS, France
7. Biopathology Department, Nancy University Hospital, 54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY, France
8. Hematology Department, Nancy University Hospital, 54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY, France

Abstract

Background: Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSC) are pluripotent stromal cells derived from umbilical cords, under development for several cell therapy applications.

Methods: WJ-MSCs produced at clinical grade at the University Hospital of Nancy were analyzed *in vitro* in culture with activated T cells, and *in vivo* in a mouse model of graft versus host disease (GVHD), to describe their immune modulation mechanisms.

Results: WJ-MSCs have an anti-proliferative potential of variable intensity on T lymphocytes (LTs). Pre-incubation of WJ-MSCs with IFN- γ (WJ-MSC-IFN) for 48 h increases their anti-proliferative potential *in vitro*. We showed that this effect was related to an increase in indoleamine2,3-dioxygenase (IDO) activity by WJ-MSCs. We also observed that independently of IFN- γ activation and of IDO, WJ-MSCs can transfer mitochondrial material to activated LTs. This transfer is contact-dependent, as is the immunosuppressive action of WJ-MSCs. After mitochondrial transfer, activated T cells having received mitochondria proliferate significantly less than those that had not received mitochondria. IDO inhibition restores the proliferative capacity of LTs, whether or not they have received mitochondria. The analysis of the metabolic pathways of LTs in the presence of WJ-MSCs revealed a modulation of T cell metabolism characterized by a decrease in aerobic glycolysis and an increase in oxidative phosphorylation, a phenomenon reversed by IDO inhibition. Finally, we have shown in a mouse model of GVHD, that 3 sequential injections of WJ-MSC-IFN (at D7, D14 and D21 post-transplantation) allow to reduce the clinical and histological signs of GVHD and increase mouse survival. The “homing” studies of WJ-MSCs have shown their presence in the lung and at a lower rate in the skin 24 hours after administration, then they become undetectable. Their contact with LTs is nevertheless transiently possible in these organs after each administration.

Conclusion: Altogether, our results suggest that WJ-MSC-IFN inhibit LT activation via complementary mechanisms involving IDO production and mitochondrial transfer modulating T cell metabolism. The results of the preclinical study led us to develop of a phase I clinical trial of several administrations of WJ-MSC for the prevention of GvHD.

Key-Words : MSC, Wharton’s Jelly, clinical grade, IDO, mitochondrial transfer, IFN- γ , GVHD

Introduction

Graft *versus* Host disease (GVHD) is a severe complication after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). The current treatment of acute GVHD relies on corticosteroids, and other immune suppressive drugs, notably ruxolitinib in second line ¹. However, acute GVHD remains the first cause of transplant-related mortality that occurs in 10 to 20% of transplanted patients. Half percent of acute GVHD are resistant or dependent of corticosteroids, and all immune suppressive drugs lead to an increased risk of infections, in these deeply immune suppressed patients ². Therefore different preventive and therapeutic strategies are needed to reduce transplant related mortality due to GVHD. Among them, mesenchymal stromal cells (MSCs) have been shown to be an interesting option, with curative potential in severe acute GVHD ³. The most described MSCs in this field of cell therapy are bone marrow-derived MSCs ⁴. However, Wharton Jelly’s MSCs (WJ-MSCs) are of particular interest, considering their isolation without invasive procedure, high expansion rate, low degree of immunogenicity, and high immune suppressive potential *in vitro* ⁵. Our team has developed a bank of clinical-grade cryopreserved WJ-MSCs ⁶, for adoptive

allogeneic use in clinical trials, with the authorization of the French Medicine Agency (ANSM). The purpose of our work was to describe their immune suppressive impact *in vitro*, and to determine the main pathways that drive T cell inhibition, in order to validate and give a comprehensive schema of licensing and administration *in vivo* in a murine model of xeno-GVHD.

Materials and Methods

Mice and disease models

NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). All mice were bred and housed in a specific pathogen-free facility in microisolator cages and used at 8 to 12 weeks of age in protocols approved by the local Ethical Committee (APAFIS23270-2017060417575295-V10).

Xeno-GvHD was induced as previously described) (5). Briefly, NSG mice were irradiated using 200cGy total body irradiation by X-ray on day -1 followed by the intravenous infusion in the caudal vein of $5 \cdot 10^6$ human PBSCs, from a healthy donor. One infusion on day 0 or repeated infusions on days 7, 14 and 21 were made with $5 \cdot 10^5$ unprimed-MSC or $5 \cdot 10^5$ IFN- γ -primed MSCs. Control group was transplanted with only $5 \cdot 10^6$ human PBSCs on day 0, and then received PBS for the further injections. Mice were monitored for survival and weight twice a week. Chimerism was analyzed on 100 μ l of mice blood, after red blood cells lysis, and staining with a mouse human CD45 antibody coupled to V500 (BD Horizon).

WJ-MSC's staining before injection:

WJ-MSCs were stained with Celltracker™ Deep Red Dye, ThermoFisher, (during 30 minutes in T75 flasks, with α -MEM without serum, at 37°C), 24 hours before injection. PBMCs were stained with Celltracker™ Blue CMAC Dye, ThermoFisher, following instructions provided by the company, 2 hours before injection.

WJ-MSC preparation

Clinical grade WJ-derived human MSC were generated as previously described⁸. Umbilical cords were collected at the university maternity hospital of Nancy, after pregnant mothers had signed an informed consent form in compliance with the French national legislation regarding human sample collection, manipulation, and personal data protection. This collection was approved by the Nancy Hospital ethics committee and French ministry of research (No DC-214-2114). WJ-MSCs productions were performed in GMP conditions in an α -MEM culture medium (Macopharma, France) enriched with 5% of human Platelet Lysate (Macopharma, France). Cross sections of the cord (3 mm) were made. Each fragment was transferred one by one to a flask (TPP 90552 Dutscher) and attached the plastic surface for 15 minutes before the addition of α -MEM medium supplemented with 5% human platelet lysate. The flasks were incubated at 37°C in hypoxia (5% CO₂, 5% O₂). The medium was changed after 4 to 5 days of culture. After nearly 10 days of migration and cell adhesion, the cross sections of the cords were removed and the medium was

renewed. When the confluence of cells was up to 80%, the medium was removed, cells were washed with PBS (Macopharma, France), trypsinization was performed for 5 min and cells were recovered by centrifugation and plated in new T75 flasks at a density of 3000 MSCs/cm². WJ-MSCs were cultured up to P2 (final product). The same culture conditions were applied for passage 1 and 2.

At the end of P2, and after trypsinization, MSCs were frozen at a concentration of 1x10⁶/ml in a final cryopreservation solution composed of 10% human albumin and 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO). MSCs were stored at -80°C and then in vapor phase nitrogen.

MSCs were thawed in a water bath at 37°C for 5 min and then washed in a fresh medium of α -MEM enriched with 5% human platelet lysate. They were transferred in T75 flasks at a concentration of 3000 viable cells/cm² and cultured for one week in hypoxia to restore their functions after thawing.

For priming, recombinant Human IFN- γ protein (285-IF-100, Biotechne) was added in the culture medium at the concentration of 100 ng/ml for 48 hours, before MSCs were considered as "IFN-WJ-MSCs".

Proliferation assays:

For WJ-MSCs and IFN- γ primed WJ-MSCs, *in vitro* suppressive capacities were tested after co-culture with non-TCR specifically activated T cells. Non-specific T cell activation was performed in a 96 round bottom plate coated with 10 μ g/mL anti-CD3 mAb (clone UCHT1) and 10 μ g/mL anti-CD28 mAb (clone 37407) for 2 hours before the addition of T cells (50,000/well). Cells were incubated in custom RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 10mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid buffer, 1mM sodium pyruvate, and 100 U/mL penicillin-streptomycin (Life Technologies). T cells were labelled with carboxyfluoresceinsuccinimidyl ester (CFSE) or CellTrace™ Violet labelling (ThermoFisher Scientific, Paisley, UK) at a final concentration of 5 μ M. In these assays, 50 000 MSCs were co-cultured with 50 000 T cells (ratio 1:1) per well.

T cell apoptosis, exhaustion and inhibition assays:

For apoptosis analyses, FITC Annexin-V and FITC-CD95 antibody (BD Biosciences) were used. T cell exhaustion was analyzed by flow cytometry with the following mAbs: BV510-PD1, PE Dazzle -TIM3 (BD Biosciences) and PE-LAG 3 (SONY). For T regs: PeCy7-CD4, BV421-CD25, PE-CD127 (BD Biosciences).

Inhibition of IFN- γ was performed by adding an anti-human IFN- γ antibody (NIB42 RUO, BD) in the culture medium at the beginning of co-culture at 25 μ g/ml. Inhibition of indoleamine 2,3 deoxygenase (IDO) was performed by adding 1-methyl-L-tryptophan (Sigma-Aldrich) at 1mM or 0.5mM. Inhibition of PD1 was performed by addition of nivolumab in the culture medium at 20 μ g/ml. To inhibit Galectin-9: β -lactose (Sigma-Aldrich) at 10 mmol/l, and a neutralizing monoclonal anti-human Galectin-9 antibody (9S2-1, Sigma-Aldrich) at 20 μ g/ml were added in co-culture medium.

To prevent contact between MSCs and T cells: ThermoScientific® Nunc® Cell culture inserts in Carrier Plate System, 141002 were used, with a diameter of 0.4 µm, preventing cell migration, in 24 well plates. T cells were in the bottom, and MSCs in the inserts.

MSC Phenotype:

At the end of P2, WJ-MSCs phenotype was analyzed with the MSC Phenotyping Kit, human, 130-095-19, MiltenyiBiotec. Other cell phenotypes analyzed by flow cytometry were done with the following antibodies: FITC-CD80, PE-CD86, APC-CD209, PE-CD40, eFluor 450-HLA-DR, FITC-CD29, PE-VCAM1, mouse anti-human neuropilin1 (NP1), mouse anti-human CD47, mouse anti-human HLA-G, all from eBioscience, PE-Galectin3, mouse anti-human Galectin9, APC-PDL1, APC-PDL2, secondary AF-594 goat anti-mouse antibody, all from Fisher Scientific, AF488-IDO from BioTechne.

ELISA and MULTIPLEX:

Human LAP (TGF-Beta 1) DuoSet Elisa, Biotechne, Human Indoleamine 2,3-dioxygenase DuoSet Elisa, BioTechne, and Prostaglandin E2 Parameter Assay Kit, Biotechne, were used to measure TGFβ1, IDO and PGE2 in supernatants. A human Magnetic Luminex Assay, Biotechne, was specially designed to measure IL-10, soluble PDL-1, Galectin-3, Galectin-9, HGF at the same time in supernatants.

Tryptophan metabolites:

At day 5 of co-cultures, supernatants were frozen and sent to UMR 1253 unit, iBrain, Tours University, France. Tryptophan and its metabolites were measured with liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry as described by Emond's Team⁹. Twenty metabolites were measured for each sample.

IDO activity could be estimated by the ratio of tryptophan metabolites mediated by IDO (kynurenine, kynurenic acid, 3-OH kynurenine, quinolinic acid and xanthurenic acid) on other tryptophan metabolites (tryptophan, 5-OH tryptophan, tryptamine, serotonin and tryptophol).

Mitochondrial transfer analysis

WJ-MSCs were stained with Mitotracker Green (488/516 nm), Invitrogen, at 50µM in α-MEM medium without serum during 30 minutes at 37°C, 1 or 2 hours before their co-cultures with T cells. At day 2 and 5 of co-cultures, and the percentage of T cells having received mitochondria material (Mito+) or not (Mito-) were determined by flow cytometry.

Metabolism analysis

Seahorse XF Cell Mito Stress Kit, Agilent, was used to analyze T cells metabolism after co-culture. Briefly, 300 000 T cells were put per well, and Oxygen Consumption Rate (OCR, pmol/min) and Extracellular Acidification Rate (ECAR, mpH/min) were analyzed in basal conditions, after Oligomycin injection, FCCP and

Actinomycin A/Rotenone injection, to measure basal respiration, ATP-linked respiration, and maximal respiratory capacity. OCR/ECAR ratio was analyzed in all conditions (12 measurements per sample).

GVHD analysis in mice

Skin, gut, liver and spleen histological analyses were made after haematoxylin-eosin staining. Immune histochemistry was also performed with human anti CD3, CD20, CD68 and CD163 staining in liver. Histological score for GVHD was evaluated according to previous reports in this mice model of GVHD ¹⁰.

Statistics

Results were expressed as mean± standard deviation (SD). The unpaired Student *t* test was performed to compare 2 mean values. Probability of null hypothesis less than 5% ($p > .05$, two-sided) was considered statistically significant. Graphpad Prism 6 software was used.

Results

1. IDO is the main pathway for WJ-MSCs T cell immune modulation

We first analyzed the effect of WJ-MSCs on T cell proliferation according to their prior priming by IFN- γ . After 5 days of culture with allogeneic T cells activated by anti CD3 and CD28 antibodies, WJ-MSCs partially inhibited T cell proliferation. IFN- γ primed WJ-MSCs (IFN-WJ-MSCs) displayed a higher potency to inhibit T cell proliferation *in vitro*, compared to unprimed WJ-MSCs (median of inhibition 60.5% (IQR 25.5-80.75) for IFN-WJ-MSCs *versus* 12% (IQR 6.5-58) for WJ-MSCs ($p=0.002$, Fig 1A). IFN-WJ-MSCs expressed higher levels of CD40, HLA-DR, and VCAM 1 compared to WJ-MSCs (Fig 1B). Despite the expression of type II HLA and CD40, IFN-WJ-MSCs did not activate allogeneic T cells in all experiments (supplementary data).

T cell inhibition induced by WJ-MSCs was partially reversed by blocking IFN- γ in the presence of non IFN-primed WJ-MSCs, while the reversion was not significant with IFN-WJ-MSCs (Fig 1C), suggesting that IFN- γ plays a role in modulating WJ-MSCs' immunosuppressive effects. Among T cells, both CD4+ and CD8+ subtypes were equally inhibited with WJ-MSCs, while the inhibition was predominant for CD4+ T cells in the presence of IFN-WJ-MSCs (Fig 1D). Reduction of T cell proliferation was associated with an increase in T cell apoptosis after 2 days of co-culture with IFN-WJ-MSCs compared to WJ-MSCs (Fig 1E) as well as an enhanced expression of CD95 on T cell surface with both WJ-MSCs and IFN-WJ-MSCs (Fig 1F). However, neither WJ-MSCs nor IFN-WJ-MSCs induced T cell exhaustion (Fig 1G).

We therefore explored the mechanisms involved in the regulation of T cell proliferation by IFN-WJ-MSCs in comparison to unprimed WJ-MSCs. First, analysis of the expression of inhibitory molecules on MSCs showed that IFN- γ pre-exposure of WJ-MSCs increased the expression of PDL-1 and PDL-2 on the cell membrane, and of IDO in the cytosol, while the cell surface expression of HLA-G, galectin 3 and 9 was similar between WJ-MSC and IFN-WJ-MSCs (Fig 2A). We then analyzed the production of regulatory molecules in the culture

media of activated T cells alone or in the presence of WJ-MSCs or IFN-WJ-MSCs. At day 5 of co-cultures, in comparison to activated T cell alone, co-cultures with MSCs showed increased levels of galectin-3, galectin-9, HGF, IDO, TGF β 1 and PGE2, similar levels of soluble PDL1 and reduced production of IL-10 (Figure 2B). When compared to unprimed WJ-MSCs, co-cultures with IFN-WJ-MSCs displayed higher levels of IDO and galectin 9 but reduced PGE2 (Figure 2B) in the co-culture media.

Addition in the coculture of anti PD1 monoclonal antibody (nivolumab) or of beta β -lactose to inhibit galectin activity or of functional anti human galectin 9 antibody, didn't change the ability of WJ-MSCs or IFN-WJ-MSCs to inhibit T cell proliferation (Figure 2C, D). By contrast, addition in the coculture medium of the IDO inhibitor 1L-methyltryptophan at 1 mM, completely abrogated the inhibition of both WJ-MSCs ($p=0.03$) or IFN-WJ-MSCs ($p=0.0009$) on T cell proliferation, while at 0.5 mM, it completely abrogated the effect of IFN-WJ-MSCs ($p=0.009$). (Figure 2E).

We further quantified IDO metabolites at the end of cocultures by liquid chromatography combined with high resolution mass spectrometry (Fig 3). A significant decrease of tryptophan (Fig 3A) and a significant increase in kynurenine and kynurenic acid (Fig 3B and C) were observed when activated T cells were in contact with WJ-MSCs in comparison to activated T cells alone. IFN-WJ-MSCs led to a higher change in tryptophan, kynurenine and kynurenic acid levels than WJ-MSCs ($p=0.039$, $p=0.019$ and $p=0.011$ respectively, Figure 3A, B and C). Moreover, IDO activity was highly increased with IFN-WJ-MSCs (Figure 3D). The addition of 1L-MT inhibited IDO activity and restored tryptophan concentration in the medium (Fig 3A and D). These results highlight the key role of IDO in the inhibition of T cells proliferation by WJ-MSC and show that IFN- γ priming increases IDO activity and thus their immunosuppressive effects towards activated T lymphocytes.

2. Sequential administration of IFN-WJ-MSCs protects from xeno-GVHD In vivo

The enhanced immunosuppressive effects of IFN-WJ-MSCs were confirmed *in vivo* in a mouse model of xeno-GVHD. Since we did not observed significant GVHD preventive effect in NSG mice transplanted with human PBMCs of a single intravenous administration of $5 \cdot 10^5$ WJ-MSCs or IFN-WJ-MSCs on day 0 of transplant (data not shown), we explored the role of several administrations of WJ-MSCs (Fig 4A). Sequential administration of IFN-WJ-MSCs on days 7, 14 and 21 after transplantation of human PBMCs improved mice survival in comparison to that of mice transplanted with PBMCs alone ($p=0.0025$), and to that of mice transplanted with PBMCs and unprimed WJ-MSCs ($p=0.03$) (Fig 4A).

Histology of GVHD target organs revealed signs of GVHD in the skin (keratinocytes apoptosis, spongiosis and lymphocytes infiltrates around the annexes and in the dermal tissue) and in the liver (hepatitis with lymphocytes infiltrates in the periportal spaces and in the middle of lobules) (Figure 4B-D). Median GVHD histological score tent to be reduced in xeno-transplanted NSG mice having received IFN-WJ-MSCs in comparison to mice transplanted with human PBMCs alone (Figure 4E). Protection from GVHD was not due

to impaired human T cell engraftment since human lymphocyte chimerism was not affected by injections of IFN-WJ-MSCs (Fig 4F).

3. *In vitro* inhibition of T cell proliferation by WJ-MSCs also involves cell-cell contact and mitochondrial transfer

Unexpectedly, the suppressive effects of both WJ-MSCs and IFN-WJ-MSCs on activated T cell proliferation was completely reverted in the presence of a transwell between WJ-MSCs and CD3/CD28 activated T cells, demonstrating that the immunosuppressive effects of IFN- γ -primed or unprimed WJ-MSCs are contact dependent (Fig 5A).

We therefore analyzed tryptophan metabolites in the medium of co-cultures between WJ-MSCs +/- IFN- γ and activated T cells in the presence or absence of transwell. Lack of contact between IFN- γ -primed and unprimed WJ-MSCs and T cells did not prevent IDO activation (Fig 5B). Thus, the loss of immunosuppressive effects of WJ-MSCs in the absence of cell-contact with T cells was still observed despite depletion of tryptophan by IDO suggesting the existence of another immune suppressive mechanism requiring cell-contact between WJ-MSCs and T cells.

We therefore explored, whether WJ-MSCs could transfer mitochondrial material to activated T cells, a potential cell contact-dependent mechanism of immune modulation recently described ¹¹. Both WJ-MSCs and IFN-WJ-MSCs transfer their mitochondria to 25 to 40% of activated CD4+ T cells after 2 and 5 days of co-culture, in a contact dependent way (Fig 5C et D). Furthermore, the proliferation of CD4+ T cells having received mitochondria material from WJ-MSCs (Mito+) was significantly reduced in comparison to that of CD4+ T cells not having received mitochondria (Mito-) ($p=0.002$ for WJ-MSCs and $p=0.009$ for IFN-WJ-MSCs) (Figure 5D). A lower rate of CD8+ T cells received mitochondria (5 to 20%), in comparison to CD4+ T cells ($p<0.0001$, Figure 5 E). The proliferation of CD8+ T cells having received mitochondria material from WJ-MSCs (Mito+) tent also to be reduced in comparison to that of CD8+ T cells not having received mitochondria (Mito-) ($p=0.02$ for WJ-MSCs and $p=0.06$ for IFN-WJ-MSCs) (Figure 5D). Reduction of T CD4+ proliferation was not due to the induction of regulatory T cells (Tregs) (supplementary Figure 1). Altogether these data show that in addition to IDO, the immunosuppressive effects of WJ-MSCs involve mitochondrial transfer from WJ-MSCs to T cells and in particular to CD4+ T cells, without inducing Tregs.

4. IDO and mitochondrial transfer are synergistic mechanisms for WJ-MSCs immune suppression and induce oxidative phosphorylation in T cells

To study the link between IDO activity and mitochondrial transfer in the immunosuppressive effect of WJ-MSCs and IFN-WJ-MSCs on T cells, we analyzed the effect of 1L-methyltryptophan on mitochondrial transfer and on CD4+ T cell proliferation. IDO inhibition with 1L-MT did not significantly modify the percentage of CD4+ T cells receiving mitochondria from WJ-MSCs or IFN-WJ-MSCs (Figure 6A). However, inhibition of IDO

in the co-cultures of WJ-MSCs +/- IFN- γ /activated T cell restored the proliferation of T cells independently of the presence of mitochondria transfer from WJ-MSCs (Figure 6B).

We then analyzed T cell metabolism modifications after CD3/CD28 activation according to the presence or not of WJ-MSCs with or without cell contact. Cell-contact between WJ-MSCs and activated T cells induced a decrease in T cell glycolysis, and a switch towards oxidative phosphorylation in basal condition, with an increase in ATP production, and T cell maximal respiration after addition of FCCP (Fig 5H). While the sole inhibition of IDO or of cell-contact between WJ-MSCs and T cells reduced oxidative phosphorylation in T cells, inhibition of both IDO and cell-contact induce a stronger reversion towards the glycolytic pathway of activated T cells (Fig 5 H, I and J). These results suggest that IDO is required to provide to WJ-MSCs' mitochondria the potential to switch T cell metabolism from glycolysis to oxidative phosphorylation.

Discussion

WJ-MSCs represent an interesting source of MSCs for clinical application thanks to their ready to use manufacturing possibilities, their high expansion rate, low immunogenicity and absence of cytogenetic abnormalities after expansion. In comparison to bone marrow derived MSCs their mechanisms of action have been less explored, and their conditions of optimal use are unknown.

In this study, as reported by other groups, we confirmed that priming of WJ-MSCs by IFN- γ enhance and homogenize their immunosuppressive effects on activated T cells *in vitro* and *in vivo* in a preclinical model of xeno-GVHD¹²⁻¹⁶. By contrast with the first observations that WJ-MSCs control T cell activation by depleting tryptophan levels and increasing kynurenic acid by IDO¹⁶⁻²¹ we report for the first time that the mechanisms involved in the immunosuppressive effects of WJ-MSCs on activated T cells require a synergy between their production of IDO and their capacity to transfer mitochondria to activated T cells. In addition, our data show that sequential administration of IFN- γ primed WJ-MSCs is absolutely required to control GVHD, suggesting that iterative injections of IFN- γ primed WJ-MSCs allow more frequent contact with T cells *in vivo*. In line with this hypothesis, we demonstrated that the contact between WJ-MSCs and T cells, allowing mitochondrial transfer, is required to observe the suppressive effect of IDO on T cell proliferation. Furthermore, T cells having received mitochondrial material from WJ-MSCs are more immunosuppressed in an IDO dependent way. Thus, IDO activity and mitochondrial transfer are interlinked and both are required for an optimal immunosuppressive effect of IFN- γ primed WJ-MSCs. Metabolic analyses of activated T cells in the presence or not of WJ-MSCs revealed that both IDO activity and mitochondrial transfer are required to switch activated T cell metabolism from glycolysis to oxidative phosphorylation.

The mechanisms by which IDO, by depleting tryptophan levels, leads to the inhibition of T cell proliferation are partially understood. Reduction of tryptophan concentration has been shown to induce mTOR inhibition^{22,23}. Böttcher et al. reported that mTOR inhibition by bone marrow-derived MSCs decreased aerobic

glycolysis in T cells and induced autophagy²⁴. On the other hand, Eleftheriadis et al. showed that tryptophan deprivation induced an increase of carnitine palmitoyltransferase I (cpt1a) activity and fatty acids β -oxidation in CD4+ T cells²⁵. IDO also increases kynurenine, which has been shown to induce fatty acid β -oxidation²⁶. IDO has also been described as inhibiting glutaminolysis as well as aerobic glycolysis in activated T cells²². These previous reports are concordant with our findings, that enhanced IDO activity in IFN- γ primed WJ-MSCs reduces T cell glycolysis and favors the oxidative phosphorylation, which is partially reversed by inhibiting IDO. In another context, glycolysis and autophagy inhibition in anti-tumor T cells was associated with a longer *in vivo* persistence and the acquisition of a memory phenotype, supporting the fact that we did not observe any decrease in circulating T cells after WJ-MSCs injections in our *in vivo* model^{24,27}.

Mitochondrial transfer has been described for the first time by Spees et al. in 2006, in bone marrow MSCs and fibroblasts²⁸. Many reports have since described mitochondrial transfer from MSCs to many cell types (macrophages, mononuclear cells of cord blood, tumoral cells like myeloid and lymphoid blasts, glioblastoma and melanoma, endothelial cells, cardiomyocytes, neuronal cells, corneal epithelial cells, T cells)^{11,29-36} as well as from other cells (platelets, smooth muscle cells) to MSCs^{37,38}. This transfer depends on Miro1, a mitochondrial Rho-GTPase, and would be mainly performed through nanotunnels³⁹, requiring a contact between cells. Court et al. recently described mitochondrial transfer from WJ-MSCs to PBMCs¹¹. This transfer occurred in about 40% of hematopoietic cells (B, T and NK cells). Consistent with our observations, the highest rate of mitochondrial transfer was seen into CD4+ T cells, in a contact dependent manner. However, by contrast with our results, T cell activation was not necessary in this study to observe a high rate of transfer towards CD4+ T cells. In the latter study, mitochondrial transfer was observed *in vivo* on T cells from the spleen and mesenteric nodes of mice having received intra peritoneal injections of human WJ-MSCs. Mito+ T cells acquired a phenotype of activated Tregs and had a higher glycolytic activity¹¹, consistently with the description of FOXP3 stabilization and of suppressive function of induced-T regs after mitochondrial transfer to CD4+ T cells³⁶. These results are in contrast with the absence of induction of T regs within CD4+ T cells having received mitochondrial transfer from WJ-MSCs in our *in vitro* experiments and the absence of increased CD4+ Tregs in our xeno-GVHD model after administration of IFN γ -WJ-MSCs. One explanation for these discrepancies between our results might be that in the study by Court et al., T cells were transferred with mitochondria previously isolated from WJ-MSCs without any contact between cells and outside any context of inflammation. The fact that mitochondria from fibroblasts do not induce Tregs, contrary to MSCs, and the fact that metabolic changes could change according to the mitochondria donor cell status¹¹, could lead to the hypothesis that an inflammatory pathway could drive the effect and the fate of mitochondrial transfer in T cells. In our report, IFN- γ and IDO do not change the rate of mitochondrial transfer. Nevertheless, IDO could be a key to drive the fate of mitochondria after their transfer to activated T cells.

Our work reports an interplay between IDO and contact-dependent mitochondrial transfer in WJ-MSCs immune suppressive property. IFN- γ licensing, by enhancing IDO activity, and 3 times weekly injections starting at day 7, by enhancing the time of MSCs contact with activated T cells, are a way to optimize WJ-MSCs scheme of administration in a GVHD setting. Based on these results, we designed a phase I trial including 3 administrations of IFN- γ primed WJ-MSCs to prevent acute GVHD in haploidentical allogeneic HSCT.

References

1. Shapiro, R. M. & Antin, J. H. Therapeutic options for steroid-refractory acute and chronic GVHD: an evolving landscape. *Expert Rev Hematol* **13**, 519–532 (2020).
2. Toubai, T. & Magenau, J. Immunopathology and biology-based treatment of steroid-refractory graft-versus-host disease. *Blood* **136**, 429–440 (2020).
3. Bader, P. *et al.* Effective treatment of steroid and therapy-refractory acute graft-versus-host disease with a novel mesenchymal stromal cell product (MSC-FFM). *Bone Marrow Transplant* **53**, 852–862 (2018).
4. Bonig, H. *et al.* Children and Adults with Refractory Acute Graft-versus-Host Disease Respond to Treatment with the Mesenchymal Stromal Cell Preparation ‘MSC-FFM’-Outcome Report of 92 Patients. *Cells* **8**, (2019).
5. Weiss, M. L. *et al.* Immune properties of human umbilical cord Wharton’s jelly-derived cells. *Stem Cells* **26**, 2865–2874 (2008).
6. Laroye, C. *et al.* Mesenchymal Stem/Stromal Cell Production Compliant with Good Manufacturing Practice: Comparison between Bone Marrow, the Gold Standard Adult Source, and Wharton’s Jelly, an Extraembryonic Source. *J Clin Med* **8**, E2207 (2019).
7. Toubai, T. *et al.* Induction of acute GVHD by sex-mismatched H-Y antigens in the absence of functional radiosensitive host hematopoietic-derived antigen-presenting cells. *Blood* **119**, 3844–3853 (2012).
8. Laroye, C. *et al.* Clinical-grade mesenchymal stem cells derived from umbilical cord improve septic shock in pigs. *Intensive Care Med Exp* **6**, 24 (2018).
9. Lefèvre, A. *et al.* Validation of a global quantitative analysis methodology of tryptophan metabolites in mice using LC-MS. *Talanta* **195**, 593–598 (2019).
10. Blazar, B. R. *et al.* Engraftment of severe combined immune deficient mice receiving allogeneic bone marrow via In utero or postnatal transfer. *Blood* **92**, 3949–3959 (1998).
11. Court, A. C. *et al.* Mitochondrial transfer from MSCs to T cells induces Treg differentiation and restricts inflammatory response. *EMBO Rep* **21**, e48052 (2020).
12. Polchert, D. *et al.* IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol* **38**, 1745–1755 (2008).

13. Sheng, H. *et al.* A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res* **18**, 846–857 (2008).
14. Wobma, H. M. *et al.* Dual IFN- γ /hypoxia priming enhances immunosuppression of mesenchymal stromal cells through regulatory proteins and metabolic mechanisms. *J Immunol Regen Med* **1**, 45–56 (2018).
15. Prasanna, S. J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S. R. & Vasandan, A. B. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One* **5**, e9016 (2010).
16. Kim, D. S. *et al.* Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- γ . *EBioMedicine* **28**, 261–273 (2018).
17. He, H. *et al.* Immunosuppressive properties of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stromal cells in vitro. *Int J Hematol* **102**, 368–378 (2015).
18. Li, X. *et al.* Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce T Lymphocyte Apoptosis and Cell Cycle Arrest by Expression of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase. *Stem Cells Int* **2016**, 7495135 (2016).
19. Wang, D. *et al.* A CD8 T cell/indoleamine 2,3-dioxygenase axis is required for mesenchymal stem cell suppression of human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* **66**, 2234–2245 (2014).
20. Burnham, A. J., Foppiani, E. M. & Horwitz, E. M. Key Metabolic Pathways in MSC-Mediated Immunomodulation: Implications for the Prophylaxis and Treatment of Graft Versus Host Disease. *Front Immunol* **11**, 609277 (2020).
21. Wang, G. *et al.* Kynurenic acid, an IDO metabolite, controls TSG-6-mediated immunosuppression of human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* **25**, 1209–1223 (2018).
22. Eleftheriadis, T., Pissas, G., Antoniadis, G., Liakopoulos, V. & Stefanidis, I. Indoleamine 2,3-dioxygenase depletes tryptophan, activates general control non-derepressible 2 kinase and down-regulates key enzymes involved in fatty acid synthesis in primary human CD4+ T cells. *Immunology* **146**, 292–300 (2015).
23. Metz, R. *et al.* IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncimmunology* **1**, 1460–1468 (2012).
24. Böttcher, M. *et al.* Mesenchymal Stromal Cells Disrupt mTOR-Signaling and Aerobic Glycolysis During T-Cell Activation. *STEM CELLS* **34**, 516–521 (2016).
25. Eleftheriadis, T. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase, by degrading L-tryptophan, enhances carnitine palmitoyltransferase I activity and fatty acid oxidation, and exerts fatty acid-dependent effects in human alloreactive CD4+ T-cells. *Int J Mol Med* **38**, 1605–1613 (2016).
26. Siska, P. J. *et al.* Kynurenine induces T cell fat catabolism and has limited suppressive effects in vivo. *EBioMedicine* **74**, 103734 (2021).
27. Sukumar, M. *et al.* Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. *J Clin Invest* **123**, 4479–4488 (2013).
28. Spees, J. L., Olson, S. D., Whitney, M. J. & Prockop, D. J. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1283–1288 (2006).

29. Jackson, M. V. *et al.* Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells* **34**, 2210–2223 (2016).
30. Chu, P. P. Y. *et al.* Intercellular cytosolic transfer correlates with mesenchymal stromal cell rescue of umbilical cord blood cell viability during ex vivo expansion. *Cytotherapy* **14**, 1064–1079 (2012).
31. Mohammadipour, A., Dumbali, S. P. & Wenzel, P. L. Mitochondrial Transfer and Regulators of Mesenchymal Stromal Cell Function and Therapeutic Efficacy. *Front Cell Dev Biol* **8**, 603292 (2020).
32. Feng, Y. *et al.* Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Rescue Endothelial Cells Experiencing Chemotherapy Stress by Mitochondrial Transfer Via Tunneling Nanotubes. *Stem Cells Dev* **28**, 674–682 (2019).
33. Plotnikov, E. Y. *et al.* Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. *J Cell Mol Med* **12**, 1622–1631 (2008).
34. Tseng, N. *et al.* Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells improves neuronal metabolism after oxidant injury in vitro: The role of Miro1. *J Cereb Blood Flow Metab* **41**, 761–770 (2021).
35. Jiang, D. *et al.* Mitochondrial transfer of mesenchymal stem cells effectively protects corneal epithelial cells from mitochondrial damage. *Cell Death Dis* **7**, e2467 (2016).
36. Do, J.-S. *et al.* Mesenchymal stromal cell mitochondrial transfer to human induced T-regulatory cells mediates FOXP3 stability. *Sci Rep* **11**, 10676 (2021).
37. Levoux, J. *et al.* Platelets Facilitate the Wound-Healing Capability of Mesenchymal Stem Cells by Mitochondrial Transfer and Metabolic Reprogramming. *Cell Metab* **33**, 283-299.e9 (2021).
38. Vallabhaneni, K. C., Haller, H. & Dumler, I. Vascular smooth muscle cells initiate proliferation of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer via tunneling nanotubes. *Stem Cells Dev* **21**, 3104–3113 (2012).
39. Ahmad, T. *et al.* Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO J* **33**, 994–1010 (2014).

The authors have no conflict of interest to declare.

The authors thank “AREMIG” and “Anaïs contre la leucémie” for their contribution to the research funding.

Figure 1

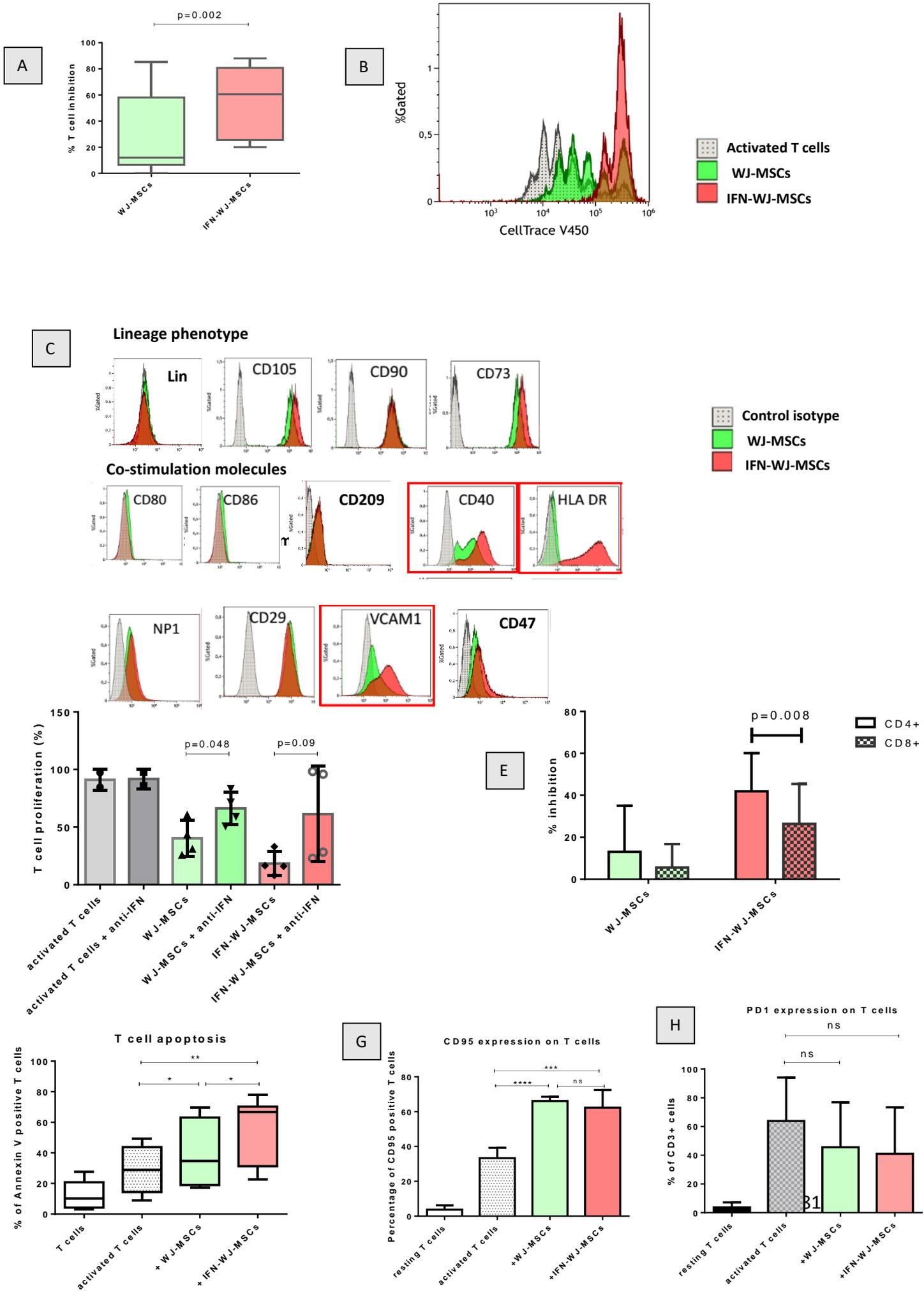
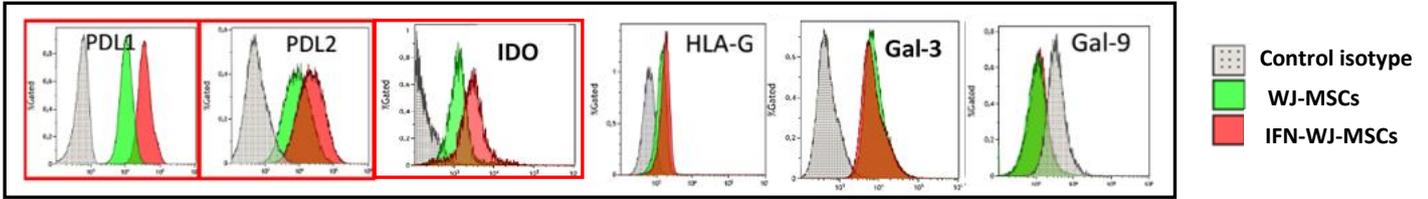


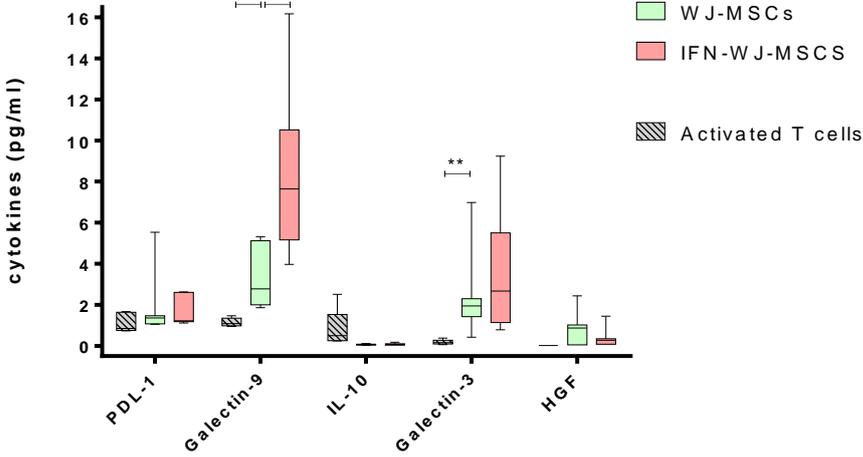
Figure 2

A

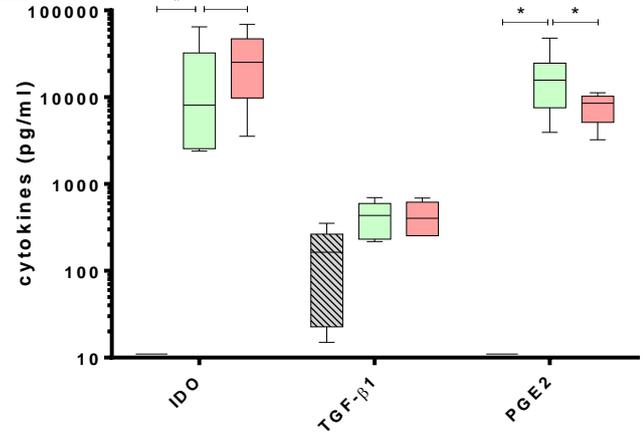
Immune suppressive molecules



B

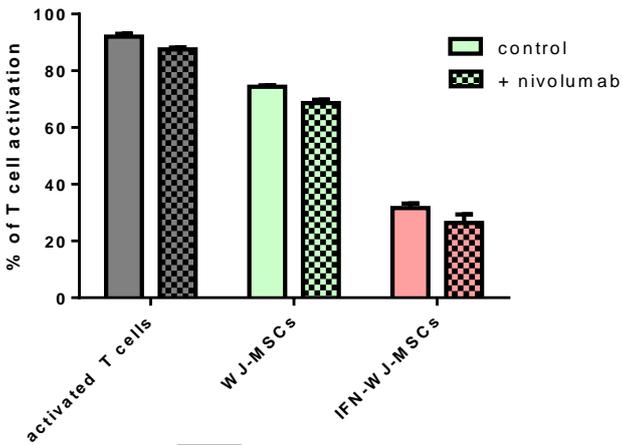


C



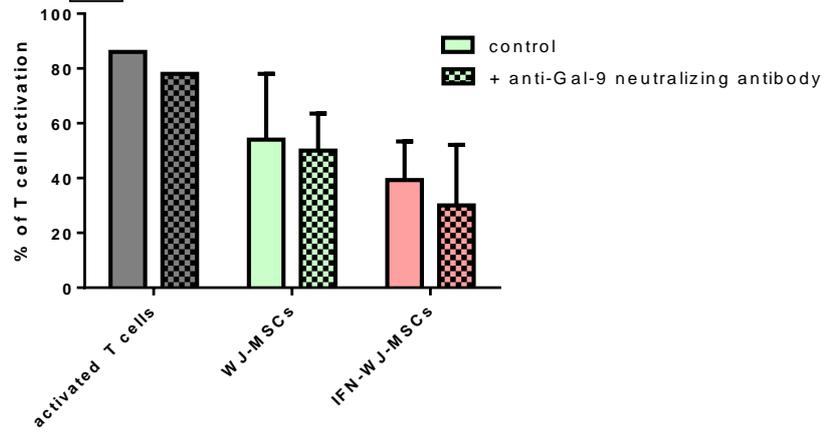
D

PD1 inhibition



E

Galectin 9 inhibition



F

IDO inhibition

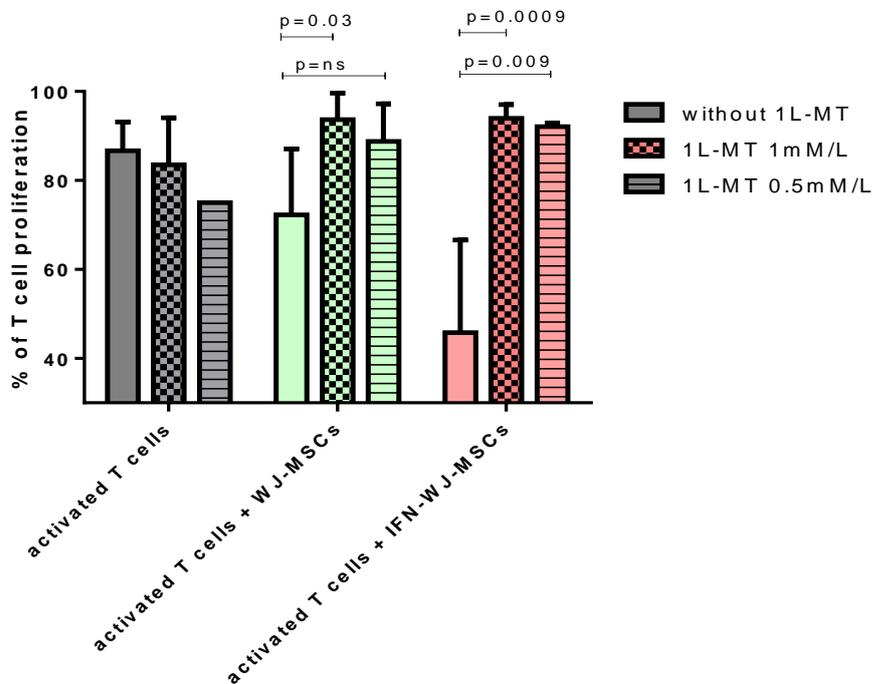


Figure 3

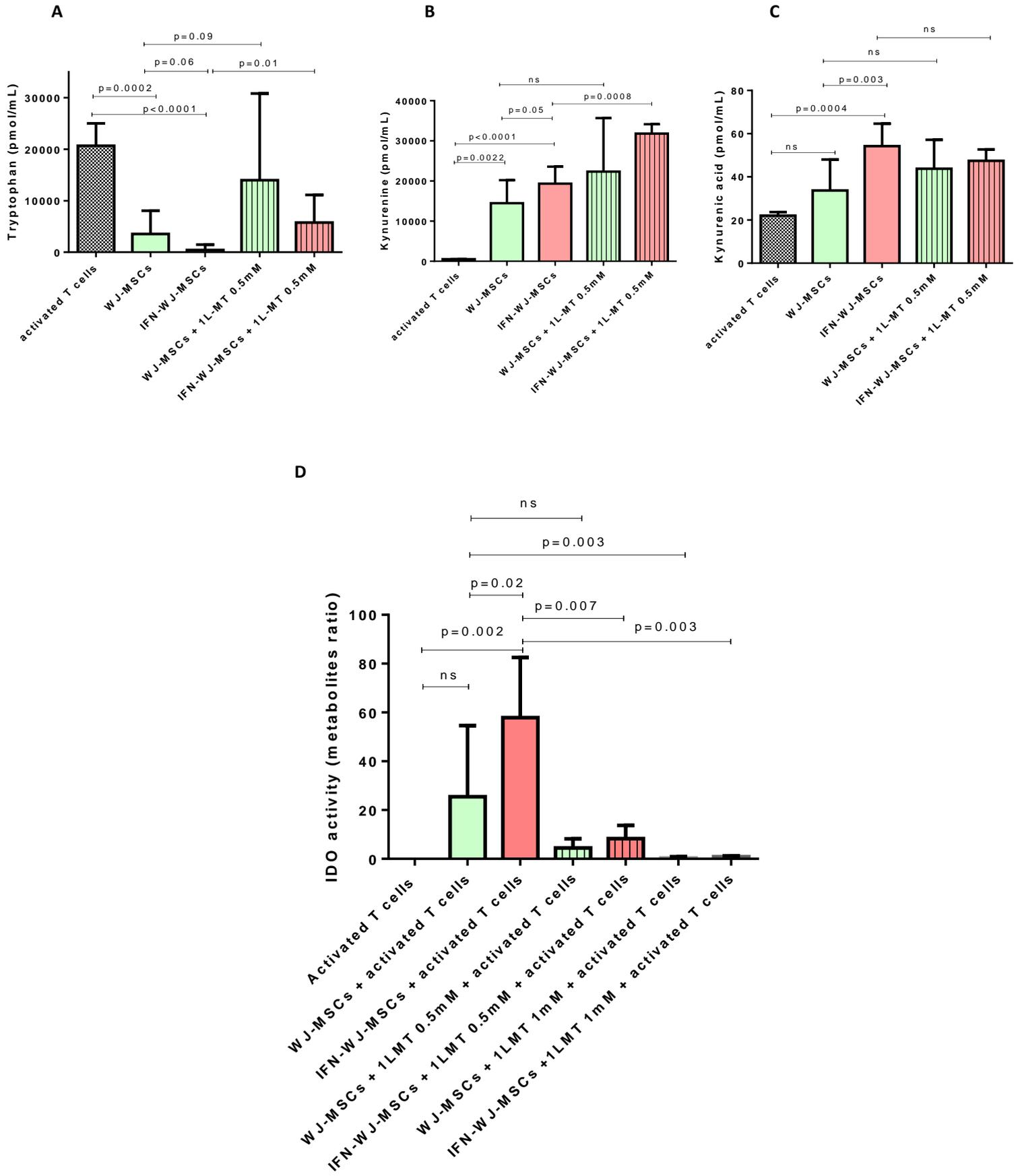


Figure 4

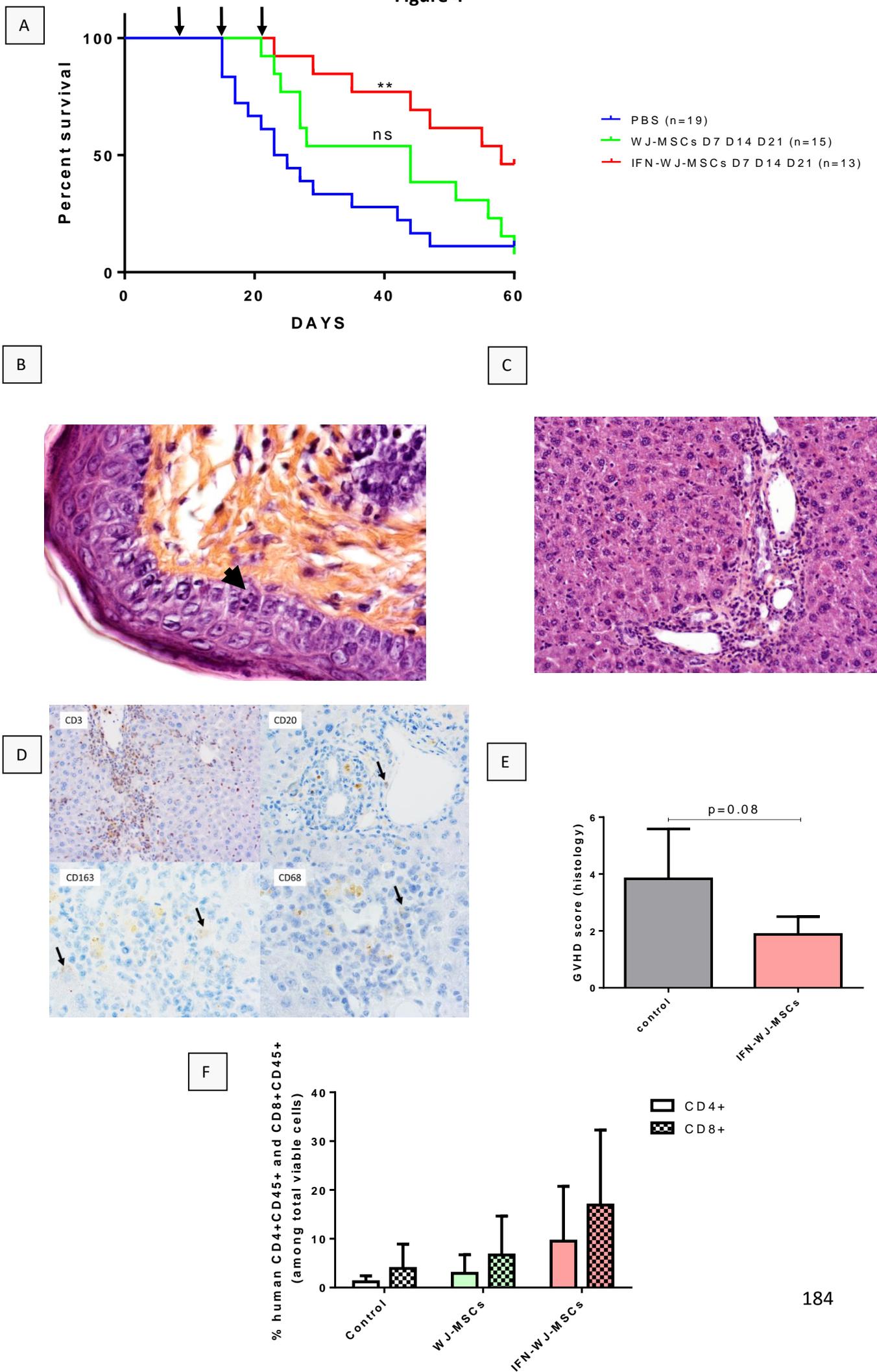
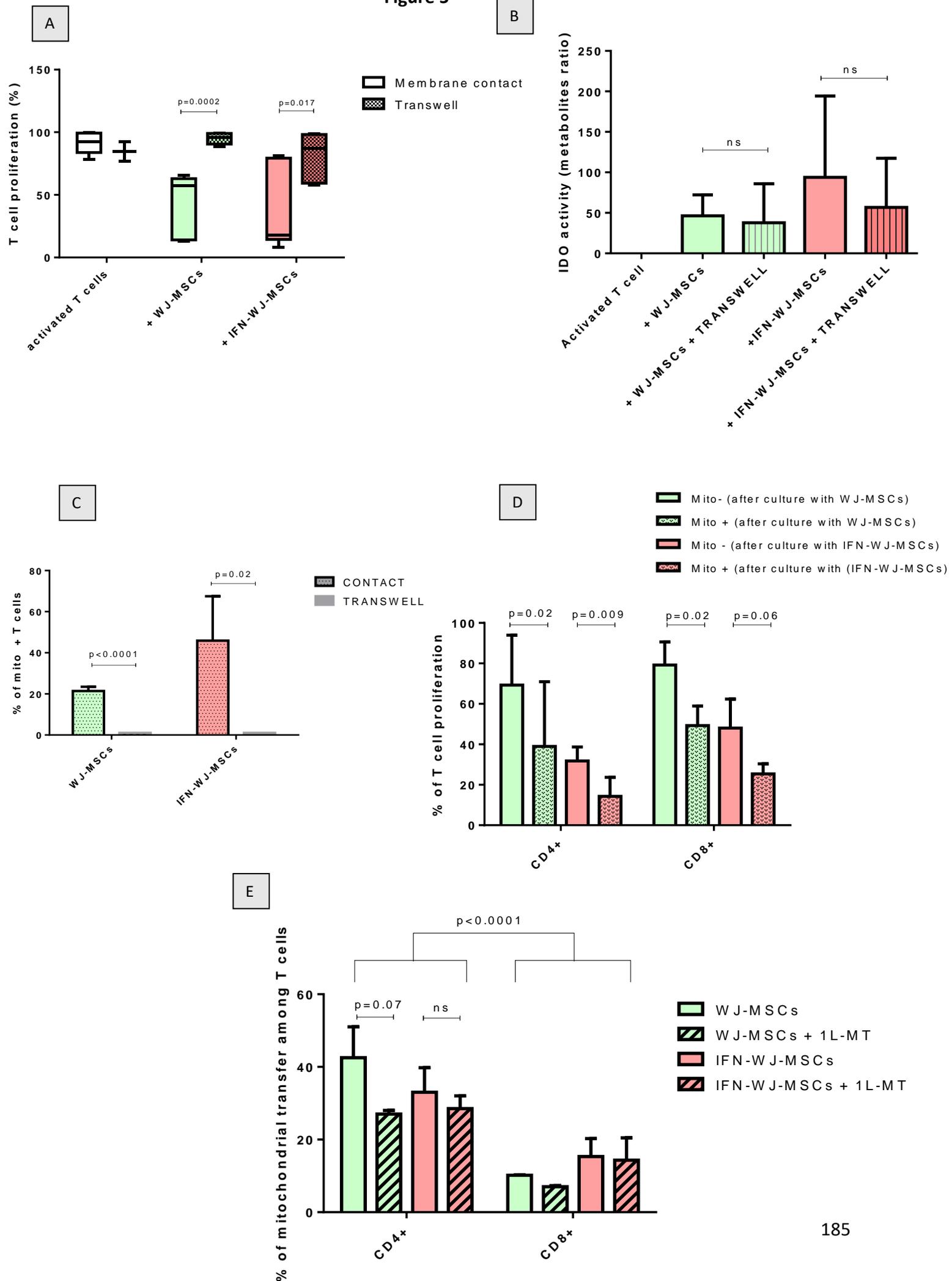
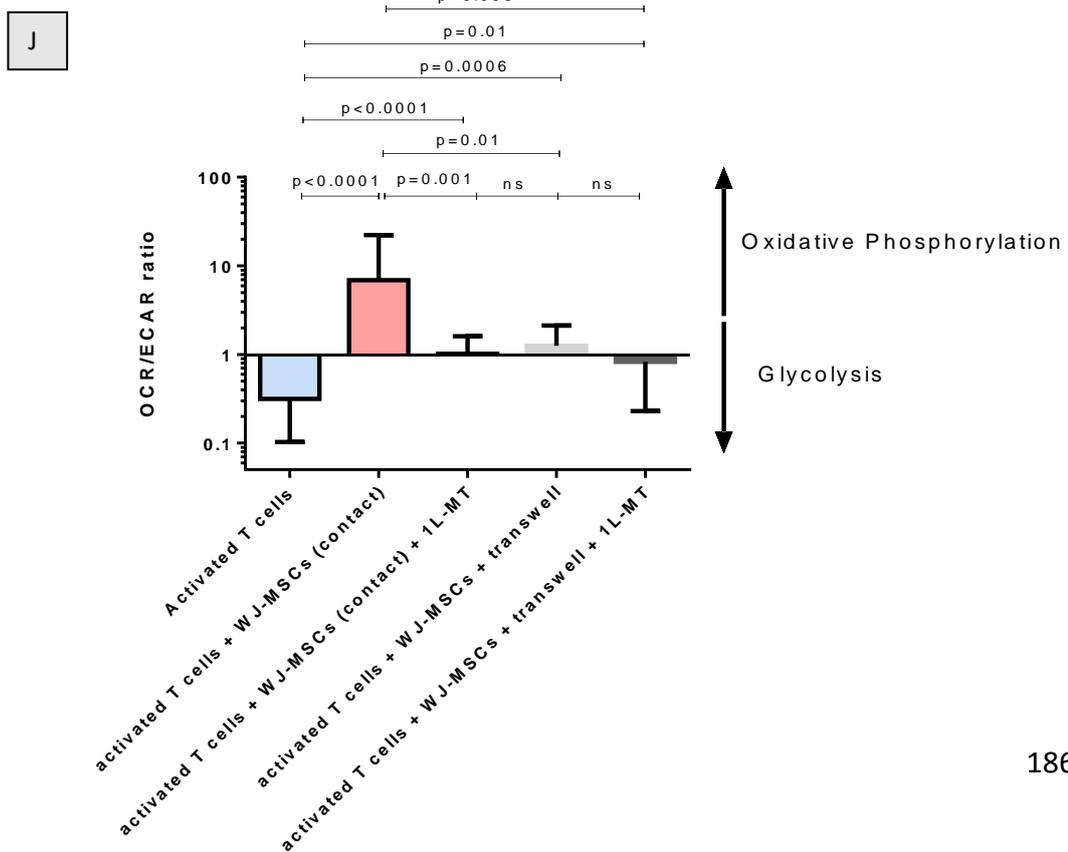
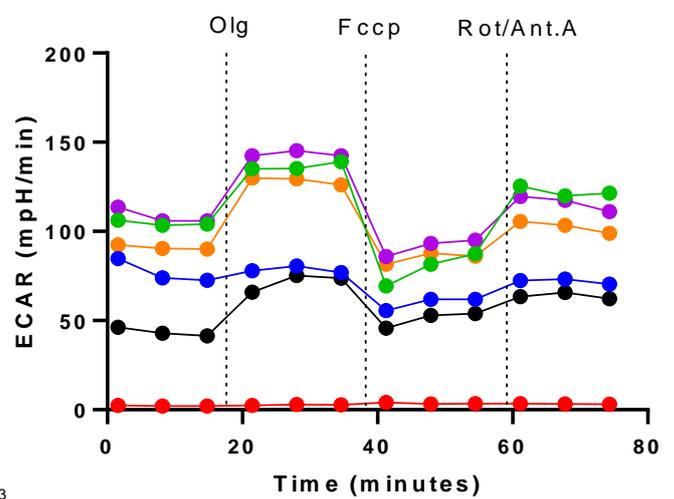
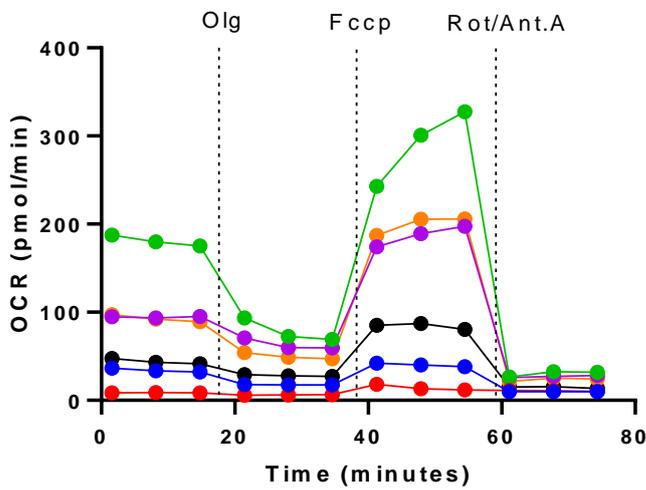
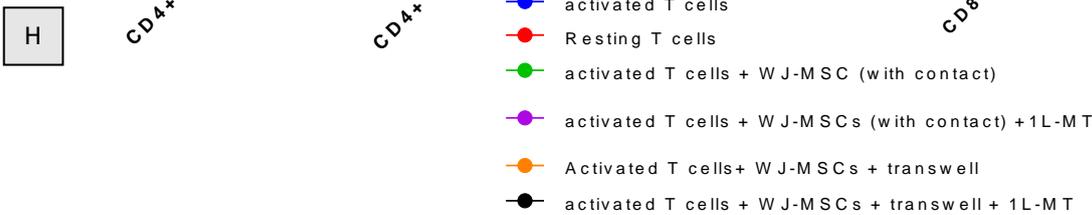
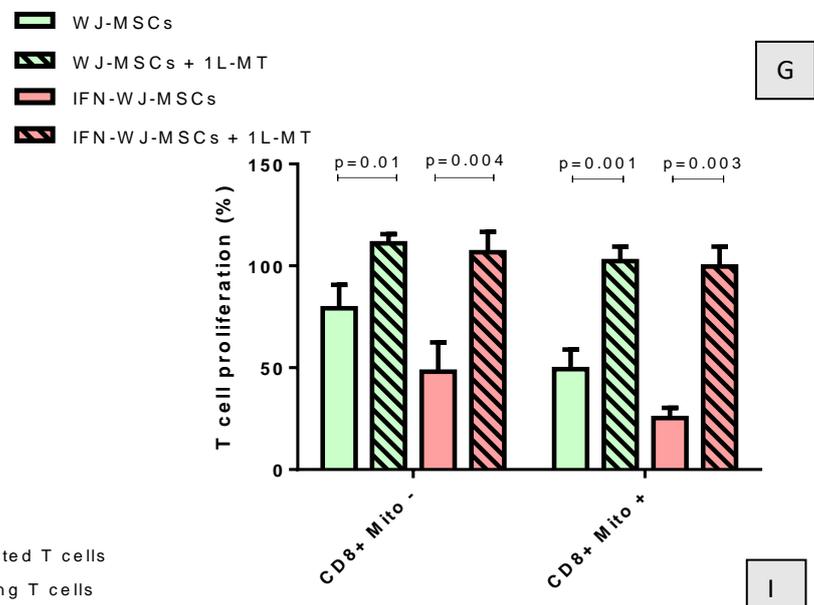
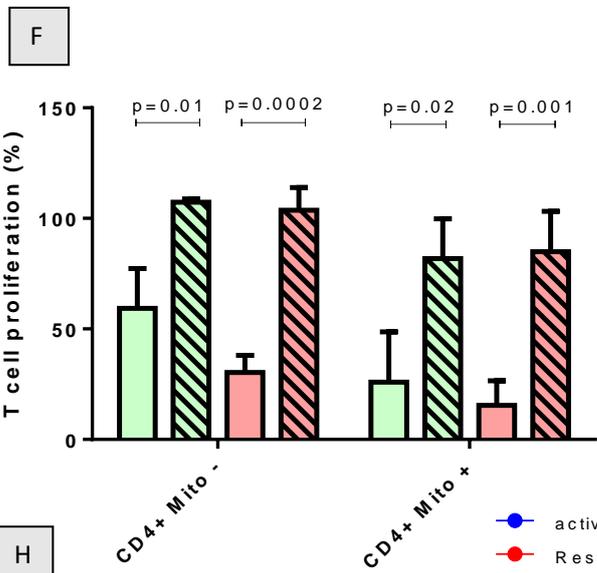
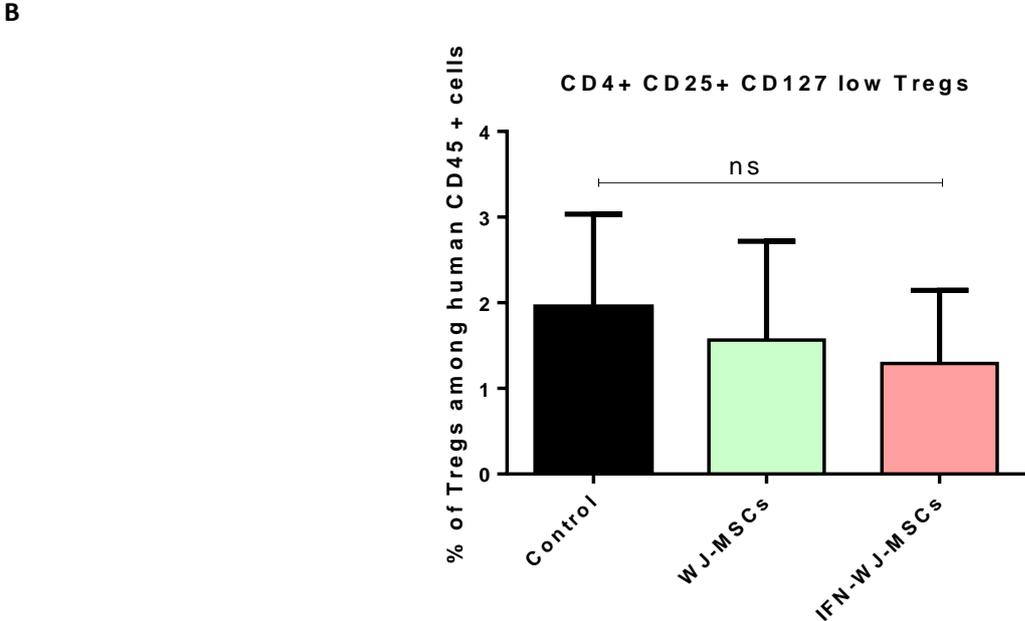
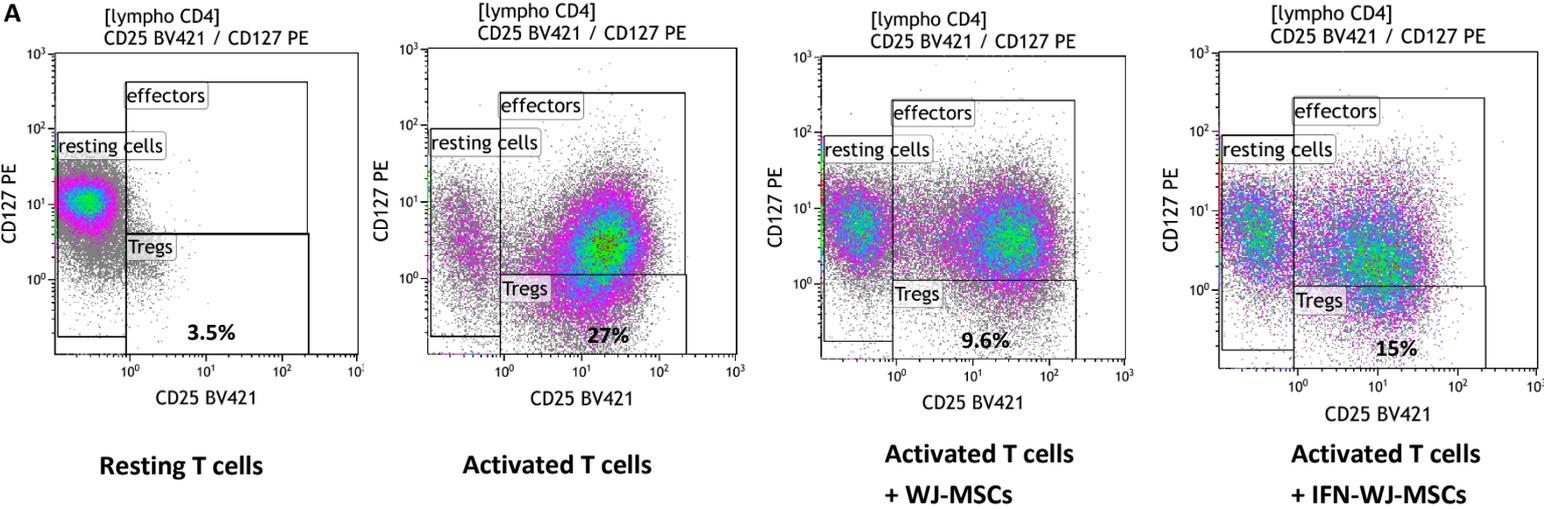


Figure 5





Supplementary Figure 1



Legends :

Fig1. IFN- γ pre-exposure increases the ability of WJ-MSCs to inhibit T cell proliferation and to heighten T cell apoptosis

A. Increased inhibition of CD3/CD28 activated CD3+ T cell proliferation after 5 days of co-culture with IFN-WJ-MSCs (red) versus WJ-MSCs (green) (median T cell inhibition= 60.5% (Interquartile range IQR 25.5-80.75) vs 12% (IQR 6.5-58), respectively, $n=10$ different cord sources, $p=0.002$, Wilcoxon test). **B.** Illustration of T cell proliferation assessed by the dilution of Celltrace after 5 days of stimulation by anti-CD3/CD28 mAbs alone (grey) or in the presence of IFN-WJ-MSCs (red) and WJ-MSCs (green). **C.** Cell surface phenotypes of WJ-MSCs and IFN-WJ-MSCs assessed by flow cytometry. Cells did not express lineage markers, CD34, CD45 and CD14 but homogenously expressed CD73, CD90 and CD105. Among molecules analyzed, IFN-WJ-MSCs (red) expressed higher median intensity fluorescence of CD40, HLA-DR, and VCAM-1 than WJ-MSCs (green, $n=10$). **D.** Inhibition of IFN- γ during the co-culture between IFN- γ -primed and unprimed WJ-MSCs and CD3/CD28 activated T cells partially abrogated the immune suppressive effects of WJ-MSCs (green), (median T cell proliferation without versus with anti-IFN- γ Mab = 37.27% (IQR 27.17-56.42) vs 65.36% (IQR 52.94-80.46), $p=0.048$) but inconstantly that of IFN-WJ-MSCs (red) (median T cell proliferation without versus with anti-IFN- γ Mab = 16.32% IQR (10.05-28.9) versus 62.13% (IQR 24.31-97.67), $p=0.09$) ($n=4$, Student tests). **E.** Comparison of T cell proliferation inhibition on activated CD4+ vs CD8+ T cell subtypes after co-cultures with WJ-MSCs (green) and IFN-WJ-MSCs (red). T cell proliferation inhibition was significantly superior on CD4+ T in comparison to CD8+ T cells in the presence of IFN-WJ-MSCs (mean inhibition of 41.88 +/- 18.23% versus 26.38 +/- 19.06%, respectively, $n=7$, $p=0.008$, paired Student test). **F.** Increased T cell apoptosis, analyzed by flow cytometry with Annexin V staining, after 2 days of CD3/CD28 activation in the presence of WJ-MSCs (green) and of IFN-WJ-MSCs (red) in comparison to activated T cells alone (white) (Median apoptosis rate=34.91% (IQR 18.97-63.12) and 66.73% (IQR 31.32-70.31) versus 28.83% (IQR 14.35-43.78), respectively, $n=6$, $p<0.05$ for each indicated comparison, paired Student test). **G.** Increased cell surface expression of Fas (CD95) on T cells analyzed by flow cytometry after 3 days of CD3/CD28 activation and co-culture with WJ-MSCs (green) or IFN-WJ-MSCs (red) in comparison to activated T cells alone (white) (median percentage of CD95+ T cells= 65.15% (IQR 64.23-78.9) and 60.77% (IQR 52.67-72.40) versus 32.36% (IQR 28.18-37.17), respectively, $*=p<0.0001$, ($n=3$, Student test). **H.** Absence of difference of PD1 expression measured by flow cytometry on T cell membrane after 5 days of CD3/CD28 activation and co-culture with WJ-MSCs (green) or IFN-WJ-MSCs (red) in comparison to activated T cells alone (median percentage of PD1 positive T cells = 35.22% (IQR 18.04-78.5) and 35.66% (IQR 10.3-74.5) versus 66.09% (IQR 33.17-93.5), respectively, $n=5$, $p=ns$, Student test).

Fig2. WJ-MSCs and IFN- γ primed WJ-MSCs inhibit T cell activation *in vitro* through IDO.

A. Comparison of expression of the indicated molecules analyzed by flow cytometry on the cell surface or intracellular staining (IDO) on WJ-MSCs (green) versus IFN-WJ-MSCs (red). The median intensity fluorescence of PDL-1 ($n=10$), PDL-2 ($n=6$) and IDO ($n=3$) expression was increased on IFN-WJ-MSCs. **B and C.** Comparison of the indicated cytokines' concentrations measured by single and multiplex Elisa in the supernatants on day 5 of culture of CD3/CD28 activated T cells alone (grey) or with WJ-MSCs (green) or IFN- γ -WJ-MSCs (red). In comparison to activated T cells alone, the presence of WJ-MSCs increased the concentrations of Galectin-9, Galectin-3, IDO and PGE-2 ($p<0,05$ for each, t-tests). In comparison to WJ-MSCs, concentrations of Galectin-9 and IDO were significantly increased with IFN-WJ-MSCs (galectin-9 median concentration=2.77 pg/ml (IQR 1.99-5.11) vs 7.64 pg/ml (IQR 5.15-10.52), respectively, $p=0.007$ and IDO median concentration= 8110 pg/ml (IQR 2550-32400) vs 25300 pg/ml (IQR 9783-47225), respectively, $p=0.04$). On the contrary, PGE2 concentration was higher with WJ-MSCs compared to IFN-WJ-MSCs (median concentration= 15754 pg/ml (IQR 7560-24653) vs 8553 pg/ml (IQR 5147-10271), respectively, $p=0.04$, t-tests). **D.** Absence of effect of Nivolumab (anti-PD1 mAb at 20 μ g/ml) when added to the co-culture of CD3/CD28 activated T cells and unprimed or IFN- γ -primed WJ-MSCs on T cell proliferation on day 5 ($n=6$, Student test). **E.** Absence of modulation of activated T cell proliferation with or without unprimed or IFN- γ -primed WJ-MSCs by the addition during the 5 days co-culture of an anti-Galectin 9 neutralizing monoclonal antibody (20 μ g/ml) ($n=3$, Student test). **E.** Addition of the IDO inhibitor 1L-MT at the beginning of co-cultures between CD3/CD28 activated T cells and unprimed or IFN- γ -primed WJ-MSCs fully abrogated the immunosuppressive effects of both WJ-MSCs and IFN-WJ-MSCs. In the presence of WJ-MSCs, median percentage of T cell proliferation was of 76.5% (IQR 56.6-83.6) without 1L-MT, versus 94.42% (IQR 87.4 -98.2) with 1L-MT at 1mM ($p=0.03$), and of 88.1% (IQR 80.7-97.5) with of 1L-MT at 0.5 mM ($p=ns$). In the presence of IFN-WJ-MSCs, median percentage of T cell proliferation was of 40.08% (IQR 28.4-66) without 1L-MT, versus 94.9% (IQR 90.7-96.6) with 1L-MT at 1mM ($p=0.0009$), and of 92.5% (IQR 91.1-92.6) with 1L-MT at 0.5 mM ($p=0.009$) ($n=6$ co-cultures with 5 different cord sources, Student test).

Fig 3. IFN- γ -primed WJ-MSCs exert a higher IDO activity

A-C. Concentrations of Tryptophan (A) and its metabolites Kynurenine (B) and Kynurenic acid (C) were measured in the supernatants on day 5 of culture of CD3/CD28 activated T cells alone (grey) or with WJ-MSCs (green) or IFN- γ -WJ-MSCs (red) in the presence or not of 1L-MT at 0.5 mM. **A.** In comparison to activated T cells alone, tryptophan concentration was reduced in the presence of WJ-MSCs and of IFN-WJ-MSCs (median concentration 22332 pmol/ml (IQR 15715-23924) versus 1174 pmol/ml (IQR 55.5-6993 and 58 pmol/ml (IQR 45-65.5), respectively, $p<0.0005$ for each comparison, $n=6$, Wilcoxon tests). Addition of 1L-MT at 0.5 mM partially restored tryptophan concentration (median concentration = 4294 pmol/ml (IQR 4256-

33411) with WJ-MSCs and 1L-MT, $p=0.09$ vs no 1L-MT; and 3058 pmol/ml (IQR 2259-11947) with IFN-WJ-MSCs and 1L-MT, $p=0.01$ vs no 1L-MT, Wilcoxon tests). **B.** Kynurenine concentrations were higher in co-cultures with both WJ-MSCs and IFN-WJ-MSCs (median concentration 13018 pmol/ml (IQR 9533-19512) and 20921 pmol/ml (IQR 15039-23101), respectively vs 549.4 pmol/ml (IQR 434.9-567.5) for activated T cells alone, $p<0.001$, for each, $n=6$, Wilcoxon tests). Addition of 1L-MT 0.5 mM increased kynurenine concentrations only in co-cultures with IFN-WJ-MSCs (median concentration 31929 pmol/ml (IQR 29404-34074), $p=0.0008$ vs without 1L-MT, $n=3$, Wilcoxon tests). **C.** Kynurenine acid concentrations were only increased in co-cultures with IFN-WJ-MSCs (median concentration 51.06 pmol/ml (IQR 48.64-62.29) vs 21.77 pmol/ml (IQR 20.45-23.78) for activated T cells alone, $p=0.0004$, $n=6$, Wilcoxon tests). Addition of 1L-MT 0.5 mM in culture medium did not change kynurenine concentrations in any culture conditions ($n=3$, Wilcoxon tests). **D.** IDO activity was evaluated by the ratio of tryptophan metabolites depending on IDO (kynurenine + kynurenic acid + 3OH-kynurenine + quinolinic acid + xanthurenic acid) on tryptophan metabolites that do not depend on IDO (tryptophan + 5OH-tryptophan + tryptamine + serotonin + tryptophol). IDO activity was superior in the supernatant of co-cultures with IFN-WJ-MSCs (median rate 60.8 (IQR 48.1-81.7), compared to WJ-MSCs (median rate 9.2 (IQR 1.7-50.2), $p=0.02$, $n=6$, Student test), and compared to activated T cells alone (median rate 0.03 (IQR 0.03-0.05), $p=0.002$). IDO activity was abrogated when 1L-MT was added to co cultures with IFN-WJ-MSCs (median rate 8.8 (IQR 2.6- 13.4) at 0.5mM, $p=0.007$ vs no 1L-MT, and 0.8 (IQR 0.6-1.2) at 1mM, $p=0.003$ vs no 1L-MT, $n=3$, Student test).

Fig 4. Repeated injections of IFN- γ - primed WJ-MSCs lead to a better survival of NSG mice transplanted with human PBMCs by reducing GVHD.

A. NSG mice were irradiated at 2 grays on day -1 and transplanted intravenously with 5×10^6 human PBMCs on day 0 alone (PBS group, blue curve, $n=19$) or associated with sequential administration of 5×10^5 WJ-MSCs (green curve, $n=15$) or of IFN-WJ-MSCs (red curve, $n=13$) on days 7, 14, and 21 post-transplantation. In comparison to the control PBS group, mice survival was improved in the IFN-WJ-MSC group (median OS= 56.5 days versus 23 days, respectively, $p=0.0025$, log-rank test), but not in the WJ-MSC group (median OS = 44 days, $p=0.2$, log-rank test). Survival of mice having received IFN-WJ-MSCs was improved in comparison to that of those having received unprimed WJ-MSCs (median OS= 56.5 days vs 44 days, $p=0.03$, log-rank test). **B.** Representative histological signs of skin GVHD on day 28 post-transplantation after HES staining. The arrow shows keratinocyte apoptosis. **C.** Representative histological signs of liver GVHD on day 28 post-transplantation after HES coloration (mononuclear cell infiltrates in the periportal space). **D.** Representative immunohistochemistry staining performed on GVHD liver lesions showing human CD3+ T cell infiltration in periportal area but rare B cells (CD20) and monocytes/macrophages (CD68 / CD163). **E.** Trend towards a reduction of the global GVHD score (skin + liver histological scores) between mice transplanted with human PBMCs alone (PBS control group, $n=3$) and those having received IFN-WJ-MSCs ($n=4$) (median GVHD score = 4 (IQR 2-5.5) versus 2 (IQR 1.25-2.37), respectively, ($p=0.08$, Wilcoxon test). **F.** Human CD4 and CD8 T cell chimerism was evaluated by flow cytometry between day 17 and 26 in the 3 transplanted groups. Human CD4 and CD8 T lymphocytes are represented as percentages of all viable targeted cells. Neither WJ-MSCs, nor IFN-WJ-MSCs impaired human T cell engraftment ($n=4$ mice in each group, $p=ns$, Student test).

Fig 5. Immunosuppressive effects of WJ-MSCs requires IDO, cell contact and mitochondrial transfer from MSCs to T cells and modifies T cell metabolism

A. The impact of cell-contact on the suppressive effects of WJ-MSCs (green) and IFN-WJ-MSCs (red) was analyzed using a transwell separating CD3/CD28 activated T cells from MSCs during the co-culture. The absence of cell-contact (transwell) completely abrogated the inhibition of T cell proliferation of WJ-MSCs (median T cell proliferation with contact = 57.5% (IQR 14-62.9) versus 95.7% (IQR 90.5-99) without contact, $p=0.0002$) and that of IFN-WJ-MSCs (median T cell proliferation 17.9% (IQR 14.4-79.2) with contact versus 87.1% (IQR 59.3-98.2) without contact, $p=0.017$) ($n=6$, Student test). **B.** Evaluation of IDO activity from metabolites measured in the culture supernatants on day 5 of co-cultures between CD3/CD28 activated T cells alone or with WJ-MSCs and IFN-WJ-MSCs, as defined in Fig 3D, was not impacted by the presence or absence of cell-contact ($n=4$, with 2 sources of MSCs, Student test). **C.** Mitochondrial transfer from WJ-MSCs and IFN-WJ-MSCs to activated CD4+ T cells was analyzed by flow cytometry using a mitotracker in co-cultures with or without transwells. Median percentage of transferred T cells (mito+) was 20.7% (IQR 19.9-23.7) after contact with WJ-MSCs and 39.7% (IQR 28-69.9) after contact with IFN-WJ-MSCs and was completely abrogated in the absence of cell-contact in both cases ($p<0.0001$ for WJ-MSCs, and $p=0.02$ for IFN-WJ-MSCs, t tests, $n=3$). **D.** Proliferation of CD3/CD28 Mito+ and Mito- T cells was evaluated after 5 days of culture with WJ-MSCs and IFN-WJ-MSCs. The proliferation of Mito+ CD4+ T Cells was lower than that of Mito- CD4+ T cells with both WJ-MSCs and IFN-WJ-MSCs (median proliferation of mito- CD4+ T cells= 68.5% (IQR 45.7-93.5) versus 33.9% (IQR 11.4-71.5) for mito+ CD4+ T cells, $p=0.02$ with WJ-MSCs and median proliferation of mito- CD4+ T cells= 32% (IQR 25-38.2) versus 11.2% (IQR 7.8-23.8) for mito+ CD4+ T cells, $p=0.009$, with IFN-WJ-MSCs) ($n=4$, paired t test). The proliferation of Mito+ CD8+ T cells was also lower than that of Mito- CD8+ T cells with WJ-MSCs (median proliferation of Mito- CD8+ T cells = 83% (IQR 66-88) versus 51% (IQR 39-58), $p=0.02$, and tent to be lower with IFN-WJ-MSCs (median proliferation of Mito- CD8+ T cells = 44% (IQR 36-64) versus 26% (IQR 20-30), $p=0.06$). **E.** Inhibition of IDO by 1L-MT did not significantly change the capacity of mitochondrial transfer from WJ-MSCs or IFN-WJ-MSCs to activated CD4+ and CD8+ T cells ($n=4$). The rate of mitochondrial transfer was higher in CD4+ T cells (from 19.9 to 39.7%) in comparison to the rate of transfer in CD8+ T cells (from 5 to 20%), $p<0.0001$. **F.**

G. IDO inhibition (by 1L-MT at 0.1 mM) restored the proliferation of activated mito+ and mito - T cells co-cultured with WJ-MSCs and IFN-WJ-MSCs for CD4+ T cells (**F**) (with WJ-MSCs: median mito - T cell proliferation= 60% (IQR 41-77) without 1L-MT vs 107% (IQR 106-109) with 1L-MT at 1mM, $p=0.01$, and median mito + T cell proliferation= 15.8% (IQR 10-52) without 1L-MT vs 85% (IQR 62.6-98) with 1L-MT, $p=0.02$; with IFN-WJ-MSCs: median mito - T cell proliferation= 32% (IQR 25-38.2) without 1L-MT vs 98% (IQR 83-111) with 1L-MT, $p=0.0002$ and median mito + T cell proliferation = 11.2% (IQR 7.8-23.8) without 1L-MT vs 74.4% (IQR 62.7-98.2) with 1L-MT, $p=0.001$) ($n=4$, Student test) as well as for CD8+ T cells (**G**) (for WJ-MSCs: median mito - T cell proliferation= 83% (IQR 66.3-88.2) without 1L-MT vs 110% (IQR 107-116) with 1L-MT, $p=0.01$ and median mito + T cell proliferation = 51% (IQR 39-58) without 1L-MT vs 101% (IQR 96-110) with 1L-MT, $p=0.001$; for IFN-WJ-MSCs: median mito - T cell proliferation= 44% (IQR 36.2-.64) without 1L-MT vs 108% (IQR 96-116) with 1L-MT, $p=0.004$ and median mito + T cell proliferation = 26% (IQR 20-30) without 1L-MT vs 102% (IQR 89-108) with 1L-MT, $p=0.003$ ($n=3$, Student test). **H.** T cell metabolism was analyzed by Seahorse in the different culture conditions: resting and CD3/CD28 activated T cells with or without WJ-MSCs with or without transwell and/or 1L-MT). OCR curves are shown for all conditions mentioned. T cells that were in contact with WJ-MSCs displayed the highest ATP production rate, and the highest maximal respiration capacity. Activated T cells alone had the lowest OCR rate. In the absence of cell contact between WJ-MSCs and T cells, T cells had a lower OCR rate, a lower ATP production and a lower maximal respiratory capacity compared to T cells in contact with WJ-MSCs. However, OCR remained higher than T cells alone. Addition of 1L-MT led to the same metabolic curve as transwell. **I.** Shows ECAR curves for all conditions mentioned. **J.** Analysis of OCR/ECAR ratio in the different conditions mentioned above. Activated T cells had a mainly aerobic glycolytic metabolism (median OCR/ECAR ratio of 0.27 (IQR 0.19-0.44), by contrast with activated T cells in contact with WJ-MSCs mainly used oxidative phosphorylation (median OCR/ECAR ratio of 2.82 (IQR 1.39-5.4), $p<0.0001$). Both inhibitions of IDO by 1L-MT and of cell-contact (transwell) partially restored the glycolytic capacity of T cells (median OCR/ECAR ratio= 0.87 (IQR 0.76-0.95), $p=0.001$ with 1L-MT and = 1.02 (IQR 0.39-2.31), $p=0.01$, with transwell). Concomitant inhibition of IDO and cell-contact (1L-MT and transwell) almost completely restored T cell glycolytic capacity (median OCR/ECAR ratio of 0.72 (IQR 0.27-1.38), $p=0.01$) ($n=1$ source of WJ-MSCs, Mann-Whitney test).

Supplementary Figure 1: WJ-MSCs and IFN-WJ-MSCs did not increase Tregs *in vitro* and *in vivo*

A. Phenotyping of resting T cells and of CD3/CD28 activated T cells co-cultured for 5 days with or without WJ-MSCs or IFN-WJ-MSCs by flow cytometry. Proportions of cells with the phenotype of Tregs (CD4+CD25 high CD127low) is not increased on activated T cells in the presence of WJ-MSCs or IFN-WJ-MSCs. **B.** Similar *in vivo* detection of human CD45+ CD4+ CD25+ CD127low Tregs in the blood of NSG mice transplanted with human PBMCs with or without sequential administration of WJ-MSCs or IFN-WJ-MSCs ((median proportion of Tregs = 2.49% [IQR 0.81-2.82]) vs 1.13% [IQR 0.64-2.92]) and 1.2% [IQR 0.53-2.13], respectively, ns; $n=5$ mice, Mann-Whitney test).

Résumé

Les Cellules Souches Mésoenchymateuses de gelée de Wharton (CSM-GW) sont des cellules stromales pluripotentes issues de cordons ombilicaux. Dans notre étude, les CSM-GW produites à grade clinique au CHRU de Nancy ont un potentiel anti-prolifératif d'intensité variable selon le cordon source sur les lymphocytes T (LT). La pré-incubation des CSM-GW par IFN- γ (CSM-GW-IFN) pendant 48h augmente leur potentiel anti-prolifératif *in vitro*. Nous montrons que cet effet est lié à l'augmentation de l'activité de l'indoleamine2,3-dioxygénase (IDO) des CSM-GW-IFN. Nous avons également observé que, indépendamment de l'activation par IFN et d'IDO, les CSM-GW sont capables de transférer du matériel mitochondrial vers les LT activés. Ce transfert est contact dépendant, tout comme l'action immunosuppressive des CSM-GW. Après transfert mitochondrial, les LT activés ayant reçu des mitochondries prolifèrent significativement moins que ceux n'ayant pas reçu de mitochondries. L'inhibition d'IDO restaure la capacité proliférative des LT, qu'ils aient ou non reçu des mitochondries. L'analyse des voies métaboliques des LT activés en présence de CSM-GW, a révélé une modulation du métabolisme des LT caractérisée par une diminution de la glycolyse aérobie et une augmentation de la phosphorylation oxydative, phénomène reversé partiellement par l'inhibition d'IDO, et par l'ajout d'un transwell. Nous avons enfin montré dans un modèle murin de maladie du greffon contre l'hôte (GVH), que 3 injections de CSM-GW-IFN séquentielles (J7, J14 et J21 post-greffe) permettaient de réduire les signes cliniques et histologiques de GVH et d'augmenter la survie des souris. Cet effet protecteur vis-à-vis de la GVH n'était pas lié à une prolifération moindre des lymphocytes T dans le sang, ni à l'induction de T régulateurs. Les études de « homing » des CSM-GW ont permis de les détecter dans les poumons et à moindre taux dans la peau 24H après l'administration puis elles deviennent indétectables. Leur contact avec les lymphocytes T est néanmoins transitoirement possible dans ces organes après chaque administration. Au total, nos résultats suggèrent que les CSM-GW-IFN inhibent l'activation des LT *via* des mécanismes complémentaires impliquant la production d'IDO et le transfert de mitochondries qui vont moduler le métabolisme des LT activés. Les résultats de l'étude préclinique nous ont conduit au développement d'une étude clinique de phase I d'injections de CSM-GW en prévention de la GVH chez l'homme.

Mots-Clefs : CSM, gelée de Wharton, grade clinique, IDO, transfert de mitochondries, IFN- γ , GVH

Abstract

Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSC) are pluripotent stromal cells derived from umbilical cords. In our study, WJ-MSCs produced at clinical grade at the University Hospital of Nancy have an anti-proliferative potential of variable intensity on T lymphocytes (LTs). Pre-incubation of WJ-MSCs with IFN- γ (WJ-MSC-IFN) for 48 h increases their anti-proliferative potential *in vitro*. We showed that this effect was related to an increase in indoleamine2,3-dioxygenase (IDO) activity by WJ-MSCs. We also observed that independently of IFN activation and of IDO, WJ-MSCs can transfer mitochondrial material to activated LTs. This transfer is contact-dependent, as is the immunosuppressive action of WJ-MSCs. After mitochondrial transfer, activated T cells having received mitochondria proliferate significantly less than those that had not received mitochondria. IDO inhibition restores the proliferative capacity of LTs, whether or not they have received mitochondria. The analysis of the metabolic pathways of LTs in the presence of WJ-MSCs revealed a modulation of T cell metabolism characterized by a decrease in aerobic glycolysis and an increase in oxidative phosphorylation, a phenomenon reversed by IDO inhibition. Finally, we have shown in a mouse model of graft versus host disease (GVHD), that 3 sequential injections of WJ-MSC-IFN (at D7, D14 and D21 post-transplantation) allow to reduce the clinical and histological signs of GVHD and increase mouse survival. This protective effect against GVHD was not related to a lower proliferation of LTs, nor to the induction of regulatory T cells. The "homing" studies of WJ-MSCs have shown their presence in the lung and at a lower rate in the skin 24 hours after administration, then they become undetectable. Their contact with LTs is nevertheless transiently possible in these organs after each administration. Altogether, our results suggest that WJ-MSC-IFN inhibit LT activation via complementary mechanisms involving IDO production and mitochondrial transfer modulating T cell metabolism. The results of the preclinical study led us to develop of a phase I clinical trial of several administrations of WJ-MSC for the prevention of GvHD.

Key-Words : MSC, Wharton's Jelly, clinical grade, IDO, mitochondrial transfer, IFN- γ , GVHD