

Université de Franche Comté – UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BOURGOGNE- FRANCHE COMTE

Ecole Doctorale Environnements – Santé

L'INTERLEUKINE-22 DANS LA MALADIE DU GREFFON CONTRE L'HÔTE APRES
ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏTIQUES

THESE

Présentée et soutenue publiquement par

Baptiste LAMARTHEE

Le 28 octobre 2014

En vue du grade de **Docteur de l'Université de Bourgogne**
Franche-Comté

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Directrice de thèse : Dr Béatrice GAUGLER

Jury :

Pr José COHEN	Rapporteur
Dr Harry SOKOL	Rapporteur
Pr Jean Christophe RENAULD	Examinateur
Pr Philippe SAAS	Examinateur
Pr Ibrahim YAKOUB-AGHA	Examinateur
Dr Béatrice GAUGLER	Examinateur

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	3
LISTE DES FIGURES	4
INTRODUCTION	5
A. L'ALLOGREFFE DE CELLULE SOUCHES HEMATOPOÏTIQUES	6
B. LA MALADIE DU GREFFON CONTRE L'HOTE (GVHD)	8
1) <i>La GVHD aiguë (GVHDA)</i>	10
2) <i>La GVHD chronique (GVHDc)</i>	11
C. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA GVHDA.....	12
1) <i>Initiation de la GVHDA</i>	13
a) Impact du conditionnement prégreffe.....	13
b) Rôles des signaux « danger ».....	13
2) <i>Induction de la GVHDA</i>	15
a) Les récepteurs de l'immunité innée	15
Rôle des Toll-like receptors dans le développement de la GVHDA.....	15
Rôle des NOD-like receptors dans le développement de la GVHDA	16
b) Activation des cellules de l'immunité innée.....	16
c) Activation et différenciation des lymphocytes T	17
Voie Th1: Tbet, STAT1, IFN- γ , TNF- α	19
Voie Th2: STAT6, GATA-3, IL-4, IL-13.....	20
Voie Th17: ROR γ t, STAT3, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23.....	20
Nouvelles sous-populations: Th9, Th22, Tfh, Th17.1.....	21
Complexité de la réponse allogénique T au cours de la GVHDA	23
3) <i>Migration des cellules effectrices et lésions tissulaires</i>	24
4) <i>Régulation de la réponse allogénique</i>	27
D. L'INTERLEUKINE 22, UNE CYTOKINE AUX EFFETS CONTRASTES	28
1) <i>Caractéristiques biochimiques</i>	28
2) <i>Sources cellulaires</i>	29
a) Les lymphocytes T $\alpha\beta$	29
b) Les lymphocytes T $\gamma\delta$	31
c) Les cellules lymphoïdes de l'immunité innée (ILC).....	31
3) <i>Cellules cibles</i>	35
4) <i>Inhibiteur naturel: l'IL-22 Binding Protein</i>	36
5) <i>Fonctions biologiques: entre réparation et inflammation</i>	37
a) Rôle protecteur.....	37
b) Rôle inflammatoire	39
OBJECTIFS DE LA THESE.....	42
RESULTATS	43
ARTICLE 1: IMPLICATION DE L'IL-22 ISSUE DU GREFFON DANS LA GVHDA.....	44
ARTICLE 2 : LA SYNERGIE ENTRE L'IL-22 ET LES INTERFERONS DE TYPE I AMPLIFIE L'INFLAMMATION INTESTINALE DE TYPE TH1 ASSOCIEE A LA GVHDA	56
1) <i>Synergie entre IL-22 et IL-17A</i>	56
2) <i>Synergie entre l'IL-22 et les IFN de type I</i>	57
ARTICLE 3 : L'ABSENCE D'IL-22 ISSUE DU GREFFON INFLUENCE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL AU COURS DE LA GVHDA (EN PREPARATION)	100
DISCUSSION	114
A. L'IL-22 DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE DU GREFFON CONTRE L'HOTE : AMPLIFICATION DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE AU DETRIMENT DE LA PROTECTION TISSULAIRE	117
1) <i>Implication de la synergie IL-22/IFN de type I dans la GVHD</i>	118
2) <i>Implication de la voie Jak/STAT1 dans la GVHD</i>	121

3) <i>L'IL-22 constitue-t-elle une cible thérapeutique?.....</i>	124
4) <i>Rôle de l'IL-22 dans la GVHD : quelle influence au niveau intestinal?.....</i>	125
a) Impact du conditionnement prégreffe	125
b) Impact de la flore microbienne dans le contexte d'allo-CSH	126
c) Vers une manipulation thérapeutique du microbiote ?	130
B. CONCLUSION GENERALE	131
BIBLIOGRAPHIE	132
ANNEXES	153
ARTICLE 1: HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR VALPROIC ACID AFFECTS PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS PHENOTYPE AND FUNCTION	
.....	153
ARTICLE 2: [INTERLEUKIN-22: ITS ROLE IN GRAFT-VERSUS-HOST-DISEASE UNRAVELED].....	153

Liste des abréviations

ADN:	Acide désoxyribonucléique	Jak:	Janus kinase
AHR:	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>	JNK:	c-Jun n-terminal kinases
Allo-CSH:	Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	LPS:	Lipopolysaccharide
AraC:	Cytarabine	LT:	Lymphocyte T
ARNm:	Acide ribonucléique messager	LTi:	<i>Lymphoid tissue inducer cell</i>
ATG:	Anti-thymoglobulines	MAPK:	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
ATP:	Adénosine triphosphate	MDR:	<i>Multi drug resistance</i>
BU:	Busulfan	MMP:	<i>Matrix metalloproteinase</i>
PDC:	Cellule dendritique plasmocytoïde	NF-kB:	<i>Nuclear factor kB</i>
CD:	<i>Cluster of differentiation</i>	NK:	<i>Natural killer</i>
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité	NKp46:	<i>Natural killer cell p46-related protein</i>
CPA:	Cellule présentatrice d'antigène	NLR:	<i>NOD like receptor</i>
CXCR:	<i>CXC chemokine receptor</i>	NOD:	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain protein</i>
CY:	Cyclophosphamide	PAMPs:	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
DAMPs:	<i>Damage associated molecular patterns</i>	PRR:	<i>Pattern recognition receptor</i>
DC:	<i>Dendritic cell</i>	PSA:	Polysaccharide A
Erk:	<i>Extracellular signal-regulated protein kinases</i>	Rag:	<i>Recombination activating gene</i>
Fas/FasL:	récepteur Fas/ ligand Fas	RANKL:	<i>Receptor activator of NF-kB ligand</i>
FLU:	Fludarabine	Reg3:	<i>Regenerating islet-derived protein</i>
Foxp3:	<i>Forkhead box p3</i>	ROR:	<i>Related orphan receptor</i>
GATA-3:	<i>GATA binding protein 3</i>	RUNX:	<i>Runt-related transcription factor</i>
G-CSF:	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>	SCFA:	<i>Short-chain fatty acid</i>
GVHD:	<i>Graft-versus-host disease</i>	SOCS:	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
GVL:	<i>Graft-versus-leukemia</i>	STAT:	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
GVT:	<i>Graft-versus-tumor</i>	Tbet:	<i>T-box expressed in T cells</i>
HLA:	<i>Human leucocyte antigen</i>	TBI:	<i>Total body irradiation</i>
HMGB:	<i>High mobility group box</i>	TCR:	<i>T cell receptor</i>
ICOS:	<i>Inducible costimulator</i>	TGF-β:	<i>Tumor growth factor-β</i>
IDO:	Indoléamine 2, 3 dioxygénase	Th:	<i>Lymphocyte T auxiliaire (helper)</i>
IFN:	Interféron	TLR:	<i>Toll like receptor</i>
IFNAR:	<i>IFN-α receptor</i>	TNFR:	<i>TNF receptor</i>
IL:	Interleukine	TNF-α:	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
ILC:	Innate lymphoid cell	Treg:	<i>Lymphocyte T régulateurs</i>
IRF:	<i>Interferon regulatory factor</i>	Tyk:	Tyrosine kinase

Liste des figures

Figure 1 : Les trois phases de la physiopathologie de la GVHDa.

Figure 2 : Relation entre l'intensité du conditionnement utilisé lors de l'allo-CSH et les atteintes tissulaires engendrées (toxicité)

Figure 3 : Les cellules présentatrices d'antigène peuvent influencer le développement de la GVHD à différents niveaux

Figure 4 : Principales voies de différenciation des lymphocytes CD4+

Figure 5 : Principaux constituants du système des chimiokines et leurs récepteurs

Figure 6 : Représentation de l'IL-22 déterminée par cristallographie

Figure 7 : Revue des lymphocytes T producteurs d'IL-22 chez l'homme

Figure 8 : Revue des lymphocytes T producteurs d'IL-22 dans la souris

Figure 9 : Revue des cellules innées lymphoïdes décrites dans la souris

Figure 10 : Revue du phénotype des cellules innées lymphoïdes ainsi que leur localisation chez l'homme

Figure 11: Le récepteur à l'IL-22

Figure 12: Hypothèse de la synergie IL-22/IFN de type I

Données supplémentaires :

Figure 1: Transplantation with WT T cells or IL-22^{-/-} T cells reduces microbial diversity in small intestine

Figure 2: Absence of graft-derived IL-22 is associated with an increased abundance of Lactobacillus after BMT

Figure 3: Antibiotic treatment amplifies the correlation of absence of graft-derived IL-22 and less severe GVHD

Figure 13: Hypothèse de l'effet pathogène de l'IL-22 dans la GVHD intestinale

Figure 14: Différents niveaux d'implication de la voie STAT1 dans l'inflammation intestinale

Introduction

A. L’allogreffe de cellule souches hématopoïétiques

La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH) a acquis une place essentielle en thérapeutique hémato-oncologique. Elle permet de guérir certaines hémopathies malignes ou des maladies non malignes de la moelle osseuse ou du système immunitaire, en remplaçant une moelle osseuse défaillante par des cellules viables et fonctionnelles. L’allo-CSH a considérablement amélioré le pronostic des leucémies aiguës, lymphoïdes et myéloïdes, qui représentent actuellement environ 50% des indications. Les autres indications sont les hémopathies lymphoïdes et myéloïdes chroniques, mais aussi les aplasies médullaires, les hémoglobinopathies sévères et les déficits immunitaires combinés sévères. Près de 20000 allo-CSH sont réalisées chaque année dans le monde.

Les greffons de CSH allogéniques peuvent avoir trois origines : la moelle osseuse, les cellules souches périphériques et le sang placentaire. La moelle osseuse, première technique historiquement décrite, est prélevée par ponction directe au niveau de la crête iliaque. Elle requiert néanmoins une anesthésie générale du donneur. Par la suite, d’autres modes de prélèvement de CSH ont été développés. Ainsi l’injection de G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) permet la mobilisation dans le sang périphérique des CSH, qui sont ensuite recueillies par aphérèse. Son avantage principal est le prélèvement d’un nombre de CSH plus important que lors d’un prélèvement médullaire, induisant une reconstitution hématopoïétique plus rapide. Enfin, les CSH contenues dans le sang placentaire présentent un grand potentiel de régénération et une faible immunoréactivité, permettant de réduire les risques liés à l’incompatibilité entre donneur et receveur. Cependant la quantité restreinte de CSH contenues dans le sang placentaire amène à l’utilisation de deux unités de sang placentaire de donneurs différents pour un receveur adulte (Barker et al., 2005).

L’allo-CSH implique la réalisation, chez le receveur, d’un conditionnement comportant une chimiothérapie associée ou non à une radiothérapie et ayant pour but :

- de libérer des niches hématopoïétiques pour l’implantation du greffon
- de détruire le système immunitaire du receveur afin de prévenir le rejet
- de détruire la maladie résiduelle en cas de greffe pour hémopathies malignes

De façon simplifiée, il existe deux types de conditionnement : myéloablatif et non-myéloablatif. Historiquement, des doses ablatives de chimiothérapie et une irradiation corporelle totale étaient considérées comme nécessaires pour éradiquer les cellules tumorales et induire une immunosuppression permettant la prise de greffe du donneur. Ces conditionnements myéloablatsifs sont encore utilisés pour un très grand nombre de patients,

Introduction

et particulièrement pour ceux atteints de maladies malignes agressives qui requièrent un effet anti-tumoral puissant. Cependant et malgré le succès de ce traitement sur la survie à long terme des patients, son usage est restreint à des patients de moins de 50 ans en raison de sa toxicité. De plus, les fortes doses de chimiothérapie employées sont associées à une aplasie profonde et prolongée et à un risque infectieux majeur. Les conditionnements non myéloablatifs ont été développés plus récemment afin de diminuer l'intensité du conditionnement, réduisant ainsi la toxicité et la durée de la phase d'aplasie.

Après conditionnement, les CSH sont administrées par voie intraveineuse puis migrent spontanément dans la moelle du receveur. Dans les années 2000, des études ont proposé l'injection des CSH directement dans l'os pour améliorer la prise de greffe (Castello et al., 2004; Kushida et al., 2001). Cette approche a été utilisée dans la greffe de sang placentaire, entraînant une reconstitution hématopoïétique plus rapide malgré le nombre restreint de CSH (Frassoni et al., 2008; Frassoni et al., 2010).

A la différence de la transplantation d'organe solide – cœur, poumons, foie, reins, – l'allo-CSH n'est pas uniquement une médecine de remplacement d'un organe ou tissu défaillant mais constitue une véritable immunothérapie. En effet, l'efficacité de l'allo-CSH dans de nombreuses maladies malignes est due à la réponse « Graft-versus-leukemia » (GVL) ou « Graft-versus-tumor » (GVT), effet dû aux lymphocytes T (LT) du donneur qui reconnaissent et détruisent les cellules malignes résiduelles du receveur. Au moins trois arguments attestent de l'existence de l'effet GVL après allo-CSH. Tout d'abord, l'obtention de rémissions partielle ou complète chez les patients ayant reçu un conditionnement pré-greffé non-myéloablatif. Ce traitement a très peu d'effet antitumoral direct et ne peut expliquer à lui seul la disparition des cellules malignes chez le receveur. Ensuite, chez des patients qui présentent une rechute alors qu'ils étaient en rémission complète après allo-CSH, une transfusion de lymphocytes issus du donneur ou « donor lymphocytes infusion » permet d'éliminer les cellules leucémiques. Enfin, des rémissions complètes de la maladie maligne ont été occasionnellement rapportées chez des patients chez qui les leucémies persistaient post-transplantation, et qui ne recevaient plus de chimiothérapie.

B. La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)

Dans les années 1950, les premières tentatives de greffe de CSH entre individus génétiquement différents sont entreprises. Dans la souris, l'équipe de D.W. Barnes observe que les receveurs d'allo-CSH présentent un syndrome appelé « maladie secondaire » associant cachexie, splénomégalie et diarrhée, et désormais connu sous le nom de « maladie du greffon contre l'hôte » (Graft-versus-host-disease, GVHD). Leurs expériences décrivent également pour la première fois la relation étroite entre la GVHD et l'effet GVL (Barnes et al., 1956; Barnes and Loutit, 1957).

Dix ans après ces travaux, Billingham définit la GVHD comme un processus au cours duquel les cellules immunocompétentes du donneur reconnaissent et attaquent les tissus de l'hôte. Il énumère ainsi les conditions nécessaires au développement de la GVHD (Billingham, 1966) :

- **Le receveur doit être incapable de rejeter le greffon.** En effet, la présence de cellules immunocompétentes du receveur entraînerait la destruction des cellules du donneur et donc le rejet de greffe. Il doit donc recevoir un traitement immunosuppresseur.
- **Le receveur doit posséder des antigènes étrangers au donneur.** L'incidence de la GVHD est directement liée au degré d'incompatibilité entre donneur et receveur, en particulier au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) appelé, chez l'homme, molécules HLA (*Human Leukocyte Antigen*). Ainsi, l'incidence varie de 35 à 45 %, en cas de très bonne compatibilité HLA (donneur familial), à 60-80 %, en cas de donneur avec un seul antigène non compatible. La disparité des antigènes mineurs d'histocompatibilité entre donneur et receveur est également un facteur de risque important pour la survenue de la GVHD.
- **Le greffon doit contenir des cellules compétentes sur le plan immunologique.** Les LT matures sont les principales cellules immunocompétentes du greffon responsables de la GVHD. Ainsi, après allo-CSH, la sévérité de la GVHD est directement corrélée au nombre de LT transfusés (Kernan et al., 1986). Le traitement immunosuppresseur est donc également administré pour prévenir l'apparition de la GVHD. En général, il comporte une association de méthotrexate (antimétabolite) et de ciclosporine (anticalcineurine).

Introduction

La GVHD présente une physiopathologie complexe qui résulte de la reconnaissance d'antigènes d'histocompatibilité propres au receveur par les LT du donneur, suivie de la destruction par ces LT activés des tissus sains du receveur (Blazar and Murphy, 2005).

Afin de mieux caractériser les réponses mises en jeu lors de l'allo-CSH, des modèles animaux expérimentaux ont été développés. Les modèles murins de GVHD sont des modèles d'incompatibilité portant soit sur le CMH, soit sur les antigènes mineurs. La GVHD, qui se développe en réponse à la disparité de CMH (classe I ou II), est dépendante des LT CD4+ auxiliaires (Th) capables d'activer les LT CD8+ qui amplifient davantage l'atteinte tissulaire. Il existe également certains modèles de GVHD induite par les LT CD8+ dépendants seulement de la machinerie cytolytique. Enfin, les modèles de GVHD portant sur les antigènes mineurs peuvent être liés soit aux LT CD8+ seuls soit aux LT CD4+ seuls, soit une combinaison des deux.

Chez l'homme, il est important de rappeler que la majorité des allo-CSH sont réalisées entre un patient et un donneur sain, compatibles au niveau HLA, mais présentant des différences au niveau des antigènes mineurs ; c'est une des raisons de l'absence de modèle murin unique et idéal capable de mimer le déroulement de l'allo-CSH humaine (Reddy and Ferrara, 2008).

La GVHD reste une complication sévère de l'allo-CSH chez l'homme. Elle est responsable d'une mortalité de 10% à 50% et d'une morbidité considérable. Du point de vue clinique, la GVHD peut se manifester sous deux formes différentes. Par convention, la forme aiguë survient dans les 100 premiers jours suivant la transplantation alors que les signes de GVHD chronique apparaissent après ce délai (Anasetti et al., 1990; Sullivan et al., 1991; Sullivan et al., 1992). Différents processus pathologiques sont impliqués dans les deux formes : la GVHD aiguë reflète un mécanisme inflammatoire exacerbé alors que la forme chronique est caractérisée par des mécanismes auto-immuns et induisant de la fibrose.

Introduction

1) La GVHD aiguë (GVHDA)

Elle s'observe entre deux et quatre semaines après la greffe. Il s'agit d'une réaction immunologique provoquée par les cellules du donneur et dirigée principalement contre les tissus du receveur : la peau, le tractus gastro-intestinal et le foie (Vogelsang et al., 2003). Dans une étude détaillée, le groupe de C. Anasetti montre que 81% des patients développent des signes cliniques cutanés, 54% présentent des manifestations au niveau intestinal et le foie est atteint dans 50% des cas (Anasetti et al., 1990). Les poumons sont également la cible de la maladie (Cooke et al., 2000).

Le diagnostic de la GVHDA est clinique mais sa confirmation nécessite une biopsie cutanée ou hépatique. La peau est souvent le premier organe atteint, manifestation coïncidant avec la prise des cellules du donneur. La maladie se caractérise au niveau cutané par un érythème maculopapuleux et un prurit qui peuvent se répartir sur tout le corps. L'atteinte digestive se manifeste par une diarrhée subaiguë, d'intensité variable, associée ou non à des douleurs abdominales (Ferrara and Deeg, 1991). L'atteinte hépatique, plus tardive, est caractérisée par des degrés variables de cytolysse et de cholestase. Lorsqu'elle est réalisée, la biopsie montre des foyers de nécrose éosinophile, une destruction des canaux biliaires, une hypertrophie des cellules de Kupffer et des infiltrats lymphocytaires péribiliaires.

La GVHDA est classée en plusieurs grades (de 0 à IV), dépendant du nombre d'organes affectés et de l'étendue de l'atteinte. Le pronostic des patients présentant une GVHD de grade III/IV est sombre. Généralement, le traitement consiste à optimiser l'immunosuppression et à ajouter de la méthylprednisolone. Environ 50% des malades répondent favorablement à ce traitement. Si la GVHD continue à progresser au-delà de quelques jours, une thérapie immunsuppressive de seconde ligne, pour laquelle il n'y a pas de standard défini, est mise en place. La prise en charge inclut par ailleurs le traitement des infections en cas de GVHD cutanée, et une nutrition adaptée en cas de GVHD gastro-intestinale.

2) La GVHD chronique (GVHDc)

Elle survient plus de 100 jours après la greffe et est souvent mais pas systématiquement précédée d'une GVHDA. Comme pour la forme aiguë, elle touche :

- La peau et les ongles et les muqueuses : zones d'hypo- ou hyperpigmentation, sclérose, lichen plan, érythème
- Les yeux et la bouche : syndrome sec
- Le tube digestif : perte d'appétit
- Le foie : ictere ou, à un moindre degré, une anomalie des tests hépatiques.

Elle peut se manifester par des phénomènes auto-immuns, avec présence d'auto-anticorps, un tableau de sclérodermie ainsi que sous forme d'une bronchiolite oblitérante caractérisée par une atteinte inflammatoire et fibrosante de la paroi des bronchioles.

Les formes limitées de la GVHDc nécessitent un traitement local, ce qui permet de diminuer l'immunosuppression et le risque de complications infectieuses. Là encore, dans les formes diffuses, le traitement de première ligne repose sur une corticothérapie, éventuellement associée à la prise de ciclosporine. En cas de GVHDc cortico-résistante, il n'existe pas de consensus formel à l'heure actuelle.

La recherche actuelle vise à identifier les mécanismes immunologiques responsables des effets GVHD et GVL pour parvenir à potentialiser l'effet GVL tout en minimisant l'effet GVHD.

C. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA GVHDa

Les travaux de J.L. Ferrara et d'autres équipes effectués dans des modèles expérimentaux ont permis de schématiser le développement de la GVHD aiguë en trois phases (Blazar and Murphy, 2005; Socie and Blazar, 2009) (voir **Figure 1**).

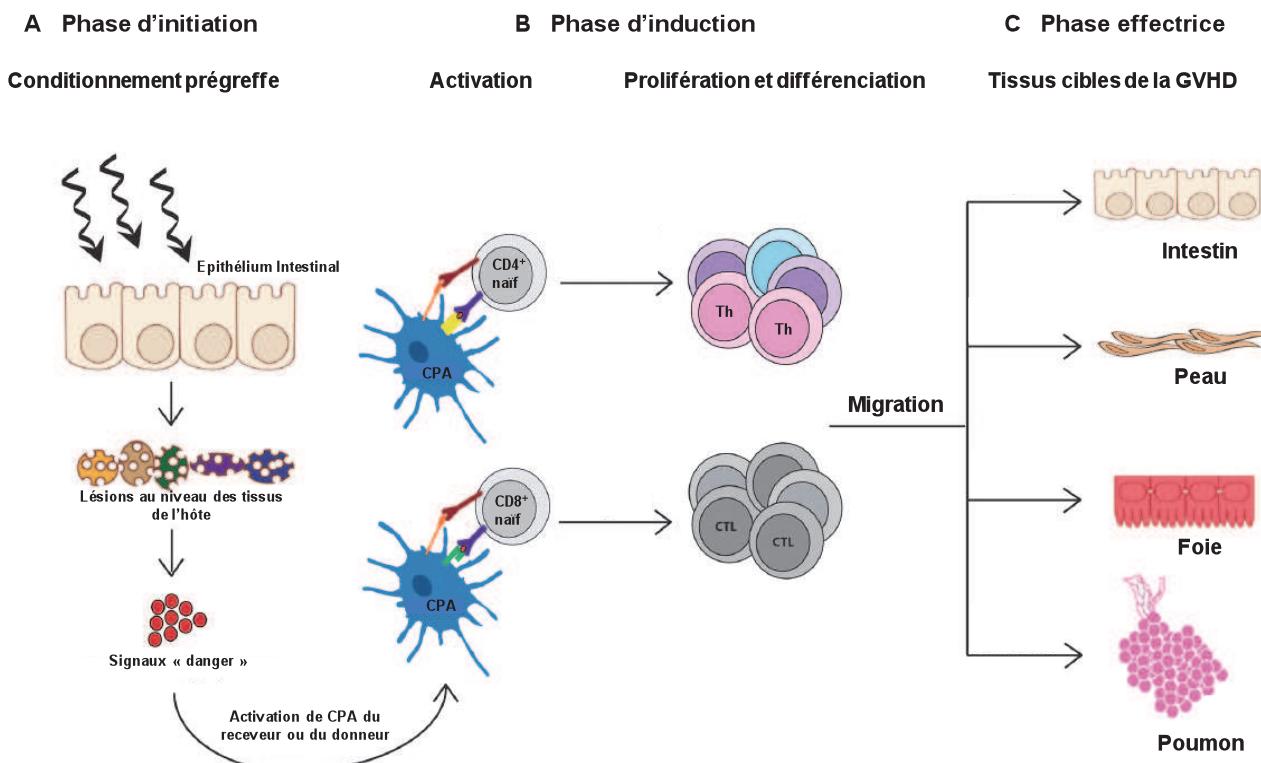


Figure 1: Les trois phases de la physiopathologie de la GVHDa. A. La phase d'initiation débute par le conditionnement prégreffe (irradiation corporelle totale et/ou chimiothérapie) qui engendre des lésions au niveau des tissus de l'hôte, notamment intestinaux. Le relargage de signaux « danger » provoque la surexpression des molécules du CMH et des molécules d'adhésion qui accroît la présentation d'alloantigènes par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) aux LT CD4+ et CD8+ du donneur. B. La phase d'induction implique la liaison du récepteur des LT (T Cell Receptor TCR) et la costimulation qui mènent à l'activation des LT et à leur prolifération. Lorsque les LT alloréactifs prolifèrent, ils se différencient en plusieurs sous populations. Ce processus est dû aux cytokines présentes dans le milieu environnant. Les LT activés sont capables de sécréter à leur tour des cytokines inflammatoires, d'exprimer des récepteurs aux chimiokines et de migrer dans les organes cibles de la GVHDa. La production de chimiokines dans les tissus lésés provoque le recrutement d'autres types cellulaires (cellules « Natural Killer » NK, polynucléaires neutrophiles, monocytes) contribuant à la GVHD. C. La phase effectrice est caractérisée par la destruction des tissus de l'hôte par les perforines, les granzymes ou le « tumor necrosis factor » (TNF- α) aboutissant aux manifestations cliniques de la GVHDa.

Modifié de (Fu et al., 2014)

1) Initiation de la GVHDa

a) Impact du conditionnement prégreffe

Le conditionnement est fortement impliqué dans l'initiation de la GVHD. Il entraîne des lésions tissulaires au niveau de l'intestin, des poumons, de la peau et d'autres organes (Down and Yanch, 2010).

Les modèles animaux et les observations cliniques ont démontré une relation directe entre l'intensité du conditionnement, les lésions tissulaires engendrées, la production de cytokines inflammatoires et la sévérité de la GVHD (Cooke et al., 2000) (Voir **Figure 2**). Ces observations ont conduit à modifier la prise en charge clinique, en réduisant l'intensité du conditionnement pré-greffe.

b) Rôles des signaux « danger »

Lors du conditionnement prégreffe, les lésions tissulaires engendrées, en particulier au niveau digestif, entraînent la production de divers signaux « danger ». Les cellules nécrotiques de l'intestin et du péritoine libèrent des molécules connues sous le nom de DAMPs (Damage-associated molecular patterns) comme le sulfate d'héparane, la protéine HMGB1 ou des acides nucléiques. Parmi ces DAMPs, l'ATP est reconnue par le récepteur P2X7 des cellules présentatrices d'antigène (CPA), active l'inflammasome et mène à la surexpression des molécules de costimulation à la surface des CPA (Wilhelm et al., 2010). Un autre exemple de DAMPs impliqué dans le développement de la GVHD est l'acide urique. Après le conditionnement prégreffe, l'acide urique est relargué dans le milieu environnant par les cellules endommagées et contribue à l'activation de l'inflammasome *via* Nlrp3. Cette activation entraîne la production d'IL-1 β et participe au déclenchement de la réponse allogénique. Ainsi, la déplétion de l'acide urique est associée à la diminution de la sévérité de la maladie dans la souris (Jankovic et al., 2013). L'utilisation thérapeutique d'urate oxydase a d'ailleurs fait l'objet d'un essai clinique de phase I (Yeh et al., 2014).

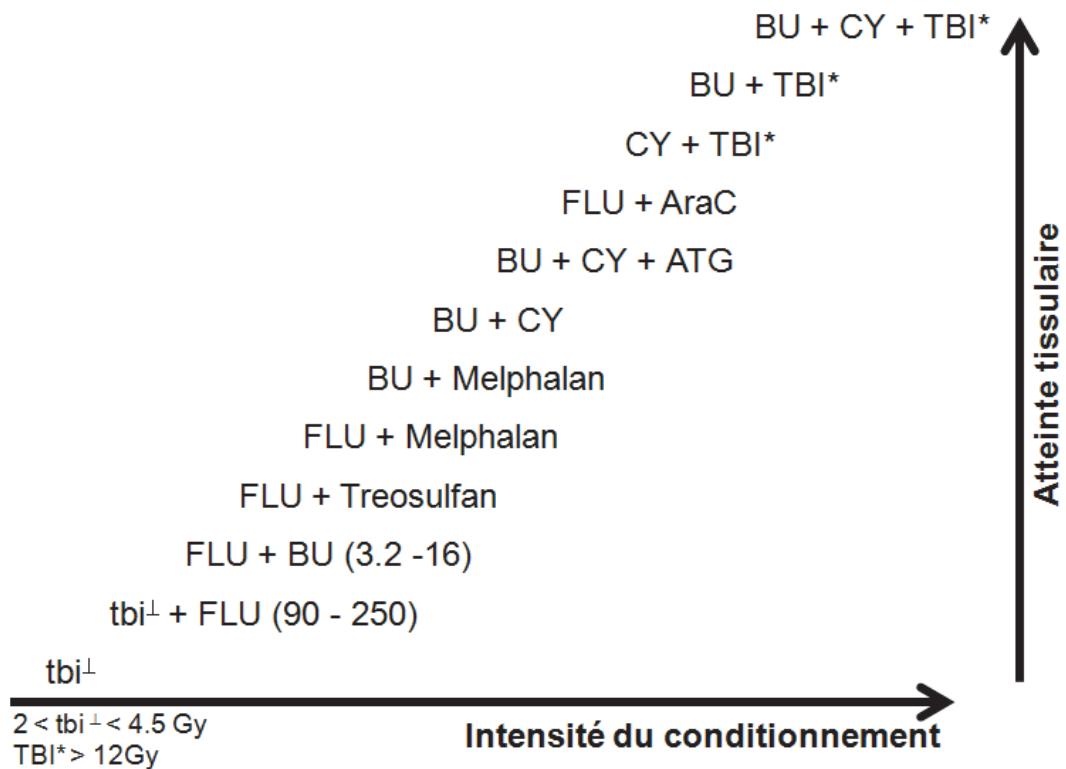


Figure 2 : Relation entre l'intensité du conditionnement utilisé lors de l'allo-CSH et les atteintes tissulaires engendrées (toxicité). TBI et tbi^{\perp} , irradiation corporelle totale ; BU, busulfan ; CY, cyclophosphamide ; FLU, fludarabine ; AraC, cytarabine ; ATG, anti-thymoglobulines

Modifié de (Warren et al. 2013)

Le conditionnement entraîne aussi la rupture de la barrière épithéliale intestinale et le passage vers la circulation sanguine d'autres signaux « danger » issus de microorganismes normalement séquestrés dans la lumière intestinale et appelés PAMPs pour « Pathogen associated molecular patterns ».

Introduction

2) Induction de la GVHDa

a) Les récepteurs de l'immunité innée

La reconnaissance des signaux « danger » par les cellules de l'immunité innée passe par des récepteurs appelés PRR (Pattern recognition receptor) exprimés à leurs surfaces et entraîne l'activation de la réponse immunitaire. La reconnaissance des DAMPs et PAMPs par les cellules de l'immunité innée est attribuable à deux familles principales de PRR : les TLR ou « Toll-like receptors » et les NLR ou « NOD-like receptors » (Heidegger et al., 2014).

Rôle des Toll-like receptors dans le développement de la GVHDa

Les TLR constituent une famille de PRR transmembranaires qui sont exprimés par de nombreux types cellulaires (O'Neill et al., 2013). La reconnaissance de composants microbiens par les TLR entraîne l'activation des CPA puis la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Hill and Ferrara, 2000; Teshima et al., 2002).

Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 sont des récepteurs de surface qui reconnaissent des produits bactériens tandis que TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont principalement localisés au niveau intracellulaire et reconnaissent les acides nucléiques d'origine bactérienne ou virale (Medzhitov and Janeway, 2002).

Un des TLR les plus étudiés dans le contexte de l'allo-CSH est le TLR4. Les mutations du TLR4, récepteur du lipopolysaccharide (LPS), ont été décrites chez les patients et dans les souris comme étant associées à une GVHD moins sévère (Imado et al., 2010; Lorenz et al., 2001). Cependant la signalisation dépendante du TLR4 ne semble pas être absolument nécessaire au développement de la GVHD. En effet, une étude a montré que des souris invalidées pour TLR4 n'étaient pas protégées de la GVHD, suggérant l'implication d'autres voies de signalisation (Calcaterra et al., 2008). Entre autres, la reconnaissance par le TLR9 d'ADN bactériens pourrait augmenter la sévérité de la maladie (Calcaterra et al., 2008; Heimesaat et al., 2010).

A l'inverse, la reconnaissance de PAMPs par d'autres membres de la famille des TLR pourrait limiter la GVHD. La flagelline, protéine constituant le flagelle de nombreuses bactéries mobiles comme *Escherichia coli*, peut être reconnue par le TLR5. Elle diminue la

Introduction

sévérité de la GVHD en inhibant la fonction des CPA et en favorisant la génération de LT régulateurs (Treg) (Hossain et al., 2011; Penack et al., 2010; Sawitzki et al., 2014).

De plus, la cinétique d'activation des TLR semble être cruciale dans le développement de la GVHD. Une équipe a montré que l'application de ligands de TLR7 sur la peau des souris après allo-CSH mais avant l'induction de la GVHD entraînait un infiltrat massif de LT et des signes cliniques aux sites traités (Chakraverty et al., 2006). A l'inverse, une seule application administrée entre le conditionnement et l'allo-CSH induit l'expression de l'enzyme indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) capable de limiter la GVHD intestinale (Jasperson et al., 2009).

Néanmoins, il est important de mentionner que la réponse allogénique peut se produire en absence de signalisation par les TLR (Li et al., 2011) suggérant que cette voie n'est pas la seule impliquée dans la pathogénèse de GVHD.

Rôle des NOD-like receptors dans le développement de la GVHD

Une autre famille de PRR, les récepteurs de la famille NLR sont également présents sur de nombreux types cellulaires (Inohara et al., 2001) et sont capables de reconnaître des produits microbiens mais également des DAMPs comme l'ADN double brin relâché par les cellules nécrotiques. Parmi ces NLR, NOD1 et NOD2 reconnaissent spécifiquement des composants des membranes bactériennes comme le peptidoglycane. Ces PRR ont été très étudiés dans la maladie de Crohn, atteinte inflammatoire chronique partageant plusieurs aspects immunopathologiques avec la GVHD intestinale. De manière intéressante, le polymorphisme de NOD2 semble influencer l'incidence de la GVHD (Penack et al., 2010). Plus précisément, des études montrent que le risque de développer une GVHD est plus sévère lorsque le receveur ou le donneur présente des mutations de NOD2 (Holler et al., 2006; Holler et al., 2004; Sairafi et al., 2008).

b) Activation des cellules de l'immunité innée

Les PAMPs et les DAMPs ainsi reconnus par les différents PRR sont responsables de l'activation des sentinelles de l'immunité, les CPA, nécessaires à la présentation des alloantigènes et donc à l'induction de la GVHD. De nombreux types cellulaires peuvent participer à la présentation antigénique avec des niveaux d'efficacité différents (Unanue,

Introduction

2002). Les CPA dites « professionnelles » sont des cellules hématopoïétiques très efficaces pour charger les peptides antigéniques sur les molécules du CMH et pour présenter ceux-ci à la membrane cellulaire conjointement aux signaux d'adhésion et de costimulation. Ces signaux formeront la synapse immunologique indispensable à l'activation des LT pour promouvoir une réponse immunitaire adaptative. Il s'agit des lymphocytes B, des macrophages et des cellules dendritiques (DC). Par ailleurs, d'autres cellules non hématopoïétiques peuvent acquérir la capacité de présenter les antigènes sous certaines conditions spécifiques.

Il y a eu récemment de nombreux progrès concernant la description du rôle des CPA dans la GVHD. Il semblerait notamment que l'origine des CPA (donneur ou receveur) joue un rôle prépondérant (Chakraverty and Sykes, 2007). Des travaux ont montré que les CPA professionnelles issues du receveur ne sont pas indispensables au déclenchement de la maladie à l'inverse des CPA issues du donneur (Toubai et al., 2011). En effet, après conditionnement et allo-CSH, les CPA radio- ou chimiosensibles ainsi que les populations précurseurs de ces CPA issues du receveur sont rapidement éliminées. Les CPA issues du donneur peuvent alors se multiplier et reconstituer le pool de CPA. La cinétique de cette reconstitution dépend, là aussi, du type de conditionnement (Auffermann-Gretzinger et al., 2002). Certaines CPA du receveur sont résistantes au conditionnement, notamment les macrophages de la peau (Bogunovic et al., 2006) ou encore les cellules de Langerhans (Durakovic et al., 2006). Au final, les principales CPA impliquées dans la GVHD sont les CPA du donneur, et de manière plus accessoire, celles du receveur qui persistent après conditionnement.

c) Activation et différenciation des lymphocytes T

Après allo-CSH, les LT naïfs du donneur migrent dans les organes lymphoïdes secondaires du receveur (Beilhack et al., 2005). Ils proliférerent alors rapidement sous l'influence des CPA activées avant de passer dans la circulation périphérique (Voir **Figure 3**). Lors du processus de GVHD, l'activation des LT, leur prolifération et leur différenciation sont considérées comme des facteurs déterminants pour le développement de la maladie.

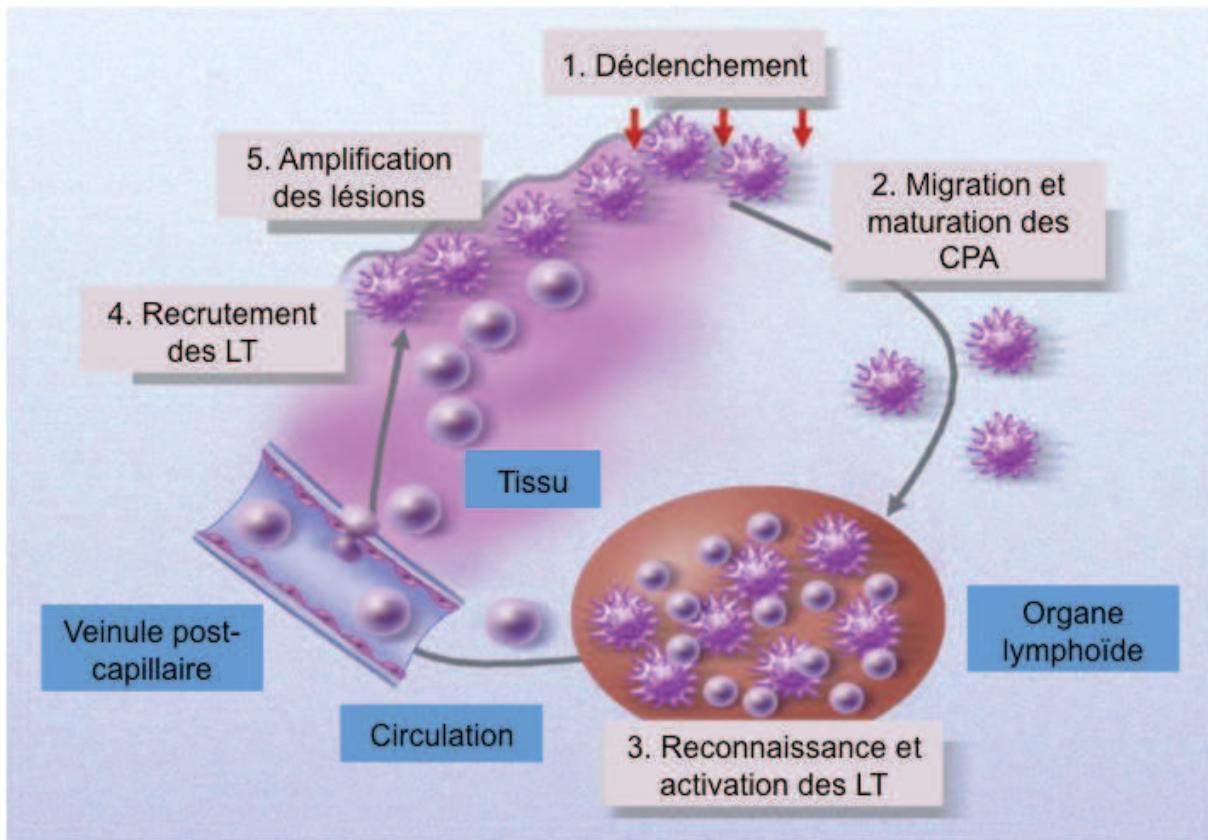


Figure 3 : Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) peuvent influencer le développement de la GVHD à différents niveaux. Après activation, les CPA migrent dans les ganglions lymphatiques dans lesquels elles activent les lymphocytes T (LT) allogéniques et leur inculquent un phénotype migratoire. Les LT effecteurs infiltrent ensuite les tissus cibles de la GVHD. Les CPA présentes dans les tissus lésés peuvent amplifier la réponse allogénique en sécrétant des cytokines et en recrutant davantage de LT.

Modifié de (Chakraverty and Sykes, 2007)

La GVHD a longtemps été considérée comme une maladie provoquée par les Th1 en raison de l'infiltrat de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et de l'augmentation de production des cytokines de type Th1 comme les interférons (IFN) et l'interleukine 12 (IL-12) (Antin and Ferrara, 1992; Blazar et al., 1997; Mohty et al., 2005). Plus tard, d'autres études ont mis en évidence la participation d'autres populations de lymphocytes Th dans la GVHD murine. Nous allons détailler les fonctions et caractéristiques des différents sous types de lymphocytes Th impliqués dans la physiopathologie de la maladie.

Les lymphocytes T CD4+ peuvent s'engager dans différentes voies de différenciation cellulaire selon les cytokines présentes dans le milieu environnant et les signaux de costimulation qu'ils reçoivent. La différenciation de ces cellules nécessite la coordination entre la transmission des signaux induits par les cytokines et l'activation de facteurs de transcription spécifiques à chaque lignée cellulaire (Voir **Figure 4**).

Introduction

Voie Th1: Tbet, STAT1, IFN- γ , TNF- α

La coordination de plusieurs facteurs de transcription induit la différenciation des LT CD4+ naïfs en Th1. D'abord, le facteur Tbet joue un rôle primordial en promouvant la différenciation Th1 et en inhibant simultanément les autres voies (Lazarevic and Glimcher, 2011). Tbet contrôle également l'expression de gènes codant des molécules nécessaires à la migration des Th1 telles que le récepteur de chimiokine CXCR3 (Lord et al., 2005). Il orchestre aussi la sécrétion d'IFN- γ (Szabo et al., 2000) et des chimiokines CCL3 et CCL4 (Lord et al., 2005). Tbet inhibe enfin l'expression de certains gènes de la famille SOCS (Suppressor of cytokine signaling) tels que SOCS1 et SOCS3 dont la répression est nécessaire à la création de Th1 fonctionnels (Oestreich et al., 2011).

L'IFN- γ ainsi sécrété provoque une stimulation endocrine en activant STAT1 (Afkarian et al., 2002). L'équipe de H. Ma a montré que l'absence de STAT1 dans les LT CD4+ du donneur réduisait la sévérité de la GVHD murine (Ma et al., 2011).

L'IFN- γ a également un effet paracrine et induit un effet pathogène direct au niveau intestinal (Yi et al., 2009). Paradoxalement, d'autres études montrent que l'IFN- γ ne semble pas indispensable à l'induction de la GVHD et peut même inhiber son développement. Une étude démontre que la transplantation de LT CD4+ issus de souris invalidées pour l'IFN- γ induisait une GVHD accélérée après irradiation à dose létale dans un modèle murin (Brok et al., 1993). A l'inverse, l'utilisation de ces mêmes cellules après irradiation sublétale provoquait une GVHD moins sévère (Welniak et al., 2000). De même, des études ont rapporté un rôle protecteur de l'IFN- γ dans les poumons (Sun et al., 2012), probablement par sa capacité à induire l'enzyme anti-inflammatoire IDO.

Une autre cytokine sécrétée par les Th1 est aussi impliquée dans la physiopathologie de la GVHD. Il s'agit du TNF- α qui participe à la phase d'initiation et qui amplifie la progression de la maladie une fois celle-ci établie. Une série d'expériences cliniques a mis en avant la forte corrélation entre les niveaux d'expression du récepteur au TNF- α (TNFR1) et la sévérité de la GVHD (Levine, 2011). Le TNF- α exerce à la fois des effets directs et indirects sur la GVHD : il induit directement l'apoptose sur les tissus cibles et active indirectement la prolifération des LT. Le ciblage thérapeutique de cette cytokine a donné des résultats prometteurs dans les modèles expérimentaux de GVHD (Korngold et al., 2003). L'Infliximab, un anticorps chimérique bloquant le TNF- α , semble être bien toléré et assez efficace dans le traitement des patients atteints de GVHD cortico-résistante (Couriel et al., 2004).

Introduction

Voie Th2: STAT6, GATA-3, IL-4, IL-13

STAT6 est un des principaux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation Th2 (Shimoda et al., 1996). Ce facteur est activé suite à la stimulation par l'IL-4 et l'IL-13. Les LT CD4+ naïfs invalidés pour STAT6 perdent en grande partie leur capacité à se différencier en Th2 (Takeda et al., 1996). De plus, STAT6 augmente l'expression de GATA-3, deuxième facteur essentiel aux Th2 (Zhu et al., 2001). En effet, dans les souris invalidées pour GATA-3, la différenciation Th2 est interrompue et les LT CD4+ naïfs s'engagent dans la voie Th1 (Pai et al., 2004).

Les deux principales cytokines produites par les Th2 sont l'IL-4 et l'IL-13. De manière intéressante, il a été rapporté que la transplantation de LT invalidés pour l'IL-4 provoquait une GVHD sévère (Foley et al., 2008; Tawara et al., 2008) bien que d'autres équipes rapportent l'inverse (Murphy et al., 1998).

L'IL-13 est une cytokine produite par les Th2 mais également par d'autres sources cellulaires. Des études *in vitro* suggèrent que l'IL-13 produite par les LT du donneur pourrait inhiber la production de TNF- α après allo-CSH et augmenter la sécrétion de cytokines immunomodulatrices telles que l'IL-4, l'IL-5 ou encore le TGF- β (Lee et al., 2001).

Ainsi, les lymphocytes Th2 ne sont pas considérés comme pathogènes et pourraient être protecteurs dans le développement de la GVHD (Fowler et al., 1994; Krenger et al., 1995; Pan et al., 1995; Tawara et al., 2008). A l'heure actuelle, l'impact de la modulation de la voie Th2 dans le contexte de l'allo-CSH n'est pas clairement établi.

Voie Th17: ROR γ t, STAT3, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23

Les Th17 sont des cellules pro-inflammatoires prenant part à l'immunité adaptative dirigée contre les pathogènes extracellulaires. Ils jouent également un rôle pathogène dans de nombreuses maladies autoimmunes (Bettelli et al., 2007). Le phénotype Th17 est dépendant des facteurs de transcription ROR γ t et STAT3 nécessaires à l'expression de l'IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22 (Ivanov et al., 2006).

Le rôle de l'IL-17 dans le développement de la GVHD n'est toujours pas clair. En effet, la transplantation *in vivo* de lymphocytes Th17 polarisés mène à une forme agressive de la maladie (Carlson et al., 2009; Iclozan et al., 2010). Cependant, la transplantation de LT invalidés pour l'IL-17 peut atténuer, exacerber ou ne pas influencer la GVHD selon le modèle et les souches murines utilisés (Kappel et al., 2009; Yi et al., 2009; Yi et al., 2008).

Introduction

L'IL-21 contribue à la sévérité de la maladie dans la souris (Bucher et al., 2009). Le groupe de B. Blazar à Minneapolis a utilisé un modèle de GVHD xénogénique dans lequel les souris immunodéficientes reçoivent un greffon humain. Dans ce modèle, le blocage par un anticorps spécifique neutralisant l'IL-21 humaine est associé à une réduction significative de la GVHD avec une perte de poids moins importante et une augmentation des Treg dans les souris traitées (Hippen et al., 2012).

En utilisant des stratégies basées sur l'utilisation des souris génétiquement modifiées, l'équipe de R. Das a étudié les effets de l'IL-23, cytokine nécessaire à la survie des Th17, sur la GVHD et sur l'effet GVL (Das et al., 2010). Ils ont démontré que le blocage spécifique de l'IL-23 protégeait le colon et atténuaient les lésions intestinales tout en préservant l'effet GVL, suggérant ainsi que l'IL-23 pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour réguler les réponses allogéniques chez les patients.

Nouvelles sous-populations: Th9, Th22, Tf_h, Th17.1

L'IL-9 est une cytokine qui était précédemment associée au phénotype Th2. Elle est impliquée dans certains phénomènes immunologiques tels que la recombinaison isotypique des immunoglobulines de classe E, la résistance aux parasites ou encore l'asthme aussi bien dans la souris que chez l'homme (Goswami and Kaplan, 2011; Soroosh and Doherty, 2009). Le phénotype Th9 correspond dans la souris à des LT CD4+ sécrétant beaucoup d'IL-9, d'IL-10, de CCL7 et CCL22 sans sécréter d'IL-4, IL-13, IFN- γ ou encore TNF- α (Veldhoen et al., 2008). De plus, les lymphocytes Th9 n'expriment pas les facteurs de transcription des autres Th tels que Tbet, GATA-3 ou ROR et leur différenciation est dépendante du récepteur OX40, de l'IL-4 et du TGF- β (Xiao et al., 2012).

Récemment, il a été montré que les Th9 pouvaient avoir un effet anticancéreux en sécrétant de l'IL-1 β après activation de STAT1 (Vegran et al., 2014). Le rôle des Th9 reste à éclaircir, même si leur différenciation semble participer à la pathogénèse de la GVHD en exacerbant directement les lésions intestinales (Dardalhon et al., 2008) et en potentialisant les réponses liées aux lymphocytes B et à la production d'auto-anticorps (Vink et al., 1999).

Une sous population spécifique produisant de l'IL-22 a été décrite pour la première fois par le groupe de S. Eyerich (Eyerich et al., 2009). Leurs études portaient principalement sur des pathologies de la peau telles que le psoriasis, l'eczéma ou les allergies de contact et ont mis en évidence des clones de LT CD4+ produisant de l'IL-22, de l'IL-10, du TNF- α et du

Introduction

CCL15. Le phénotype Th22 dépend des facteurs de transcription AHR et Foxo4 (Duhen et al., 2009). Le rôle de l'IL-22 dans la GVHD a fait l'objet de ce travail.

Les cellules Tfh ont été découvertes dans les années 2000 par différents groupes qui rapportèrent que la majorité des LT CD4+ se développant dans les amygdales présentent un phénotype unique exprimant des taux élevés de CXCR5 et permettant la génération de LB produisant des IgG et IgA (Kim et al., 2001). Les Tfh sont sous la dépendance du facteur de transcription Bcl-6 car en son absence, on observe une perte complète de la génération de LB dans les centres germinatifs (Yu et al., 2009a). Les Tfh expriment CD40L, ICOS, produisent de l'IL-10 et sont responsables de la différenciation des LB (Schaerli et al., 2000). Les Tfh sont capables de sécréter des cytokines propres aux lymphocytes Th1, Th2 et Th17 (Nurieva et al., 2008). Ils sécrètent de l'IL-21, cytokine primordiale à leur propre développement. Très récemment, une étude a montré qu'un taux élevé de Tfh était associé à l'augmentation de la sévérité de la GVHD dans la souris sans clairement montrer par quels mécanismes (Flynn et al., 2014).

Récemment, des lymphocytes T produisant à la fois de l'IFN- γ et de l'IL-17 ont été décrits chez l'homme (Acosta-Rodriguez et al., 2007). Cette sous population appelée Th17.1 exprime le récepteur à l'IL-23 et sécrète à la fois des cytokines associées aux Th17 c'est-à-dire l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-22 mais également de l'IFN- γ ce qui lui confère des propriétés fortement pro-inflammatoires (Ramesh et al., 2013).

Dans la souris, le groupe de L.E. Harrington a observé une population similaire aux Th17.1 (Harrington et al., 2005). Ces Th17.1 pathogènes ou pTh17 dépendent à la fois des facteurs de transcription Tbet, ROR- γ t mais également de RUNX1 et RUNX3 (Wang et al., 2014). Cette population est impliquée dans la réponse cellulaire anticancéreuse (Viaud et al., 2013) et semblent induire une encéphalite allergique expérimentale plus sévère que celle induite par les Th17 (Ghoreschi et al., 2010).

Ce phénotype Th17.1 n'est pas encore bien déterminé. En effet, on ne sait pas si ce phénotype est réellement stable ou s'il résulte d'une « reconversion » de Th17 vers la voie Th1. En effet, des études ont montré la plasticité des Th17 qui peuvent s'engager selon le milieu environnant dans une polarisation Th1 et produire à la fois de l'IL-17 et de l'IFN- γ (Lee et al., 2009) et ce, de manière physiologique (Hirota et al., 2011). De manière très intéressante, ce processus de « reconversion » semble se produire davantage dans un milieu lymphopénique (Martin-Orozco et al., 2009) et potentiellement dans le contexte d'allo-CSH (Nishimori et al., 2012).

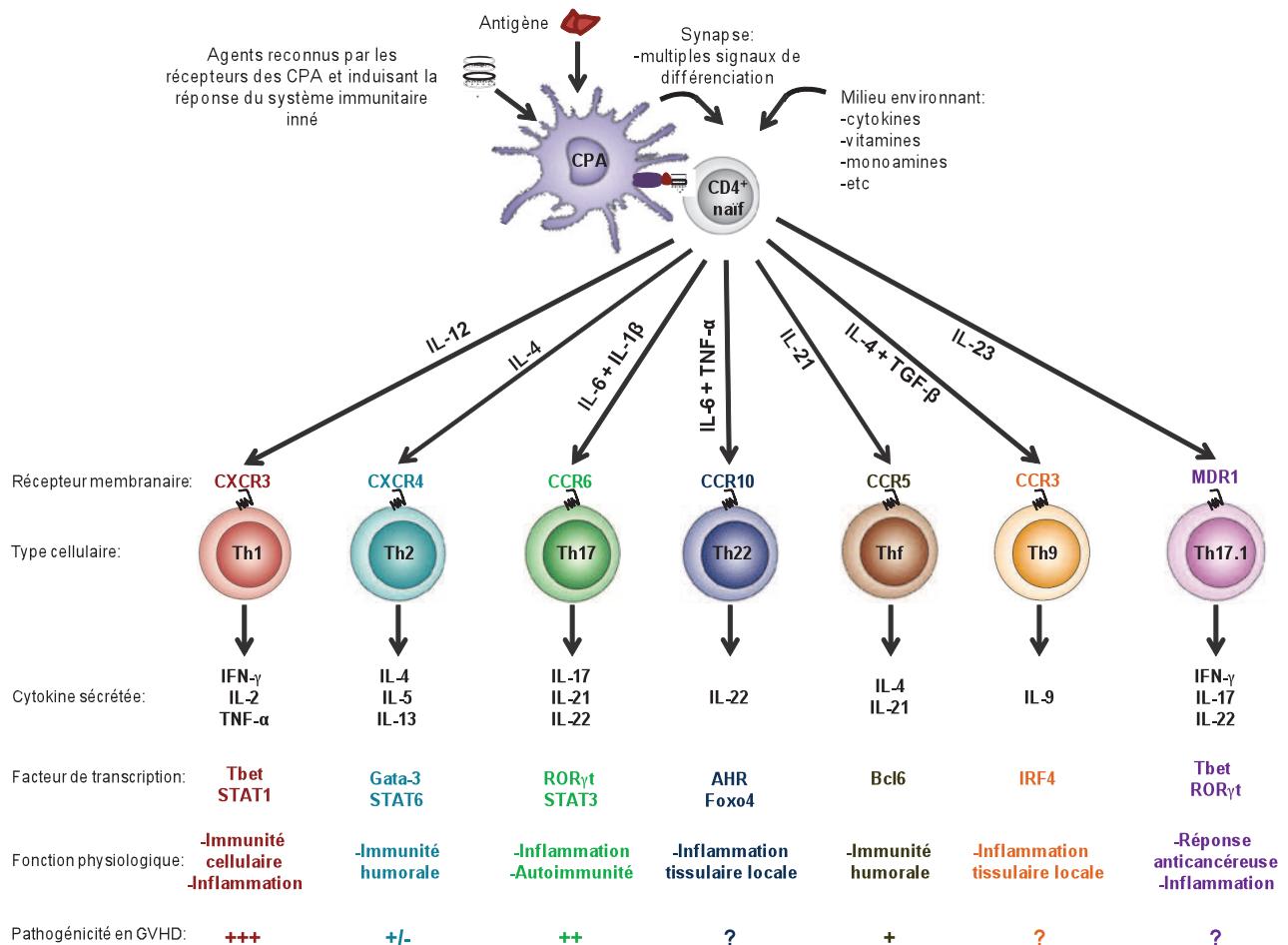


Figure 4 : Principales voies de différenciation des lymphocytes CD4+. Ce schéma récapitule les principales caractéristiques des différentes sous populations T effectrices : les cytokines induisant la polarisation vers un profil donné, les facteurs de transcription et récepteurs associés ainsi que leur fonction et leur implication dans la GVHD.

Complexité de la réponse allogénique T au cours de la GVHDa

Dans la GVHDa, le rôle de chaque sous population de Th reste encore à préciser. Le groupe de T. Yi a étudié l'effet pathogène des sous populations Th1, Th2, Th17 dans les tissus cibles de la maladie (Yi et al., 2009). Ils ont démontré dans le modèle C57BL/6 dans BALB/c soit un modèle d'incompatibilité de CMH de classe I largement utilisé, que les LT issus de donneur sauvage se différenciaient préférentiellement en Th1 et participaient aux lésions intestinales et hépatiques. Cependant l'invalidation de l'IFN-γ dans les LT du donneur entraînait les différenciations Th2 et Th17 et exacerbait les lésions pulmonaires et cutanées. L'absence combinée d'IL-4 et d'IFN-γ issue du donneur mène à la différenciation Th17 et

Introduction

cause principalement des lésions cutanées. L'absence d'IFN- γ et d'IL-17 était, quant à elle, associée à une augmentation des Th2 et entraînait une atteinte pulmonaire. L'ensemble de ce travail montre qu'il est possible d'induire une GVHDa par différentes sous populations de Th et que chacune est associée à un tissu cible en particulier.

3) Migration des cellules effectrices et lésions tissulaires

Les atteintes spécifiques au cours de la GVHDa sont donc liées à la différenciation et à la migration des LT dans les tissus cibles. Cette migration est dépendante de l'expression des récepteurs aux chimiokines. Plusieurs études ont mis en évidence l'augmentation de l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs au cours de la GVHD (Mapara et al., 2006; New et al., 2002).

Les chimiokines (ou cytokines chimio-attractives) forment un groupe de petites protéines qui agissent en se fixant sur des récepteurs membranaires. Elles permettent de diriger les cellules circulantes à travers le corps et d'orchestrer spécifiquement la réponse immunitaire dans certains tissus. Les gradients de chimiokines liées à la matrice extracellulaire ou sous forme soluble dirigent l'infiltration des leucocytes dans les tissus après phénomène de diapédèse. Chez l'homme, il existe environ 50 gènes codant des ligands de chimiokines et plus de 20 gènes codant leurs récepteurs spécifiques. Les chimiokines sont classées en quatre groupes: C, CC, CXC ou CX3C selon la position du résidu cystéine dans leur séquence d'acides aminés et leurs récepteurs respectifs suivent généralement cette nomenclature. Par exemple, une chimiokine CC se fixe à un récepteur CC la plupart du temps (Voir **Figure 5**).

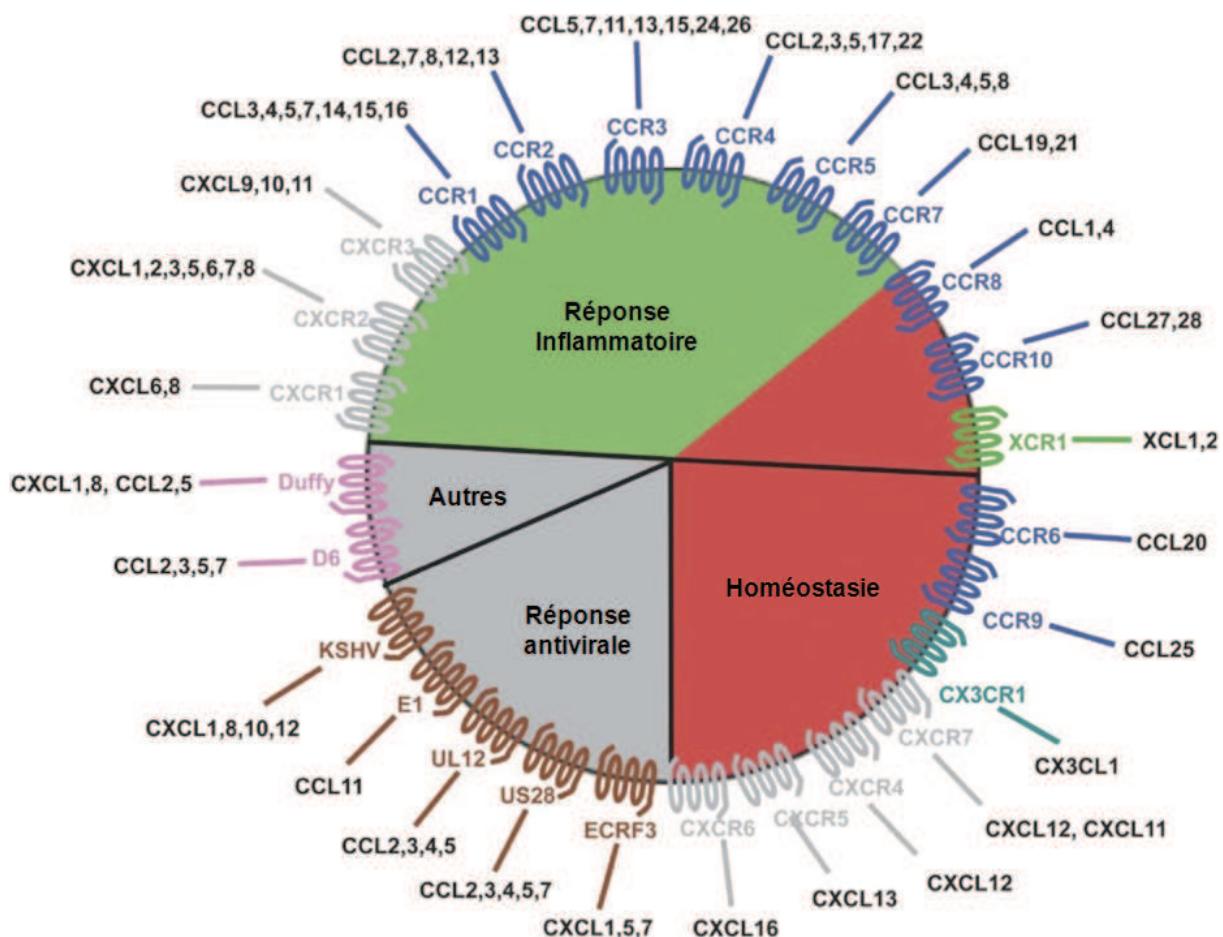


Figure 5 : Principaux constituants du système des chimiokines et leurs récepteurs. Les chimiokines pro-inflammatoires sont inducibles et impliquées dans la réponse immunitaire. Les chimiokines homéostatiques sont impliquées dans le développement physiologique des tissus. Certaines chimiokines sont également associées à la réponse antivirale.

Dans le contexte de GVHD, le rôle des chimiokines sur le recrutement des LT allogéniques dans les tissus cibles commence à être bien défini. Par exemple, le recrutement des LT CCR5+ est associé au développement de la GVHD hépatique (Murai et al., 1999). L'utilisation d'un antagoniste de CCR5 semble être une piste pour limiter la GVHD chez l'homme (Reshef et al., 2012).

Le rôle d'autres couples récepteurs/chimiokines est également rapporté. Par exemple, l'expression de CCR9 par les LT alloréactifs facilite leur migration au niveau intestinal et cutané. Tandis que le rôle de CCR9 dans les modèles murins est incertain, le

Introduction

polymorphisme de CCR9 est associé à la sévérité de la GVHD chez l'homme (Inamoto et al., 2010).

CCR4 et CCR10 sont importants pour la migration au niveau de la peau et un grand nombre de LT CCR4+CCR10+ est retrouvé dans le sang périphérique de patients atteints de GVHD cutanée (Faaij et al., 2006).

CXCR3 est impliqué dans la migration des Th1 au niveau des lésions tissulaires (Piper et al., 2007). Il a par ailleurs été montré dans la souris que l'inhibition de CXCR3 réduisait la sévérité de la GVHD (He et al., 2008).

Le transfert adoptif de LT CD4+ invalidés pour CCR6 retarde l'induction de la maladie et diminue les symptômes de GVHD. Dans cette étude, il est aussi montré que CCR6 participe à la migration des LT au sein des organes cibles de la GVHD, probablement *via* l'augmentation de CCL20 (Varona et al., 2005).

Dans la GVHDc, l'équipe de M.M. Imanguli a observé que l'expression de CXCL9 était augmentée dans les muqueuses orales des patients atteints de GVHD comparée aux patients ne développant pas la maladie (Imanguli et al., 2009). D'autres équipes ont également observé l'augmentation de l'expression de CXCL9, CXCL10 et CXCL11 mais aussi du ligand CXCR3 propre aux Th1 dans la conjonctive (Westekemper et al., 2010) et dans l'épiderme (Piper et al., 2007) de patients atteints de GVHDc.

Le traitement de la GVHD par corticoïdes influence les niveaux d'expression de chimiokines telles que CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2 et CCL3. Ces différences d'expression semblent inhiber le recrutement des LT au niveau intestinal mais pas au niveau hépatique (Bouazzaoui et al., 2011).

Le ciblage thérapeutique des molécules responsables de la migration des Th dans les tissus cibles semble donc être une alternative intéressante pour le traitement de la GVHD. Cependant l'utilisation de tels antagonistes comme les antagonistes de CCR5, peut également interférer dans le recrutement de Treg dans les tissus cibles (Wysocki et al., 2005).

Après migration dans les tissus, les LT CD4+ participent à la phase effectrice de la GVHD par une cascade complexe de plusieurs effecteurs inflammatoires qui se traduit par une activation des LT cytotoxiques (Hill and Ferrara, 2000). Les voies de Fas/FasL et perforine/granzyme sont les mécanismes classiques que les LT cytotoxiques utilisent pour lyser les cellules cibles (Kagi et al., 1994; Russell and Ley, 2002). Si la plupart des études n'arrivent pas à montrer le rôle de la voie perforine/granzyme dans la GVHD, l'implication de

Introduction

la voie Fas/FasL est bien décrite. En effet, les LT invalidés pour FasL diminuent fortement la GVHD dans le foie, la peau et les organes lymphoïdes (van den Brink and Burakoff, 2002).

4) Régulation de la réponse allogénique

Certaines cellules de l'immunité sont, quant à elles, capables de limiter la réponse allogénique. C'est le cas des Treg CD4+CD25+FoxP3+ ou encore de cellules myéloïdes suppressives (Highfill et al., 2010; Lees et al., 2011). De nombreuses études ont montré le rôle essentiel des Treg dans la régulation de la GVHD (Hoffmann et al., 2002). En effet ces LT suppriment la réponse allogénique par la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- β . Les Treg peuvent agir sur les CPA *via* une inhibition dépendante d'un contact. Une étude a montré que des Treg obtenus *ex vivo* après stimulation avec les CPA allogéniques du receveur peuvent moduler la GVHD (Cohen and Boyer, 2006). Par conséquent, il a été proposé que le pourcentage de Treg dans le sang des patients soit un biomarqueur de la GVHD (Magenau et al., 2010). L'utilisation de Treg (Martin et al., 2013a) ou de cellules myéloïdes suppressives pourrait être une thérapeutique prometteuse (Janikashvili, manuscrit en soumission).

D. L'interleukine 22, une cytokine aux effets contrastés

1) Caractéristiques biochimiques

L'interleukine 22 (IL-22) a été identifiée à l'origine comme facteur apparenté à l'IL-10 et induit par les LT (IL-TIF ou IL-10-related T cell-derived inducible factor) (Dumoutier et al., 2000a; Xie et al., 2000). Elle fait désormais partie de la famille de l'IL-10 au même titre que l'IL-19, l'IL-20, l'IL-24 et l'IL-26. L'IL-22 est exprimée aussi bien chez l'homme que dans la souris (Wolk et al., 2010). Chez l'homme, la protéine a un poids moléculaire d'environ 70 kDa. Elle est composée de 146 résidus d'acides aminés dont 80,8% sont homologues à la protéine murine. Le gène humain *IL22* est présent au niveau du locus 12q15, proche de celui de l'IL-26 et de l'IFN- γ (Sabat et al., 2007). Dans la souris, le gène *Il22* est présent au niveau du chromosome 10D2 (Wolk and Sabat, 2006). Bien que l'IL-22 ne partage que 22,8% d'homologie de résidus d'acides aminés avec l'IL-10, toutes deux présentent la même structure secondaire composée de multiples hélices α (**Figure 6**) caractéristiques de cette famille de cytokines (Ouyang et al., 2011). Au niveau fonctionnel, la forte glycosylation de l'IL-22 semble être plus importante pour sa liaison au récepteur que sa conformation spatiale (Logsdon et al., 2004).

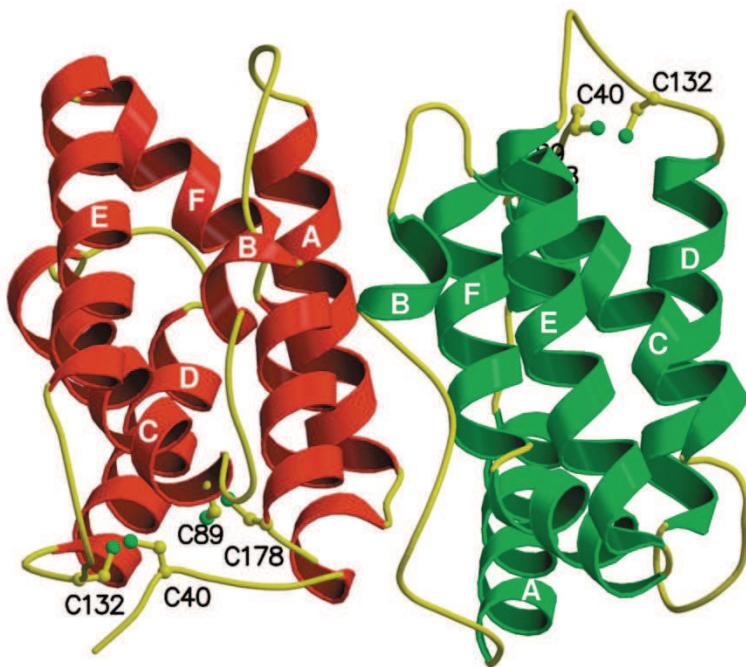


Figure 6 : Représentation déterminée par cristallographie d'un dimère d'IL-22 humaine. L'IL-22 est composée de plusieurs hélices α (notées de A à F) et de ponts disulfures entre résidus cystéine (Cys40-Cys132 et Cys89-Cys178). Sa structure secondaire caractéristique des cytokines de la famille de l'IL-10.

Modifié de (Nagem et al., 2002)

2) Sources cellulaires

La production d'IL-22 murine a été décrite pour la première fois dans une lignée cellulaire de lymphome T stimulée par l'IL-9 et dans des splénocytes traités par la concanavaline A, indépendamment de l'IL-9 (Dumoutier et al., 2000a). L'expression de l'IL-22 humaine, quant à elle, a été décrite dans les LT stimulés par des anticorps anti-CD3 et/ou concanavaline A (Dumoutier et al., 2000b; Xie et al., 2000). Parmi les populations cellulaires du système immunitaire, il a été montré par la suite, que seules les LT et les cellules lymphoïdes innées (ILC) produisent de l'IL-22. En revanche, les lymphocytes B (activés ou non), les monocytes, les macrophages et les DC, ou encore les cellules non hématopoïétiques, ne semblent pas produire cette cytokine (Wolk et al., 2002; Wolk et al., 2004; Wolk et al., 2006; Wolk et al., 2008). Les **Figures 7 et 8** résument la production de l'IL-22 par les différentes populations lymphocytaires T chez l'homme et la souris.

a) Les lymphocytes T $\alpha\beta$

Parmi les lymphocytes exprimant les chaines α et β du TCR (T cell receptor), les LT CD4+ sont la principale source de production de l'IL-22 comme illustré en **Figure 8**.

Introduction

Initialement, il a été montré que les lymphocytes Th1 et les Th17 étaient les principales cellules productrices d'IL-22 (Wolk et al., 2002).

Puis, une nouvelle population appelée Th22 et sécrétant exclusivement de l'IL-22 a été décrite. Cette population présente uniquement chez l'homme est dépendante du facteur de transcription AHR et exprime CCR10, ce qui lui confère des propriétés de domiciliation dans les tissus cutanés (Duhen et al., 2009; Trifari et al., 2009).

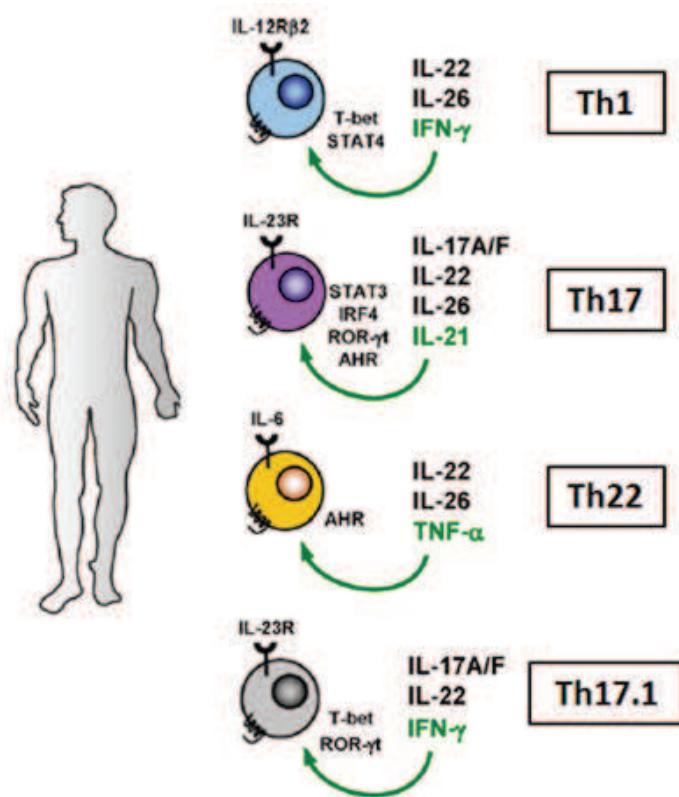


Figure 7 : Revue des lymphocytes T producteurs d'IL-22 chez l'homme. Chaque population cellulaire est présentée avec les facteurs de transcription spécifiques, les récepteurs de surface et la production cytokinique. Abréviations: AHR, arylhydrocarbon receptor; IRF, interferon regulatory factor; ROR γ t, retinoic acid-related orphan receptor γ t; STAT, signal transducer and activator of transcription; T-bet, T-box expressed in T cells.

Modifié de (Witte et al., 2010)

autre sous-population CD8+, appelée Tc22 et équivalente aux Th22, produirait de l'IL-22 sans produire de l'IL-17 (Liu et al., 2011).

b) Les lymphocytes T $\gamma\delta$

L'IL-22 peut également être sécrétée par les LT exprimant les chaines γ et δ du TCR. Comme les Th17, les LT $\gamma\delta$ expriment ROR γ t, IL-23R, CCR6 et des PRR (TLR1, TLR2 et Dectin-1). En plus de l'IL-22, ils produisent de l'IL-17 et de l'IL-21 en réponse à l'IL-23 et à l'IL-1 β sans stimulation du TCR (Martin et al., 2009; Monteleone et al., 2009; Sutton et al., 2009). Comme pour les Th17, AHR est le facteur de transcription nécessaire à l'expression de l'IL-22, mais pas de l'IL-17.

Chez l'homme, il existe aussi des LT $\gamma\delta$ sécréteurs d'IL-22 (T $\gamma\delta$ 22). Leur différenciation requiert une stimulation par l'IL-1 β , l'IL-23 et le TGF- β (Ness-Schwickerath et al., 2010).

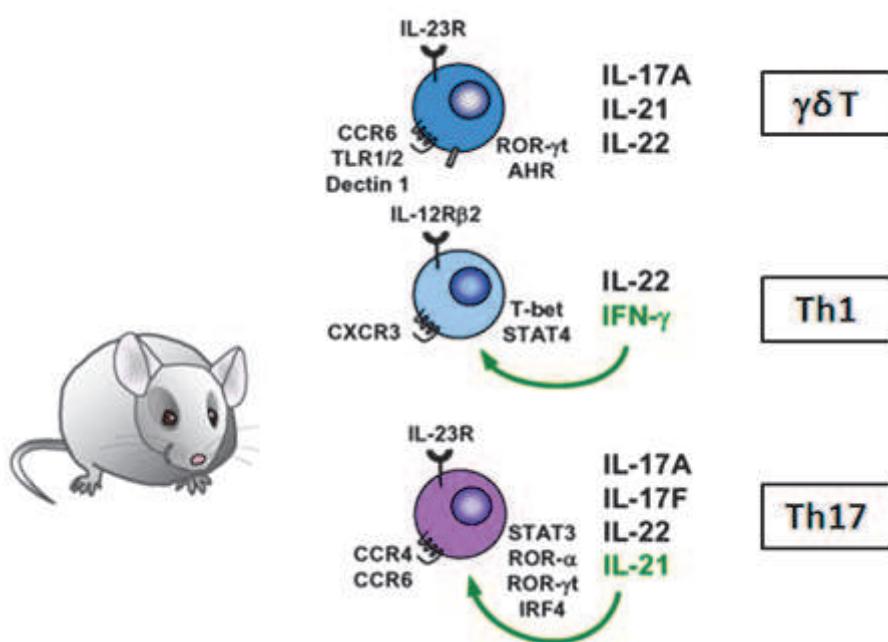


Figure 8 : Revue des lymphocytes T producteurs d'IL-22 dans la souris. Chaque population cellulaire est présentée avec les facteurs de transcription spécifiques, les récepteurs de surface et la production cytokinique. Abréviations: IRF, interferon regulatory factor; ROR α , retinoic acid-related orphan receptor α ; ROR γ t, retinoic acid-related orphan receptor γ t; RUNX, Runt-related transcription factor; STAT, signal transducer and activator of transcription; T-bet, T-box expressed in T cells.

Modifié de (Witte et al., 2010)

✓ Les autres lymphocytes de l'immunité innée (V201)

La sécrétion d'IL-22 par d'autres cellules que les LT a été observée pour la première fois dans des modèles murins d'infection à *Citrobacter rodentium* (Zheng et al., 2008). Dans ces modèles, les souris Rag2 $^{-/-}$, caractérisées par un déficit en LT, produisaient un taux

Introduction

équivalent d'IL-22 comparé aux souris sauvages. Par immunohistochimie, les auteurs ont d'abord attribué la sécrétion d'IL-22 à des cellules CD11c+ c'est-à-dire à des DC. Cependant, les très faibles taux d'IL-22 produits *in vitro* par des cellules myéloïdes telles que les DC après stimulation par IL-23 semblent indiquer que ces cellules restent une source mineure d'IL-22 (Rutz et al., 2013).

De manière intéressante, l'expression de CD11c peut être augmentée dans d'autres types cellulaires et en particulier dans les ILC (Satoh-Takayama et al., 2008) qui, par la suite, ont été décrites comme sources importantes d'IL-22 dans différentes conditions inflammatoires (Luci et al., 2009; Sanos et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008; Takatori et al., 2009). Les ILC représentent une petite fraction des cellules immunitaires totales présentes dans les organes lymphoïdes, aux surfaces des barrières épithéliales et dans d'autres tissus. Elles sont, comme les lymphocytes B et T issues d'un progéniteur lymphoïde commun mais n'expriment pas de récepteur spécifique à l'antigène produit par réarrangement génique. Ces cellules forment un groupe très hétérogène composé de plusieurs sous-populations présentant des similarités en termes de profil cytokinique et de facteurs de transcription essentiels aux populations de Th. Ces similarités suggèrent que les ILC représentent un intermédiaire dans l'évolution entre la réponse innée et la réponse adaptative.

La revue de H Spits et T Cupedo décrit notamment bien les phénotypes et fonctions de ces sous-populations récemment découvertes (Spits and Cupedo, 2012). Par exemple, les ILC du groupe 1 sont associées à l'immunité cellulaire comme les lymphocytes Th1. Il s'agit des cellules « Natural killer » NK et potentiellement d'autres cellules exprimant le facteur de transcription Tbet et produisant de l'IFN- γ . Les ILC du groupe 2 sont dépendantes du facteur de transcription ROR- α , expriment le facteur de transcription GATA-3 et produisent des cytokines associées aux Th2 telles que l'IL-5 et l'IL-13 (Spits and Di Santo, 2011). Enfin la population du groupe 3 est composée de cellules dites : « Lti » pour « lymphoid tissue inducer » responsables de l'organogenèse lymphoïde mais également des populations récemment décrites telles que les cellules « LTi-like », les ILC17s et NCR22s exprimant le récepteur NKp46 propre aux cellules NK.

Toutes les ILC productrices d'IL-22 sont également dépendantes de GATA-3 pour leur développement (Serafini et al., 2014). Elles sont décrites comme des cellules analogues aux Th17 notamment par leur dépendance au facteur de transcription ROR- γ t, à leur production d'IL-17A, IL-17F et IL-22 ainsi qu'à leur fonction protectrice ou inflammatoire sur

Introduction

les cellules épithéliales. Les **figures 9 et 10** représentent les ILC récemment décrites dans la souris (**Figure 9**) et leurs homologues humains (**Figure 10**).

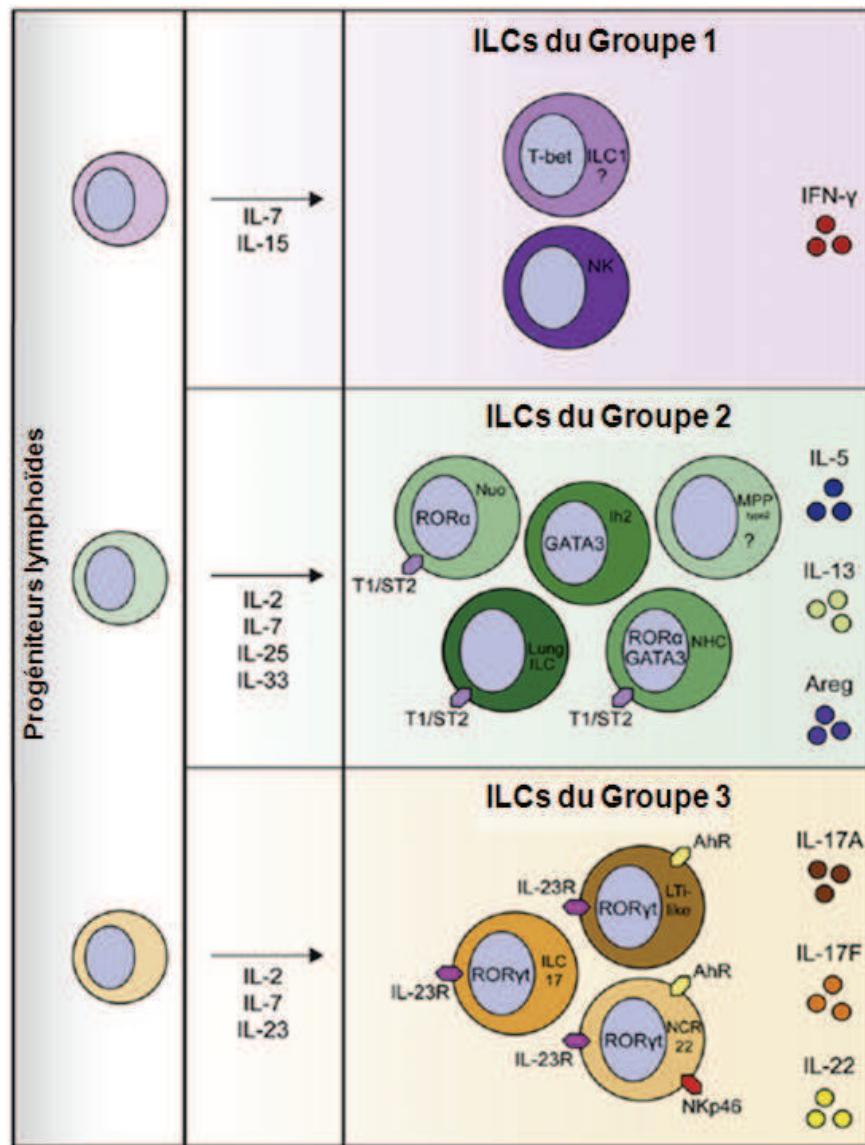


Figure 9 : Revue des cellules innées lymphoïdes décrites dans la souris. Chaque population cellulaire est présentée avec les facteurs de transcription spécifiques, les récepteurs de surface et la production cytokinique. Les cellules du groupe 3 sont dépendantes du facteur ROR- γ t et produisent de l'IL-22

Modifié de (Tait Wojno and Artis, 2012)

ILCs du Groupe 2	
Phénotype et fonction	Localisation anatomique
 <p>ST2 CD127 CD25</p>	Poumons
 <p>CTRH2 CD127 IL-25 IL-33 IL-13</p>	Sang périphérique Poumons
 <p>ST2 CD34 TSLPR TSLP IL-33 IL-5 IL-13</p>	Muqueuse pulmonaire de patients asthmatiques
ILCs du Groupe 3	
Phénotype et fonction	Localisation anatomique
 <p>RORyt LTI-like CD127 IL-17 IL-22 IFN-γ</p>	Muqueuse intestinale saine ou inflammée Ganglion lymphatique
 <p>NKp44 CCR6 RORyt IL-23R CD127 IL-22</p>	Amygdale Plaque de Peyer Appendice

Figure 10 : Revue du phénotype des cellules innées lymphoïdes ainsi que leur localisation chez l'homme.
 Chaque population cellulaire est présentée avec les facteurs de transcription spécifiques, les récepteurs de surface et la production cytokinique. Les cellules du groupe 3 sont dépendantes du facteur ROR- γ t et produisent de l'IL-22 dans l'intestin notamment dans les plaques de Peyer au cours de l'inflammation.

Modifié de (Tait Wojno and Artis, 2012)

3) Cellules cibles

L'IL-22 se lie à un récepteur hétéro-dimérique formé de l'IL-22R1 et IL-10R2C (Xie et al., 2000). Seule l'expression de l'IL-22R1 conditionne la sensibilité cellulaire à l'IL-22, puisque l'expression de l'IL-10R2C est ubiquitaire. La liaison de la cytokine au récepteur conduit à l'activation de protéines telles que Jak1 et Tyk2, qui activent à leurs tours des facteurs de transcription de la famille STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). Le principal facteur activé est STAT3 (Wolk et al., 2004; Wolk et al., 2006) mais aussi STAT1 et STAT5 (Boniface et al., 2005; Brand et al., 2006; Dumoutier et al., 2000b; Xie et al., 2000). Une étude menée sur une lignée cellulaire d'hépatome dans le rat montre également l'activation des voies MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*), comme le suggère la phosphorylation de Erk1/2, JNK et p38 (Lejeune et al., 2002) (voir **Figure 11**). L'activation des voies MAPK par l'IL-22 a aussi été rapportée chez l'homme (Andoh et al., 2005; Ikeuchi et al., 2005; Wolk et al., 2006).

L'expression de l'IL-22R1 a été observée dans plusieurs tissus constituant les interfaces avec l'environnement telles que les muqueuses respiratoires (Aujla et al., 2008), gastro-intestinales (Andoh et al., 2005; Sugimoto et al., 2008) et la peau (Wolk et al., 2008), mais aussi au niveau hépatique, pancréatique et rénal (Aggarwal et al., 2001; Dumoutier et al., 2000b; Wolk et al., 2007). Dans ces tissus, les cellules qui répondent à l'IL-22 sont les kératinocytes, les fibroblastes dermiques, les cellules épithéliales bronchiques et intestinales, les myofibroblastes subépithéliaux intestinaux, les hépatocytes et les cellules acineuses du pancréas. A l'inverse, les monocytes, les lymphocytes B et T, les ILC, les macrophages ou les DC, ainsi que les polynucléaires n'expriment pas l'IL-22R1 (Wolk et al., 2002).

L'expression et la fonction du récepteur de l'IL-22 jouent un rôle important dans certains contextes pathologiques. Par exemple, l'analyse du génome de patients atteints de la maladie de Crohn a permis d'identifier des mutations dans les gènes de l'IL-22 et de l'IL-10R2C (Glocker et al., 2009; Silverberg et al., 2009).

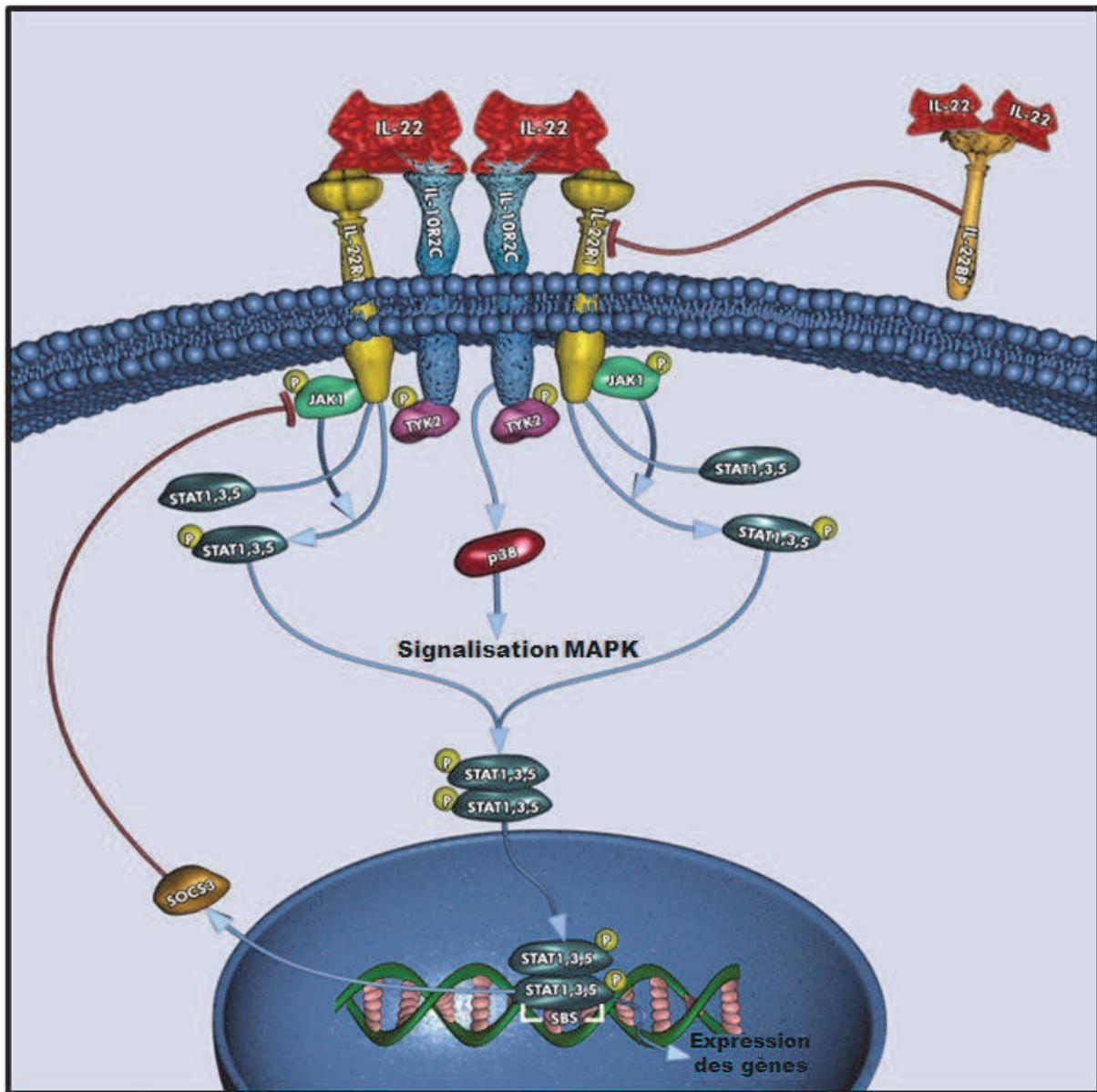


Figure 11: Le récepteur à l'IL-22. Le récepteur à l'IL-22 est composé de deux sous unités, l'IL-22R1 et l'IL-10R2C. L'IL-22 se fixe tout d'abord sur l'IL-22R1 puis l'IL-10R2C se lie au complexe IL-22/IL-22R1. Les voies Jak1 et Tyk2 sont induites et propagent les signaux de phosphorylation via STAT3 mais aussi STAT1 et STAT5 ou MAPK. L'IL-22 peut aussi être captée par son récepteur soluble, l'IL-22 BP (*Binding Protein*), neutralisant ainsi son action.

4) Inhibiteur naturel: l'IL-22 Binding Protein

En plus de l'IL-22R1, il existe un récepteur soluble à l'IL-22, appelé IL-22 *Binding protein* (IL-22BP), structurellement homologue au domaine extracellulaire de l'IL-22R1 mais codé par un gène indépendant (Dumoutier et al., 2001; Kotenko et al., 2001). L'IL-22BP fixe l'IL-22 avec une très forte affinité, empêchant ainsi la liaison de la cytokine à l'IL-22R1 (Jones et al., 2008; Logsdon et al., 2002). Ce récepteur soluble est exprimé de manière constitutive dans différents tissus dont les ganglions lymphatiques et l'intestin (Gruenberg et

Introduction

al., 2001; Weiss et al., 2004; Xu et al., 2001). La principale source cellulaire d'IL-22BP à l'état basal semble être un sous-type de DC conventionnelles (Huber et al., 2012b; Martin et al., 2013b). Plus spécifiquement, dans l'intestin des souris, l'IL-22BP est exprimé par des DC exprimant les marqueurs CD103 et CD11b (Martin et al., 2013b). Suite à des atteintes intestinales, l'IL-22 est sécrétée au niveau local et participe à la prolifération cellulaire, conduisant à terme à la réparation de la barrière épithéliale *via* STAT3. Dans ce contexte, l'IL-22BP semble jouer un rôle crucial dans le contrôle de la prolifération des cellules épithéliales en inhibant l'IL-22 lorsque l'intégrité des barrières épithéliales est restaurée. En effet, si l'IL-22 n'est pas contrôlée par l'IL-22BP après la phase de réparation, elle peut conduire à une prolifération anarchique des cellules épithéliales et contribuer ainsi à la croissance tumorale (Huber et al., 2012b). Chez l'homme, l'IL-22BP est également exprimé par des DC et son expression décroît fortement sous l'influence de l'IL-18 et lors de la maturation des DC (Huber et al., 2012b; Martin et al., 2013b).

5) Fonctions biologiques: entre réparation et inflammation

L'IL-22 est produite par les cellules immunitaires mais n'agit pas directement sur celles-ci. Elle régule les fonctions des cellules de certains tissus (Wolk et al., 2004) et peut participer à l'inhibition ou au contraire à l'induction de certaines pathologies. Les modèles animaux de ces maladies, associés à l'utilisation de souris invalidées pour l'IL-22 et l'administration d'anticorps neutralisants, ont permis d'identifier des rôles inflammatoires et protecteurs de l'IL-22.

a) Rôle protecteur

De manière générale, les propriétés protectrices de l'IL-22 sont dues aux fonctions biologiques cruciales de STAT3 dans les cellules cibles (Jarnicki et al., 2010; Wang et al., 2011). En effet, STAT3 induit l'activation cellulaire, la prolifération cellulaire et la survie cellulaire *via* l'expression de gènes anti-apoptotiques. Ainsi, l'IL-22 est responsable de l'homéostasie des muqueuses et de l'intégrité des barrières épithéliales, ce qui lui confère des propriétés régénératrices dans certains tissus.

Certains modèles murins suggèrent que l'IL-22 joue un rôle prépondérant dans la réparation intestinale. Par exemple, les souris invalidées pour l'IL-22 présentent une guérison de lésions au niveau du colon retardée par rapport aux souris sauvages (Brand et al., 2006; Pickert et al., 2009). De plus, dans d'autres modèles de colites induites par le

Introduction

sulfate de dextran (impliquant les cellules de la réponse innée) ou par transfert de LT CD4+CD45RB^{high}CD25+ (impliquant la voie Th1): les souris invalidées pour l'IL-22 présentent une forte perte de poids, des changements morphologiques sévères ainsi qu'une mortalité accrue (Sugimoto et al., 2008; Zenewicz et al., 2008). Ensuite, dans un modèle murin de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (impliquant la voie Th2), l'IL-22 peut être thérapeutique: le transfert du gène *Il22* dans le colon des souris est associé à une diminution de l'inflammation (Sugimoto et al., 2008).

Un autre effet important de l'IL-22 au niveau intestinal est l'induction de l'expression de mucines, protéines formant une couche protectrice permettant de limiter les interactions entre la flore microbienne et les cellules de l'hôte (Sugimoto et al., 2008). De plus, l'IL-22 participe à la lutte contre les pathogènes extracellulaires. Elle induit la sécrétion de plusieurs protéines antimicrobiennes par les cellules épithéliales comme les « Regenerating islet-derived protein » Reg3 γ et Reg3 β impliquées dans la protection contre les bactéries pathogènes (Sonnenberg et al., 2011).

L'IL-22 participe à la réparation des tissus hépatiques après hépatectomie partielle mais aussi à la réparation des lésions induites par l'alcool (Xing et al., 2011). En effet, dans les hépatocytes, l'IL-22 active les voies anti-apoptotiques, augmentant ainsi la survie de ces cellules. Dans la souris, le transfert de Th17 produisant de l'IL-22 réduit la sévérité de l'hépatite (Radaeva et al., 2004; Zenewicz et al., 2007). L'IL-22 favorise la régénération du foie après lésions d'ischémie-reperfusion (Chestovich et al., 2012), ainsi que dans la lipogenèse et la stéatose hépatique induite par un régime gras (Ren et al.; Sharif et al.; Yang et al.) mais également dans des modèles d'intoxication au paracétamol (Scheiermann et al., 2013).

Au niveau pulmonaire, l'IL-22 semble protectrice dans des modèles de lésions induites par ventilation mécanique (Hoegl et al., 2011). De plus, les LT $\gamma\delta$ exprimant l'IL-22 sont importants pour la protection contre la fibrose pulmonaire (Simonian et al., 2010). En absence d'IL-22, les souris présentent plus de fibrose et l'administration d'IL-22 recombinante réduit la production de collagène.

Au niveau cutané, des tests *in vitro* ont montré que le traitement de kératinocytes par l'IL-22 favorisait la réparation après lésion (Eyerich et al., 2009). De plus, l'IL-22 participe à la défense antimicrobienne en induisant des protéines de la famille S100 comme S100A7, S100A8 et S100A9 qui séquestrent des éléments essentiels aux bactéries tels que le zinc et le fer. Elle induit également des β -défensines capables de déstabiliser les membranes bactériennes (Wolk et al., 2004).

Introduction

Au final, l'IL-22 semble essentielle au maintien de l'intégrité des barrières épithéliales et à la réparation tissulaire consécutive aux lésions d'origines diverses. Une étude a montré que l'IL-22 pouvait induire la sécrétion d'IL-10 anti-inflammatoire qui joue un rôle crucial dans la régulation de l'inflammation locale (Nagalakshmi et al., 2004).

Comme l'administration d'IL-22 à des souris saines ne semble induire ni inflammation aiguë ni immunosuppression sévère (Scheiermann et al., 2013; Wolk et al., 2004), les données actuelles suggèrent l'utilisation de cette cytokine à court terme en thérapie visant à la protection et à la régénération tissulaire. Récemment, un essai clinique de phase I caractérisant l'innocuité de l'administration d'IL-22 à des volontaires sains a été initié (Muhl, 2013).

b) Rôle inflammatoire

Malgré ses propriétés protectrices, l'IL-22 est également connue pour son effet délétère dans certaines maladies inflammatoires chroniques, au cours desquelles sa surexpression systémique est corrélée avec la sévérité de la maladie.

Tout d'abord, l'IL-22 ne présente aucune propriété anti-inflammatoire directe. En effet, l'administration d'IL-22 dans un modèle d'endotoxémie n'inhibe pas la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IFN- γ durant les phases précoce c'est-à-dire jusqu'à 8h après l'induction de la maladie (Scheiermann et al., 2013). De plus, lors d'une endotoxémie plus prolongée, c'est-à-dire 16h après l'administration de l'endotoxine, les souris invalidées pour l'IL-22 présentent une mortalité réduite. Cette étude démontre que l'IL-22 peut prendre part à l'inflammation systémique prolongée (Dumoutier et al., 2011).

Cette notion est également illustrée par une étude dans laquelle les auteurs ont utilisé des souris transgéniques qui exprimaient artificiellement le récepteur à l'IL-22 à la surface de leurs lymphocytes. Ces souris se développent normalement cependant elles présentent une inflammation systémique multi-organe entre 2 et 3 mois après leur naissance (Savan et al., 2011).

Plus spécifiquement, l'IL-22 participe à la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde durant laquelle le taux d'IL-22 sérique est corrélé avec la sévérité de la maladie (Leipe et al., 2011). De plus, l'IL-22 augmente la prolifération des fibroblastes synoviaux et induit la sécrétion de la chimiokine pro-inflammatoire MCP1 et l'expression du récepteur RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand), un ligand qui active les ostéoblastes

Introduction

in vitro (Ikeuchi et al., 2005). L'augmentation de l'ostéoclastogénèse conduirait directement à la destruction osseuse des articulations (Kim et al., 2012). D'autre part, dans un modèle murin d'arthrite induite par le collagène, l'incidence de la maladie est diminuée dans les souris invalidées pour l'IL-22, que ce soit au niveau clinique (gonflement, rougeur) ou histologique (formation de pannus, destruction osseuse). Cette moindre sévérité est associée à une diminution de l'expression synoviale de l'IL-1 β , l'IL-6, du TNF- α et de la métalloprotéinase de matrice 9 (MMP9) (Geboes et al., 2009). Plus récemment, une étude a montré le rôle pathogène de l'IL-22 dans la spondylarthrite ankylosante (Sherlock et al., 2012).

Le psoriasis est un autre exemple de maladie auto-immune dans laquelle l'IL-22 est pathogène. En effet, l'IL-22 est un médiateur clé dans la phase finale de la maladie, durant laquelle il y a formation de lésions au niveau des kératinocytes. Ainsi, une forte expression de l'ARNm de l'IL-22 est retrouvée dans les lésions cutanées des patients alors qu'aucune expression n'est détectée dans la peau de donneurs sains (Boniface et al., 2007). Le taux sérique d'IL-22 est encore une fois corrélé avec la sévérité de la maladie (Wolk et al., 2006). Dans les modèles animaux, le blocage ou le déficit en IL-22 est associé à une amélioration du psoriasis expérimental (Van Belle et al., 2012). Par exemple, l'application cutanée répétée d'IL-23 n'induit pas de dermatose et limite l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans la peau lésée lorsque les souris sont invalidées pour l'IL-22 (Zheng et al., 2007). De plus, des études récentes dans la souris démontrent que les LT sont la principale source d'IL-22 dans ce contexte. Ainsi, dans un autre modèle murin de psoriasis induit par transfert de LT, la neutralisation de l'IL-22 réduit la dermatose, l'infiltrat inflammatoire et l'expression de certaines cytokines (Ma et al., 2008). Enfin, les souris transgéniques surexprimant l'IL-22 développent des lésions cutanées apparentées au psoriasis (Wolk et al., 2009). Les effets majeurs de l'IL-22 au niveau cutané consistent à la différenciation des kératinocytes et à l'induction de molécules pro-inflammatoires telles que CXCL5, l'IL-20 et les MMP1 et MMP3 (Boniface et al., 2005; Nograles et al., 2008; Sabat and Wolk, 2011). L'ensemble des données actuelles suggère que le blocage de l'IL-22 peut être une piste de thérapie intéressante chez les patients atteints de psoriasis.

Les connaissances actuelles sur le rôle de l'IL-22 dans les infections sont peu nombreuses et fragmentées. Alors qu'elle est habituellement protectrice au niveau hépatique, l'IL-22 participe à la sévérité des infections expérimentales par le virus de l'hépatite B en induisant l'expression des chimiokines CXCL9 et CXCL10 (Zhang et al., 2011). De la même façon, l'IL-22 semble pathogène dans des modèles d'infection par le virus West Nile en induisant l'expression de chimiokines telles que CXCL1 et CXCL5 au niveau cérébral (Wang et al., 2012). A l'inverse, l'IL-22 semble protectrice lors de l'infection

Introduction

par le virus de la grippe A (Kumar et al., 2013; Paget et al., 2012) probablement par la capacité importante de cette cytokine à préserver l'intégrité des muqueuses pulmonaires (Aujla et al., 2008; Hoegl et al., 2011).

L'IL-22 semble aussi pro-inflammatoire dans les infections parasitaires. En effet, l'infection à *Toxoplasma gondii* dans la souris entraîne une sévère iléite, et un taux de mortalité élevée qui est dépendante de l'IL-23 et de la production de MMP2. L'infection est contrôlée mais non éradiquée par la voie Th1 et persiste en formant des kystes principalement dans le cerveau. Une première étude, dans laquelle le parasite est administré oralement aux souris, démontre l'effet délétère de l'IL-22 dans l'inflammation de l'iléon. Le déficit en IL-22 des souris receveuses est associé à une résistance au niveau de la pathologie intestinale ainsi qu'à une survie améliorée (Muñoz et al., 2009). Une autre étude démontre que la neutralisation de l'IL-22 par un anticorps diminue le développement de la maladie. L'amélioration constatée en absence d'IL-22 est accompagnée d'une diminution de l'expression de l'IL-17A, l'IL-17F et du TNF- α au niveau intestinal et de l'expression de l'IL-17A, l'IL-17F et l'arginase-1 dans les ganglions mésentériques (Wilson et al., 2010).

Au final, les effets de l'IL-22 semblent donc être pathogènes ou protecteurs selon le contexte inflammatoire, la localisation et la nature du tissu affecté ainsi que le milieu cytokinique environnant.

Objectifs de la thèse

Ce travail s'inscrit dans la thématique du laboratoire qui a pour but d'étudier la relation hôte-greffon, et d'analyser les mécanismes intervenant dans la régulation de la réponse allogénique post-transplantation.

La maladie du greffon contre l'hôte reste une complication sévère après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. La compréhension des réponses immunologiques mises en jeu lors du développement de la maladie représente un enjeu majeur et pourrait aboutir à de nouvelles pistes thérapeutiques.

Les objectifs de ce travail sont de définir le rôle de l'IL-22 issue du donneur dans la physiopathologie de la GVHD. Pour cela, nous utiliserons des modèles murins expérimentaux d'allo-CSH et nous investiguerons l'influence de l'IL-22 sur l'inflammation associée à la GVHD. Nous étudierons les mécanismes par lesquels l'IL-22 participe à la GVHD et notamment son influence sur l'intestin et la flore bactérienne au cours de l'allo-CSH.

Résultats

Article 1: Implication de l'IL-22 issue du greffon dans la GVHDA

De nombreux travaux ont démontré que les différentes sous populations de LT allogéniques issus du donneur et leurs cytokines associées étaient impliquées dans la physiopathologie de la GVHDA (voir Introduction). L'IL-22 est une cytokine de la famille de l'IL-10 et est sécrétée par les LT $\gamma\delta$, Th1, Th17, Th22, et cellules lymphoïdes de l'immunité innée (ILC), notamment dans les maladies inflammatoires de l'intestin et de la peau. Le récepteur de l'IL-22 étant majoritairement exprimé par les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal, formant un des principaux tissus cibles de la GVHDA, nous avons postulé que l'IL-22 issue du greffon pouvait avoir un rôle important dans la GVHDA. C'est ce qui fait l'objet de cette première partie du travail de thèse dont les résultats sont présentés dans l'article suivant publié dans Leukemia en 2013.



ORIGINAL ARTICLE

IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect

M Couturier^{1,2,3,8}, B Lamarthée^{1,2,3,9}, J Arbez^{1,2,3}, J-C Renaud⁴, C Bossard⁵, F Malard^{6,7}, F Bonnefoy^{1,2,3}, M Mohty^{6,7}, S Perruche^{1,2,3}, P Tibergien^{1,2,3}, P Saas^{1,2,3} and B Gaugler^{1,2,3}

Acute graft-versus-host disease (aGVHD) remains a major complication following allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT), limiting the success of this therapy. Many proinflammatory cytokines secreted following the conditioning regimen have been linked to aGVHD initiation. Interleukin-22 (IL-22) is a cytokine related to IL-10 for its structure and is secreted by T helper type 17 (TH17) cells and innate immune cells. Given the paradoxical role of IL-22 in inflammation with both protective or proinflammatory functions, we investigated whether IL-22 could have a role in aGVHD pathophysiology in a mouse allo-HCT model. In this study, we show that IL-22 deficiency in donor T cells can decrease the severity of aGVHD, while limiting systemic and local inflammation in aGVHD target organs. In addition, we found that Foxp3+ regulatory T cells (Treg cells) were increased in recipient mice that received IL-22-deficient T cells, suggesting that Treg were involved in the reduced severity of GVHD. Finally, we found that the graft-versus-leukemia (GVL) effect mediated by donor T cells was preserved in the absence of IL-22. Overall, these data suggest that targeting of IL-22 may represent a valid approach towards decreasing aGVHD severity after allo-HCT while preserving the GVL effect.

Leukemia advance online publication, 5 March 2013; doi:10.1038/leu.2013.39

Keywords: IL-22; GVHD; transplantation

INTRODUCTION

Acute graft-versus-host disease (aGVHD) remains a major complication following allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT), limiting the success of this therapy.^{1,2} GVHD is the result of alloreactive donor T cells attacking host tissues, including, but not limited to, the skin, liver and gut.³ Many proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-12 and interferon (IFN)- γ secreted following the conditioning regimen have been linked to aGVHD initiation and pathophysiology.^{4–6} More recently, we and others reported that T helper type 17 (TH17)-related cytokines (especially IL-17A and IL-21) can contribute to aGVHD pathophysiology.^{7–10} IL-22 is a cytokine structurally related to the IL-10 family and is secreted by TH17 cells, $\gamma\delta$ T cells, natural killer cells and innate lymphoid cells (ILC).^{11–13} The IL-22 receptor (IL-22R) is mainly expressed by non-hematopoietic cells, including epithelial cells of the lung and of the gastrointestinal tract as well as keratinocytes,^{14,15} found in the sites of aGVHD. *In vitro* studies showed that IL-22 can activate Stat3 (signal transducer and activator of transcription factor 3) inducing the expression of antimicrobial molecules S100A7, S100A8, S100A9 and β -defensins in keratinocytes.^{14,16,17} IL-22 can have either a protective or a pathogenic role in chronic inflammatory diseases depending on the nature of the affected

tissue and the local cytokine milieu. IL-22 has been shown to be protective in several colitis models.^{18–20} By contrast, it has been reported that IL-22 is associated with the pathogenesis of rheumatoid arthritis²¹ or in the development of psoriasis.^{14,22} Given the broad activity of IL-22, we hypothesized that donor-derived IL-22 could contribute to aGVHD pathophysiology. Thus, we examined the contribution of donor-derived IL-22 to aGVHD in experimental mouse models of allo-HCT using IL-22-deficient mice. We found that donor-derived IL-22 has a key role in exacerbating the inflammation in the gastrointestinal tract and contributes to the severity of aGVHD but does not significantly interfere with the graft-versus-leukemia (GVL) effect.

MATERIALS AND METHODS

Mice

BALB/c (H-2^d) and B6D2F1 (H-2^{b/d}) mice were purchased from Janvier (Genest-St-Isle, France). C57BL/6 IL-22^{−/−} (B6.IL-22^{−/−}, H-2^b) which were originally generated in the 129 background and were subsequently backcrossed with C57BL/6 for 13 generations, and C57BL/6 (B6.WT, H-2^b) mice were provided by J.C. Renaud (Ludwig Institute for Cancer Research, Brussel, Belgium). We next maintained breeding colonies in our animal facility. All mice were used at 8–12 weeks of age. All protocols were

¹INSERM UMR1098, Besançon, France; ²Université de Franche-Comté, UMR 1098, Besançon, France; ³EFS Bourgogne Franche-Comté, UMR 1098, Besançon, France; ⁴Ludwig Institute for Cancer Research and Experimental Medicine Unit, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium; ⁵EA 4273 Biometadys, Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France; ⁶Service d'Hématologie Clinique, CHU and Université de Nantes, Nantes, France and ⁷INSERM CRNCA UMR892, Nantes, France. Correspondence: Dr B Gaugler, INSERM UMR1098, EFS Bourgogne Franche-Comté, 1 Bd A Fleming, Besançon Cedex F-25020, France. E-mail: beatrice.gaugler@efs.sante.fr

⁸These authors contributed equally to this work.

Received 1 October 2012; revised 20 January 2013; accepted 6 February 2013; accepted article preview online 12 February 2013

performed according to the approval of the 'Services Vétérinaires de la Santé et de la Protection Animale' delivered by the Ministry of Agriculture (Paris, France).

Hematopoietic cell transplantation procedures

Recipient mice were conditioned with total body irradiation administered at a single lethal dose on day -1 at 1100 cGy (B6D2F1) or 750 cGy (BALB/c). To induce aGVHD in BALB/c recipients, mice were transplanted with 5×10^6 allogeneic T-cell-depleted bone marrow (TCD BM) from B6.WT or 1×10^6 allogeneic donor splenic T cells from B6.WT or B6.II-22^{-/-} mice. Syngeneic control mice were obtained by transferring 1×10^6 splenic T cells from BALB/C mice. T-cell depletion was performed using the CD3 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) and purified populations of donor T cells were obtained using the Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Treg (regulatory T cells; CD25)-T-cell depletion was performed using CD25-PE and anti-PE microbeads and AutoMacsPro (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. The purity of TCD BM and T cells in all the experiments exceeded 95%. CD25-depleted T cells' purity were, respectively, $98.2 \pm 1.6\%$ for WT T cells and $98.2 \pm 2.1\%$ for IL-22^{-/-} T cells. To induce aGVHD in B6D2F1 recipients, mice were transplanted with allogeneic splenocytes (10×10^6 cells, B6.WT or B6.II-22^{-/-}) or syngeneic splenocytes (10×10^6 cells, B6D2F1) isolated from donor mice previously treated by subcutaneous injection of $10 \mu\text{g}/\text{animal}$ recombinant human granulocyte colony-forming factor (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) on day -5. Cells were injected in the lateral tail vein.

GVL effect analysis

To examine the GVL effect, 5×10^5 luciferase-expressing A20 leukemic cells (A20-luc, H-2^d) were given along with TCD BM in BALB/c recipients. Mice received 750 cGy total body irradiation on day -1. Delayed allogeneic T-cell infusions (1.10^6 T B6.WT or B6.II-22^{-/-}) were given on day 7 after allo-HCT. For GVL effect assessment by bioluminescence imaging (BLI), mice were injected intravenously with 150 µg/g body weight E-luciferin (Promega, Lyon, France) diluted in phosphate-buffered saline and anesthetized using isoflurane (2.5% vaporized in O₂). For analysis, imaging was done 5 min later using NightOWL I imaging system (Berthold Technologies GmbH and Co. KG, Bad Wildbad, Germany) and total photon flux (photons per second) was measured from a fixed region of interest over the entire abdomen and thorax using WinLight software (Berthold Technologies). BLI was performed 1 day before and 3 days after delayed donor T-cell infusions, then once every week until day 40 after allo-HCT.

Assessment of GVHD

The degree of systemic aGVHD was assessed by a scoring system that sums changes in five clinical parameters: weight loss, posture (hunching), activity, fur texture and skin integrity (maximum index = 10), as previously described.²³ Recipient mice were graded weekly from 0 to 2 for each criterion without knowledge of the treatment group. Animals with severe clinical aGVHD (scores > 6) were killed according to ethical guidelines. For histological analyses, samples of the skin, small and large intestine were removed immediately after killing, and fixed in 4% formalin. Paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin. The histological grade of skin aGVHD was assessed according to the grading system, used routinely to assess the human skin aGVHD:²⁴ grade 1, focal or diffuse vacuolar alteration of the basal cell layer; grade 2, grade 1 change plus dyskeratotic squamous cell in the epidermis; grade 3, grade 2 plus subepidermal vesical formation; and grade 4, complete separation of the epidermis from the dermis. The histological grade of small and large intestine aGVHD was assessed according to the grading system previously described.²⁵ Scores were determined in a blinded fashion by two pathologists.

Flow cytometry analysis

At designated time points, animals were killed and organs were collected. Single-cell suspensions of the spleen, peripheral (PLN) and mesenteric lymph nodes (MLN) were prepared passing through sterile mesh filters. For detection of cytokine production, cells were stimulated for 6 h with 25 ng/ml phorbol-12-myristate-13-acetate (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and 1 µg/ml ionomycin (Sigma-Aldrich), with 1 µl/ml Golgi Plug (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France) before staining for flow cytometric analysis. Cells were first stained with eFluor780 Fixable Viability Dye (eBioscience, Paris,

France) according to the manufacturer's instructions. Surface staining was performed using FITC (fluorescein isothiocyanate)-conjugated CD3 (from BD Biosciences), Pacific Blue-CD4 and PE-CD8 antibodies (from Biolegend, Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France); cells were then fixed and permeabilized using CytoFix/Perm Buffer (BD Biosciences) before staining with PE/Cy7-IFN-γ, PercP/Cy5.5-TNF-α (Biolegend) and APC (allophycocyanin)-IL-17A- (eBioscience) specific antibodies or the corresponding isotype controls. For the detection of IL-22-secreting cells, cells were stained with Horizon V500-conjugated CD3 (from BD Biosciences), Pacific Blue-CD4 and PercP-CD8 antibodies (from Biolegend, Ozyme), cells were then fixed and permeabilized using CytoFix/Perm Buffer (BD Biosciences) before staining with PE/Cy7-IFN-γ (Biolegend), PE-IL-22 and APC-IL-17A- (eBioscience) specific antibodies or the corresponding isotype controls. Analysis was performed using FACSCount II and FACSDiva software (BD Biosciences). Treg cell analysis was performed by cell surface staining with FITC-CD3, Pacific Blue-CD4 (from Biolegend) and APC-CD25 (from BD Biosciences), cells were then fixed and permeabilized with Foxp3 Staining Buffer set (eBioscience) and stained with PE-Foxp3 (clone FKJ16, eBioscience).

Real-time PCR analysis

Before RNA extraction, tissue samples were homogenized using FastPrep-24 system (MP Biomedicals Europe, Illkirch, France). RNA was extracted using RNeasy Mini kit (Qiagen, Cergy-Pontoise, France) with RLT buffer (Qiagen) supplemented with β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Total RNA was subjected to reverse transcription (High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and quantified by real-time quantitative PCR using commercially available primer/probe sets (Assay On Demand, Applied Biosystems). Real-time PCR were performed on the iCycler CFX96 real-time PCR system (Life Science, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Relative expression for the mRNA transcripts was calculated using the ΔΔCt method and G6PDH mRNA transcript as reference.

Cytokines measurements

Blood samples were obtained from recipient mice at day 6 after allo-HCT. Cytokines were quantified in plasma using BD cytometric bead array kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. TNF-α and IL-22 levels in cell culture supernatants were measured using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits (Biolegend) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Group comparisons of cell populations, gene expression, cytokine levels and pathology scores data were performed using the Student's t-test. Survival curves were compared using the log-rank test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant in all the experiments. Data were computed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Absence of IL-22 in donor T cells decreases acute GVHD severity

To examine the contribution of IL-22 produced by donor T cells in regulating development of aGVHD, we induced aGVHD by transferring T cells from wild-type C57BL/6 (B6.WT) or IL-22-deficient C57BL/6 (B6.II-22^{-/-}) mice with TCD BM into lethally irradiated allogeneic BALB/c-recipient mice. The absence of IL-22 in donor T cells led to a reduction from aGVHD-induced mortality as compared with recipients receiving WT allogeneic T cells (median survival time 12 versus 34 days, $P < 0.0001$; Figure 1a) and to a reduced morbidity as shown by a significant lower clinical score up to day 24 (clinical aGVHD score on day 12 following allo-HCT: WT T cells 4.17 ± 0.33 versus IL-22^{-/-} T cells 1.11 ± 0.36 , $P < 0.0001$, Figure 1b). Furthermore, we observed that the severity of aGVHD assessed by histological grade was significantly reduced in the skin and small intestine and colon of mice that received IL-22-deficient donor T cells compared with mice that received WT donor T cells (Figures 1c-f). As expected, we observed a significant increase of pathological scores in tissues from mice receiving allogeneic T cells as compared with syngeneic T cells. By contrast,

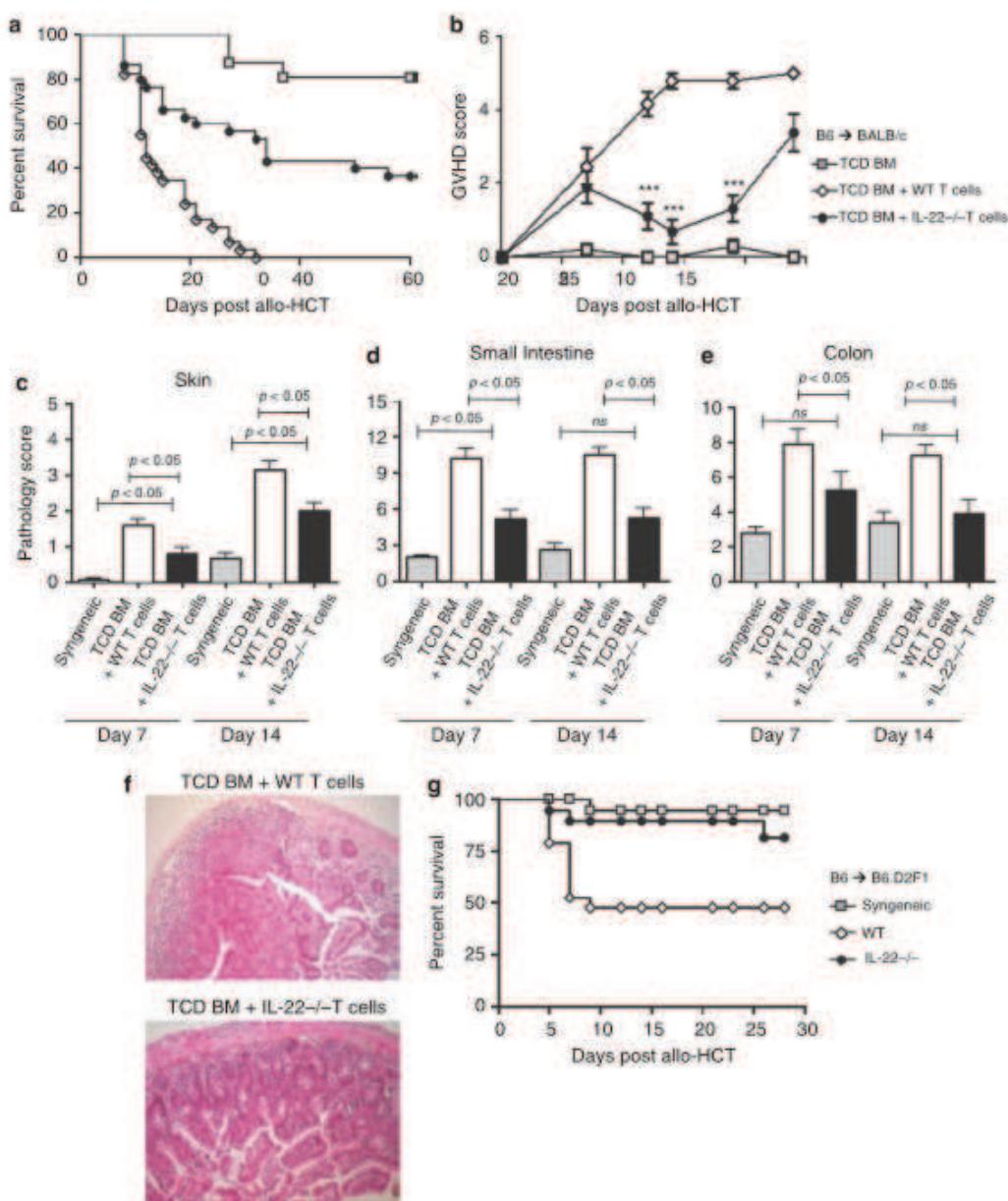


Figure 1. Absence of T-cell-derived IL-22 decreases acute GVHD severity. Lethally irradiated BALB/c recipients were transplanted with 5×10^6 B6.WT TCD BM only or with 1×10^6 B6.WT T cells or 1×10^6 B6.IL22^{-/-} T cells ($n = 30$ per group and five independent experiments). (a) Survival data are shown (log-rank test, $P < 0.0001$ for B6.TCD BM + B6.WT T cells versus B6.IL22^{-/-} T cells). (b) GVHD clinical scores were determined as described in Methods and were decreased in B6.TCD BM + B6.IL22^{-/-} T-cell recipients, at days 12, 14 and 19 post allo-HCT, $P < 0.0001$. (c–e) Pathology scores in the skin, small intestine and colon in mice 7 and 14 days after allo-HCT. Data are presented as the mean \pm s.e.m. from cumulative results from three experiments for day 7 and two experiments for day 14. Scores are significantly different between the syngeneic groups and the TCD BM + WT T cells groups ($P < 0.05$). P-values are indicated on the graphs for comparison between the groups of syngeneic and TCD BM + WT T cells or between TCD BM + WT T cells and TCD BM + IL-22^{-/-} T cells. (f) A representative example of the section of the small intestine of BALB/C mice transplanted with TCD BM and B6.WT T cells or B6.IL22^{-/-} T cells at day 7 ($\times 20$ magnification). Intestinal mucosa of TCD BM + B6.WT T-cell recipient mice was characterized by an increased number of mononuclear inflammatory cells with extensive crypt loss and an increased number of apoptotic epithelial cells in resting crypts. Non-inflammatory intestinal mucosa was characterized by a normal architecture without crypt loss. Only some apoptotic epithelial cells were individualized in the bottom of some crypt. (g) Splenocytes from granulocyte colony-forming factor mobilized B6.WT or B6.IL22^{-/-} donor mice or syngeneic B6.D2F1 as control were transplanted into lethally irradiated B6.D2F1-recipient mice ($n = 12$ per group). Survival data are shown (log-rank test, $P < 0.01$ for B6.WT versus B6.IL22^{-/-} splenocytes).

for small intestine and colon, no significant differences were detected between mice receiving syngeneic T cells and IL-22^{-/-} T cells, reflecting the reduced severity of aGVHD induced by IL-22^{-/-} T cells. Moreover, we also observed a reduction in aGVHD-induced mortality in another aGVHD model²⁶ consisting of transplanting lethally irradiated B6D2F1-recipient mice with donor splenocytes from B6.WT or B6.IL-22^{-/-} mice that have received subcutaneous injections of granulocyte colony-forming factor (median survival: 9 days versus a median survival not reached, log-rank test $P < 0.01$; Figure 1g). In this model, in which lethality related to GVHD was reduced as compared with the B6 → BALB/C model, we confirmed the decreased severity of aGVHD in the absence of IL-22 from donor cells. These data demonstrated that

IL-22 deficiency in donor T cells reduced aGVHD mortality and decreased aGVHD severity after allo-HCT, suggesting a potential pathological role of IL-22 in this allo-HCT setting.

Absence of T-cell-derived IL-22 leads to a reduction of inflammatory CD8 T cells in lymphoid organs

To investigate the contribution of T effector cell subsets in the development of aGVHD, we examined the proportion of CD4+ and CD8+ T cells in the spleen, PLN and MLN of recipient mice at day 6 after allo-HCT. As shown in Figure 2, absolute splenocytes and CD3+ T-cell numbers were decreased in recipient mice receiving B6.IL-22^{-/-} T cells as compared with mice receiving

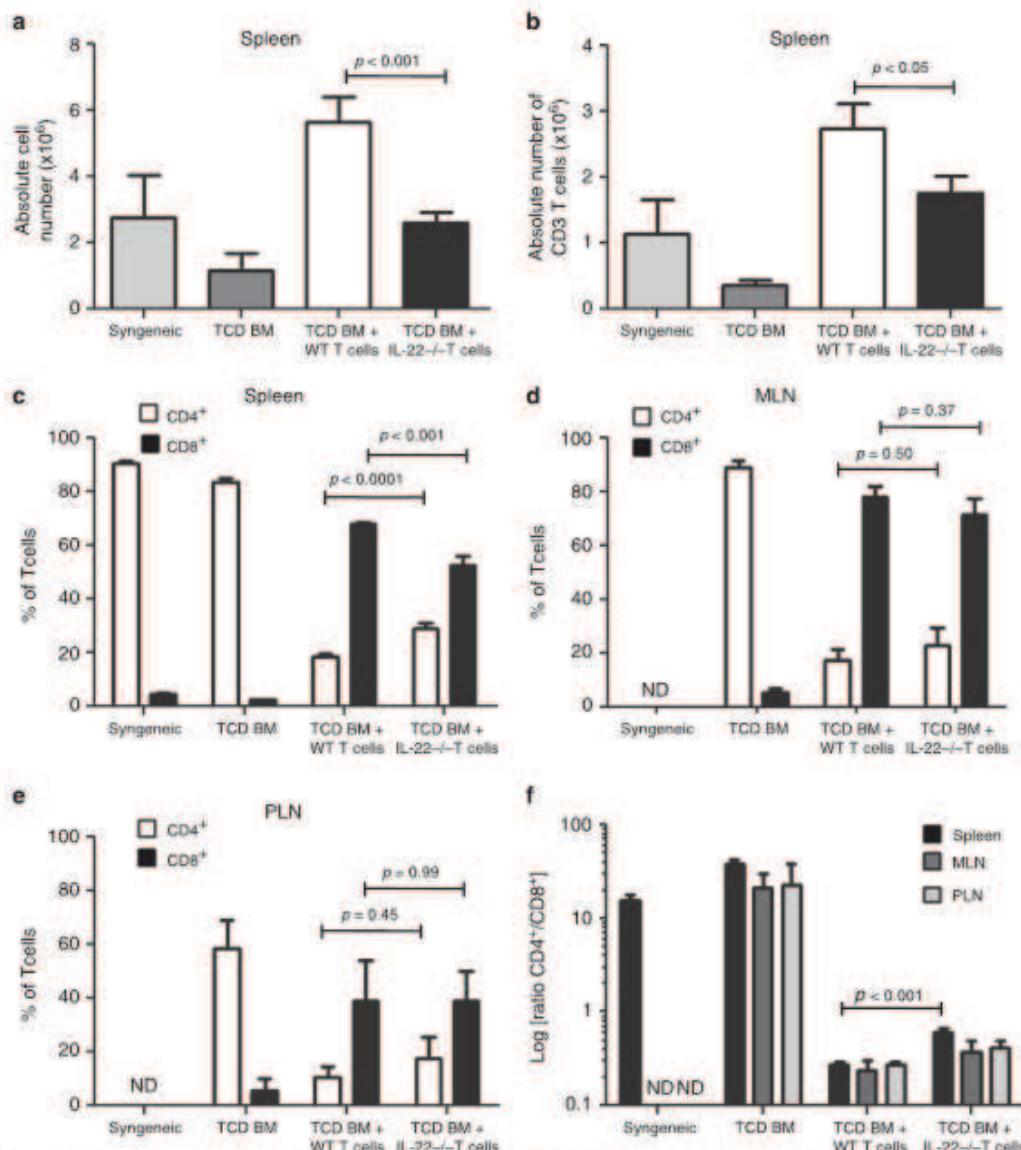


Figure 2. Absence of T-cell-derived IL-22 leads to decreased splenic CD8+ T cells. Lethally irradiated BALB/c recipients were transplanted with B6 TCD BM only or with B6.WT T cells or B6.IL-22^{-/-} T cells. Syngeneic controls were transplanted with BALB/c TCD BM and BALB/c T cells. Splenocytes, MLN and PLN from recipient mice were harvested at day 6 post allo-HCT. Absolute numbers of (a) total splenocytes and (b) CD3+ T cells are shown. The proportion of CD4+ and CD8+ T cells in the (c) spleen, (d) MLN and (e) PLN were analyzed by flow cytometry. Mean ± s.e.m. is shown ($n = 12$) and data are combined from at least three independent experiments. (f) CD4+/CD8+ ratio is indicated. ND, not determined.

B6.WT T cells (Figures 2a and b). Also, the proportion of CD8+ T cells was significantly decreased in the spleen, but not in MLN and PLN, of recipient mice receiving B6.IL-22^{-/-} T cells as compared with mice receiving B6.WT T cells (Figures 2c–e), leading to an increased CD4/CD8 T-cell ratio (Figure 2f, $P < 0.001$ in spleen). These differences observed *in vivo* were not related to an attenuated proliferative capacity of IL-22^{-/-} T cells, as demonstrated by similar *in vivo* proliferation assessed by CFSE (carboxy-fluorescein succinimidyl ester) staining (Supplementary Figure S1), as well as *in vitro* proliferation in response to the stimulation by anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Supplementary Figure S2A and B). We also observed a trend towards an increased CD4/CD8 ratio in the PLN and MLN of B6.IL-22^{-/-} T cell allo-HCT-recipient mice (Figure 2f).

We next investigated the profile of cytokines secreted by alloreactive T cells post allo-HCT. We observed that IL-22 secretion was induced in splenocytes as well as in cells isolated from MLN (Figure 3a) from B6.WT T-cell recipients, but not from B6.IL-22^{-/-} T-cell recipients as expected, further suggesting that IL-22 contributes to aGVHD pathophysiology. In addition, we also observed that intracellular IL-22 staining was revealed in CD4+ T cells in the spleen and MLN in the B6.WT T-cell recipients, but not in syngeneic T-cell recipients, suggesting that IL-22 production resulted, at least in the spleen, from the alloreactive response of T cells (Figures 3b and c). Furthermore, IL-22 secretion was detected only after *ex vivo* restimulation of T cells (data not shown). We excluded that IL-22 was secreted by γδ T cells, because they were not detectable in the spleen and MLN after allo-HCT (data not shown). We next addressed whether the absence of IL-22 in donor T cells affected the generation of TH1 and TH17 cells *in vivo* 1 week after allo-HCT. We found no significant difference in IL-17A+ T cells among CD3+CD4+ splenocytes (Figure 3d), whereas a strong TH1 response was observed (Figures 3e and f). We could observe a trend for a decrease in the number of IFN-γ secreting CD8+ T cells in the spleen from B6.IL-22^{-/-} allo-HCT recipients as compared with B6.WT recipients (Figures 3e and f), suggesting that IL-22 indirectly could be involved in the modulation of the TH1 response. Nevertheless, we did not observe differences in the capacity of T cells isolated from the spleen of B6.WT or B6.IL-22^{-/-} mice and activated *in vitro* by anti-CD3/CD28 antibodies to secrete IFN-γ (Supplementary Figure S2C–E). The great majority of IL-22+ CD4+ T cells were also IFN-γ+ but not IL-17A+ (Supplementary Figure S3). We also analyzed the secretion of TNF-α by splenocytes isolated from allo-HCT recipients 1 week after allo-HCT. A significantly reduced number of TNF-α+ CD4+ and CD8+ T cells were detected in B6.IL-22^{-/-} recipients (Figures 3g and h, $P < 0.01$). Moreover, the level of TNF-α measured by enzyme-linked immunosorbent assay in the supernatant of splenocytes activated *in vitro* for 24 h by phorbol-12-myristate-13-acetate and ionomycin was significantly reduced in B6.IL-22^{-/-} recipients (Figure 3i, $P < 0.05$). Thus, the decreased TNF-α secretion could contribute to the diminished incidence of aGVHD in IL-22^{-/-} T-cell recipients.

Absence of T-cell-derived IL-22 leads to an expansion of Treg cells in lymphoid organs

As IL-22 deficiency in donor T cells resulted in reduced aGVHD, we analyzed whether inhibition of aGVHD involved a Treg-dependent mechanism. On day 6 after allo-HCT, we found a significant increase in the proportion of CD25+ Foxp3+ Treg among CD4+ T cells from the spleen (Figures 4a and b, $P < 0.005$) as well as an increase of the numbers of Treg in the spleen of B6.IL-22^{-/-} T-cell recipients as compared with B6.WT T-cell recipients (Figure 4c, $P < 0.005$), suggesting that the increase in Treg could contribute to the regulation of the alloreactive response. This difference was not due to a difference in the graft content because the numbers of Treg CD4+ CD25+ Foxp3+ were similar

in T cells from the spleen of B6.WT or B6.IL-22^{-/-} mice ($11.9\% \pm 0.7$ for WT Treg and $9.8\% \pm 1.1$ for IL-22^{-/-} Treg, $P = 0.21$). Moreover, we did not detect any differences in their suppressive capacity by evaluating *in vitro* using CD4+ CD25+ T cells stained with CFSE cultured in the presence of CD4+ CD25+ Treg isolated from B6.WT or B6.IL-22^{-/-} spleen cells (Supplementary Figure S4). To evaluate the contribution of Treg for the IL-22-mediated effects on aGVHD, we performed BMT experiments using CD25-depleted T cells from WT and IL-22^{-/-} donor mice. On day 6 after allo-HCT, the numbers of CD25+ Foxp3+ Treg among CD4+ cells were severely decreased in the groups of mice receiving CD25-depleted T cells (Figure 4c), suggesting that the majority of Treg observed at day 6 post allo-HCT resulted from the proliferation of natural Treg present in the graft. However, we could still observe an increase in the numbers of Treg in the spleen of B6.IL-22^{-/-} CD25-depleted T-cell recipients, as compared with B6.WT CD25-depleted T-cell recipients (Figure 4c, $P < 0.005$), suggesting that in the absence of IL-22, both expansion of natural Treg and conversion of naive CD4+ CD25+ T cells into induced Treg was more effective. We also observed that Treg cells were mainly of donor origin in the spleens of mice receiving B6.WT T cells. By contrast, the proportion of residual recipient Treg cells was significantly increased in mice receiving B6.IL-22^{-/-} T cells, suggesting that they were spared from the alloreactive response (Figure 4d). Finally, when we compared the survival of recipient mice infused with B6.WT CD25-depleted T cells versus B6.IL-22^{-/-} CD25-depleted T cells, we did not observe the beneficial effect of the absence of IL-22, suggesting that Treg cells were involved in the protection conferred by the absence of IL-22 in donor T cells (Figure 4e).

Absence of T-cell-derived IL-22 leads to a reduction of inflammatory mediators both systemically and in aGVHD target organs

To further investigate the underlying mechanism of reduced aGVHD severity in recipients of IL-22^{-/-} T cells, we studied the role of IL-22 in controlling the systemic and local inflammatory response. We evaluated inflammatory cytokine levels in the plasma of recipient mice during aGVHD. A significant decrease of TNF-α, IFN-γ and MCP-1 in the plasma was detected in the first week following allo-HCT with B6.IL-22^{-/-} T cells as compared with B6.WT T cells, whereas IL-6 level was unchanged (Figure 5). We detected neither IL-10 nor IL-12 in the plasma of treated mice (data not shown), suggesting that circulating IL-10, a negative regulator of inflammation, was not involved in the IL-22-deficiency-mediated decreased aGVHD severity.

We also examined the local inflammatory response induced in aGVHD target organs, the skin and the small intestine, given the fact that IL-22 has been associated with the pathogenesis of several inflammatory disorders in these organs. As shown in Figure 6, we observed a reduced expression of IFN-γ and the chemokines CXCL9 (C-X-C motif chemokine ligand 9), CXCL10, CXCL11 involved in the recruitment of TH1 lymphocytes, in the small intestine of allo-HCT recipients receiving B6.IL-22^{-/-} T cells. The expression of β-defensin 3 and cathelicidin, both known to be induced by IL-22, were also decreased in the skin of B6.IL-22^{-/-} T-cell allo-HCT recipients, thus likely contributing to a reduced recruitment of immune effector cells in GVHD target tissues. Expression of CXCL9 and IL-6 were also significantly reduced in the lung of B6.IL-22^{-/-} T-cell allo-HCT recipients, indicating that IL-22 deficiency reduced proinflammatory mediators in multiple organs after allo-HCT.

The GVL effect is preserved in donor IL-22-deficient T cells

Given the classical association between GVHD and GVL, we next sought to determine whether donor IL-22^{-/-} T cells were able to retain their capacity to control tumor growth in relation to the GVL

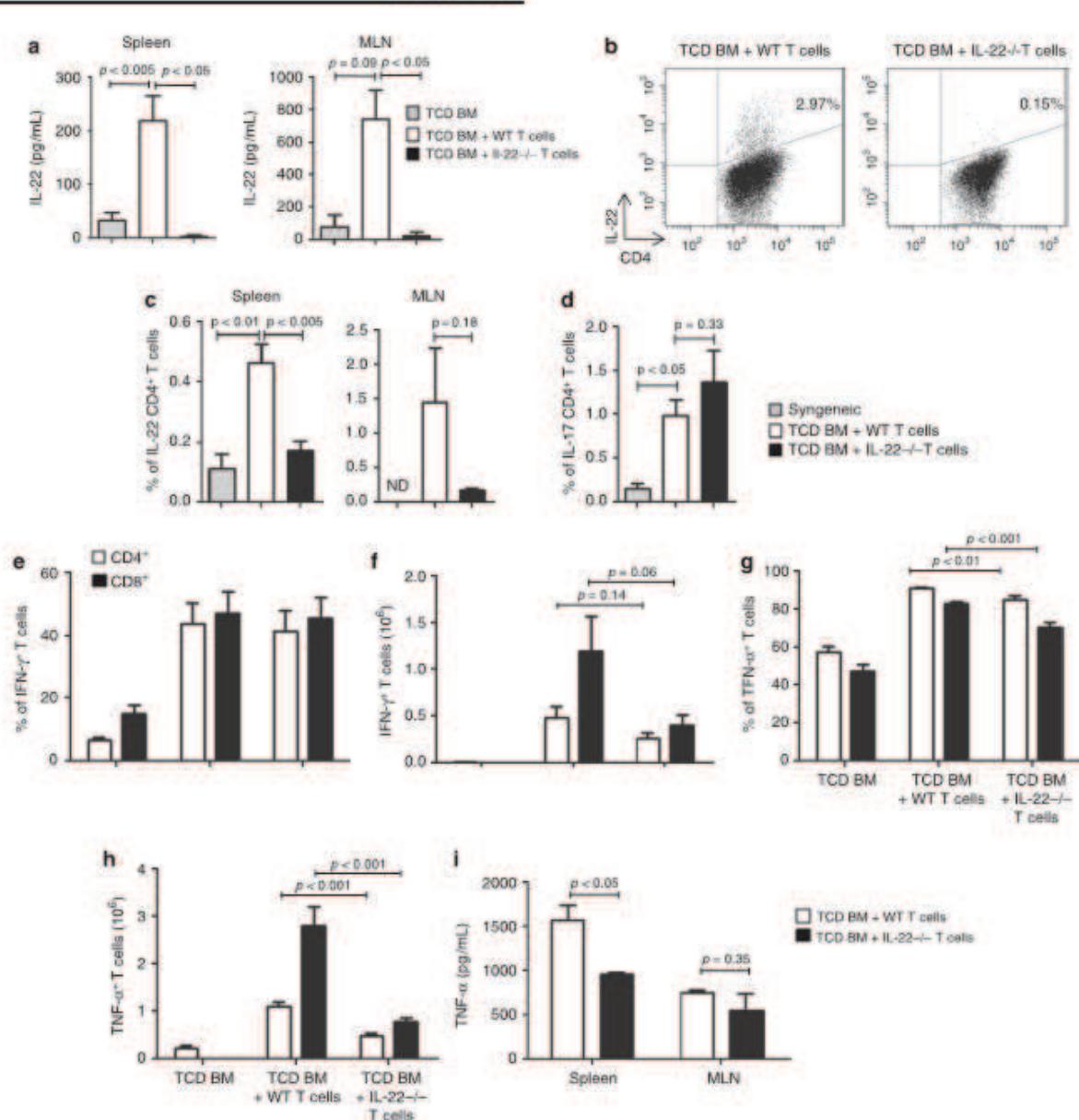


Figure 3. Absence of T-cell-derived IL-22 reduces secretion of inflammatory cytokines. Lethally irradiated BALB/c recipients were transplanted with BALB/c TCD BM with BALB/c T cells (syngeneic) or with B6 TCD BM only or with either B6.WT T cells or B6.IL-22^{-/-} T cells. Splenocytes and MLN cells were harvested at day 6 post allo-HCT. (a) IL-22 level was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the supernatant of splenocytes and MLN cells activated for 48 h with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and ionomycin. Mean ± s.e.m. are represented. (b, c) Splenocytes and MLN cells were activated for 6 h with PMA, ionomycin and Brefeldin A. Expression of IL-22 on gated CD3+CD4+ T cells is shown for a representative MLN sample (b) and mean ± s.e.m. of the percentages of IL-22+ CD4+ T cells in the spleen and MLN is represented (c). (d) Expression of IL-17A on gated CD3+CD4+ T cells in the spleen is represented, mean ± s.e.m. from three independent experiments. (e–i) Intracellular IFN-γ and TNF-α levels of splenic CD4+ and CD8+ T cells were analyzed. Mean ± s.e.m. of the percentage (e) and number (f) of T cells CD4+ and CD8+ secreting IFN-γ in the spleen is shown. Mean ± s.e.m. of the percentage (g) and number (h) of T cells CD4+ and CD8+ secreting TNF-α in the spleen is shown. Data are combined from three independent experiments ($n = 12$). (i) TNF-α level was measured by ELISA in the supernatant of splenocytes and MLN cells activated for 24 h with PMA and ionomycin. Mean ± s.e.m. is represented from three independent experiments.

effect expected in the context of allo-HCT. To this end, we administered A20-luc leukemia cells to allo-HCT-recipient mice, which were subsequently monitored *in vivo* by BLI. As shown in Figure 7, a strong signal was observed at day 30 in recipient mice

receiving TCD-BM and A20 cells, attesting for tumor growth (Figure 7a). By contrast, when recipient mice received both TCD-BM and A20 cells and then WT T cells, a low BLI signal was observed, indicating that tumor growth was controlled by WT T

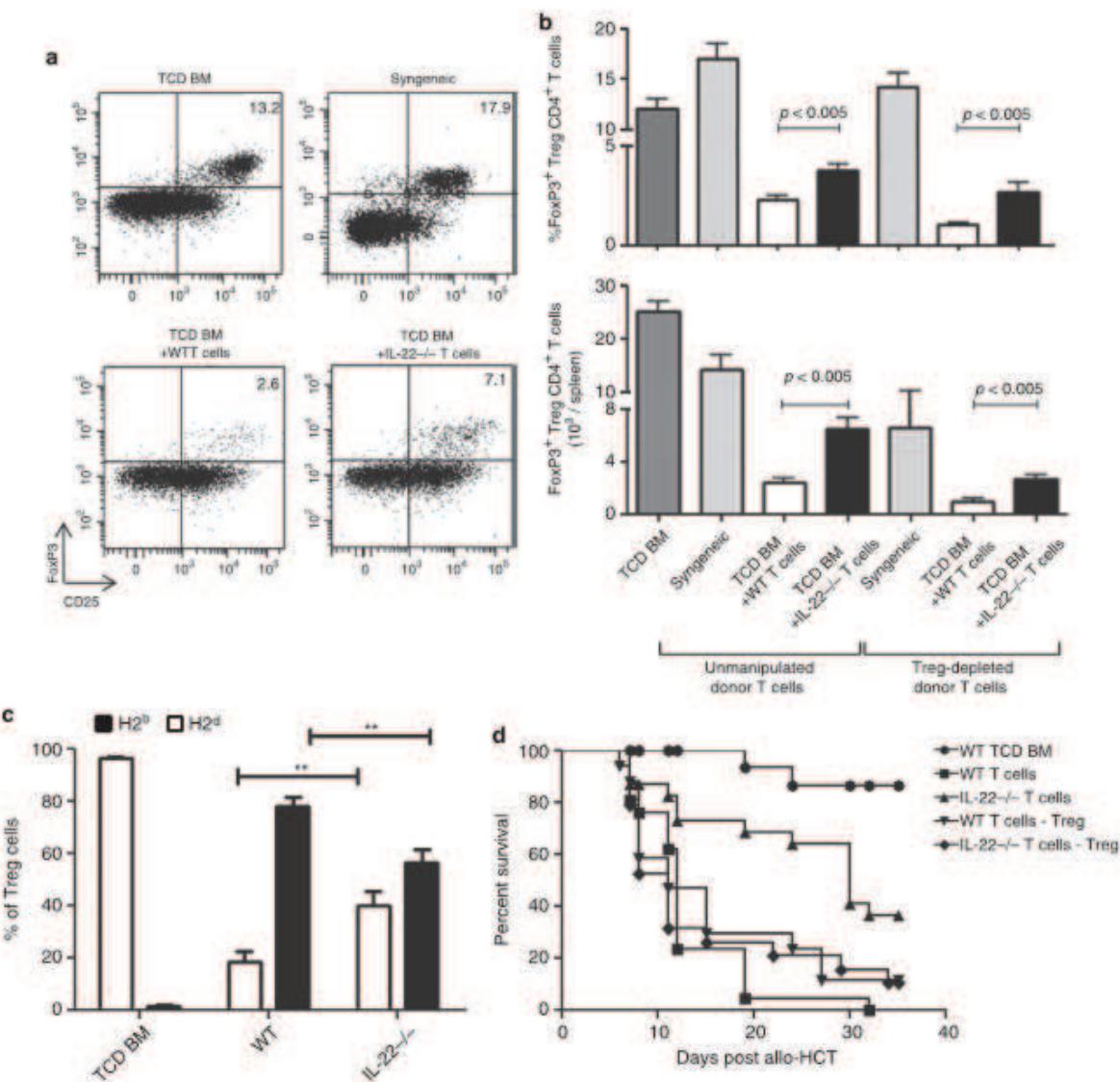


Figure 4. Absence of T-cell-derived IL-22 is associated with an increase of T regulatory cells. Lethally irradiated BALB/c-recipient mice were transplanted with B6 TCD BM alone or with unmanipulated or CD25-depleted B6.WT or IL22-/- T cells. Syngeneic controls were transplanted with BALB/c T cells. Splenocytes were harvested 1 week after allo-HCT ($n = 18$) and were analyzed for the expression of CD4, CD25 and Foxp3. (a) Expression of CD25 and Foxp3 on gated CD4+ T cells is shown for a representative sample. (b) Mean \pm s.e.m. of the percentage and (c) absolute number of CD25+ Foxp3+ in the spleen of at least three independent experiments with three mice/group are represented. Data comparing the three groups were significantly different using analysis of variance test, $P < 0.0001$. (c) Origin of Treg cells was determined by the expression of H-2d and H-2b after gating on CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells. Mean \pm s.e.m. of the percentage of H-2b donor Treg and H-2d recipient cells are represented. (d) Survival data after depletion of CD25+ T cells from the graft are shown (log-rank test, $P < 0.0001$ for WT T cells versus IL22-/- T cells, $P = 0.109$ for WT T cells versus IL22-/- T cells-Treg, $P = 0.82$ for WT T cells versus WT-Treg T cells, $P = 0.004$ for IL22-/- T cells versus IL22-/- T cells-Treg, $P = 0.087$ for WT T cells versus IL22-/- T cells-Treg).

cells (Figures 7a–c). Ultimately, all recipient mice died from severe aGVHD, leading to an increased mortality (Figure 7d). A strong GVL effect was mediated by IL22-/- T cells as shown by the absence of BLI signal in recipient mice (Figures 7a and b) and was comparable to that obtained with WT T cells (Figure 7c). Moreover, the majority of IL22-/- T-cell recipients survived through the 40 days observation period without or with very little BLI signal (Figure 7d). Altogether, these data indicated that IL22-/- T cells retained their capacity to mediate a GVL effect while preserving recipient mice from aGVHD mortality.

DISCUSSION

Thus far, the role of IL-22, a TH17-related cytokine, has not been extensively addressed in the context of aGVHD pathophysiology. Our data show that donor-derived IL-22 contributes to the severity of aGVHD by participating into the systemic inflammation process and through amplification of local inflammation in aGVHD target tissues. This is in line with the critical role of IL-22, which can promote local or systemic inflammation.^{27,28} Paradoxically, IL-22 has been found not only to promote pathological inflammation but also to prevent tissue

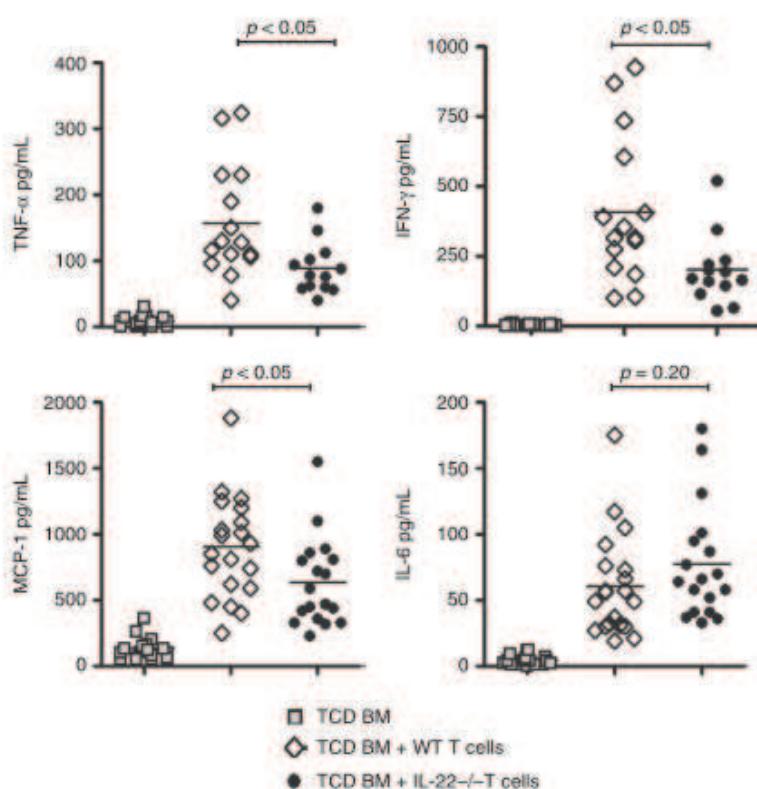


Figure 5. Absence of T-cell-derived IL-22 decreases inflammatory cytokine levels in blood. Lethally irradiated BALB/c mice were transplanted with B6 TCD BM and either B6.WT or B6.IL-22^{-/-} T cells. Plasma was collected at day 6 after allo-HCT and cytokines concentrations were measured using BD cytometric bead array set. Data from three independent experiments are shown. Mean is indicated by a bar.

destruction. Thus, IL-22 was tissue protective in mouse models of hepatitis,²⁹ whereas IL-22 deficiency exacerbated tissue destruction in a dextran sodium sulfate-mediated colitis¹⁸ or a T-cell-transfer model of colitis.^{19,20} Recently, Hanash *et al.*³⁰ demonstrated that IL-22 produced by recipient ILC protected mice from aGVHD-induced tissue damage and mortality by protecting intestinal stem cells, which express IL-22R. Thus, these results highlight the fact that the same cytokine produced by donor versus recipient derived sources may have opposing effects on clinical outcome of allo-HCT recipients. The inflammatory milieu resulting of the allo-HCT procedure and the induction of the so-called cytokine storm may favor the pathological function of IL-22 rather than its tissue-protective effect during the first week after allo-HCT. This is consistent with data showing that IL-22 was involved in immunopathology of the gut after *Toxoplasma gondii* infection and development of TH1 cytokine-mediated inflammation.³¹ The contribution of TH17 cells in aGVHD is somewhat controversial. In our study, we did not detect any differences in IL-17A production by T cells 1 week after allo-HCT. By contrast, we observed a significant increase of CD25⁺ Foxp3⁺ Treg cells in recipients administered with B6.IL-22^{-/-} T cells. The protective effect of Treg on aGVHD was already demonstrated in several models.^{32,33} The mechanism through which IL-22 deficiency results in Treg expansion is not clear, but likely involves indirect factors as Treg cells do not express IL-22R.^{14,15} Alternatively, Treg cell expansion could be the result of immune compensatory mechanisms in response to compromised containment of commensal bacteria in the absence of IL-22, leading to a change of the microbiota and the induction of Treg

by bacteria.³⁴ Of note, specific changes in the microbiota following allo-HCT have been recently reported and associated to aGVHD.^{35,36} In our study, we did not completely abrogate aGVHD by using IL-22^{-/-} T cells to induce GVHD. Although we did not observe a source of IL-22 other than T cells, we cannot exclude that radioresistant ILC from the recipient might persist and could contribute to the regulation of intestinal inflammation. However, Hanash *et al.*³⁰ showed that ILC were eliminated during aGVHD. The role of IL-22 in T-cell activation seems to be indirect given the restricted expression of IL-22R on non-hematopoietic cells.^{14,15} However, we cannot exclude that antigen-presenting cells (APC) could modulate the alloreactive response in the absence of IL-22. Indeed, it has been reported that hematopoietic CD11b⁺ APCs expressed increased levels of IL-22R during induction of disease after immunization with uveitogenic antigen in an experimental model of autoimmune uveitis.³⁷ Despite previous findings showing that MHC (major histocompatibility complex) class II-bearing host APCs are required to induce CD4⁺ T-cell dependent aGVHD,³⁸ recent reports indicated that non-hematopoietic APCs are sufficient to induce lethal aGVHD.^{39,40} In fact, MHC class II-expressing recipient non-hematopoietic cells of the gastrointestinal tract were shown to be able to induce aGVHD.³⁹ By using well established BM chimeras, the group of Reddy and colleagues recently demonstrated that sex-mismatched H-Y antigens can induce GVHD even in the absence of radiosensitive host-derived APC.⁴⁰ Thus, one may speculate that the modulation of IFN- γ in the gastrointestinal tract in the absence of IL-22 could impair the induction of class II expression on epithelial cells, leading to

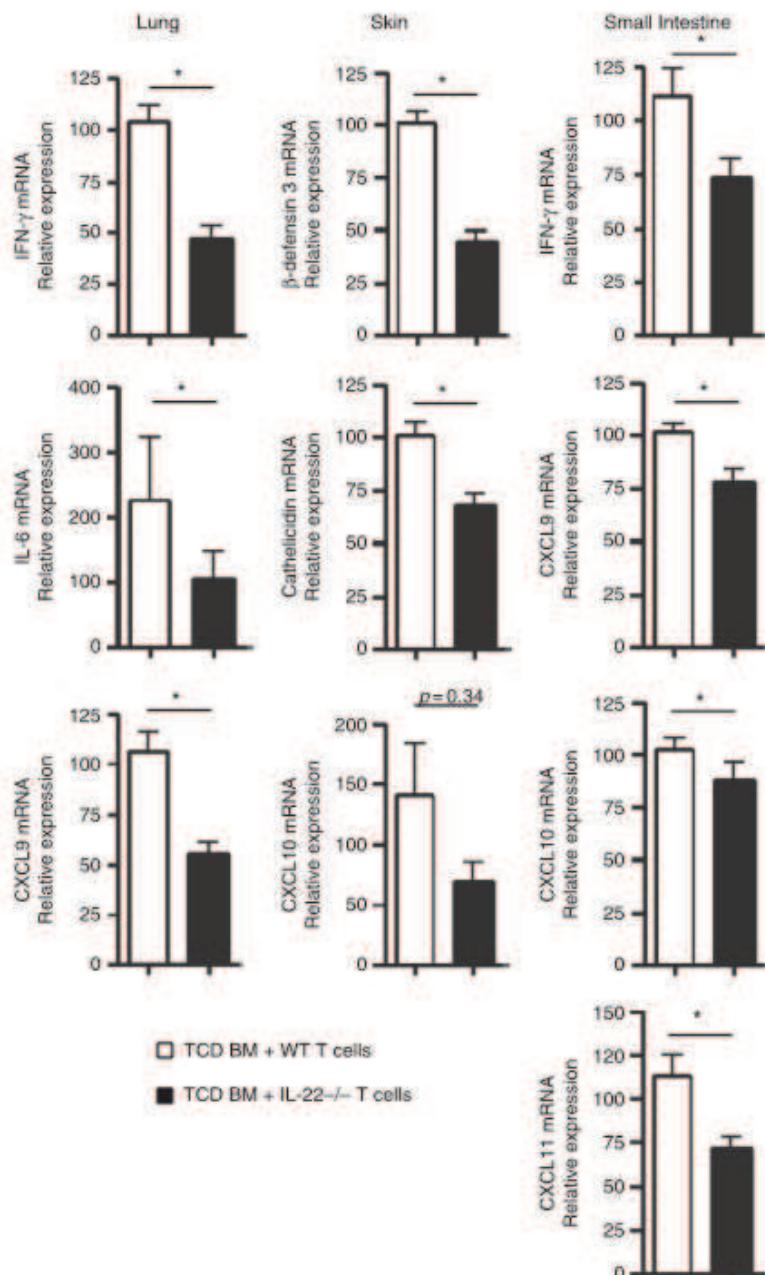


Figure 6. Absence of T-cell-derived IL-22 decreases inflammatory gene expression in aGVHD target tissues. Lethally irradiated BALB/c mice were transplanted with B6 TCD BM and either B6.WT or B6.IL-22^{-/-} T cells. Quantitative reverse transcriptase-PCR analysis for each indicated gene was performed using RNA isolated from the lung, skin and small intestine collected at day 6 after allo-HCT. Mean \pm s.e.m. of gene expression levels are represented. Data are combined from three independent experiments ($n = 12$).

decreased incidence and severity of aGVHD. Interestingly, both TNF- α and IFN- γ have been shown to upregulate IL-22R expression in keratinocytes and fibroblasts, suggesting that these cytokines released after conditioning may amplify IL-22 activity on target tissues of aGVHD.^{14,41} Notably, it has been recently reported that the C-type lectin regenerating-islet-3a (REG3 α), which is produced by Paneth cells and induced by IL-22, is detected in the serum of aGVHD patients and validated as a biomarker of intestinal

aGVHD.⁴² Therefore, REG3 α expression likely increased upon inflammation and is then released into the systemic circulation as a consequence of breaches in the mucosal epithelial barrier caused by aGVHD. Interestingly, we also observed in our model an increase in antimicrobial peptide expression, such as β -defensin3 and cathelicidin, during aGVHD. As expected, in the absence of IL-22, the expression of these molecules was downregulated. Of note, another alarmin, namely Elafin, was also reported as a

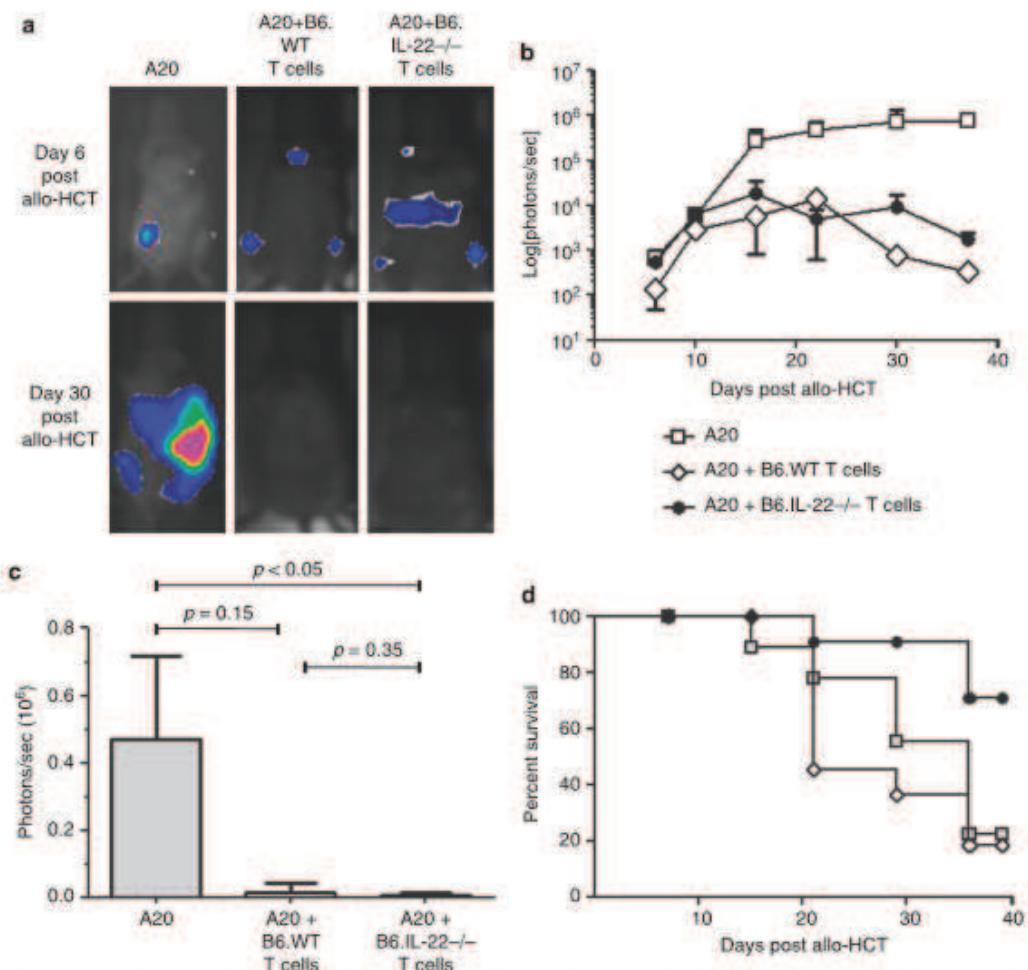


Figure 7. GVL activity is preserved in the absence of donor-T-cell-derived IL-22. Lethally irradiated BALB/c mice were administered with B6 TCD BM and A20-luc leukemic cells. On day 7 after allo-HCT, 1×10^6 B6.WT T cells or B6.IL-22^{-/-} T cells were administered. Tumor growth in recipients was monitored by *in vivo* bioluminescent imaging (BLI). (a) One representative mouse from each group is shown at days 6 and 30 after administration of T cells. BLI signal intensity (photons/sec measured from the ventral view) is shown at (b) multiple time points or at (c) day 30 after administration of B6.WT or B6.IL-22^{-/-} T cells. Data are obtained from two independent experiments with five recipient mice per group. (d) Recipient survival is shown for the three groups; median survival time 21 days versus undefined days, log-rank test $P < 0.01$.

biomarker of human skin aGVHD.⁴³ Finally, because of the critical role of IL-22 in keratinocyte differentiation and pathology of the skin,^{28,44} we can also speculate that IL-22 could mediate a role in skin pathology during GVHD. Indeed, recent data demonstrated a crucial role of IL-22 in thymic regeneration after thymic injury. In the elegant study of Dudakov *et al.*,⁴⁵ they observed that intrathymic IL-22 was produced by ILC after thymic insult and was essential to promote thymic recovery. Thus, this study emphasizes the importance of IL-22 in allo-HCT by inducing a delicate balance between T-cell recovery and adverse effects on alloreactivity.

Overall, findings from this work suggest a potential important role of IL-22 in aGVHD pathophysiology. From the translational standpoint, the IL-22/IL-22R axis need to be further explored to delineate its inflammatory versus protective effects in GVHD. Data showing that blocking donor-derived IL-22 can attenuate aGVHD without impairing the GVL effect support the design of clinical approaches aiming to target IL-22 pathways in allo-HCT patients.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the technical support of D. Paris for animal care. We also thank the 'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) Grant No.3175 to MM and BG', the 'Agence de Biomédecine', the 'Association Cent pour Sang à Vie', the Conseil Régional de Franche-Comté (AutoMACS Pro), the Agence Nationale de la Recherche (Labex LipSTIC, ANR-11-LABX-0021) and the Etablissement Français du Sang (AO-2011-11) for their generous and continuous support for our research work.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed in the manuscript have contributed substantially to this work. BG designed experimental research, interpreted data and wrote the manuscript; MC and BE participated in experimental design, performed research, analyzed data and wrote the manuscript; JA, FB and SP participated in experimental work; JCR generated IL-22-deficient mice; FM and CB performed histological

analyses; MM, PS and PT participated in experimental design, interpretation of data and helped in writing and revising the manuscript.

REFERENCES

- Wingard JR, Majhail NS, Brazauskas R, Wang Z, Sobocinski KA, Jacobsohn D et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 2230–2239.
- Baron F, Labopin M, Niederwieser D, Vigouroux S, Cornelissen JJ, Malm C et al. Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning: allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation. *Leukemia* 2012; **26**: 2462–2468.
- Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; **373**: 1550–1561.
- Antin JH, Ferrara JL. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1992; **80**: 2964–2968.
- Mohry M, Blaise D, Faucher C, Vey N, Bouabdallah R, Stoppa AM et al. Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning: allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2005; **106**: 4407–4411.
- Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease: biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 2012; **12**: 443–458.
- Kappel LW, Goldberg GL, King CG, Suh DY, Smith OM, Ligh C et al. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood* 2009; **113**: 945–952.
- Carlson MJ, West ML, Coghill JM, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. In vitro-differentiated Th17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood* 2009; **113**: 1365–1374.
- Hanash AM, Kappel LW, Yilmaz NL, Nejat RA, Goldberg GL, Smith OM et al. Abrogation of donor T-cell IL-21 signaling leads to tissue-specific modulation of immunity and separation of GVHD from GVL. *Blood* 2011; **118**: 446–455.
- Bossard C, Malard F, Arbez J, Chevallier P, Guillaume T, Delaunay J et al. Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Leukemia* 2012; **26**: 1471–1474.
- Renaud JC. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 667–676.
- Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; **203**: 2271–2279.
- Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol* 2011; **12**: 21–27.
- Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004; **21**: 241–254.
- Tachiri A, Imamura R, Wang Y, Fukui M, Umemura M, Suda T. Genomic structure and inducible expression of the IL-22 receptor alpha chain in mice. *Genes Immun* 2003; **4**: 153–159.
- Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 2005; **174**: 3695–3702.
- Wolk K, Witte E, Wallace E, Docke WD, Kunz S, Asadullah K et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 2006; **36**: 1309–1323.
- Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008; **118**: 534–544.
- Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Stevens S, Flavell RA. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 2008; **29**: 947–957.
- Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* 2009; **208**: 1465–1472.
- Geboes L, Dumoutier L, Kelchtermans H, Schurgers E, Mitera T, Renaud JC et al. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in CS7BL/6 mice. *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 390–395.
- Caproni M, Antiga E, Melani L, Volpi W, Del Bianco E, Fabbri P. Serum levels of IL-17 and IL-22 are reduced by etanercept, but not by acitretin, in patients with psoriasis: a randomized-controlled trial. *J Clin Immunol* 2009; **29**: 210–214.
- Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte Jr J, Crawford JM et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 1996; **88**: 3230–3239.
- Lemer KG, Kao GF, Storb R, Buckner CD, Clift RA, Thomas ED. Histopathology of graft-vs-host reaction (GVHR) in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplant Proc* 1974; **6**: 367–371.
- Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997; **90**: 3204–3213.
- Pan L, Teshima T, Hill GR, Bungard D, Brinson YS, Reddy VS et al. Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized allogeneic stem cell transplantation maintains graft-versus-leukemia effects through a perforin-dependent pathway while preventing graft-versus-host disease. *Blood* 1999; **93**: 4071–4078.
- Liang SC, Nickerson-Nutter C, Pittman DD, Carrier Y, Goodwin DG, Shields KM et al. IL-22 induces an acute-phase response. *J Immunol* 2010; **185**: 5531–5538.
- Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J et al. Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; **445**: 648–651.
- Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 2007; **27**: 647–659.
- Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, O'Connor MH, Young LF, Singer NV et al. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* 2012; **37**: 339–350.
- Munoz M, Heimesaat MM, Danker K, Struck D, Lohmann U, Plickert R et al. Interleukin (IL)-23 mediates Toxoplasma gondii-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *J Exp Med* 2009; **206**: 3047–3059.
- Shin HJ, Baker J, Leveson-Gower DB, Smith AT, Segal EI, Negrin RS. Rapamycin and IL-2 reduce lethal acute graft-versus-host disease associated with increased expansion of donor type CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood* 2011; **118**: 2342–2350.
- Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+ XCD25+ I- immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002; **99**: 3493–3499.
- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* 2011; **331**: 337–341.
- Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2012; **209**: 903–911.
- Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H et al. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins. *Blood* 2012; **120**: 223–231.
- Ke Y, Sun D, Jiang G, Kaplan HJ, Shao H. IL-22-induced regulatory CD11b+ APCs suppress experimental autoimmune uveitis. *J Immunol* 2011; **187**: 2130–2139.
- Teshima T, Ordemann R, Reddy P, Gagin S, Liu C, Cooke KR et al. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med* 2002; **8**: 575–581.
- Koyama M, Kuns RD, Oliver SD, Raffelt NC, Wilson YA, Don AL et al. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med* 2011; **18**: 135–142.
- Toubai T, Tawara I, Sun Y, Liu C, Nieves E, Evers R 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* 2012; **119**: 3844–3853.
- Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Wagstaff K, Anderson M et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol Med (Berl)* 2009; **87**: 523–536.
- Ferrara JL, Harris AC, Greenison JK, Braun TM, Holler E, Teshima T et al. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 2011; **118**: 6702–6708.
- Paczesny S, Braun TM, Levine JE, Hogan J, Crawford JM, Coffing B et al. Elafin is a biomarker of graft-versus-host disease of the skin. *Sci Translational Med* 2010; **2**: 13ra12.
- Van Belle AB, de Heusch M, Lemaire MM, Hendrickx E, Warnier G, Dunussi-Joannopoulos K et al. IL-22 is required for imiquimod-induced psoriasisiform skin inflammation in mice. *J Immunol* 2012; **188**: 462–469.
- Dudakov JA, Hanash AM, Jenq RR, Young LF, Ghosh A, Singer NV et al. Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice. *Science* 2012; **336**: 91–95.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu/>)

Article 2 : La synergie entre l'IL-22 et les interférons de type I amplifie l'inflammation intestinale de type Th1 associée à la GVHDa

Nos données ont montré que l'IL-22 issue du greffon participe à l'inflammation systémique mais également locale dans un contexte de GVHDa. Nous avons voulu caractériser les mécanismes par lesquels l'IL-22 peut participer à l'inflammation associée à la GVHDa notamment au niveau intestinal.

Récemment, plusieurs études ont suggéré que l'IL-22 sécrétée conjointement à d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17 mais aussi les interférons de type I et de type II pouvaient créer un milieu cytokinique favorisant l'inflammation des tissus (Qiu et al., 2013).

1) Synergie entre l'IL-22 et l'IL-17A

Une très belle étude menée par l'équipe de G.F. Sonnenberg (Sonnenberg et al., 2010) démontre notamment que dans un modèle expérimental, l'administration d'une forte dose de bléomycine induit des lésions et de l'inflammation au niveau des poumons pouvant entraîner la mort des souris sauvages. Dans ce modèle, ils observent que les lymphocytes Th17 sécrètent à la fois de l'IL-22 et de l'IL-17A dans les poumons. La sévérité de la maladie induite par bléomycine est diminuée dans des souris invalidées pour l'IL-22 ou lorsque les souris sauvages sont traitées par un anticorps bloquant l'IL-22 suggérant ainsi la participation délétère de l'IL-22 dans ce contexte. Cependant, malgré l'augmentation de la sécrétion d'IL-22 dans les poumons, les souris invalidées pour l'IL-17A présentent une diminution des symptômes. De plus, l'administration de l'anticorps bloquant l'IL-22 dans ces souris exacerbe l'inflammation induite par la bléomycine indiquant que l'IL-22 joue un rôle protecteur en l'absence d'IL-17A. Enfin, dans un système de culture *in vitro*, l'ajout d'IL-22 protège les cellules épithéliales de poumons de l'apoptose induite par bléomycine, effet qui disparaît en coadministrant de l'IL-22 et de l'IL-17A. Ces données indiquent que la synergie entre IL-22 et IL-17A participe à l'inflammation alors que l'IL-22 seule joue un rôle protecteur dans ce contexte expérimental.

Un autre contexte dans lequel IL-22 et IL-17A induisent l'inflammation de façon synergique a été décrit par l'équipe de H.L. Ma (Ma et al., 2008). Cette équipe utilise un modèle d'inflammation cutanée qui consiste à transférer des LT CD4+ CD45RB^{hi} dépourvus de lymphocytes Treg dans des souris scid/scid. Les souris receveuses développent des plaques cutanées présentant des similarités au psoriasis humain. Dans ce modèle, les auteurs ont étudié la participation de l'IL-22 en utilisant à nouveau un anticorps bloquant. La

neutralisation de l'IL-22 inhibe le développement de la maladie et est associée à une diminution significative de l'expression des cytokines telles que l'IL-17A, l'IL-17F mais aussi l'IL-6 au niveau cutané. De plus l'administration intradermique d'IL-22 tend à augmenter l'expression locale d'IL-6. Ces données suggèrent que l'IL-22 participe au développement de Th17 autoréactifs, entretenant notamment l'inflammation par sécrétion conjointe d'IL-22 et d'IL-17A dans ce modèle d'inflammation.

2) Synergie entre l'IL-22 et les IFN de type I

La synergie IL-22/IFN est multiple. Tout d'abord, les IFN de type I semblent induire l'expression de l'IL-22R1a dans des kératinocytes humains cultivés dans des contextes équivalents à la peau vivante (Tohyama et al., 2012). Ces observations suggèrent que les IFN de type I peuvent augmenter l'activité biologique de l'IL-22 en induisant l'expression de son récepteur.

D'autre part, il est connu depuis longtemps que la fonction de certaines cytokines sur leurs cellules cibles peut être modifiée en présence d'IFN de type I et II. De façon intéressante, ce sont majoritairement les cytokines dont la signalisation dépend des protéines STAT qui sont les plus sujettes à ce type de synergie (Gough et al., 2012). Par exemple, l'IFN- α potentialise la capacité de l'IL-10, une cytokine connue pour ses propriétés anti-inflammatoire, à activer STAT1 et ainsi induire la sécrétion de chimiokines CXCL9 et CXCL10 pro inflammatoires par des macrophages humains (Sharif et al., 2004). Ce phénomène est probablement dépendant de STAT1 car de la même façon, l'IL-10 entraîne également l'activation de STAT1 en présence d'IFN- γ (Herrero et al., 2003). Plus récemment, l'équipe de M. Bachmann et collègues ont étudié la synergie entre les IFN de type I et l'IL-22 et ont observé des effets similaires sur l'activation de STAT1 notamment dans des lignées de carcinome du colon telles que DLD1 et Caco2, dans les cellules d'hépatome HepG2 mais aussi dans des kératinocytes primaires. L'activation de STAT1 était associée à l'induction de l'expression de chimiokines telles que CXCL9 et CXCL10 (Bachmann et al., 2012) typiques d'une inflammation de type Th1.

Comme évoqué précédemment (lire **Rôle protecteur**), l'activation intracellulaire de protéines de la famille STAT confère des signaux aux effets opposés dans différents modèles (Stephanou and Latchman, 2005). A l'inverse de la voie STAT3, l'activation de STAT1 semble induire l'apoptose et renforcer l'inflammation de type Th1 (Ouyang et al., 2011; Paludan, 2000; Yu et al., 2009b). Cette polarisation par les voies STAT1 ou STAT3 a également été observée à l'aide de souris invalidées pour STAT3 (Ray et al., 2014). Dans

dans cette étude, les auteurs ont investigué l'effet du déficit de STAT3 dans les Tfh. Ils ont observé que le transcriptome des Tfh invalidés pour STAT3 est davantage apparenté au transcriptome des Th1, avec notamment des expressions augmentées de Tbet mais aussi des récepteurs aux IFN de type I. En conséquence, le taux d'activation intracellulaire de STAT1/STAT3 semble crucial pour engendrer soit la prolifération cellulaire soit l'expression d'effecteurs inflammatoires comme illustré dans la **Figure 12**.

Cellules exprimant le récepteur à l'IL-22

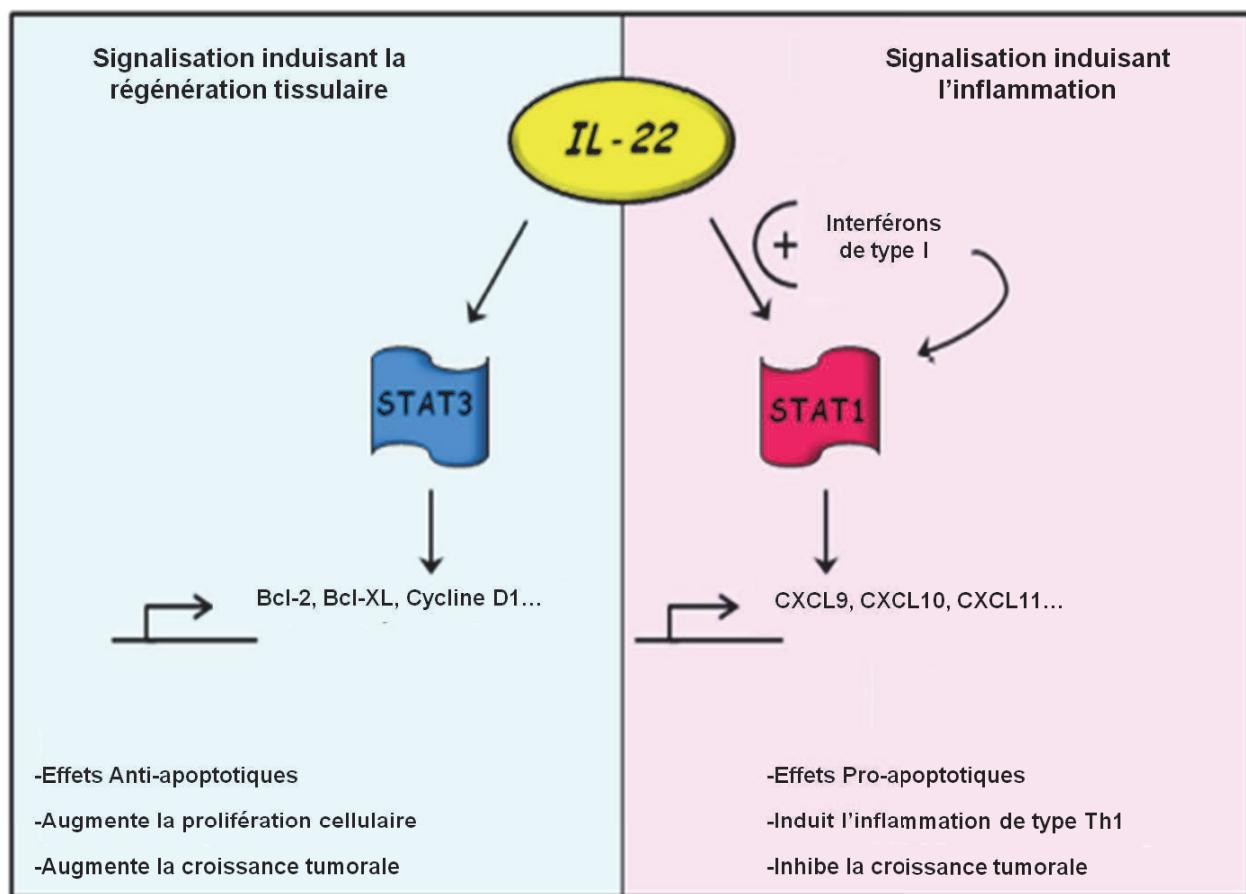


Figure 12: Hypothèse de la synergie IL-22/IFN de type I. Dans les conditions physiologiques, les signaux de transduction suivant la fixation de l'IL-22 sur son récepteur sont majoritairement dominés par la phosphorylation de STAT3 dans les cellules cibles. Cette activation de STAT3 facilite la prolifération cellulaire. La synergie avec les IFN de type I semble davantage activer STAT1 (Bachmann et al., 2012) ce qui, contrairement à STAT3, entraîne une inflammation de type Th1 favorisant l'apoptose et inhibant la croissance tumorale.

Modifié de (Muhl et al., 2013)

Résultats

Après avoir observé le rôle pathogène de l'IL-22 dans la GVHDa, nous avons émis l'hypothèse que cette cytokine pouvait agir en synergie avec les interférons de type I dans le contexte de GVHD et ainsi amplifier l'inflammation en augmentant la sécrétion de chimiokines au niveau intestinal. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle murin expérimental de GVHD intestinale dans lequel les souris receveuses sont invalidées pour le gène du récepteur aux interférons de type I (IFNAR). C'est ce qui fait l'objet de cette seconde partie du travail de thèse dont les résultats sont présentés dans l'article suivant soumis dans Gut le 5 Septembre 2014.

Donor Interleukin-22 and host type I interferon signaling pathway participate in intestinal graft-versus-host disease via STAT1 activation and CXCL10

Baptiste Lamarthée^{1,2,3}, Florent Malard^{4,5,6,7}, Clémentine Gamonet^{1,2,3}, Céline Bossard^{8,9}, Mélanie Couturier^{1,2,3}, Jean-Christophe Renauld¹⁰, Mohamad Mohty^{5,6,7}, Philippe Saas^{1,2,3} and Béatrice Gaugler^{1,2,3}

¹INSERM UMR1098, Besançon, F-25000, France

²Université de Bourgogne Franche-Comté, UMR 1098, SFR FED 4234, Besançon, F-25000, France

³EFS Bourgogne Franche-Comté, UMR 1098, F-25020 Besançon Cedex, France

⁴INSERM CRNCA UMR892, Nantes, F-44000, France

⁵Centre de Recherche Saint-Antoine, INSERM UMRs938, Paris, France

⁶Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

⁷Service d'Hématologie Clinique, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

⁸EA4273 Biometadys, Faculté de médecine, Université de Nantes, France

⁹Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, CHU de Nantes, Nantes, France.

¹⁰Ludwig Institute for Cancer Research and Experimental Medicine Unit, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

Running title: IL-22 and IFN type I signalling in acute GVHD

Words count: Abstract: Main text:

Correspondence to: Béatrice Gaugler, Ph.D.; INSERM UMR1098, EFS Bourgogne Franche-Comté, 8 rue du Dr Girod, F-25020, Besançon Cedex, France. Phone: +33 381615615; Fax: +33 381615800

E-mail: beatrice.gaugler@inserm.fr

ABSTRACT

Background Acute graft-versus-host disease (aGVHD) remains a major complication following allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT), limiting the success of this therapy. Inflammatory cytokines are strongly associated with aGVHD pathogenesis. Interleukin-22 (IL-22) is an IL-10 family cytokine and is secreted by both innate and adaptive immune cells. We previously reported that IL-22 participates to aGVHD development, but the underlying mechanisms of its contribution remain poorly understood.

Aim To analyze the potential mechanism of the pathological function of IL-22 in acute intestinal GVHD.

Methods We used both major and minor histocompatibility mismatched aGVHD murine models. We transplanted recipient mice with bone marrow cells and wild-type or IL-22^{-/-} T cells to induce aGVHD. To evaluate a potential synergy between IL-22 and type I IFN, we used either wild-type or type I IFN receptor deficient (IFNAR^{-/-}) recipient mice and analyzed intestinal barrier integrity, inflammatory factors as well as infiltrating T cell subsets. *Ex-vivo* colon cultures were performed to directly assess the synergistic role of IL-22 and type I IFN. Finally, immunohistochemistry staining of activated STAT1 were performed on gastrointestinal (GI) biopsies of 20 transplanted patients with or without aGVHD.

Results A decreased severity of aGVHD after allo-BMT with IL-22^{-/-} T cells was associated with a lower level of STAT1 activation and reduced C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) expression in the large intestine. Additionally, *ex-vivo* colon cultures indicated that IL-22 synergized with type I IFN to induce Th1-like inflammation *via* STAT1 and CXCL10 in large intestine cells. We examined whether both absence of graft-derived IL-22 and type I interferon signaling in recipient cells

could limit intestinal aGVHD. IFNAR^{-/-} recipient of allogeneic IL-22^{-/-} cells demonstrated a decrease of both CXCL10 expression and Th1 effector cell infiltration in injured colon. Finally, we observed enhanced STAT1 activation in GI tissues from patients with GVHD as compared to those without GVHD.

Conclusions These findings indicate that IL-22 and type I IFN signaling give rise to exacerbated aGVHD by enhancing CXCL10 expression and STAT1 activation in inflamed sites. Thus, interfering with both IL-22 and type I IFN signaling provides a novel approach to limit aGVHD.

INTRODUCTION

Acute graft-versus-host disease (aGVHD) remains a major complication following allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT), limiting the success of this therapy (Wingard et al., 2011). Many pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β), tumor-necrosis-factor (TNF- α), IL-12, interferon- γ (IFN- γ) secreted following the conditioning regimen have been linked to aGVHD initiation and pathophysiology (Antin and Ferrara, 1992; Hanash et al., 2012; Mohty et al., 2005). IL-22 is a cytokine produced by adaptive immune cells, such as CD4 $^{+}$ (Th1, Th17, Th22) and CD8 $^{+}$ (Tc17, Tc22) T cells, but also by innate immune cells, such as, $\gamma\delta$ T cells or innate lymphoid cells (ILC) (Rutz et al., 2013). The IL-22 receptor (IL-22R) is essentially expressed by non-hematopoietic cells, and more particularly by epithelial cells of the gastrointestinal tract, keratinocytes and epithelial cells of the respiratory tract (Wolk et al., 2004). We recently reported that donor-derived IL-22 contributes to the severity of aGVHD in an experimental mouse model of allo-HCT using IL-22 deficient mice (Couturier et al., 2013). IL-22 is a member of the IL-10 family that exerts both protective and inflammatory functions, most likely depending on the cytokine microenvironment and the tissues and/or the cell types involved (Zenewicz and Flavell, 2011). The binding of IL-22 on its receptor activates signal transducer and activator of transcription factor 3 (STAT3) signaling and induces expression of antimicrobial peptides, as well as cell proliferation and tissue repair (Sonnenberg et al., 2011). However, during intestinal inflammation, when adaptive immune responses are overwhelming, IL-22 secreted by T cells can be pathogenic by causing mucosal hyperplasia (Kamanaka et al., 2011). Exuberant IL-22 production together with that of other proinflammatory cytokines might create a cytokine milieu that

promotes tissue inflammation. Consistent with this notion, a recent study by Bachmann and colleagues reported a synergy between IFN- α and IL-22 which leads to the activation of STAT1 in human colonic cell lines (Bachmann et al., 2013). Such synergy is likely to contribute to inflammatory mechanisms in several diseases involving both cytokines (Muhl, 2013). This ambivalent role of IL-22 depending on cytokine environment is in line with data showing that IL-22 was involved in gut lesions after *Toxoplasma gondii* infection and development of Th1 cytokine-mediated inflammation (Munoz et al., 2009). The inflammatory milieu resulting from the allo-HCT procedure and, in particular, the conditioning regimen leading to the induction of the so-called “cytokine storm” may favor the pathological function of IL-22 rather than its tissue-protective effect. Finally, IL-22 activity is regulated by IL-22 binding protein (IL-22 BP), a soluble receptor with structural similarity to IL-22R1 that prevents IL-22 binding to its receptor (14). In this report, we determined the factors involved in the pathological effect of IL-22 in the setting of acute intestinal GVHD. We evaluated whether IL-22 acts in synergy with type I IFN in aGVHD using mice deficient in the type I IFN receptor (IFNAR^{-/-}) as recipients of IL-22 deficient grafts. We demonstrated that donor-derived IL-22 in synergy with the type I IFN signalling pathway in recipient tissues aggravates aGVHD by promoting the activation of STAT1 and pro-inflammatory mediator production in the large intestine, and by amplifying the CXCL10-mediated Th1 responses after allo-HCT. Both IL-22 and type I IFN signaling pathway are necessary for optimal STAT1 activation.

MATERIAL AND METHODS

Mice

Wild-type (WT) 129sv (hereafter named 129) ($H2^b$), BALB/c ($H2^d$) or C57BL/6 (hereafter named B6) ($H2^b$) mice were purchased from Charles River (Chatillon-sur-Chalaronne, France). IL-22^{-/-} and IFNAR^{-/-} mice were kindly provided by J.C. Renauld (Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Belgium). The IL-22^{-/-} deficient mice were originally generated in the 129 background and were subsequently backcrossed with B6 mice for 13 generations. We next maintained breeding colonies in our animal facility. All mice were used at 8-12 weeks of age. All protocols were performed according to the approval of the “Services Vétérinaires de la Santé et de la Protection Animale” delivered by the Ministry of Agriculture (Paris, France).

HCT procedures

Recipient mice were conditioned with total body irradiation administrated as single 750 cGy (BALB/c) or 850cGy (129) lethal doses on day-1. To induce MHC-mismatched aGVHD in BALB/c recipients, mice were transplanted with 5×10^6 allogeneic T cell-depleted bone marrow (TCD BM) from WT B6 mice and 1×10^6 allogeneic donor splenic T cells from either WT or IL-22^{-/-} B6 mice. T cell depletion was performed using the CD3 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) and purified populations of donor T cells were obtained using the Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. The purity of TCD BM and T cells in all experiments exceeded 95%. To induce minor histocompatibility antigen (mHA)-mismatched aGVHD in 129 recipients, mice were transplanted with

5×10^6 BM and 10×10^6 donor spleen cells from either WT or IL-22^{-/-} B6 mice. Cells were injected in the lateral tail vein.

Assessment of acute GVHD

Acute GVHD was assessed by a clinical scoring system and by histological analysis of the small and large intestine, as previously described (Couturier et al., 2013). In addition, intestinal barrier permeability was assessed using FITC-dextran (FD4-1G, Sigma-Aldrich, Lyon, France) administered by oral gavage at a concentration of 80 mg/ml in phosphate-buffered saline (PBS) in 200 µl (16mg) per mouse. Four hours later, plasma was collected from peripheral blood, then mixed 1:1 with PBS and analyzed on plate reader at excitation/emission wavelength of 485nm/535nm.

Immunohistochemistry of human intestinal biopsies

Intestinal biopsies were collected from a cohort of 20 patients who underwent allo-HCT at the University-Hospital of Nantes (Nantes, France) between May 2007 and December 2010. Patients included in this study were diagnosed with gastrointestinal aGVHD by histological examination of biopsies. All patients were enrolled in clinical research protocols approved by local ethical committees. The control patients were a cohort already published of 5 allo-HCT patients who volunteered to participate to the study and did not have digestive symptoms (Bossard et al., 2012). Written informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki (Table S1). Patients, disease and allo-HCT characteristics are summarized in Table S1. Staining for phosphorylated STAT1 (P-STAT1) of the human biopsies was performed according to standard protocols, as we previously described (Bossard et al., 2012). To evaluate STAT1 activation, we used the following semiquantitative grading scale:

grade 0, no expression; grade 1, low expression; grade 2, medium expression; and grade 3, high expression. The semiquantitative grading of antigen expression was performed independently by 2 examiners (F.M. and C.B.).

Ex-Vivo Colon Culture

Sections of 1 cm of colon were excised and cleared of feces, fat tissues and Peyer's patches. They were then longitudinally opened and mucus was removed by shaking in HBSS containing 10% FBS and 5mM EDTA (Sigma-Aldrich). The colon sections were subsequently cultured in complete RPMI medium at 37°C with 5% CO₂ in 24-well plates (BD Falcon). Where indicated, the sections were incubated with recombinant mouse IFN-α (5.10⁴ U/mL) (Miltenyi Biotec). Mouse recombinant IL-22 (100 ng/mL) (R&D Systems, Lille, France) was added directly thereafter without exchange of medium. Ruxolitinib and tofacitinib were purchased from Invivogen (Toulouse, France) and used at the indicated concentrations. At indicated time points, the tissue sections were harvested for protein or mRNA extractions.

Protein extraction

Tissue samples were homogenized using FastPrep-24 system (MP Biomedicals, Illkirch, France) and cell lysates were prepared using a protease inhibitor cocktail (cComplete, EDTA-free, Roche). Total protein concentration was determined by microBCA Protein Assay (Pierce, Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions.

Western Blot analysis

The following antibodies were used for western blotting: pSTAT1-Y701 (58D6 rabbit monoclonal antibody 1:1000), STAT1 (rabbit polyclonal antibody 1:1000), β-actin

(D6A8, rabbit monoclonal antibody 1:1000, Cell Signaling Technology). Signals were detected with HRP-conjugated anti-Rabbit IgG (eB182) secondary antibody 1:25000 (Rockland, Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France) and quantified on a bioluminescence imager and BIO-1D advanced software (Wilber-Lourmat, Marne la Vallée, France).

ELISA and CBA measurement

Concentrations of IFN- γ , TNF- α , IL-6 and MCP-1 were measured using the BD cytometric bead array kit (CBA) (CBA Mouse Inflammation, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) according to the manufacturer's instructions. P-STAT1 and total STAT1 (t-STAT1) concentrations were quantified using the BD CBA cell signaling kit (BD Biosciences) with an input of 300 μ g of total protein extracted from intestinal tissue.

Real-time PCR analysis

Prior to RNA extraction, tissue samples were homogenized using FastPrep-24 system with RLT buffer (Qiagen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). RNA was extracted using RNeasy Mini kit (Qiagen). Total RNA was subjected to reverse transcription (High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and quantified by real-time quantitative PCR using commercially available primer/probe sets (Assay On Demand, Applied Biosystems). Real-time PCR was performed on the iCycler CFX96 real-time PCR system (Life Science, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Relative expression for the mRNA transcripts was calculated using the $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ method and *GAPDH* mRNA transcript as reference.

Flow cytometry analysis

At designated time points, animals were killed and organs were collected. Single-cell suspensions of the spleen and mesenteric lymph nodes (MLN) were passed through sterile mesh filters. For detection of cytokine production, cells were stimulated for 6 hours with 25 ng/ml phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and 1 µg/mL ionomycin (Sigma-Aldrich), with 1µL/mL Golgi Plug (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France) prior to staining for flow cytometric analysis. Cells were first stained with eFluor®506 Fixable Viability Dye (eBiosciences, Paris, France) according to the manufacturer's instructions. Surface staining was performed using FITC-conjugated CD45, PercPCy5.5-CD4 (from Biolegend, Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and APC-eFluor780-TCR β antibodies (eBiosciences), cells were then fixed and permeabilized using CytoFix/CytoPerm Buffer (BD Biosciences) before staining with PE/Cy7-IFN- γ (Biolegend), PE-IL-22 and APC-IL-17A (eBioscience, Paris, France) specific antibodies or the corresponding isotype control. Ki67 and Treg cell analysis was performed by cell surface staining with FITC-CD8, V450-CD4 and PeCy7-CD25, APC-CD3 (BD Biosciences) and eFluor780-TCR β . Cells were then fixed and permeabilized with Foxp3 Staining Buffer set (eBioscience) and stained with PE-Foxp3 (eBioscience) and PercPCy5.5-Ki67 (BD Biosciences). Analysis was performed using FACSCanto II and FACSDiva software (BD Biosciences).

Statistical analysis

Group comparisons of data on cell populations, gene expression, cytokine levels and pathology scores were performed using the Student *t* test. Survival curves were compared using the log-rank test. A value of $p<0.05$ was considered statistically significant in all experiments. Data were computed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS**Graft-derived IL-22 increases STAT1 phosphorylation and inflammatory chemokine production in the colon of recipient mice during acute GVHD.**

We previously demonstrated that donor-derived IL-22 was associated with aGVHD severity in a full MHC-mismatched GVHD model. This was attested, at least in the gastrointestinal tract, by a decrease of GVHD lesions in the small and large intestine, as well as reduced local pro-inflammatory factor mRNA expression in recipient mice receiving IL-22^{-/-} donor T cells (Couturier et al., 2013). We assessed the role of IL-22BP and the engagement of pathological STAT1 pathway in IL-22-induced GVHD. Thus, administration of B6 IL-22^{-/-} T cells with TCD BM into lethally irradiated allogeneic BALB/c-recipient mice significantly decreased GVHD mortality as compared with that of recipients receiving WT allogeneic T cells (Fig 1A). Then, we analyzed the expression of *il-22bp* mRNA, encoding the secreted form of IL-22R1 which neutralizes the biological activity of IL-22 (Dumoutier et al., 2001). At day 7 after transplantation, *il-22bp* mRNA transcripts were significantly decreased in the large intestine of recipient mice that received allogeneic T cells, as compared to control mice, thereby potentially increasing IL-22 activity in the colon during aGVHD (Fig 1B). These data suggest that aGVHD is associated with a down-regulation of IL-22BP, as previously demonstrated in other acute inflammatory models (Huber et al., 2012b). Then, mRNA transcripts of inflammatory mediators such as CXCL9 and CXCL10 were also analyzed in colonic tissue, with a significant reduction of *cxc10* expression in mice that received IL-22^{-/-} T cells (Fig 1C). Because CXCL9 and CXCL10 are known to be induced by STAT1 activation, we measured STAT1 phosphorylation in the colon of transplanted mice. Western Blot analyses of proteins

extracted from colon tissue isolated at day 7 post-BMT revealed that P-STAT1 was induced in samples from mice that received allogeneic WT T cells, as compared to mice receiving IL-22^{-/-} T cells or BM control (Fig1D). This result was also confirmed by CBA analysis, showing that P-STAT1/tSTAT1 ratio was significantly higher in colon from mice administrated with WT T cells, as compared to those receiving IL-22^{-/-} T cells (Fig1E) or BM cells alone. Altogether, these results suggest that the STAT1 pathway is involved in acute intestinal GVHD, and donor-derived IL-22 contributes to STAT1 activation signaling.

IL-22 synergizes with type I-IFN to induce *ex vivo* STAT1 phosphorylation and inflammatory cytokine in the colon.

IL-22 has been shown to trigger different types of responses depending on the cytokine environment (Sonnenberg et al., 2010). Moreover, recent data demonstrated the effects of type I IFN priming on IL-22-activated STAT1 in human colon cell lines (Bachmann et al., 2013). To evaluate this effect on IL-22-mediated STAT1 activation, we used an *ex vivo* colon culture model as previously described (Zenewicz et al., 2008). Colon section samples isolated from naive B6 WT or IL-22^{-/-} mice were cultured for 24h in the presence of recombinant cytokines IFN- α , IL-22 or both. We measured the expression of *RegIII γ* , an antimicrobial peptide produced in response to IL-22, as positive control for IL-22 stimulation. In IL-22^{-/-} colon, *RegIII γ* mRNA expression was not detectable in the absence of IL-22, whereas a strong induction was observed after recombinant IL-22 treatment (FigS1A). As positive control for recombinant IFN- α response, *irf7* mRNA expression was assessed after recombinant IFN- α stimulation, as previously described (Izaguirre et al., 2003)(FigS1B). To examine the synergistic effect of type I IFN and IL-22 on the large

intestine, we next analyzed the expression of the following chemokines: CXCL9, CXCL10, CXCL11. As depicted in Figure 2, we observed a significant induction of *cxc10* mRNA after IFN- α and IL-22 treatment, as compared to IFN- α or IL-22 alone (Fig2C). We also observed a trend towards an increase of *cxc11* mRNA after both IL-22 and IFN- α stimulation (Fig2D), whereas no difference was observed for *TNF- α* or *cxc19* mRNA expression (Fig2A). Moreover, the analysis of STAT1 activation by Western Blot revealed that both P-STAT1 and t-STAT1 were induced after IL-22 and IFN- α stimulation (Fig 2E), which is in line with previous data on colon cell lines (Bachmann et al., 2013). Finally, the use of ruxolitinib, an inhibitor of JAK1/2 or tofacitinib, an inhibitor of JAK1/3 located upstream of the STAT1 signaling pathway (Ihle and Kerr, 1995), completely abolished STAT1 activation (Fig 3A) and *cxc10* mRNA induction mediated by both IFN- α and IL-22 (Fig 3B) in colon cultures. These results show that IL-22 can synergize with type I IFN signaling pathway to increase *cxc10* mRNA expression and activate STAT1 in the large intestine.

Absence of IL-22 in donor cells and type I IFN signaling pathway in recipient mice decrease GVHD severity in a minor histocompatibility antigen-mismatched model.

We next addressed how engagement of STAT1 activation induced by type I IFN priming and IL-22 can affect GVHD severity. For this purpose, we transferred BM and splenocytes from WT or IL-22^{-/-} B6 mice into lethally irradiated WT or IFNAR^{-/-} 129 mice (Figure 4A). In this mHA-mismatched model, recipient mice developed GVHD starting around day 14 post-transplantation. Interestingly, IFNAR^{-/-} mice which received IL-22^{-/-} donor cells had significantly better survival than other mouse groups, and less weight loss at day 20, as compared with WT recipients of WT donor

Résultats

cells (% of initial weight at day 20 following BMT: WT donor WT recipient $71.71 \pm 2.27\%$ versus IL-22^{-/-} T cells $88.27 \pm 3.18\%$, $p < 0.0001$, or IL-22^{-/-} donor IFNAR^{-/-} recipient $81.75 \pm 1.89\%$, $p < 0.05$, Fig 4B/C). Thus, in this mHA-mismatched GVHD model, only the absence of IL-22 in donor T cells combined with IFNAR deficiency in recipients led to a statistically significant reduction of GVHD-induced mortality, as compared with that of WT mice receiving WT splenocytes (median survival time undefined versus 26 days, $p < 0.05$; Figure 4B/C).

We also evaluated intestinal barrier integrity in BMT recipients by performing oral administration of FITC Dextran, at day 8 and day 20 after BMT, as previously described (Hanash et al., 2012). At day 8, we observed an increase of GVHD-related intestinal damage and loss of epithelial barrier integrity in mice receiving spleen cells from WT or IL-22^{-/-} donors, as compared to BM control, indicating that in the B6 to 129 model, aGVHD is associated with intestinal lesions (Figure 4D). Interestingly, at day 20, the intestinal lesions were detected only in WT mice that received WT spleen cells, as compared to IFNAR^{-/-} mice which received IL-22^{-/-} or WT splenocytes (Figure 4E). This loss of epithelial barrier integrity is in accordance with an increase of pathological scores in the colon (Figure 4F-G).

Altogether, these data demonstrate that only the lack of type I IFN signaling in recipient mice combined with IL-22 deficiency in donor cells contributes to decreased GVHD severity in the mHA-mismatched GVHD model. Thus, these results suggest that IL-22-mediated STAT1 activation after type I IFN priming may be critical in the loss of intestinal barrier integrity and the aGVHD process.

Absence of IL-22 in donor cells and type I IFN signaling pathway in recipient mice leads to reduction of inflammatory mediators both systemically and in intestinal draining lymph nodes.

The data presented above showed that the absence of IL-22 in the graft and of type I IFN signaling pathway in recipient organs lowered GVHD severity. The reduced mortality of recipient mice and the conserved intestinal barrier integrity at day 20 post-BMT were accompanied by a reduced expression of pro-inflammatory mediators, CXCL10 and the Th1-associated cytokine IFN- γ in the colon (Fig 5A, B) and in the circulation, as detected in the serum of transplanted mice at day 8 after BMT (Fig 5C). Significantly reduced systemic levels of Th1-associated cytokines (TNF- α , IFN- γ) and MCP-1 were observed only in IFNAR $^{-/-}$ mice receiving IL-22 $^{-/-}$ T cells, but not of IL-6 (Fig 5C, D, E, F). These observations confirm the synergistic role of donor IL-22 and type I IFN signaling pathway in GVHD triggering.

To further investigate the mechanisms involved in the synergy between donor IL-22 and host type I IFN signaling in the intestinal GVHD, we evaluated the profile of cytokines produced by allogeneic T cells in the spleen and mesenteric lymph nodes of mice at day 20 after transplantation. We found no significant difference in IL-17A $^{+}$ T cells among CD4 $^{+}$ T cells from the spleen or MLN (Figure 6A), whereas a significant decrease in Th1 response, as attested by a decrease of IFN- γ $^{+}$ CD4 $^{+}$ T cells, was observed in the group of IFNAR $^{-/-}$ mice transplanted with IL-22 deficient graft, as compared to WT graft. (Figure 6B, C). Such difference was not observed for WT mice receiving IL-22 $^{-/-}$ T cells (Figure 6B, C). Decreased infiltration of Th1 cells in intestinal draining lymph nodes confirms the reduced expression of *ifn- γ* mRNA in the colon of IFNAR $^{-/-}$ mice receiving IL-22 $^{-/-}$ T cells, as well as reduced systemic Th1 cytokine secretion in these mice.

In vivo T cell proliferation was assessed by Ki67 staining of T cells from the spleen at day 20 after transplantation. Despite the increase in Ki67⁺ CD4⁺ T cells and, more importantly, Ki67⁺ CD8⁺ T cells, in mice developing GVHD compared to BM control mice, no difference was observed in CD4⁺ or CD8⁺ T cell proliferation between WT and IFNAR^{-/-} recipient (Fig S2). This suggests that in this model, type I IFN does not favor donor CD4⁺ or CD8⁺ T cell proliferation.

In addition, we did not observe any difference in the proportion of CD25⁺Foxp3⁺ Treg among CD4⁺ T cells from the spleen of WT mice that received WT spleen cells, as compared to IFNAR^{-/-} mice that received IL-22^{-/-} splenocytes (data not shown). Overall, this suggests that the synergistic effect of type I IFN deficiency in recipient mice affects mainly GVHD target tissues, rather than directly T cells. This fits with the restricted expression of IL-22R1 on these target tissues.

Phosphorylated STAT1 is increased in human intestinal GVHD lesions

Next, we evaluated the activation of STAT1 signaling pathway on intestinal biopsies from a group of 20 transplanted patients with and without GVHD (Figure 7A, B, C). As shown by immunohistochemical staining, enhanced P-STAT1 was observed in biopsies from patients developing aGVHD as compared to transplanted patients without aGVHD (Figure 7D). Furthermore, in aGVHD biopsies, P-STAT1 was expressed by epithelial cells (Figure 7D) and in chorionic mononuclear cells (Figure 7D). Thus, these observations suggest that STAT1 signaling pathway is also critical in human intestinal GVHD

Discussion

Résultats

In this study, we confirmed IL-22 as a critical component for the development of acute intestinal GVHD in both major and minor histocompatibility-mismatched models. In fact, both protective and inflammatory properties have been described for IL-22 depending on the cytokine microenvironment and the tissues and/or cell types. Thus, it has been reported that sustained IL-22 systemic exposure leads to an acute-phase response (Liang et al., 2010). Moreover, IL-22 produced by ILC in the intestinal tract has been observed as a protective factor in several diseases. Nevertheless, in the aGVHD context, Hanash *et al* showed that ILC are completely depleted following donor CD4⁺ T cell infiltration in the lamina propria (Hanash et al., 2012), which is consistent with a recent report showing that conventional CD4⁺ T cells reduce ILC3 number in lamina propria in a microbiota and inflammation independent manner (Korn et al., 2014). Other studies have described that IL-22 can be pathogenic, notably in synergy with other cytokines such as, IL-17A (Ma et al., 2008; Sonnenberg et al., 2010) or type I IFN (Bachmann et al., 2013). Consistent with it, we observed a synergy between IL-22 and IFN- α in an *ex-vivo* mouse colon explant treatment. This synergy led to an increase in STAT1/CXCL10 signaling pathway. Altogether, this suggests that IL-22 can promote Th1 cell infiltration –the main pathological T cell subset in aGVHD– in local tissues in an IFN- α rich environment *via* STAT1 and CXCL10.

In this study, we report for the first time a significant decrease of *IL-22BP* mRNA expression in intestinal tissues from mice experiencing GVHD, which is in line with recent reports showing that *IL-22BP* expression is suppressed during inflammation (Huber et al., 2012b). In fact, in mice, the main *IL-22BP* producing cells correspond to a subset of conventional dendritic cells (DC) which are MHCII⁺ CD11c⁺ CD103⁺ CD11b⁺ (Huber et al., 2012b; Martin et al., 2014). These cells constitutively produced

IL-22BP in lamina propria of the large intestine at steady state, but its expression is decreased after DC maturation leading to an increase of the ratio of IL-22/IL-22BP (Martin et al., 2014). Thus, our observation of the decrease in IL-22BP expression during GVHD could explain the pathogenic role of IL-22 in the setting of acute intestinal GVHD. Our results clearly established that graft-derived IL-22 acts in synergy with type I IFN signaling in target tissues and influence GVHD severity *via* STAT1 activation. These observations are consistent with previous work showing that induction of GVHD leads to a rapid phosphorylation of STAT1 in both the liver and spleen in a mouse model (Leng et al., 2006). Moreover, that study showed that treatment with histone deacetylase resulted in a significantly reduced GVHD associated with systemic and local inhibition of phosphorylated STAT1 and attenuated proinflammatory cytokine production during the initiation phase of GVHD (Leng et al., 2006). In addition, STAT1 activation by type I IFN has been reported to be a critical step in oral mucosa inflammation in chronic GVHD patients. In fact, patients with severe chronic GVHD showed elevated P-STAT1 levels in keratinocytes compared to patients without oral lesions (Imanguli et al., 2009). In this context, STAT1 activation was associated with an increase of inflammatory mediators such as CXCL9 and type I IFN–driven migration, proliferation, and differentiation of type I T cell effectors (Imanguli et al., 2009). Our observation of STAT1 activation in GVHD patients are in line with previous results showing that expression and activation of STAT1 was heightened in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis (Schreiber et al., 2002). A recent report by Capitini *et al* demonstrated that transplantation of STAT1-deficient BM resulted in decrease of GVHD dependent on functional alteration of plasmacytoid dendritic cells (PDC) and IFN- α production (Capitini et al., 2014). In addition, pharmacologic inhibition of STAT1 also significantly

reduced GVHD severity, thus demonstrating the effectiveness of this strategy. The use of Jak1/2 inhibitors or the development of STAT1 inhibitors may constitute promising therapeutic tools for GVHD treatment. Although we did not demonstrate the origin of the cells producing type I IFN after BMT, we cannot exclude that PDC are involved in this process. Interestingly, we previously demonstrated that PDC are increased in the gastrointestinal mucosa of GVHD patients (Bossard et al., 2012). The recent report from Zhao *et al* showed that the main producers of IL-22 involved in allo-reactive immune responses of GVHD were donor CD4⁺ T cells that carried CD62L⁻CD44^{high/low} surface markers, corresponding to effector memory or recent activated T cells (Zhao et al., 2014). Accordingly, we also reported that IL-22 is produced by donor CD4⁺ T cells in mesenteric lymph nodes in early stage of GVHD (Couturier et al., 2013).

In our study, we showed that CXCL10 was increased in response to the synergistic effect of IL-22 and type I IFN. CXCL10 can recruit effector T cells expressing CXC-chemokine receptor 3 (CXCR3) to sites of tissue injury. Moreover, the inhibition of CXCR3 has been shown to reduce the severity of GVHD in mice (Aujla et al., 2008). Interestingly, a recent report demonstrated that in addition to recruiting CXCR3⁺ Th1 cells, CXCL10 is also involved in Th1 polarization (Zohar et al., 2014). Thus, we speculate that CXCL10 can amplify the Th1 response observed early after BMT and its altered production in the colon of IFNAR^{-/-} mice receiving IL-22^{-/-} T cells may explain the decrease of infiltrated Th1 CD4⁺ T cells. The Th1 cytokines IFN- γ and TNF- α have been reported to directly contribute to the loss of intestinal barrier integrity by acting on the tight junctions (Turner, 2009). Thus, by contributing to the local Th1 response the synergy between donor-derived IL-22 and host type I IFN signaling pathway may favor the loss of intestinal barrier integrity in the aGVHD

process. Steroid therapy may alter the levels of several chemokines, such as CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2 and CCL3, and this differential expression affects the recruitment of T cells to the gut, but not the liver (Bouazzaoui et al., 2011). Recently, it has been shown that IL-22 mediates antiviral functions by promoting accumulation of neutrophils in peripheral tissues, notably in the liver and lung, *via* CXCL1 production, the main neutrophil-chemoattractant (Stacey et al., 2014). Whether such a mechanism is also involved in the effect of IL-22-induced GVHD remains to be determined in this setting. In fact, the role of neutrophils recruited in intestinal tissues of GVHD recipients contribute to tissue damage and aggravation of intestinal GVHD (Schwab et al., 2014). Whether donor-derived IL-22 and host type I IFN participates also in neutrophil recruitment during GVHD remains to be studied. Altogether, our results provide insight into the mechanisms underlying the pathogenic effect of IL-22 in combination with inflammatory cytokines. Therapeutically, these results suggest that GVHD patients may benefit from treatment with STAT1 inhibitors.

Acknowledgments

The authors acknowledge the technical support of D. Paris and F. Coulon for animal care and Anna Daoui for her technical help. We also thank the “Agence de Biomédecine”, the Agence Nationale de la Recherche (Labex LipSTIC, ANR-11-LABX-0021) and the Etablissement Français du Sang (AO#2011-11 and AO#2014-10) for their generous and continuous support to our research work. FM was supported by educational grants from the “Association for Training, Education and Research in Hematology, Immunology and Transplantation” (ATERHIT). MM would like to thank Pr JV Melo (University of Adelaide, Australia) for critical reading of the manuscript.

Author contributions and Conflict of Interest Statements

All authors listed on the manuscript have substantially contributed to this work. BL participated in experimental design, performed research, analyzed data and wrote the manuscript; BG designed experimental research, interpreted data and wrote the manuscript; MC participated in experimental work; JCR generated IL-22 and IFNAR deficient mice; FM and CB performed histological analyses, MM and PS participated in experimental design, interpretation of data, and helped writing and revising the manuscript.

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Wingard JR, Majhail NS, Brazauskas R, Wang Z, Sobocinski KA, Jacobsohn D, et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2011;29(16):2230-9. Epub 2011/04/06.
2. Antin JH, Ferrara JL. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood.* 1992;80(12):2964-8. Epub 1992/12/15.
3. Mohty M, Blaise D, Faucher C, Vey N, Bouabdallah R, Stoppa AM, et al. Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2005;106(13):4407-11. Epub 2005/09/06.
4. Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, O'Connor MH, Young LF, Singer NV, et al. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity.* 2012;37(2):339-50. Epub 2012/08/28.
5. Rutz S, Eidenschenk C, Ouyang W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunological reviews.* 2013;252(1):116-32. Epub 2013/02/15.
6. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity.* 2004;21(2):241-54. Epub 2004/08/17.
7. Couturier M, Lamarthee B, Arbez J, Renaud JC, Bossard C, Malard F, et al. IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect. *Leukemia.* 2013;27(7):1527-37. Epub 2013/02/13.
8. Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *International immunology.* 2011;23(3):159-63. Epub 2011/03/12.
9. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nature immunology.* 2011;12(5):383-90. Epub 2011/04/20.
10. Kamanaka M, Huber S, Zenewicz LA, Gagliani N, Rathinam C, O'Connor W, Jr., et al. Memory/effector (CD45RB^{lo}) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *The Journal of experimental medicine.* 2011;208(5):1027-40. Epub 2011/04/27.
11. Bachmann M, Ulziibat S, Hardle L, Pfeilschifter J, Muhl H. IFNalpha converts IL-22 into a cytokine efficiently activating STAT1 and its downstream targets. *Biochemical pharmacology.* 2013;85(3):396-403. Epub 2012/11/17.
12. Muhl H. Pro-Inflammatory Signaling by IL-10 and IL-22: Bad Habit Stirred Up by Interferons? *Frontiers in immunology.* 2013;4:18. Epub 2013/02/06.
13. Munoz M, Heimesaat MM, Danker K, Struck D, Lohmann U, Plickert R, et al. Interleukin (IL)-23 mediates Toxoplasma gondii-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *The Journal of experimental medicine.* 2009;206(13):3047-59. Epub 2009/12/10.
14. Bossard C, Malard F, Arbez J, Chevallier P, Guillaume T, Delaunay J, et al. Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Leukemia.* 2012;26(7):1471-4. Epub 2012/02/16.
15. Dumoutier L, Lejeune D, Colau D, Renaud JC. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J Immunol.* 2001;166(12):7090-5. Epub 2001/06/08.

16. Huber S, Gagliani N, Zenewicz LA, Huber FJ, Bosurgi L, Hu B, et al. IL-22BP is regulated by the inflamasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature*. 2012;491(7423):259-63. Epub 2012/10/19.
17. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(6):1293-305. Epub 2010/05/26.
18. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Stevens S, Flavell RA. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity*. 2008;29(6):947-57. Epub 2008/12/23.
19. Izaguirre A, Barnes BJ, Amrute S, Yeow WS, Megjugorac N, Dai J, et al. Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Journal of leukocyte biology*. 2003;74(6):1125-38. Epub 2003/09/10.
20. Ihle JN, Kerr IM. Jak and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends in genetics : TIG*. 1995;11(2):69-74. Epub 1995/02/01.
21. Liang SC, Nickerson-Nutter C, Pittman DD, Carrier Y, Goodwin DG, Shields KM, et al. IL-22 induces an acute-phase response. *J Immunol*. 2010;185(9):5531-8. Epub 2010/09/28.
22. Korn LL, Thomas HL, Hubbeling HG, Spencer SP, Sinha R, Simkins HM, et al. Conventional CD4+ T cells regulate IL-22-producing intestinal innate lymphoid cells. *Mucosal immunology*. 2014. Epub 2014/01/23.
23. Ma HL, Liang S, Li J, Napierata L, Brown T, Benoit S, et al. IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(2):597-607. Epub 2008/01/19.
24. Martin JC, Beriou G, Heslan M, Chauvin C, Utriainen L, Aumeunier A, et al. Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal immunology*. 2014;7(1):101-13. Epub 2013/05/09.
25. Leng C, Gries M, Ziegler J, Lokshin A, Mascagni P, Lentzsch S, et al. Reduction of graft-versus-host disease by histone deacetylase inhibitor suberonylanilide hydroxamic acid is associated with modulation of inflammatory cytokine milieu and involves inhibition of STAT1. *Experimental hematology*. 2006;34(6):776-87. Epub 2006/05/27.
26. Imanguli MM, Swaim WD, League SC, Gress RE, Pavletic SZ, Hakim FT. Increased T-bet+ cytotoxic effectors and type I interferon-mediated processes in chronic graft-versus-host disease of the oral mucosa. *Blood*. 2009;113(15):3620-30. Epub 2009/01/27.
27. Schreiber S, Rosenstiel P, Hampe J, Nikolaus S, Groessner B, Schottelius A, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. *Gut*. 2002;51(3):379-85. Epub 2002/08/13.
28. Capitini CM, Nasholm NM, Chien CD, Larabee SM, Qin H, Song YK, et al. Absence of STAT1 in donor-derived plasmacytoid dendritic cells results in increased STAT3 and attenuates murine GVHD. *Blood*. 2014. Epub 2014/08/01.
29. Zhao K, Zhao D, Huang D, Yin L, Chen C, Pan B, et al. Interleukin-22 Aggravates Murine Acute Graft-Versus-Host Disease by Expanding Effector T Cell and Reducing Regulatory T Cell. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2014. Epub 2014/04/12.
30. He S, Cao Q, Qiu Y, Mi J, Zhang JZ, Jin M, et al. A new approach to the blocking of alloreactive T cell-mediated graft-versus-host disease by in vivo administration of anti-CXCR3 neutralizing antibody. *J Immunol*. 2008;181(11):7581-92. Epub 2008/11/20.

Résultats

31. Zohar Y, Wildbaum G, Novak R, Salzman AL, Thelen M, Alon R, et al. CXCL11-dependent induction of FOXP3-negative regulatory T cells suppresses autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(5):2009-22. Epub 2014/04/10.
32. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(11):799-809. Epub 2009/10/27.
33. Bouazzaoui A, Spacenko E, Mueller G, Huber E, Schubert T, Holler E, et al. Steroid treatment alters adhesion molecule and chemokine expression in experimental acute graft-vs.-host disease of the intestinal tract. *Experimental hematology*. 2011;39(2):238-49 e1. Epub 2010/11/27.
34. Stacey MA, Marsden M, Pham NT, Clare S, Dolton G, Stack G, et al. Neutrophils recruited by IL-22 in peripheral tissues function as TRAIL-dependent antiviral effectors against MCMV. *Cell host & microbe*. 2014;15(4):471-83. Epub 2014/04/12.
35. 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. *Nature medicine*. 2014;20(6):648-54. Epub 2014/05/20.

Figure Legends

Figure 1: Graft-derived IL-22 increases STAT1 phosphorylation and inflammatory cytokine production in the colon of recipient mice during acute GVHD. Lethally irradiated BALB/c recipients were transplanted with 5×10^6 B6.WT TCD BM only or with 1×10^6 B6.WT T cells or 1×10^6 B6.IL-22^{-/-} T cells (n=5 per group and two independent experiments). (A) Survival data are shown (log-rank test, p<0.05 for BM + WT T cells versus BM + IL-22^{-/-} T cells). (B-C) Quantitative reverse transcriptase-PCR analysis for each indicated gene was performed using RNA isolated from the large intestine at day 7 after allo-HCT. Mean±SEM. of gene expression levels are represented. Data are combined from at least three independent experiments (n=12). (D-E) Total protein was isolated from the large intestine collected at day 7 after allo-HCT. (D) Cellular content of phosphorylated (P) STAT1, total (t) STAT1, and β-actin was evaluated by Western blot analysis. One representative experiment is shown. (E) P-STAT1/t-STAT1 ratio was evaluated using the CBA (n=3 per group and 6 independent experiments).

Figure 2: IL-22 and IFN-alpha are both necessary to increase STAT1 phosphorylation and inflammatory cytokine production in the large intestine. Colons from WT or IL-22^{-/-} B6 naïve mice were excised, prepared and cultured as described in Material and Methods. WT or IL-22^{-/-} colon segments were either kept as unstimulated control or stimulated with IL-22 (100 ng/mL) for 18 h (A-D) or 45min (E). Where indicated, colon segments were preincubated with IFN-α (5×10^4 U/mL) for 12h. (A-D) CXCL9, CXCL10, CXCL11 and TNF-α mRNA expression were assessed by real time PCR analysis. Relative expressions were normalized to GAPDH. Bars represent the mean of two to three mice/group. An asterisk indicates p < 0.05. The experiment was performed at least three times with similar results. (E) Cellular content of phosphorylated (P) STAT1, total (t) STAT1, and β-actin was evaluated by Western blot analysis. One representative of at least two independent experiments is shown.

Figure 3: JAK inhibitors reduce CXCL10 mRNA expression and STAT1 activation in mouse colon. Colons from IL-22^{-/-} B6 naïve mice were excised. Colon segments were preincubated for 12h with IFN-α (5×10^4 U/mL) alone or, where

indicated, the JAK inhibitors ruxolitinib (RUXO, 10 μ M) or tofacitinib (TOFA, 10 μ M) or control vehicle (DMSO). After preincubation, colon segments were either kept as unstimulated control or stimulated with IL-22 (100 ng/ml) for 45 min (**A**) or 18 h (**B**). (**A**) Cellular content of phosphorylated (P) STAT1, total (t) STAT1, and β -actin was evaluated by Western blot analysis. One representative of at least two independent experiments is shown. (**B**) CXCL10 mRNA expression was assessed by real time PCR analysis. Relative expression was normalized to GAPDH. Bars represent the mean of two to three mice/group. The experiment was performed at least twice with similar results.

Figure 4: Absence of IL-22 in donor cells and IFNAR in recipient mice decreases GVHD severity in a minor histocompatibility antigen-mismatched GVHD model. (**A-F**) Lethally irradiated WT or IFNAR $^{-/-}$ 129 recipients were transplanted with 5x10 6 B6 WT or IL-22 $^{-/-}$ BM only or with 10x10 6 B6.WT splenocytes or 10x10 6 B6.IL-22 $^{-/-}$ splenocytes (n=5 per group and five independent experiments). (**B**) Survival data are shown (log-rank test, p<0.05 for B6.WT graft in WT 129sjl recipients versus B6.IL-22 $^{-/-}$ graft in IFNAR $^{-/-}$ 129sjl). (**C**) Mean \pm s.e.m. of percentage of initial weight measured at day 20 after allo-HCT are represented. Data are combined from at least five independent experiments (n=20). (**D**) WT or IFNAR $^{-/-}$ 129sjl mice transplanted with BM only, WT graft or IL-22 $^{-/-}$ graft were challenged with oral gavage of FITC-dextran at day 8 and 20 after allo-HCT. Graph shows plasma FITC-dextran concentrations. Data are combined from at least four independent experiments (n=12). (**E-F**) Pathology scores in the colon of recipient mice 20 days after allo-HCT. Data are presented as the mean \pm SEM from cumulative results from four experiments. (**F**) A representative example of the section of the large intestine of 129sjl mice, WT or IFNAR $^{-/-}$, transplanted with BM only or B6.WT cells or B6.IL-22 $^{-/-}$ cells at day 20 (x200 magnification).

Figure 5: IL-22 in donor cells and intact type I IFN signaling pathway in recipient mice are required for increased inflammatory mediator production in both the large intestine and in the blood.

(A-F) Lethally irradiated WT or IFNAR^{-/-} 129 recipients were transplanted with 5×10^6 B6 WT or IL-22^{-/-} BM only or with 10×10^6 B6.WT splenocytes or 10×10^6 B6.IL-22^{-/-} splenocytes (n=5 per group and five independent experiments). **(A-B)** At day 20 post-transplantation, colons were excised for quantitative reverse transcriptase-PCR analysis for each indicated gene. **(C-F)** Plasma was collected at day 20 after allo-HCT and cytokine concentrations were measured using CBA set. Data from three independent experiments are shown. Mean is indicated by a bar.

Figure 6: Absence of IL-22 in donor cells and IFNAR in recipient mice reduces secretion of inflammatory cytokines

(A-B) Lethally irradiated WT or IFNAR^{-/-} 129 recipients were transplanted with 5×10^6 B6 WT or IL-22^{-/-} BM only or with 10×10^6 B6.WT splenocytes or 10×10^6 B6.IL-22^{-/-} splenocytes (n=5 per group and five independent experiments). Spleen and mesenteric lymph nodes (mLN) were harvested at day 20 post allo-HCT. Splenocytes and mLN cells were activated for 6 h with PMA, ionomycin and brefeldin A. Intracellular IFN- γ and IL-17 of CD4+ T cells were analyzed. **(A)** Expression of IL-17 and IFN- γ on gated CD4+ T cells is shown for a representative sample. **(B-C)** Mean \pm SEM of the percentage of CD4+ T cells secreting IFN- γ in the mLN and spleen is shown. Data are combined from three independent experiments (n=12).

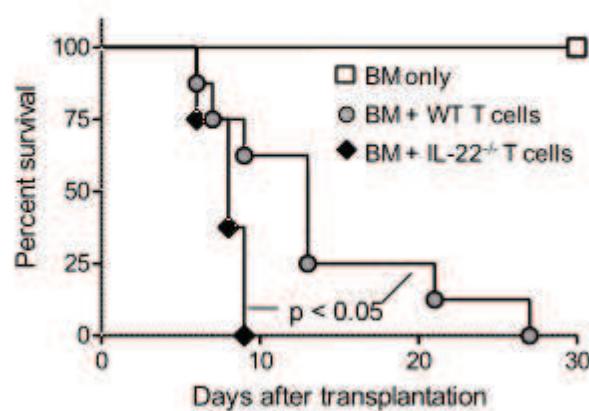
Figure 7: STAT1 is activated in both intestinal epithelial cells and mononuclear cells of the lamina propria around altered crypts during GI GVHD in patients

(A-D) STAT1 phosphorylation and nuclear translocation is observed in cells from patients with severe gastro-intestinal (GI) aGVHD, but not control patients. **(A-C)** Representative immunohistochemistry of gastro-intestinal tissue (magnification x200 for **A** and **B** and x400 for **C**). **(D)** Expression of P-STAT1 is represented.

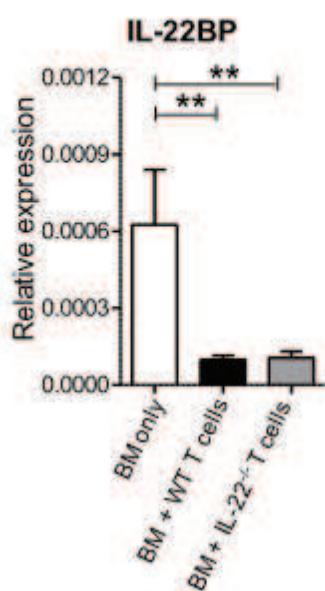
Résultats

Résultats

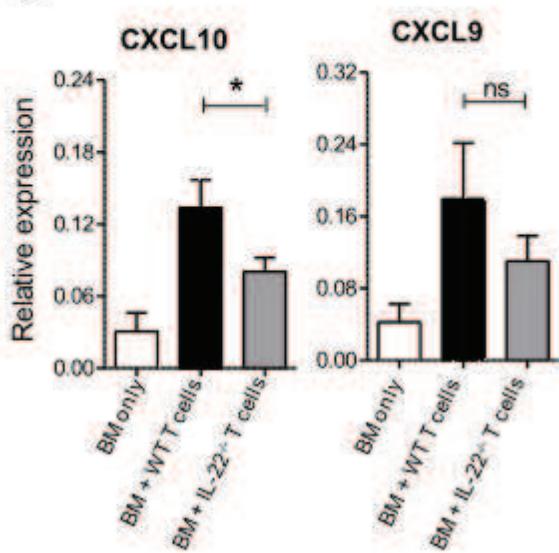
A



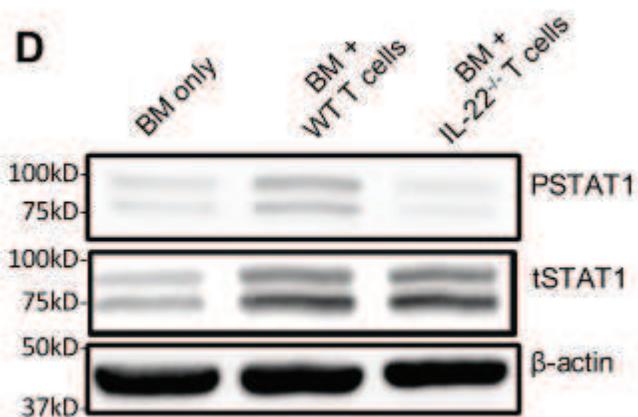
B



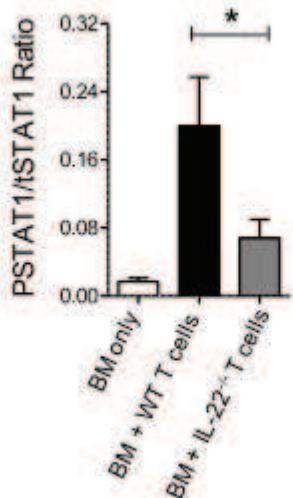
C

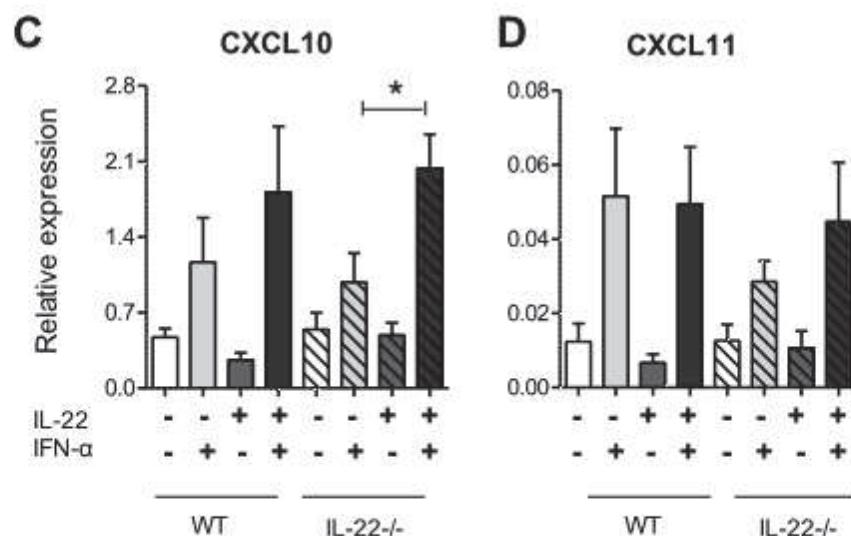
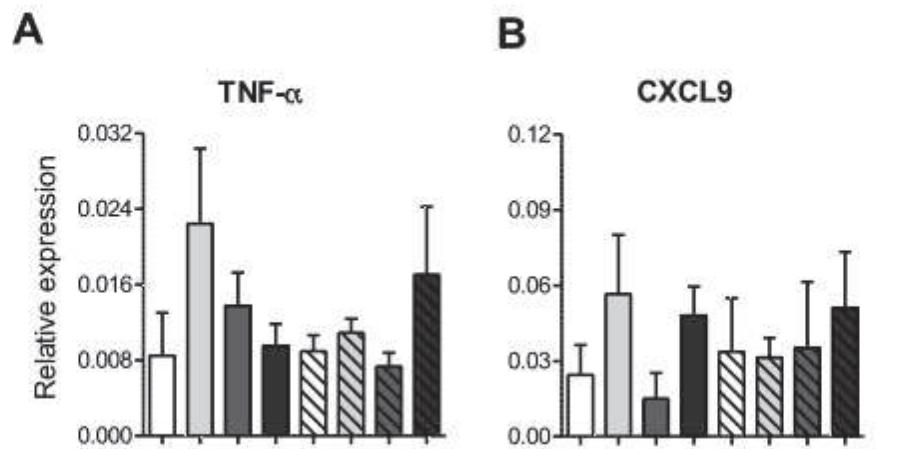


D



E

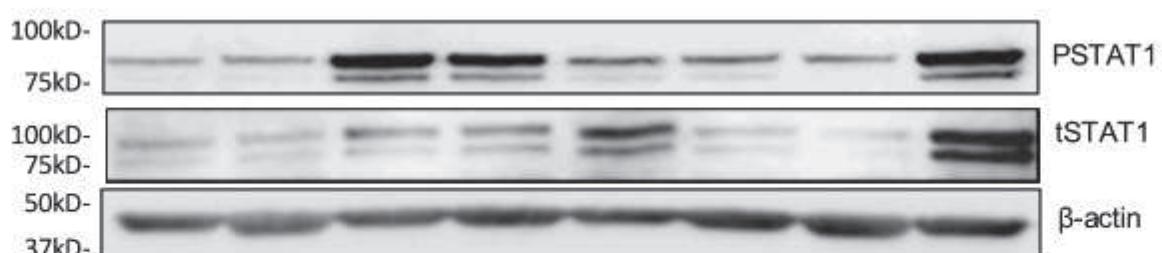




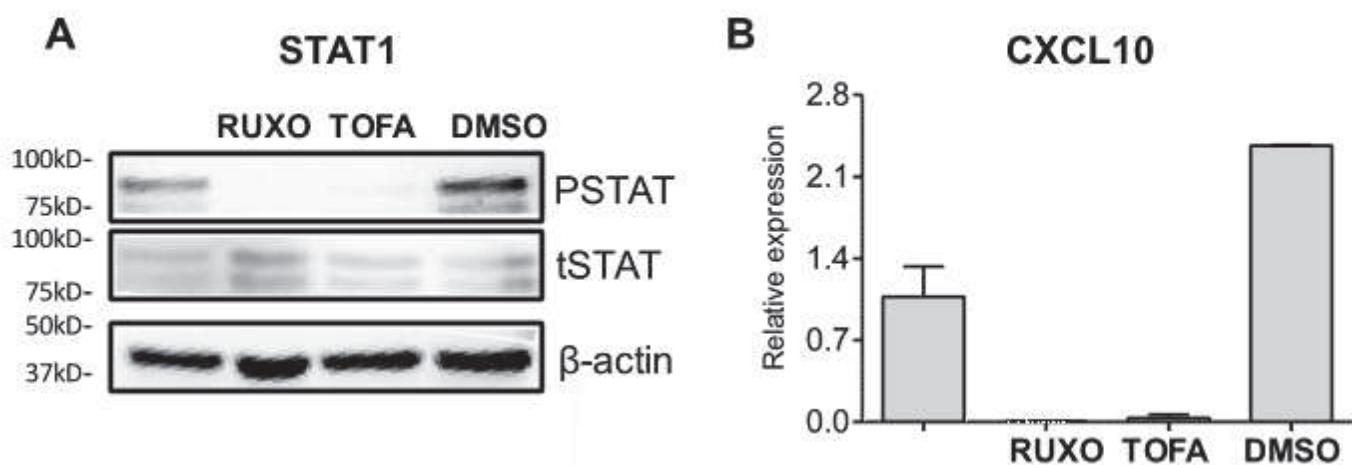
E

WT

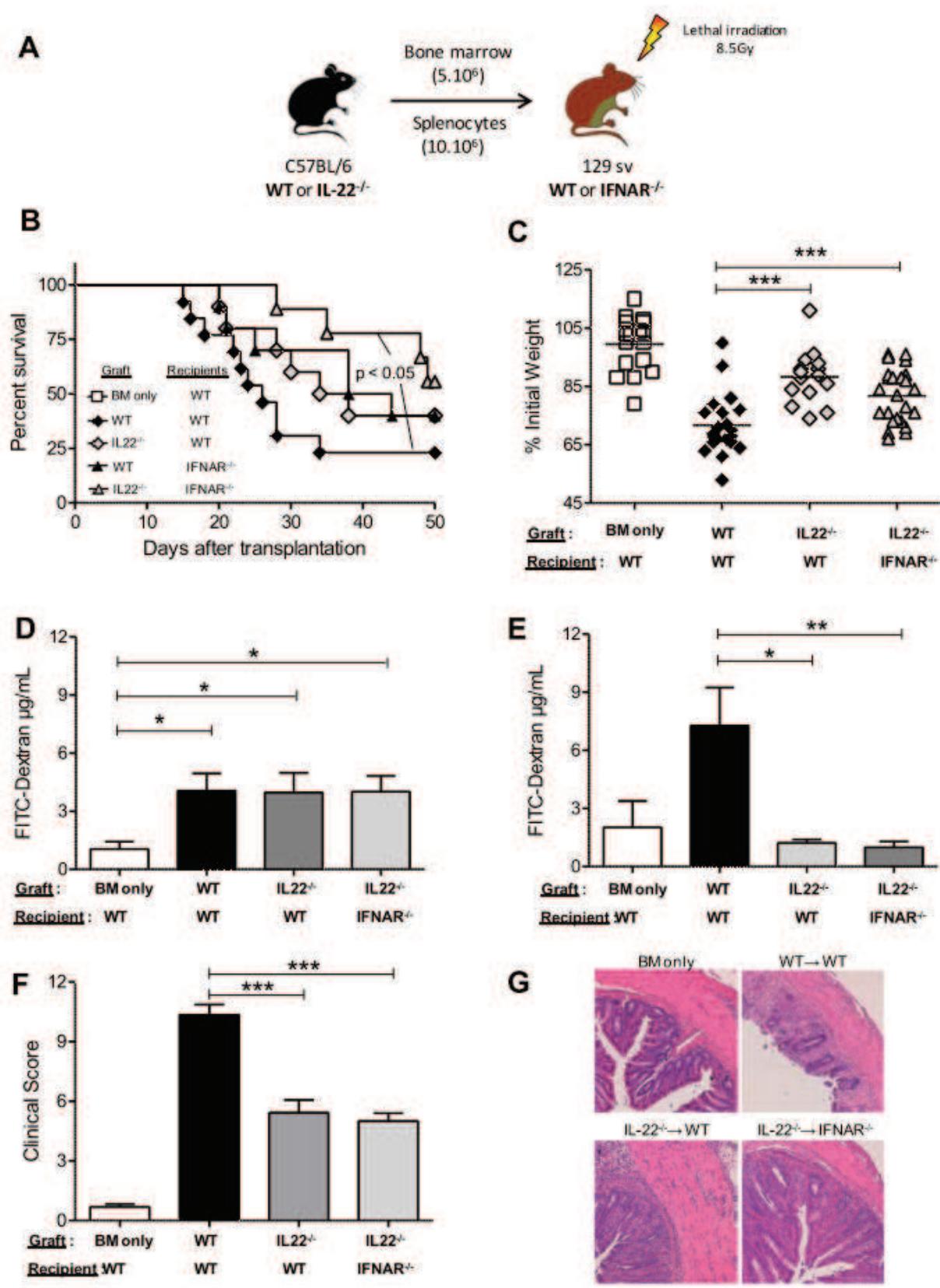
IL-22 $^{-/-}$

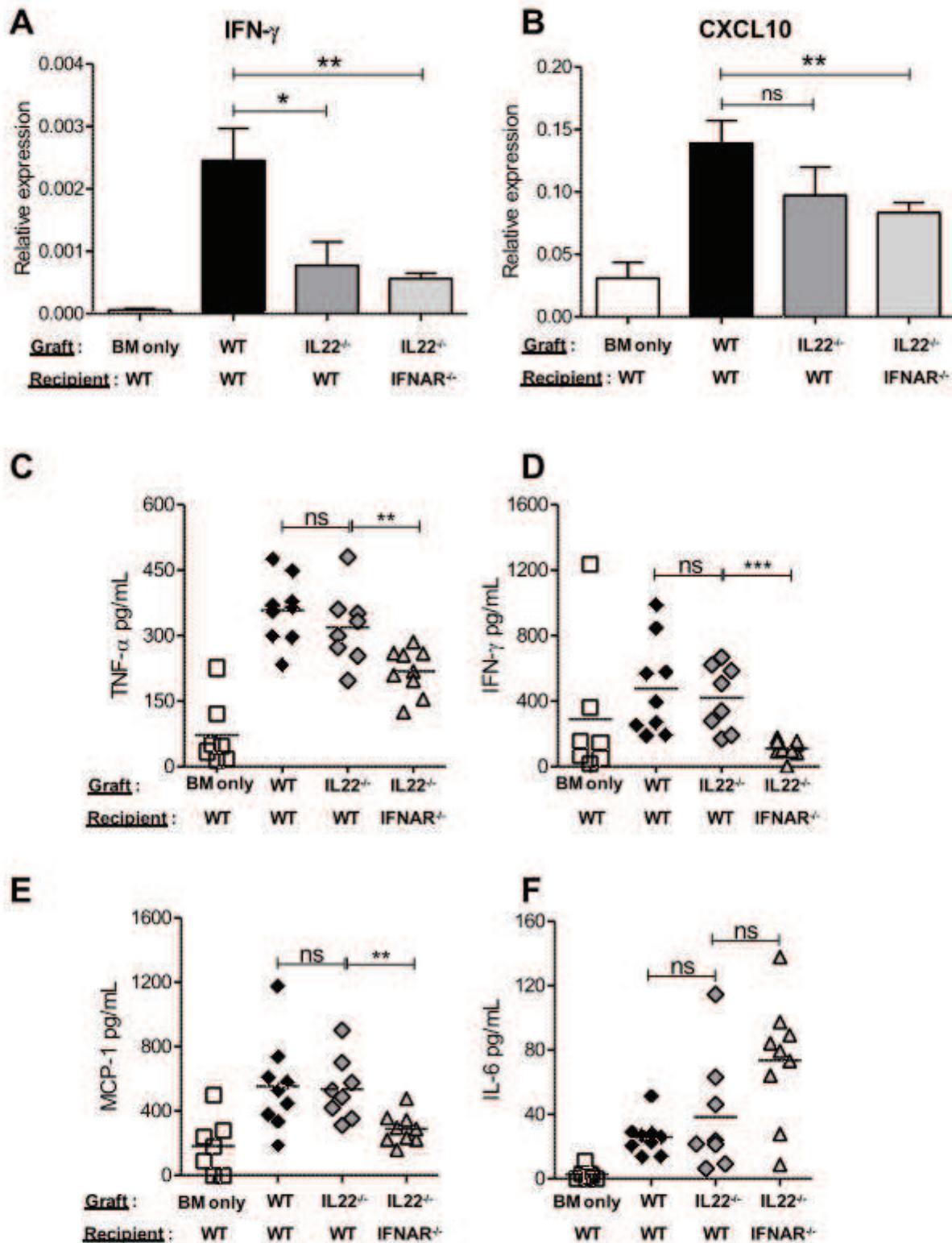


IL-22	-	-	+	+	-	-	+	+
IFN- α	-	+	-	+	-	+	-	+



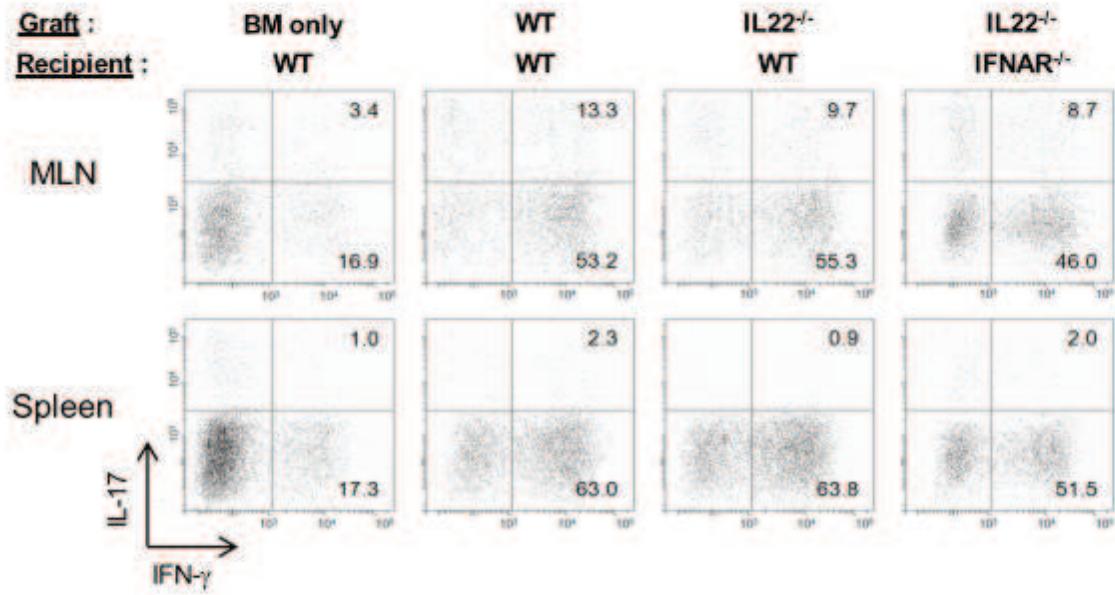
Résultats



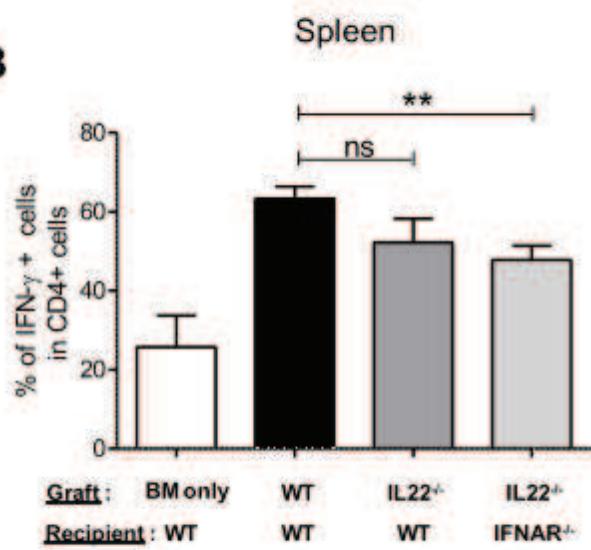


Résultats

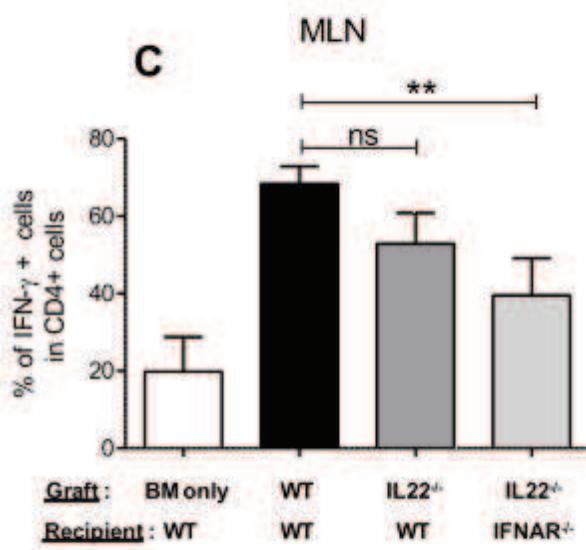
A

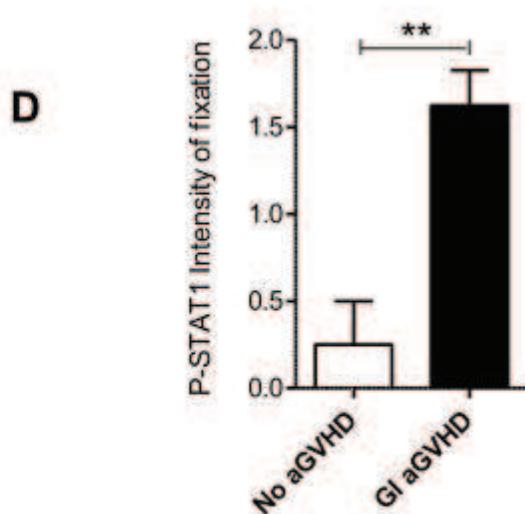
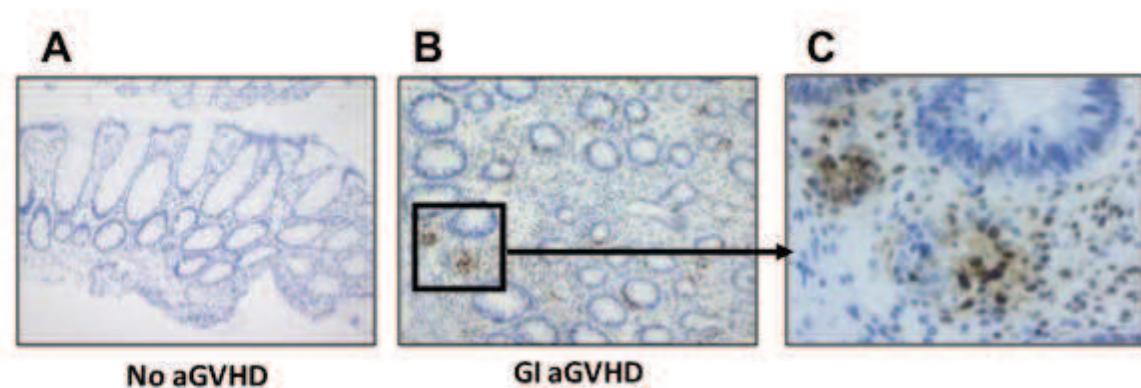


B



C

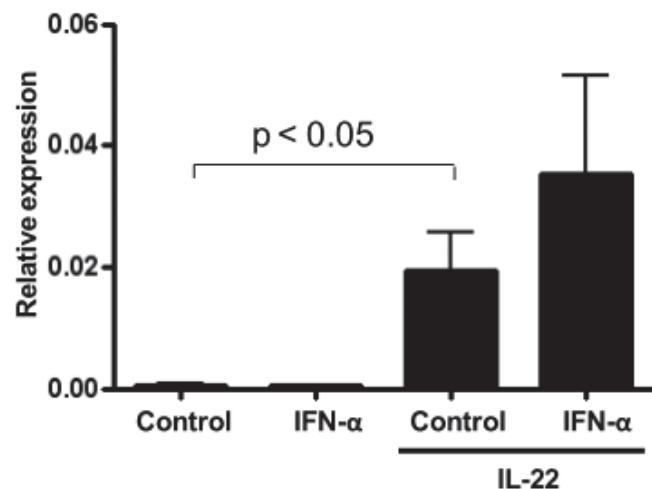




Supplementary Figure 1

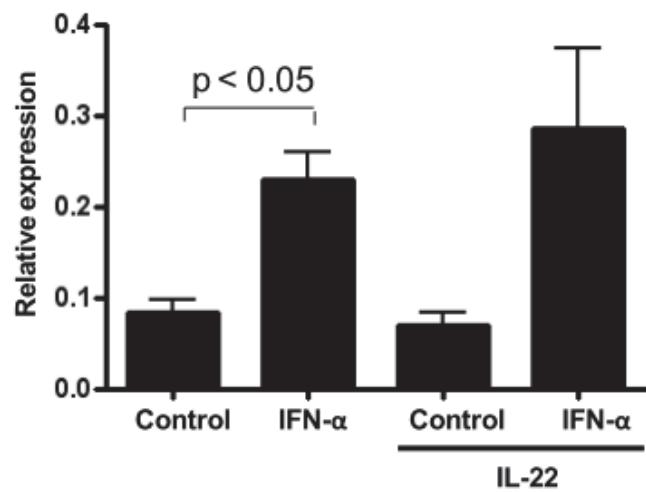
A

RegIII γ



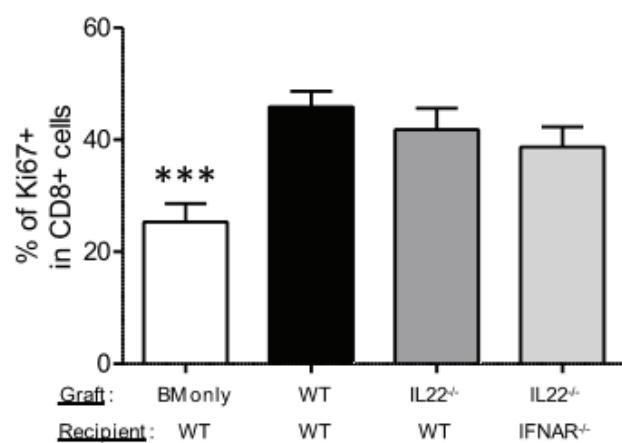
B

IRF7

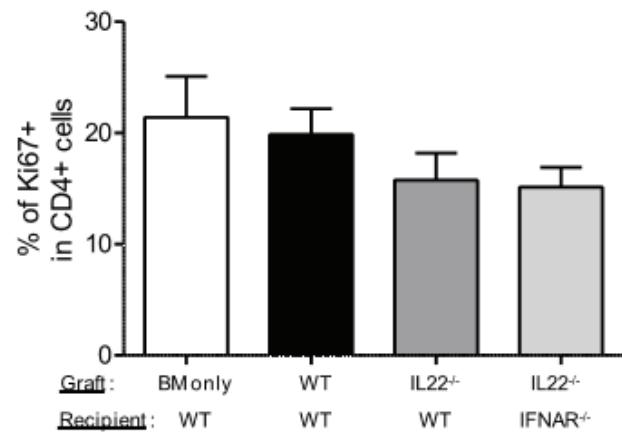


Supplementary Figure 2

A



B



Résultats

Supplementary Figure 1: IL-22 and IFN-alpha induce Reg3 γ and IRF7 respectively in murine colon. Colons from IL-22 $^{-/-}$ B6 naïve mice were excised. Colon segments were prepared and cultured as described in the Material and Methods. IL-22 $^{-/-}$ colon segments were either kept as unstimulated control or stimulated with IL-22 (100 ng/ml) for 18h. Where indicated, colon segments were preincubated with IFN- α (5x10 4 U/mL) for 12h. *REG3 γ* and *IRF7* expression were assessed by real time PCR analysis. Relative expressions were normalized to GAPDH. Bars represent the mean of two to three mice/group. The experiment was performed at least three times with similar results.

Supplementary Figure 2: Absence of IL-22 in donor cells and IFNAR in recipient mice does not favor CD4+ or CD8+ proliferation during GVHD

Lethally irradiated WT or IFNAR $^{-/-}$ 129 recipients were transplanted with 5x10 6 B6 WT or IL-22 $^{-/-}$ BM only or with 10x10 6 B6 WT splenocytes or 10x10 6 B6 IL-22 $^{-/-}$ splenocytes (n=5 per group and five independent experiments). Spleen was harvested at day 20 post allo-HCT. Intracellular expression of Ki67 in CD4+ or CD8+ T cells was analyzed. Mean \pm s.e.m. of the percentage of CD8+ (A) or CD4+ (B) T cells in the spleen is shown. Data are combined from three independent experiments (n=12). (Student t test, *** p<0.0001 for BM only versus all other groups)

Résultats

Supplemental Table 1. Patients, disease and transplant characteristics

Characteristic	Study population (N=20)	No aGVHD (N=4)	aGVHD (N=16)
Median recipient age y (range)	55.5 (16-64)	54.5 (21-60)	55.5 (16-64)
Patient sex, Male/Female, no. (%)	16/4 (80/20)	3/1 (60/40)	13/3 (81/19)
Median post transplant time of biopsy, days (range)	42.5 (23-137)	35.5 (27-50)	47.5 (231-37)
Diagnosis, no. (%)			
Myeloid malignancies:			
Acute myeloblastic leukemia	4 (20)	1 (25)	3 (19)
Myelodysplastic syndrome	3 (15)	0 (0)	3 (19)
Lymphoid malignancies	10 (50)	2 (50)	8 (50)
Acute lymphoblastic leukemia	1 (5)	1 (25)	1 (6)
Non Hodgkin Lymphoma	4 (20)	1 (25)	4 (25)
Hodgkin Disease	2 (10)	0	2 (13)
Multiple Myeloma	1 (5)	0	1 (6)
Aplastic Anemia	3 (15)	1 (25)	2 (13)
Conditioning regimen, no. (%)			
Myeloablative	2 (10)	0	2 (13)
Reduced intensity	18 (90)	4 (100)	14 (87)
GVHD prophylaxis, no (%)			
CsA alone	7 (39)	3 (75)	4 (25)
CsA + MycophenolateMofetil	10 (48)	1 (25)	9 (56)
CsA + Methotrexate	3 (13)	0	3 (19)
Graft source, no (%)			
Peripheral blood stem cells	15 (78)	4 (100)	11 (68)
Bone marrow	2 (9)	0	2 (13)
Cord blood	3 (13)	0	3 (19)
Donor type (%)			
Matched related donor (MRD)	8 (40)	2 (50)	6 (38)
Matched unrelated donor (MUD)	8 (40)	2 (50)	6 (38)
Mismatched unrelated donor (MISUD)	4 (20)	0 (0)	4 (25)

Article 3 : l'absence d'IL-22 issue du greffon influence la composition du microbiote intestinal au cours de la GVHDa (en préparation)

Le microbiote intestinal comprend l'ensemble des micro-organismes vivants en symbiose dans l'intestin des mammifères. Chez l'homme, les bactéries commensales constituant majoritairement le microbiote sont issues de 1000 à 5000 espèces différentes (Qin et al., 2010). Des études récentes ont mis en évidence des altérations du microbiote intestinal chez des patients atteints de maladies aussi variées que le diabète et l'obésité, des allergies et désordres auto-immuns (Flint et al., 2012; Hill and Artis, 2010; Kau et al., 2011; Morgan et al., 2012; Musso et al., 2011). Ces observations, de plus en plus nombreuses, suggèrent que les bactéries présentes au niveau intestinal peuvent directement et indirectement participer à la régulation de gènes de l'hôte et influencer la susceptibilité à un large spectre de maladies. En effet, les bactéries, mais également les métabolites qu'elles génèrent au cours du processus de digestion, peuvent être reconnus par le système immunitaire inné et adaptatif et réguler le développement mais également la fonction des cellules immunitaires (Brestoff and Artis, 2013; Round and Mazmanian, 2009).

Etant donné le rôle antimicrobien de l'IL-22 au niveau intestinal, nous avons investigué l'effet potentiel de l'IL-22 issue du donneur sur la modulation du microbiote du receveur dans le contexte de GVHD. Ce projet a fait l'objet de l'article en cours de préparation suivant :

Graft-derived interleukin-22 modifies intestinal microbiota composition following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

B Lamarth  e¹, C Carron¹, B Valot², D Hocquet³, P Saas¹, B Gaugler¹

¹INSERM UMR1098, Besançon

²CNRS UMR 6249 Chrono-environnement, Besançon

³Laboratoire de Bact  riologie, Hôpital Jean Minjoz, Besançon

ABSTRACT

We recently demonstrated that interleukin-22 (IL-22), a cytokine with antimicrobial properties, contributes to graft-versus-host-disease (GVHD). Transplantation with IL-22^{-/-} T cells was associated with less severe GVHD. In this study, we found that graft-derived IL-22 can modify the composition of the recipient intestinal microbiota during GVHD. In absence of graft-derived IL-22, an increase of *Lactobacillus* and a decrease of *Clostridium* in the small intestine of recipient mice were observed. Thus, gut decontamination by antibiotic treatment did not increase GVHD severity in absence of graft-derived IL-22. These results suggest that the decreased severity of GVHD in absence of IL-22 was mediated by a mechanism independent of the microbiota.

INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a potential treatment of hematologic diseases such as acute lymphoblastic leukemia. This therapy is still limited by graft-versus-host disease (GVHD). During GVHD, the activation of donor-derived cells and more particularly of T cells leads to tissue damage in skin, liver and intestine. The conditioning regimen, a combination of chemotherapy and radiotherapy, also contributes to intestinal epithelium lesions and favors systemic exposure of microorganisms normally sequestered in the intestinal lumen (1).

Countless microorganisms colonize the intestine and form part of the host microbiota. Cross-talk of the microbiota with various immune cell subsets of the host immune system is known to modulate the immune responses and affect autoimmunity, metabolic diseases, and response to pathogens (2, 3). In line with this, previous and recent data have uncovered a role for the recipient microbiota in the severity of GVHD. Studies in mice have shown a

reduction of GVHD with gut-decontaminating antibiotics (4) and transplantation under germ-free conditions (5). Furthermore, breaching of the epithelial barriers and translocation of pathogen-associated molecular patterns have been shown to enhance proinflammatory cytokines released from damaged host tissue, enhance donor T cell alloreactivity, and aggravate GVHD (6).

IL-22 is a cytokine produced by adaptive immune cells, such as CD4⁺ (Th1, Th17, Th22) and CD8⁺ (Tc17, Tc22) T cells, but also by innate immune cells, such as, $\gamma\delta$ T cells or innate lymphoid cells (ILC) (7). IL-22 can have either a protective or a pathogenic role in inflammatory diseases depending on the nature of the affected tissue and the local cytokine milieu. The IL-22 receptor (IL-22R) is essentially expressed by non-hematopoietic cells, and more particularly by epithelial cells of the gastrointestinal tract, keratinocytes and epithelial cells of the respiratory tract (8). In these tissues, IL-22 can induce the expression of antimicrobial molecules S100A7, S100A8, S100A9 and C-type lectins and β -defensins (9). Whereas β -defensins destabilize bacterial membrane, antimicrobial properties of S100A8 and S100A9 are based on zinc and iron sequestration (10, 11). Certain C-type lectins such as RegIII γ participate to intestinal mucosa protection. These lectins notably inhibit Gram-positive bacteria growth by directly interfering with peptidoglycan (12).

Given antimicrobial properties of IL-22, we evaluated by metagenomic methods if graft-derived IL-22 can modify the composition of intestinal microbiote following allo-HSCT. In this study, we showed for the first time the potential influence of IL-22 in microbiota composition during GVHD.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Wild-type (WT) BALB/c (H-2d) mice and C57BL/6 (H-2b) mice were purchased from Charles River (Chatillon-sur-Chalaronne, France). C57BL/6 IL-22^{-/-} mice (B6.IL-22^{-/-}, H-2b), which were originally generated in the 129 background and were subsequently backcrossed with C57BL/6 for 13 generations, were provided by J.C. Renaud (Ludwig Institute for Cancer Research, Brussel, Belgium). We next maintained breeding colonies in our animal facility. All mice were used at 8-12 weeks of age. All protocols were performed according to the approval of the “Services Vétérinaires de la Santé et de la Protection Animale” delivered by the Ministry of Agriculture (Paris, France).

Hematopoietic cell transplantation procedures

Recipient mice were conditioned with total body irradiation administered at a single lethal dose on day -1 at 750 cGy. To induce GVHD in BALB/c recipients, mice were transplanted with 5.10^6 allogeneic T-cell-depleted bone marrow (TCD BM) from B6.WT and 1.10^6 allogeneic donor splenic T cells from B6.WT or B6.IL-22^{-/-} mice. Syngeneic control mice were obtained by transferring 1.10^6 splenic T cells from BALB/C mice. T-cell depletion was performed using the CD3 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) and purified populations of donor T cells were obtained using the Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. The purity of TCD BM and T cells in all experiments exceeded 95%.

Gut decontamination

When indicated, recipient mice received 1g/L of kanamycin, amoxicillin, vancomycin and metronidazole (Sigma) as previously described (13) in drinking water from day -7 until day 50 after allo-HSCT.

DNA extraction

Recipient mice were sacrificed at day 7 after allo-HSCT. Ileal samples were frozen at -80°C. DNA was extracted using QIAamp DNA Fast Stool Mini kit (QIAGEN) according to manufacturer's instruction.

16S rRNA gene amplification, 454 pyrosequencing

For each sample, PCR contained 50 ng of extracted DNA, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1.25 units of Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 2.5 µl of 10× PCR buffer, and 0.2 µM of each primer designed to amplify the V4-V6 16S rRNA variable regions. The cycling conditions used were: 94°C for 1 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 68°C for 1 min. Amplicons were purified using the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey Nagel). PCR products were qualified using Experion™ DNA 12 K Analysis kit (Biorad) before sequencing on a 454 GS FLX Titanium platform following the recommended procedures (Next Generation Sequencing Technologies, Roche 454 Pyrosequencing Analysis, Beckman Coulter).

Sequence analysis

Phylogenetic classification to genus level was performed by Beckman Coulter Genomics. PCoA was performed on the resulting matrix of distances between each pair of samples using XLSTAT software (Addinsoft, Paris, France). For OTUs analysis, sequence data were compiled and processed using MOTHUR (14). Sequences were aligned to the 16S rRNA gene, using as a template the SILVA reference alignment. Sequences with distance-based similarity of 97% or greater were assigned to the same OTU. Microbial diversity was estimated by calculating the inverse Simpson index and Shannon index (15).

Real-time PCR

Quantitative PCR for the 16S rRNA gene was performed with SYBR Green (*Power SYBR Green Master Mix, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France*) and normalized to total bacterial DNA. Reactions were run with the iCycler CFX96 real-time PCR system (Life Science, Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Primers used in this study have been described previously (16) . Specific primers for Eubacteria (all bacteria) were UniF340 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' and UniR514 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'. Specific primers for SFB were SFB736F 5'-GACGCTGAGGCATGAGAGCAT-3' and SFB844R 5'-GACGGCACGGATTGTTATTCA-3'. Specific primers for Bacteroides were BactF285 5'-GGTTCTGAGAGGAGGTCCC-3' and UniR338 5'-GCTGCCTC CCGTAGGAGT-3'. Specific primers for Lactobacillaceae were LabF362 5'-AGCAGTAGGAAATCTTCCA-3' and LabR677 5'-CACCGCTACACATGGAG-3'.

Statistical analysis

Student t-tests were used to compare microbial diversity, percentage of bacteria and reads number. Survival curves were compared using the log-rank test. A value of P<0.05 was considered statistically significant in all the experiments. Data were computed using GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Transplantation with allogeneic WT or IL-22^{-/-} T cells reduces microbial diversity in small intestine

Lethally irradiated BALB/c (H2-d) mice received 1.10^6 syngeneic T cells (control group) or 1.10^6 allogeneic B6 (H2-b) T cells along with TCD BM on day 0 as depicted in Figure 1A. As previously demonstrated (17), the allogeneic recipients developed intestinal GVHD and absence of graft-derived IL-22 was associated with a less severe form of the disease (data not shown).

Since IL-22 promotes antimicrobial defense by inducing α and β -defensins in intestine (9), we evaluated the impact of graft-derived IL-22 on the microbiota during GVHD. On day 7 after allo-HSCT, recipient mice were sacrificed and ileum feces were isolated. We performed 16S rRNA gene sequencing and evaluated microbial diversity at phylum level, as measured by Shannon index and inverse Simpson index. As depicted in Figure 1B and 1C, a significant decrease of ileal flora diversity were observed in mice which received allogeneic WT or IL-22^{-/-} T cells as compared to syngeneic control.

We then evaluated for changes in the main bacterial subpopulations and we observed a large shift in favor of Firmicutes in all mice undergoing allo-HSCT as previously described (18). Moreover, we found an increase of Proteobacteria in the ileum of allogeneic recipients as compared to syngeneic control (percentage of Proteobacteria abundance: 6% in Syngeneic T cells group versus 32% and 21% in WT T cells and IL-22^{-/-} T cells respectively) (Figure 1D).

Absence of graft-derived IL-22 is associated with an increased abundance of Lactobacillus and a decrease of Clostridium after allo-HSCT

To better qualify changes in the composition of the flora at genus level, we performed principal coordinate analysis (PCoA). We found that ileal floras of allogeneic recipients were distinct from syngeneic recipients. Interestingly, mice which received allogeneic WT T cells clustered apart from mice which received IL-22^{-/-} T cells (Figure 2A). These results suggest that graft-derived IL-22 can modify the global composition of the ileal microbiota after allo-HSCT.

We then evaluated for changes in bacterial subpopulations at genus level. Since the more represented phylum after allo-HSCT was Firmicutes, we evaluated the composition of the genus *Lactobacillus*, the dominant member of Lactobacillales, but also *Clostridium* and other Firmicutes as illustrated in Figure 2B. Interestingly, we found a marked expansion of *Lactobacillus* in the ileum of IL-22^{-/-} T cells recipient as compared to WT T cells (percentage

of *Lactobacillus* abundance: 34% in Syngeneic T cells group versus 31% in WT T cells and 59% in IL-22^{-/-} T cells, Figure 2C).

Within the 16S sequences assigned to the genus *Lactobacillus* in all recipient mice, nearly half had identical sequence homology with *Lactobacillus johnsonii*, a species found as commensal in humans (19) and rodents (20). The other half was mainly assigned to the species *Lactobacillus grasseri* which can be found in probiotics. Interestingly, these species were more represented in the ileal flora of IL-22^{-/-} T cells as compared to WT T cells (percentage of *L.johnsonii* abundance: 9% in WT T cells group versus 25% in IL-22^{-/-} T cells and percentage of *L.grasseri* abundance: 7% in WT T cells group versus 19% in IL-22^{-/-} T cells) as shown in Figure 2D and 2E.

Moreover, an important loss of *Clostridium* was also observed in absence of graft-derived IL-22 (percentage of *Clostridium* abundance: 20% in Syngeneic T cells group versus 16% in WT T cells and 4% in IL-22^{-/-} T cells) as illustrated in Figure 2F. Within the genus *Clostridium*, the sequences were mainly assigned to *Clostridium sp K39*. Surprisingly, this species was totally absent in IL-22^{-/-} T cells recipients (percentage of *Clostridium sp K39* abundance: 9% in Syngeneic T cells group versus 10% in WT T cells and 0.1% in IL-22^{-/-} T cells, Figure 2G). These results suggest that absence of graft-derived IL-22 may favor *L.johnsonii* and *L.grasseri* expansion and disfavor *Clostridium* species in GVHD context.

The decreased severity of GVHD in absence of graft-derived IL-22 is not due to Lactobacillus and Clostridium shifts.

It has been previously reported that probiotic reintroduction of *Lactobacillus* species was associated with a less severe form of murine GVHD (21). Moreover, certain *Clostridium* species such as segmented filamentous bacteria (SFB) have been shown to be important for Th17-driven intestinal inflammation (16, 22). Since absence of IL-22 may favor *Lactobacillus* expansion instead of *Clostridium* in recipient ileum, we wanted to determine if this shift of microbiota composition was responsible for the better outcome of IL-22^{-/-} T cells recipients. In that purpose, we treated recipient mice with an antibiotic mix consisting in administration of Amoxicillin, Kanamycin, Vancomycin and Metronidazole in drinking water as depicted in Figure 3A. After gut decontamination, a profound loss of *Lactobacillecae* and SFB in mice undergoing allo-HSCT was observed at day 7 after transplantation (Figure 3B). We then used this antibiotic cocktail to evaluate the impact of *Lactobacillecae* and SFB depletion on

Résultats

the overall survival of WT T cells and IL-22^{-/-} T cells recipients. Without antibiotic, transplantation with IL-22^{-/-} T cells was associated with a better survival ($p=0.02$) as expected (17). Thus, in WT T cells recipients, gut decontamination decreased GVHD severity (Median survival time: 6 versus 20 days, $p<0.0001$, Figure 3C) which is in line with previous studies (4, 23, 24). Surprisingly, depletion of *Lactobacillus* and *Clostridium* after antibiotic treatment was associated with an even better survival in IL-22^{-/-} T cells recipients (Median survival time: 7.5 versus 42 days, $p<0.0001$). These results suggest that the decreased severity of GVHD in absence of graft-derived IL-22 is not due to *Lactobacillus* and *Clostridium* shifts.

DISCUSSION

In intestinal mucosa, IL-22 induces antimicrobial peptides such as C-type lectins or β -defensins that can potentially favor or disfavor certain bacterial species. According with this notion, a recent report showed that IL-22 deficient mice present altered microbial composition (25). The link between IL-22 and microbial composition is important. Notably, it has been described that intestinal flora can also promote the secretion of IL-22 by NKp46+ type 3 ILCs (26).

Given the antimicrobial properties of IL-22, we used the well characterized MHC-mismatch B6 \rightarrow BALB/c murine model in order to determine the potential impact of graft-derived IL-22 on recipient microbiota after allo-HSCT. Using metagenomic approach, we observed a dramatic loss of microbial diversity in allogeneic recipients as compared to syngeneic recipients in the B6 \rightarrow BALB/c model. This loss of diversity has been previously observed in other murine GVHD models (18) but also in patients treated with allo-HSCT (27). Beside a lower diversity, Taur and colleagues demonstrated that intestinal domination, defined as occupation of at least 30% of the microbiota by a single predominating bacterial taxon, occurred frequently in human allo-HCST context. Commonly encountered dominating organisms included *Enterococcus* or various Proteobacteria (28). In mice, we observed that transplantation with allogeneic or syngeneic T cells was associated with a large shift toward Firmicutes domination whereas *Enterococcus* represented less than 0.01% of total bacteria. Thus, among Firmicutes, our results suggest that IL-22 secreted by allogeneic T cells during GVHD can favor *Clostridium* expansion and disfavor *Lactobacillus*.

Lactobacillus domination has been showed to limit murine GVHD. In fact, probiotic administration of *Lactobacillus* prevented murine GVHD (21). Moreover, gut decontamination with amoxicillin and reintroduction of *L.johnsonii* decreased the severity of the disease (18). Interestingly, the major species of Lactobacillus we observed in absence of graft-derived IL-22 were *L.johnsonii* and *L.grasseri*.

In contrast, we observed a profound depletion of *Clostridium* in absence of graft-derived IL-22. Among *Clostridium*, certain species are known to induce protective Treg (29) or proinflammatory Th17 cells (22). After allo-HSTC, the major species of *Clostridium* was *C.sp K39* which has not been described as a potential contributor to gut GVHD.

Previously, we demonstrated that graft-derived IL-22 increases GVHD severity (17) which is in line with a more recent study showing that administration of recombinant IL-22 aggravates GVHD (30). In allo-HSCT context, recipient IL-22 producing type 3 ILCs have been showed to be eliminated (31) but the main IL-22 producing cells correspond to a specific subset of donor CD4+ T cells (32). During GVHD process, recipient microbiota changes are due to allogeneic CD4+ T cells (18). One mechanism by which donor CD4+ derived IL-22 may increase GVHD severity could be prevention of *Lactobacillus* expansion in favor of *Clostridium* which may exacerbate GVHD-associated intestinal damage and inflammation. In order to verify this hypothesis, we treated allogeneic recipient mice with antibiotic cocktail targeting Lactobacillaceae and Clostridiales. Surprisingly, depletion of *Lactobacillus* and *Clostridium* did not restore GVHD severity in absence of graft-derived IL-22. These results suggest that graft-derived IL-22 can participate to microbial homeostasis during allo-HSCT but the pathogenic mechanism of graft-derived IL-22 is not dependant of *Lactobacillus* or *Clostridium* shift. Other bacterial strains have been shown to be able to modulate immune response. For instance, certain *Bacteroides* are able to inhibit innate lymphoid cells (33). Moreover, a recent report showed that the abundance of bacteria belonging to the genus *Blautia* predicted for protection from severe GVHD (34). The potential impact of IL-22 on these strains remains to be addressed in GVHD context.

LEGENDS

Figure 1: Transplantation allogeneic T cells produces marked changes in the microbiota. (A-D) BALB/c mice were lethally irradiated and transplanted with 5×10^6 B6 T cell-depleted BM supplemented with 1×10^6 Syngeneic T cells from BALB/c or allogeneic WT or IL-22^{-/-} T cells from C57BL6. (B-D) Recipient mice were sacrificed at day 7 after allo-HSCT and pyrosequencing were performed on ileum content. (B and C) After OTU analysis at the genus level, diversity of ileal floras from BALB/c recipient mice transplanted with Syngeneic or WT or IL-22^{-/-} T cells was determined by the Shannon or Simpson index. (D) After phylogenetic analysis, comparison at phylum level of Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Chlamydia or Other bacteria from ileal samples are represented. Combined results from three experiments with three mice per group per experiment. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ns stands for “not significative”.

Figure 2: Absence of graft-derived IL-22 is associated with a predominance of *Lactobacillus* after allo-HSCT. (A-G) BALB/c mice were transplanted and ileal floras were analyzed as in

Figure 1. (A) Principal coordinate analysis at the genus level is represented. (B) After phylogenetic analysis, bacterial composition at the genus level of ileal flora of each recipient mice is depicted. (C-G) For a more precise analysis of *Clostridium* and *Lactobacillus* species, mean bacterial composition at the species level of ileal flora is depicted. Combined results from at least two experiments with 3-4 mice per group are shown.

Figure 3: Gut decontamination amplifies the correlation of absence of graft-derived IL-22 and less severe GVHD. (A-C) BALB/c mice were transplanted as in Fig. 1. When indicated, recipient mice received antibiotic treatment (ATB) which consisted in added 1g/L of Kanamycin, Vancomycin, Amoxicillin and Metronidazole in the drinking water for 1 week before allo-HSCT and for 4 weeks after allo-HSCT. (B) Recipient mice were sacrificed on day 7 after and qPCR specific for Lactobacillaceae or SFB 16S rRNA genes were performed on DNA extracted from ileum content. (C) Survival data were combined from three experiments with 5 mice per group.

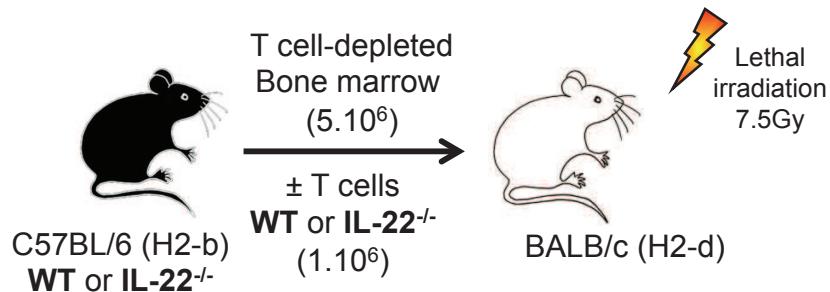
REFERENCES

1. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. Lancet. 2009 May 2;373(9674):1550-61.
2. Brestoff JR, Artis D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. Nat Immunol. 2013 Jul;14(7):676-84.
3. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nat Rev Immunol. 2009 May;9(5):313-23.
4. van Bekkum DW, Roodenburg J, Heidt PJ, van der Waaij D. Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. J Natl Cancer Inst. 1974 Feb;52(2):401-4.
5. Jones JM, Wilson R, Bealnear PM. Mortality and gross pathology of secondary disease in germfree mouse radiation chimeras. Radiat Res. 1971 Mar;45(3):577-88.
6. Penack O, Holler E, van den Brink MR. Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. Blood. 2010 Mar 11;115(10):1865-72.
7. Rutz S, Eidenschenk C, Ouyang W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. Immunological reviews. [Review]. 2013 Mar;252(1):116-32.
8. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. Immunity. 2004 Aug;21(2):241-54.
9. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. Nat Immunol. 2011 May;12(5):383-90.
10. Sohnle PG, Hunter MJ, Hahn B, Chazin WJ. Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). J Infect Dis. 2000 Oct;182(4):1272-5.

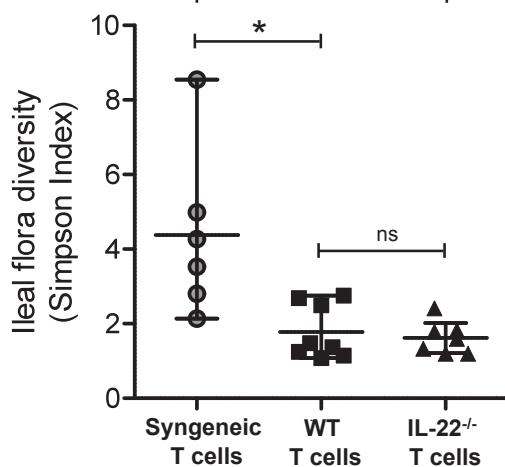
11. Holmes MA, Paulsene W, Jide X, Ratledge C, Strong RK. Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration. *Structure*. 2005 Jan;13(1):29-41.
12. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*. 2006 Aug 25;313(5790):1126-30.
13. Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*. 2011 May 27;145(5):745-57.
14. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Dec;75(23):7537-41.
15. Magurran AE. Measuring biological diversity. Blackwell publishing ed.; 2004.
16. Qiu J, Guo X, Chen ZM, He L, Sonnenberg GF, Artis D, et al. Group 3 innate lymphoid cells inhibit T-cell-mediated intestinal inflammation through aryl hydrocarbon receptor signaling and regulation of microflora. *Immunity*. 2013 Aug 22;39(2):386-99.
17. Couturier M, Lamarthee B, Arbez J, Renaud JC, Bossard C, Malard F, et al. IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect. *Leukemia*. 2013 Jul;27(7):1527-37.
18. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med*. 2012 May 7;209(5):903-11.
19. Pridmore RD, Berger B, Desiere F, Vilanova D, Barreto C, Pittet AC, et al. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 24;101(8):2512-7.
20. Buhnik-Rosenblau K, Danin-Poleg Y, Kashi Y. Predominant effect of host genetics on levels of *Lactobacillus johnsonii* bacteria in the mouse gut. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Sep;77(18):6531-8.
21. Gerbitz A, Schultz M, Wilke A, Linde HJ, Scholmerich J, Andreesen R, et al. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4365-7.
22. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 2009 Oct 30;139(3):485-98.
23. Beelen DW, Elmaagacli A, Muller KD, Hirche H, Schaefer UW. Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood*. 1999 May 15;93(10):3267-75.
24. Vossen JM, Heidt PJ, van den Berg H, Gerritsen EJ, Hermans J, Dooren LJ. Prevention of infection and graft-versus-host disease by suppression of intestinal microflora in children treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990 Jan;9(1):14-23.
25. Zenewicz LA, Yin X, Wang G, Elinav E, Hao L, Zhao L, et al. IL-22 deficiency alters colonic microbiota to be transmissible and colitogenic. *J Immunol*. 2013 May 15;190(10):5306-12.
26. Satoh-Takayama N, Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, Sawa S, Lochner M, Rattis F, et al. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity*. 2008 Dec 19;29(6):958-70.
27. Holler E, Butzhammer P, Schmid K, Hundsrucker C, Koestler J, Peter K, et al. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic SCT: Loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal GvHD. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Jan 31.
28. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2012 Oct;55(7):905-14.

29. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*. 2011 Jan 21;331(6015):337-41.
30. Zhao K, Zhao D, Huang D, Yin L, Chen C, Pan B, et al. Interleukin-22 Aggravates Murine Acute Graft-Versus-Host Disease by Expanding Effector T Cell and Reducing Regulatory T Cell. *J Interferon Cytokine Res*. 2014 Apr 10.
31. Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, O'Connor MH, Young LF, Singer NV, et al. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity*. 2012 Aug 24;37(2):339-50.
32. Zhao K, Zhao D, Huang D, Song X, Chen C, Pan B, et al. The identification and characteristics of IL-22-producing T cells in acute graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Immunobiology*. 2013 Dec;218(12):1505-13.
33. An D, Oh SF, Olszak T, Neves JF, Avci FY, Erturk-Hasdemir D, et al. Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. *Cell*. 2014 Jan 16;156(1-2):123-33.
34. Fuji S, Kapp M, Einsele H. Possible implication of bacterial infection in acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Oncol*. 2014;4:89.

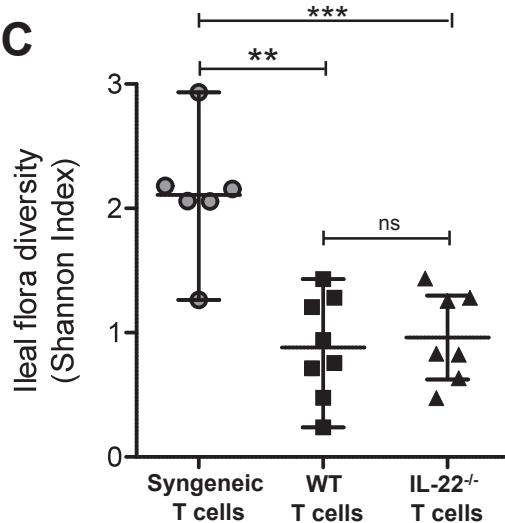
A



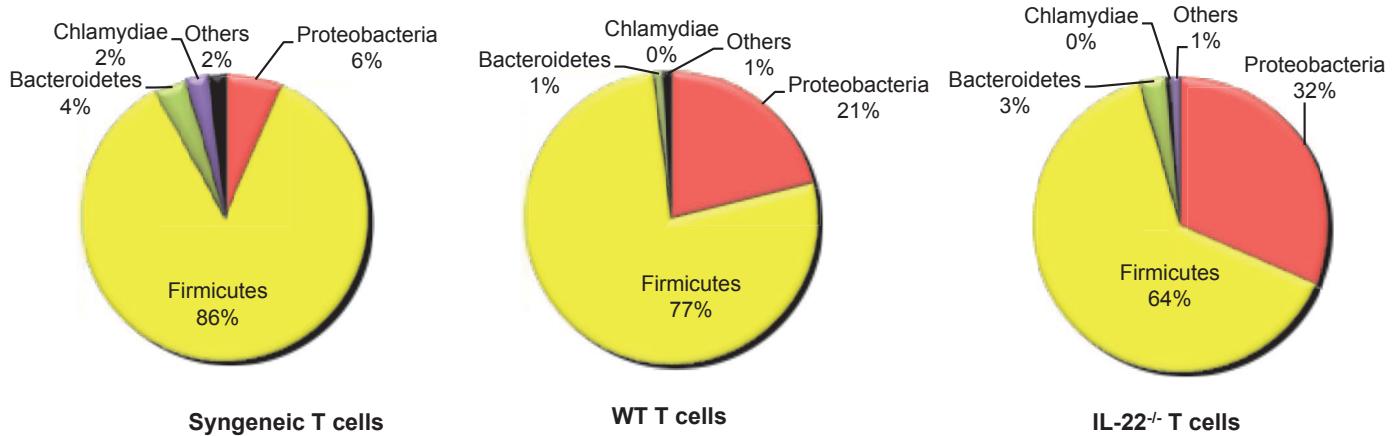
B

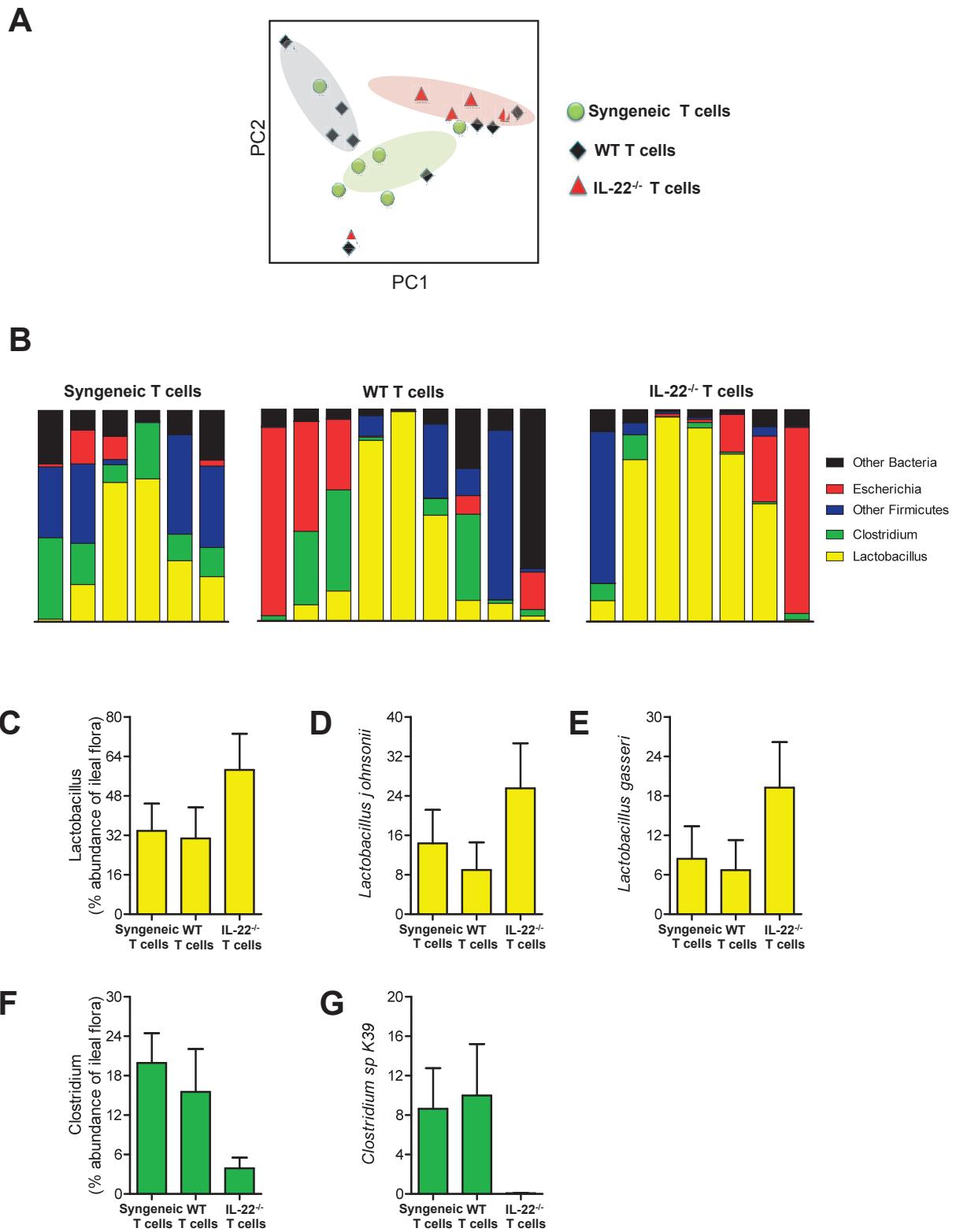


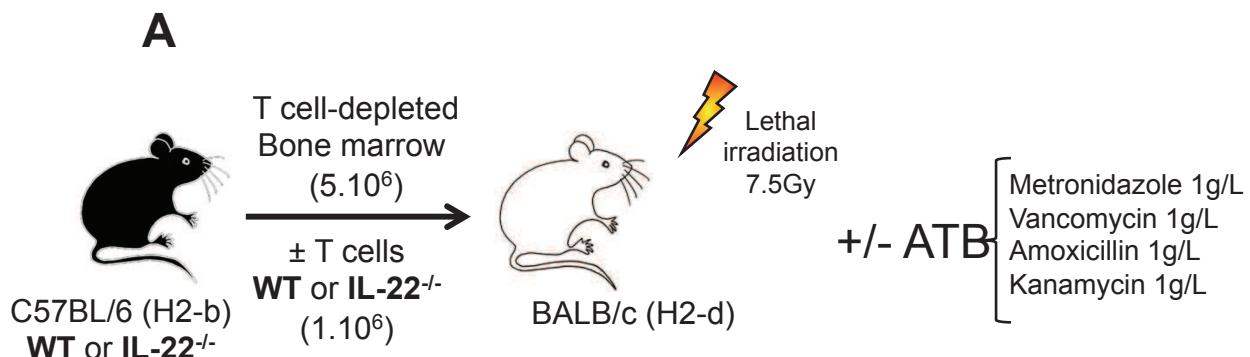
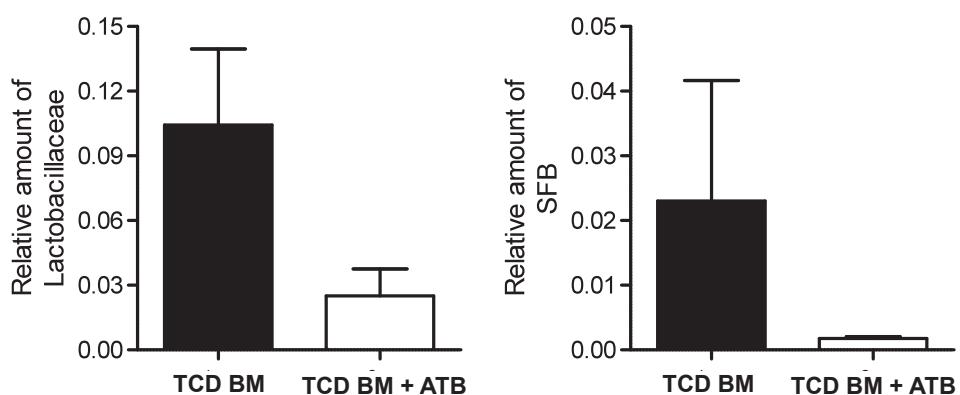
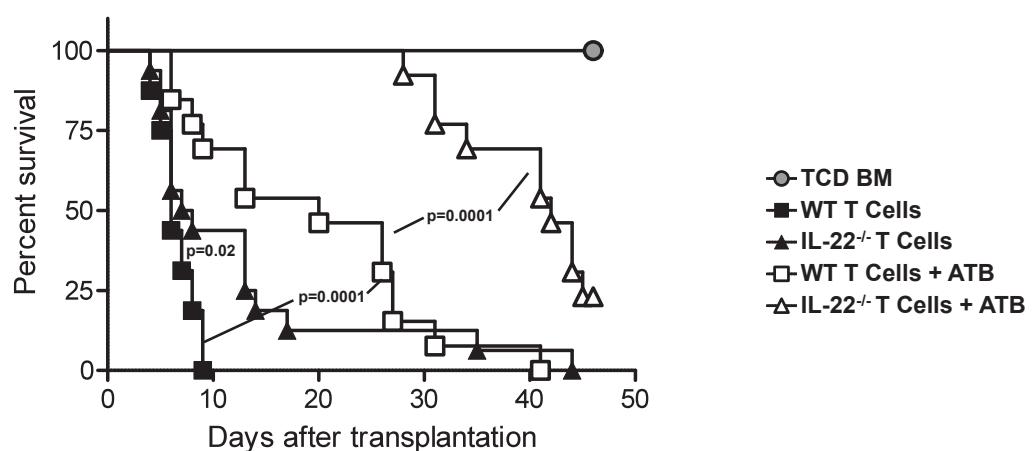
C



D





**B****C**

Discussion

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est une thérapeutique pour traiter les patients atteints d'hémopathies malignes ou non malignes. Le nombre de ces allogreffes est en constante augmentation du fait, notamment, de la diversification des sources de greffon et de l'utilisation de conditionnements prégreffes ayant une toxicité réduite ce qui permet de les appliquer à des patients plus à risques et plus âgés. Cependant, la GVHD reste une complication majeure de ces greffes et entraîne une morbidité et une mortalité importantes. La GVHD aiguë correspond à une réponse immune inflammatoire exacerbée qui conduit à la destruction des tissus sains du receveur par les cellules immunitaires du donneur. Les études pionnières de l'équipe de J.L. Ferrara (Ferrara et al., 2009) ont proposé un modèle physiopathologique de la GVHD aiguë comprenant trois étapes: (1) l'activation des CPA par les cytokines inflammatoires, (2) l'activation des LT issus du donneur, et (3) la phase effectrice conduisant à la destruction des tissus cibles (Ferrara et al., 2009). La contribution de l'immunité innée dans le déclenchement de la GVHD a été revisitée par de nombreuses études au cours des dernières années, d'une part par l'identification des PAMPs et des récepteurs cellulaires comme les PRR. Par exemple, une étude a montré que l'infiltration de polynucléaires neutrophiles, cellules majoritaires du sang, suite à la reconnaissance de produits microbiens via la signalisation TLR, était associée à une sévérité de GVHD intestinale plus importante (Schwab et al., 2014). L'IL-22 étant sécrétée à la fois par les cellules de l'immunité innée et adaptative dans les tissus cibles de la GVHD et ayant un rôle soit protecteur, soit inflammatoire, nous avons émis l'hypothèse de sa participation dans la GVHD. Au cours de nos travaux, nous avons cherché à comprendre si l'effet dominant de l'IL-22 consiste à protéger les tissus ou bien à augmenter l'inflammation. Nous avons ensuite investigué les mécanismes directs de l'IL-22 sur ses cellules cibles dans la GVHD. Enfin, étant donné le lien indirect entre l'IL-22 et microbiote intestinal, nous avons étudié les effets de l'IL-22 sur le changement de composition de la flore intestinale et les conséquences de ce changement au cours de l'allo-CSH.

A. L'IL-22 dans la physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte : amplification de la réponse inflammatoire au détriment de la protection tissulaire

La GVHD résulte de l'activation des lymphocytes T du donneur qui reconnaissent et détruisent les tissus de l'hôte dont la peau et les intestins. Compte tenu des propriétés de l'IL-22 dans les tissus qui sont le plus souvent la cible de la GVHD, nous avons évalué sa contribution au développement de cette maladie dans un modèle expérimental de GVHD

aiguë. Nos travaux ont montré que l'IL-22 contribuait à la sévérité de la GVHD en participant à la fois à l'inflammation systémique et locale. Ce résultat est en adéquation avec le rôle critique de l'IL-22 dans l'inflammation systémique déjà démontré dans des modèles murins. En effet, dans un séduisant modèle d'administration de l'IL-22 à l'aide d'un adénovirus, l'exposition systémique d'IL-22 induit une réponse de phase aiguë détectée aussi bien au niveau sanguin que dans les organes périphériques (Liang et al., 2010). De plus, dans le contexte d'allo-CSH, une étude très récente a montré que l'administration systémique d'IL-22 dans des souris post-transplantation exacerbait la maladie, ce qui confirme la contribution délétère de cette cytokine dans la GVHD (Zhao et al., 2014).

Dans l'étude de K Zhao, les auteurs ont également montré que l'IL-22 contribuait indirectement à l'expansion des LT effecteurs et à la diminution du nombre de Treg. Ces données rejoignent nos propres observations : nous avions noté une augmentation des Treg en absence d'IL-22 issue du greffon dans la rate et les ganglions des souris greffées. De nombreux travaux expérimentaux ont prouvé que les Treg pouvaient contrôler les réponses alloréactives et réduire la sévérité de la GVHD dans la souris (Edinger and Hoffmann, 2011; Ganguly et al., 2014). Les mécanismes par lesquels l'absence d'IL-22 permet de promouvoir l'expansion de Treg ne sont pas encore bien déterminés puisque les Treg n'expriment pas le récepteur de cette cytokine. Il est probable qu'il s'agisse d'un effet indirect et que l'effet pathogène de l'IL-22 dans le contexte d'allo-CSH entretienne la prolifération de LT conventionnels pro-inflammatoires au détriment des Treg et que ce déséquilibre puisse participer à la sévérité de la GVHD.

1) Implication de la synergie IL-22/IFN de type I dans la GVHD

L'IL-22 est capable d'induire l'inflammation selon les cytokines du milieu environnant. Nos travaux ont montré aussi bien *in vitro* que *in vivo* une synergie entre l'IL-22 et IFN de type I dans la souris. *In vivo*, ce sont les expériences utilisant des souris receveuses invalidées pour le récepteur aux IFN type I et des souris donneuses invalidées pour l'IL-22 qui démontrent pour la première fois la contribution de cette synergie dans la GVHD. Cependant, dans ce travail, nous n'avons pas pu mettre en évidence la production d'IFN de type I. Il est possible que la cinétique analysée ne soit pas adéquate. Des expériences visant à identifier les CPA produisant les IFN de type I sont donc nécessaires pour une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu. Le conditionnement prégreffe induit des lésions épithéliales, entraînant la translocation de signaux « danger » responsables de l'infiltration de cellules de l'immunité participant à la réponse inflammatoire. D'autres travaux de notre

équipe ont montré que les cellules dendritiques plasmocytoïdes (PDC), exprimant notamment TLR9 et capables de sécréter de l'IFN- α , infiltreraient aussi les muqueuses intestinales chez des patients atteints de GVHD (Bossard et al., 2012). Dans la peau, l'infiltration de PDC est également observée chez les patients atteints de GVHD cutanée (Malard et al., 2013). La relation entre PDC et IL-22 est suggérée par les données montrant que l'IFN- α produit par les PDC peut augmenter l'expression de la sous-unité IL-22R1a sur les kératinocytes (Tohyama et al., 2012). D'autre part, chez l'homme, la différenciation des LT Th22, exprimant CCR10, CCR6 et CCR4 et produisant de l'IL-22 mais pas d'IL-17 ni IFN- γ est dépendante des PDC (Duhen et al., 2009). De plus, l'IFN- α permet de différencier les monocytes en DC conventionnelles productrices d'IL-23, cytokine importante dans l'expansion des LT Th17 et Th22 (Santini et al., 2011). Ainsi, les lésions épithéliales induites par le conditionnement, que ce soit au niveau cutané ou intestinal, induisent l'infiltration de cellules de l'immunité innée au niveau local et celles-ci pourraient contribuer à la fois à la sécrétion des IFN de type I, à l'augmentation de l'expression du récepteur à l'IL-22 et au maintien des LT producteurs d'IL-22.

Un des mécanismes par lequel l'IL-22 peut amplifier l'inflammation locale repose donc sur la synergie entre l'IL-22 issue du greffon et les IFN de type I produits au cours de la réponse allogénique.

Au niveau protéique, la synergie IL-22/IFN de type I peut provenir de l'interaction directe des récepteurs des deux cytokines. En effet, il est reconnu que le récepteur aux IFN de type I interagit physiquement avec le récepteur à l'IFN- γ , facilitant la génération d'homodimères de PSTAT1 (Takaoka et al., 2000). Une interaction similaire a aussi été rapportée entre le récepteur aux IFN de type I et le récepteur à l'IL-6 (gp130) (Mitani et al., 2001). Il serait intéressant de déterminer si une telle interaction est possible entre ce récepteur et celui de l'IL-22.

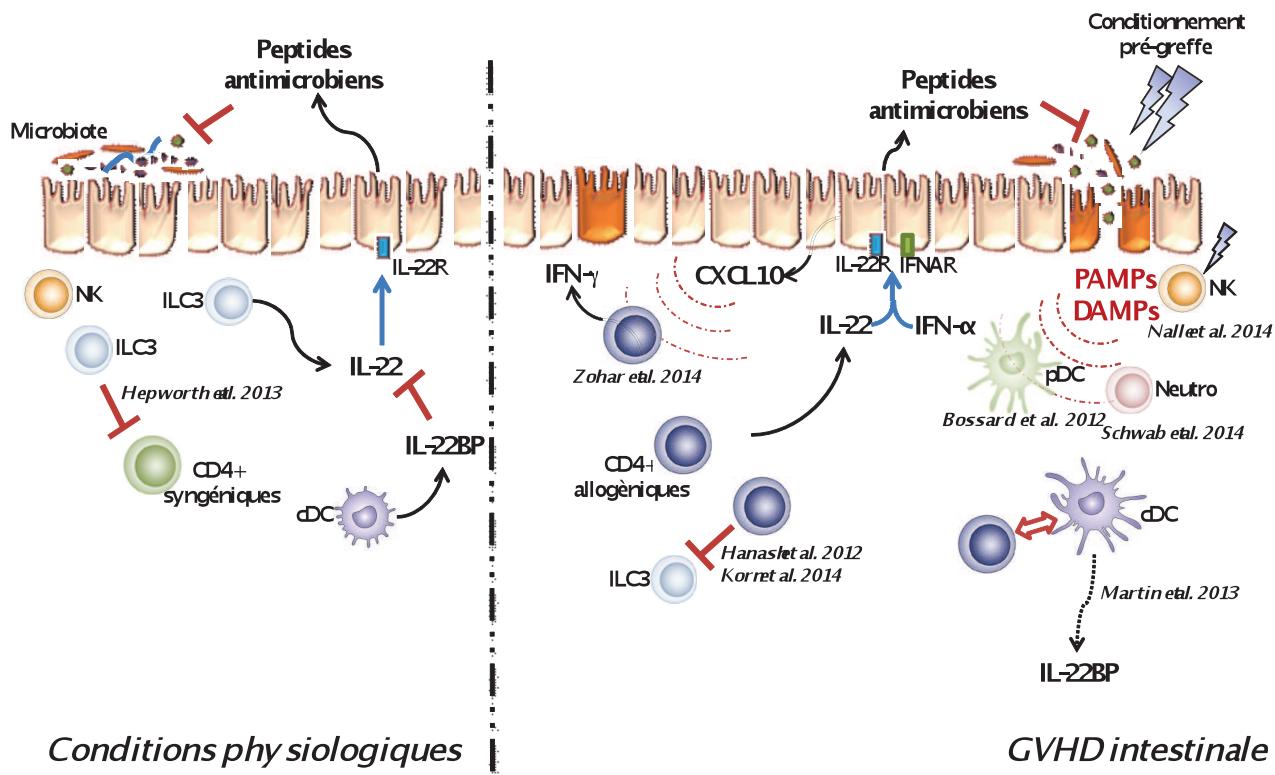


Figure 13: Hypothèse de l'effet pathogène de l'IL-22 dans la GVHD intestinale. Dans les conditions physiologiques, les ILC3 sont responsables à la fois de l'homéostasie du microbiote intestinal via la sécrétion d'IL-22 mais aussi de l'homéostasie des lymphocytes infiltrant les muqueuses. L'IL-22 est, quant à elle, contrôlée par l'IL-22BP sécrétée par les DC immatures. Dans le contexte de l'allo-CSH, le conditionnement pré-greffe entraîne la rupture de la barrière épithéliale et la destruction des NK du receveur. Ces lésions cellulaires engendrent le relargage de DAMPs ainsi que de PAMPs issus du microbiote. Ces signaux danger induisent l'infiltration de PDC et de neutrophiles et sont responsables de l'activation des CPA qui activent à leur tour les LT du donneur provoquant « l'orage cytokinique ». L'IL-22 et les IFN de type Th1 participent alors à la sécrétion de CXCL10 et à l'entretien de l'inflammation de type Th1.

2) Implication de la voie Jak/STAT1 dans la GVHD

La synergie entre l'IL-22 et les IFN de type I induit la phosphorylation de STAT1 dans les cellules épithéliales intestinales du receveur probablement au détriment de la voie STAT3 qui semble plutôt protectrice (Nagalakshmi et al., 2004). L'implication de l'activation de STAT1 dans la GVHD intervient à plusieurs niveaux. En effet, il a été montré que l'invalidation de STAT1 dans les cellules du donneur était associée à une diminution de la GVHD (Ma et al., 2011). Ainsi, les LT du donneur invalidés pour STAT1 se différencient préférentiellement en Treg plutôt qu'en Th1, ce qui aboutit à une inhibition de la réponse allogénique. De plus, la transplantation de cellules médullaires invalidées pour STAT1 mène à l'expansion de PDC issues du donneur et favorisant l'expansion des Treg. En effet, ces PDC invalidées pour STAT1 présentent un taux intracellulaire de STAT3 plus élevé. Elles sécrètent moins d'IFN- α et sont moins efficaces pour induire la différenciation Th1 par présentation antigénique (Capitini et al 2014).

De manière intéressante, la polarisation intracellulaire STAT1/STAT3 peut être contrôlée par l'IL-22 par l'induction de protéines de la famille SOCS (Suppressor of cytokine signaling) (Hoegl et al., 2011). En effet, il a été démontré que les protéines SOCS1 et SOCS2 étaient responsables de l'inhibition de STAT1 (Song and Shuai, 1998). Récemment, une étude a montré que l'expression de SOCS1 est diminuée chez les patients atteints de GVHDA ou GVHDc, ce qui suggère que l'induction potentielle de STAT1 par l'IL-22 n'est plus inhibée dans ce contexte (Lee et al., 2013).

Dans les cellules du receveur, l'induction de la GVHD est associée à une phosphorylation rapide de STAT1 dans le foie et la rate (Leng et al., 2006). Dans cette étude, les auteurs ont montré dans la souris que le traitement par un inhibiteur de HDAC (Histone desacetylase) diminuait la sévérité de la GVHD, entraînant à la fois une baisse de la phosphorylation de STAT1 systémique et locale et une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires. Dans la forme chronique de la GVHD, l'activation de STAT1 par les IFN de type 1 semble être une étape critique dans l'inflammation de la muqueuse orale. En effet, les patients atteints de GVHDc sévère présentent un niveau élevé de STAT1 phosphorylé au niveau des kératinocytes comparé aux patients ne développant pas de lésions orales. Dans ce contexte, l'activation de STAT1 est également associée à une augmentation de médiateurs de l'inflammation tels que CXCL9 et autres effecteurs de la voie Th1 (Imanguli et al., 2009). Ces données sont en accord avec nos observations de l'augmentation importante de l'activation STAT1 à la fois dans les cellules épithéliales mais

aussi dans les cellules hématopoïétiques infiltrant les muqueuses coliques des patients atteints de GVHD gastro-intestinale.

Etant donné le rôle clé des cytokines pro-inflammatoires dans la GVHD, l'inhibition des signaux de transduction semble être une approche thérapeutique prometteuse. Les Janus Kinases (Jak) sont des protéines cytoplasmiques initiant la signalisation cellulaire menant à la sécrétion de cytokine et passant par l'activation des formes latentes des protéines STAT (Ihle and Kerr, 1995). Dans des modèles précliniques, l'utilisation des inhibiteurs de Jak2 et 3 sont efficaces pour limiter la GVHD (Betts et al., 2011; Cetkovic-Cvrlje et al., 2002). Récemment, une étude a également souligné le rôle du ruxolitinib, un inhibiteur de Jak1 et 2, capable de limiter la GVHD en inhibant notamment la différenciation des LT du donneur en Th1 (Spoerl et al., 2014). De plus, une autre étude très récente a rapporté que l'inhibition de STAT1 par un peptide agoniste du récepteur du glucagon-like peptide-1 (GLP-1), l'Exenatide, était associée à une GVHD moins sévère (Capitini et al 2014). Dans ces études, les auteurs se sont particulièrement intéressés aux effets des inhibiteurs Jak ou STAT sur le devenir des cellules du donneur et sur leur capacité à mener la réponse allogénique. Nos résultats montrent que le traitement par des inhibiteurs de Jak est également susceptible de limiter l'activation de STAT1 ainsi que l'expression de chimiokines telles que CXCL10 dans les épithéliums intestinaux.

Les effets des chimiokines de la famille de CXCL10 dans l'inflammation commencent à être bien décrits. Récemment, une étude a démontré que ces chimiokines n'étaient pas seulement responsables de la migration et du recrutement des cellules exprimant CXCR3 dans les tissus cibles. En effet, les chimiokines CXCL9 et CXCL10 sont aussi capables d'induire la différenciation des LT CD4+ naïfs en Th1 sous la dépendance de STAT1. Paradoxalement, CXCL11, connu pour se lier à un autre épitope de CXCR3, induit préférentiellement des LT produisant de l'IL-10 (Zohar et al., 2014). L'expression de CXCL10 induite par la synergie IL-22/IFN de type I et l'activation de STAT1 dans les cellules des muqueuses du receveur pourraient donc à la fois participer au recrutement des Th1 au niveau local mais aussi entretenir l'inflammation de type Th1 en influençant la polarisation des LT. La **figure 13** schématise les différents mécanismes par lesquels l'IL-22 issue du donneur peut participer à la GVHD tandis que la **figure 14** présente les différents niveaux d'implication de la synergie entre IFN- α et IL-22 et de la voie STAT1.

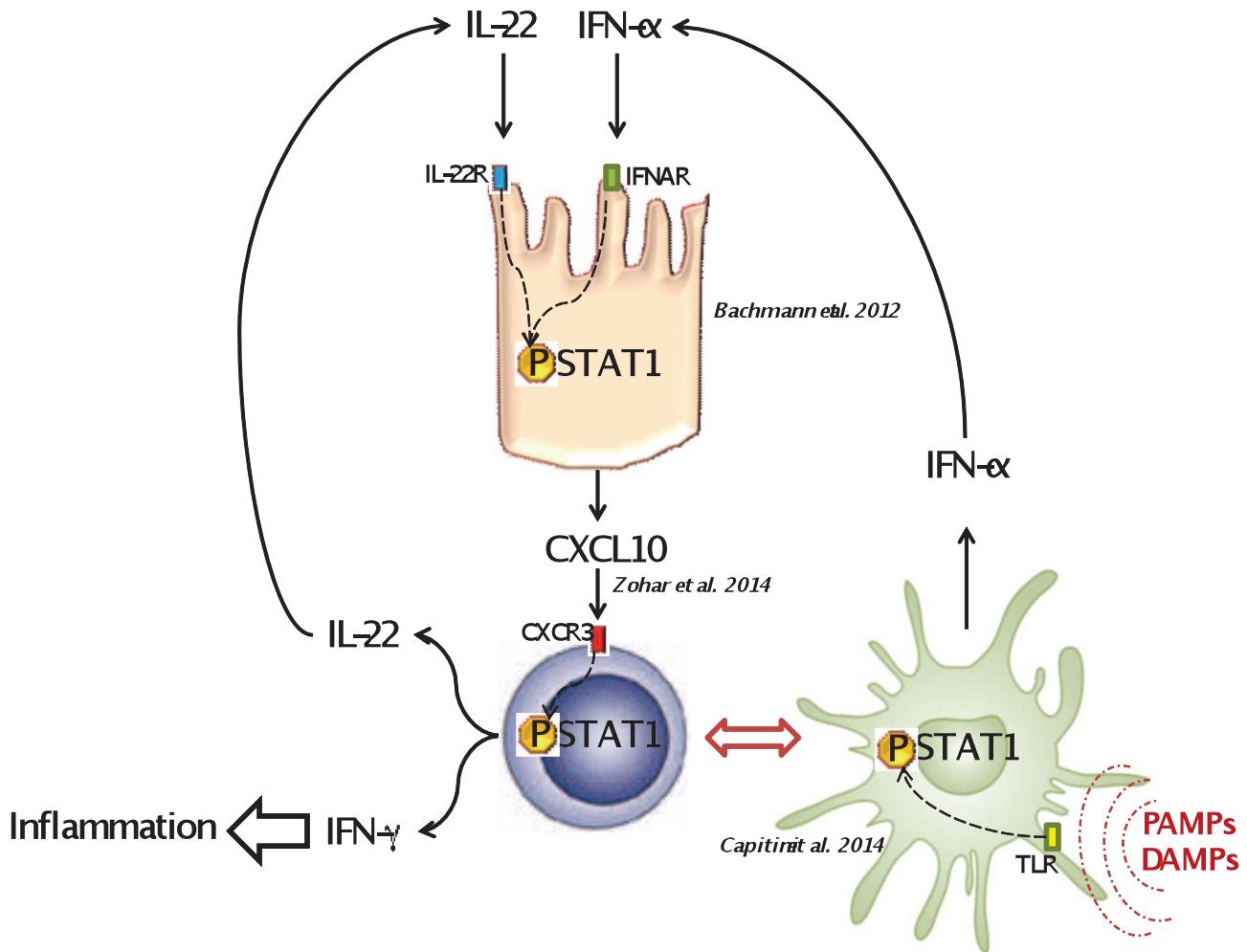


Figure 14: Différents niveaux d'implication de la voie STAT1 dans l'inflammation intestinale. Suite à l'infiltration des PDC (cellule verte) dans les tissus intestinaux en réponse aux signaux danger, les PAMPs et DAMPs provoquent la sécrétion locale d'IFN- α via la reconnaissance par les TLR suivie de l'activation de STAT1. L'IFN- α est alors capable d'induire l'activation de STAT1 dans l'épithélium (cellule rose) entraînant la production de CXCL10 dans l'intestin. CXCL10 induit à la fois la migration des lymphocytes CXCR3+ (cellule bleue) mais également leur différenciation en Th1 sécréteurs d'IFN- γ sous la dépendance de STAT1. Les Th1 participent alors l'inflammation locale en sécrétant également de l'IL-22, contribuant à l'activation de STAT1 dans les cellules épithéliales.

3) L'IL-22 constitue-t-elle une cible thérapeutique?

Malgré nos observations, il reste encore prématuré de conclure sur l'impact négatif de l'IL-22 dans le contexte d'allo-CSH, même si celui-ci semble être dominant. En effet, mis à part les LT du donneur, d'autres cellules peuvent sécréter de l'IL-22 au cours de l'allo-CSH. Une étude a, par exemple, montré que les ILC localisées dans l'intestin des souris receveuses résistaient au conditionnement prégreffe et sécrètent de l'IL-22 lorsqu'elles étaient activées par l'IL-23, participant ainsi à la protection des cellules souches intestinales (Hanash et al., 2012). Cette étude montre cependant que ces ILC issues du receveur sont détruites au cours de la réaction allogénique. D'autre part, les ILC peuvent interagir avec les LT CD4+ dans l'intestin. Il a été notamment rapporté que les ILC expriment les molécules du CMH de classe II ce qui leur permet de réguler le nombre des LT CD4+ (Hepworth et al., 2013). Paradoxalement, les LT CD4+ semblent aussi capables de réguler le nombre d'ILC du groupe 3 dans les muqueuses intestinales (Korn et al., 2014). Dans le contexte d'allo-CSH, il est probable que les ILC du receveur expriment les molécules du CMH et soient éliminées par les LT allogéniques. Néanmoins, le rôle des ILC issues du donneur reste encore à explorer. De manière intéressante, une étude a montré qu'un taux élevé d'ILC issues du donneur dans le sang de patients traités par allo-CSH était associé à une GVHD moins sévère (Munneke et al., 2014). Il serait donc important de déterminer si ces cellules infiltrent les tissus cibles de la maladie et, produisent de l'IL-22 *in situ* et protègent les cellules souches intestinales.

L'effet de l'IL-22 dans le contexte d'allo-CSH reste donc difficile à cerner. Tout d'abord sa détection reste encore techniquement difficile même par cytométrie de flux. La cinétique de sécrétion de l'IL-22 par les LT du donneur ou les ILC n'est sans doute pas encore bien déterminée. De plus, les effets de l'IL-22 semblent multiples et complexes, rendant difficile l'approche thérapeutique visant à neutraliser cette cytokine dans le contexte d'allo-CSH. Une étude a montré que l'IL-22 produite par les cellules LTI RORyt⁺CCR6⁺NKp46⁻ du thymus est nécessaire pour induire la régénération thymique après une irradiation corporelle totale dans un modèle expérimental (Dudakov et al., 2012). La neutralisation de l'IL-22 postgreffe pourrait donc avoir un impact direct sur la régénération du thymus potentiellement endommagé à la suite du conditionnement prégreffe, et influencer négativement la reconstitution immunitaire. Une étude récente a montré dans un modèle de GVHD que l'administration d'IL-22 recombinante à des souris receveuses entraînait une sévérité plus importante de la maladie notamment au niveau intestinal. Paradoxalement, la régénération du thymus était meilleure dans le groupe ayant reçu la cytokine durant les deux premières semaines post-greffe mais après cela, la taille du thymus était comparable dans

les deux groupes (Zhao et al., 2014). Ces données indiquent qu'une meilleure régénération thymique en présence d'IL-22 n'est pas corrélée avec une diminution de la GVHD mais également que l'effet de l'IL-22 peut être pathogénique pour certains organes et protecteur pour d'autres, et ce, dans le même contexte allogénique.

4) Rôle de l'IL-22 dans la GVHD : quelle influence au niveau intestinal?

a) Impact du conditionnement prégreffe

L'effet de l'IL-22 sur la régénération tissulaire pourrait potentiellement être bénéfique dans le contexte d'allo-CSH. En effet, le conditionnement prégreffe combinant chimiothérapies et irradiation contribue aux lésions de l'épithélium intestinal, favorisant l'exposition systémique aux PAMPs normalement séquestrés au niveau de la lumière intestinale (Ferrara et al., 2009). Physiologiquement, les ILC de type 3 sécrètent de l'IL-22 pour participer à la réparation des tissus mais celles-ci sont détruites au cours de la GVHD (Hanash et al., 2012). Paradoxalement, l'IL-22 issue du donneur aggrave l'inflammation intestinale au cours de la GVHD. Une étude récente a proposé un modèle expérimental murin permettant de dissocier les effets des conditionnements prégreffe : l'effet de la destruction de la barrière intestinale seul et l'effet de la destruction des cellules du receveur permettant la prise de greffe (Nalle et al., 2014). Leurs résultats montrent que le conditionnement prégreffe n'est pas nécessaire pour induire une réponse allogénique dans un modèle murin d'incompatibilité de CMH et que seule la suppression des cellules NK du receveur suffit à la prise du greffon (Nalle et al., 2014). De plus, cette élégante étude montre que la destruction physique de la barrière intestinale seule n'est pas suffisante à l'induction de la GVHD dans un modèle d'incompatibilité des antigènes mineurs. En effet, dans ce modèle, les souris receveuses développaient une GVHD seulement si les NK du receveur étaient détruites et que la barrière intestinale était lésée ce qui suggère la nécessité des signaux DAMPs libérés par la destruction des cellules NK et des signaux PAMPs issus du microbiote intestinal pour activer les CPA et induire la GVHD. Ce modèle comprenant l'utilisation de souris Rag1^{-/-} déplétées de NK comme receveuses et l'utilisation de sulfate de dextran pour induire les lésions épithéliales nous offre la perspective suivante : pouvoir déterminer si la destruction des barrières intestinales est nécessaire à l'effet pathogène de l'IL-22 dans le contexte l'allo-CSH.

Discussion

Dans nos travaux, nous avons décrit pour la première fois une diminution de l'expression d'IL22BP après allo-CSH. L'expression de l'IL-22BP est maximale lorsque la barrière intestinale est intègre (Huber et al., 2012b). A l'inverse, les lésions tissulaires et l'infiltration de bactéries diminuent l'expression de l'IL-22BP. Le mécanisme par lequel les cellules dendritiques expriment ou non l'IL-22BP est contrôlé par l'inflammasome (Huber et al., 2012a). Les inflammasomes sont des complexes multiprotéiques cytoplasmiques qui agissent comme senseurs de PAMPs et DAMPs. Ils peuvent se constituer notamment de protéines de la famille des NLR comme NLRP3 ou NLRP6 et sont responsables de la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 par les cellules épithéliales (Elinav et al., 2011; Zaki et al., 2010). L'IL-18 ainsi produite est alors capable d'inhiber l'expression de l'IL-22BP par les DC (Schroder and Tschoop, 2010). Les études portant sur l'effet de IL-18, dans un contexte de GVHD, ont donné des résultats controversés (Reddy and Ferrara, 2003; Scholl et al., 2004).

La diminution de l'expression de l'IL-22BP est vraisemblablement responsable d'une augmentation de la biodisponibilité de l'IL-22, du moins au niveau local. Ces observations doivent toutefois être confirmées chez les patients traités par allo-CSH. De manière intéressante, il a été rapporté que certains peptides antimicrobiens, tels que Reg3 α , produits par les cellules de Paneth en présence d'IL-22 étaient détectés dans les sérum des patients en GVHD et validés comme biomarqueurs de la GVHD intestinale (Ferrara et al., 2011). Ces données sont concordantes avec nos observations et celles de l'équipe d'Y. Eriguchi qui montre une augmentation de l'expression de défensines dans les souris en GVHD et qui confirme que l'IL-22 est bien active au niveau intestinal au cours de l'allo-CSH (Couturier et al., 2013; Eriguchi et al., 2013).

b) Impact de la flore microbienne dans le contexte d'allo-CSH

Le lien entre IL-22 et flore microbienne est étroit. L'IL-22 induit la sécrétion de peptides antimicrobiens tels que les β -défensines 2 et 3, S100A8 et S100A9, capables de cibler spécifiquement certains microorganismes. Alors que les β -défensines agissent en déstabilisant la membrane bactérienne, l'action antimicrobienne de S100A8 et S100A9 est basée sur la séquestration des éléments tels que le zinc et le fer (Holmes et al., 2005; Sohnle et al., 2000). Reg3 γ affecte la croissance des bactéries à gram positif en interférant directement avec le peptidoglycane (Cash et al., 2006). Parallèlement, la flore microbienne

Discussion

est aussi capable d'induire directement la sécrétion d'IL-22 par les ILC3 NKp46+ (Satoh-Takayama et al., 2008). Ainsi, les souris invalidées pour l'IL-22 présentent une altération de la composition de la flore microbienne intestinale provoquant une susceptibilité accrue aux colites induites (Zenewicz et al., 2013). Ces données peuvent potentiellement expliquer les résultats de l'équipe de A.M. Hanash qui montre que les souris invalidées pour l'IL-22 sont aussi plus susceptibles à la GVHD intestinale (Hanash et al., 2012). Etant donné le lien entre l'IL-22 et flore bactérienne, nous avons dans la troisième partie de notre travail commencé à investiguer l'effet de l'IL-22 sur la flore microbienne intestinale et ses conséquences au cours de l'allo-CSH.

L'impact important du microbiote dans le contexte d'allo-CSH est connu depuis de nombreuses années. Dans les années 70, des études dans les modèles murins ont montré que la décontamination intestinale par des antibiotiques (van Bekkum et al., 1974) ou la transplantation en condition stérile (Jones et al., 1971) atténuait la sévérité de la GVHD dans la souris. Chez l'homme aussi, il a été rapporté qu'un environnement bactérien appauvri était associé à un risque plus faible de GVHD (Storb et al., 1983). De manière intéressante, la réduction de la flore intestinale par traitement antibiotique limite non seulement la GVHD intestinale mais également cutanée ce qui suggère un effet systémique du microbiote sur la maladie (Lampert et al., 1988). Ces données sont concordantes avec le fait que certains antibiotiques sont quelquefois prescrits pour produire des effets anti-inflammatoires comme l'azithromycine dans la fibrose kystique, le sulfasalazine chez les patients traités pour l'arthrite rhumatoïde ou le dapsoné utilisé chez les patients atteints de dermatose neutrophilique. Il est possible que les effets anti-inflammatoires de ces antibiotiques soient dus à des modifications du microbiote ou plus simplement à la diminution de taux de PAMPs relargués dans l'organisme (Surana and Kasper, 2014).

Dans les années 1990, des études ont confirmé que la décontamination bactérienne des patients traités par allo-CSH pouvait potentiellement diminuer le risque de GVHD (Beelen et al., 1999; Beelen et al., 1992; Vossen et al., 1990). Cependant, l'utilisation prophylactique d'antibiotique pose le problème de la favorisation de souches bactériennes résistantes qui peuvent prendre le dessus sur la flore commensale normale et causer des infections (Chakrabarti et al., 2000; Taur et al., 2012). Le type d'antibiotique utilisé ainsi que le timing de leur administration doit donc être soigneusement étudié.

Le contexte d'allo-CSH à lui seul est associé à une perte de la diversité microbienne. A l'aide de modèles murins, l'équipe d'Y. Eriguchi a observé la destruction des cellules de

Paneth responsables de la sécrétion de défensines antimicrobiennes lors de la GVHD, expliquant potentiellement les perturbations du microbiote intestinal (Eriguchi et al., 2012). Cette destruction des cellules de Paneth accompagnée d'une perte de diversité bactérienne ont également été rapportées chez les patients atteints de GVHD (Jenq et al., 2012).

Les conséquences de ces changements de composition de microbiote notamment sur la réponse allogénique sont encore largement méconnues mais font l'objet d'importants travaux. Les nouvelles technologies permettant de séquencer le gène de l'ARN ribosomal 16s offrent ainsi une analyse plus précise de la composition bactérienne intestinale. Alors que la composition du microbiote du donneur n'influence pas la réponse allogénique (Tawara et al., 2013), les relations entre composition du microbiote du receveur et devenir des patients traités par allo-CSH commencent à être investiguées (Taur et al., 2014). Récemment, l'équipe de E. Holler et collègues a analysé le microbiote de patients atteints de GVHD (Holler et al., 2014). Dans cette étude, la composition du microbiote à partir d'échantillons de selles issus de 31 patients a pu être analysée à l'aide de séquençage de nouvelle génération. Au temps de l'admission, les patients présentent une prédominance de bactéries commensales. Après transplantation, le taux d'entérocoques est plus élevé chez les patients comparés aux sujets sains et ce taux est encore plus important chez les patients qui développent une GVHD intestinale. Les PCR spécifiques des enterocoques confirment la prédominance d'*Enterococcus faecium* et d'*Enterococcus faecalis* dans les échantillons issus des patients en GVHD.

Il est connu depuis longtemps que le microbiote intestinal peut moduler les réponses immunitaires. Les souris élevées dans un milieu exempt de germe et complètement dénuées de microbiote, présentent par exemple un nombre diminué de LT et ceux-ci tendent vers un profil Th2 (Gordon, 1959). Il est certain que toutes les bactéries composant le microbiote ne sont pas capables d'influencer la réponse immunitaire. Il semble plutôt que cette capacité soit partagée par quelques familles bactériennes spécifiques. Ce champ d'investigation a fait l'objet de nombreuses revues (Honda and Littman, 2012; Hooper et al., 2012; Kamada and Nunez, 2013). Il a été, par exemple, rapporté que la colonisation de l'intestin par des bactéries à filaments segmentés (SFB) entraînait une meilleure protection contre l'infection à *Citrobacter rodentium* par l'induction de lymphocytes Th17 (Ivanov et al., 2009). Néanmoins, les investigations de l'impact du microbiote sur la santé sont le plus souvent menées rétrospectivement et non prospectivement et il n'est pas toujours clair si l'association entre les souches bactériennes observées et les modulations des réponses immunitaires sont des causes directes ou bien des conséquences du contexte pathogène sous-jacent.

Discussion

Les métabolites générés par le microbiote au cours du processus de digestion et que l'on appelle « métabolome », peuvent également être reconnus par le système immunitaire inné et adaptatif et réguler l'homéostasie, le développement mais également la fonction des cellules immunitaires (Hill and Artis, 2010). Des études ont aussi mis en avant l'impact des Bacteroides sur la réponse immunitaire via la production de polysaccharide A (PSA). Le PSA est capable de protéger de la colite ou de la sclérose dans des modèles murins expérimentaux par l'induction de Treg sécrétant de l'IL-10 (Mazmanian et al., 2008; Ochoa-Reparaz et al., 2010). De plus, *Bacteroides fragilis* est responsable de la production de glycosphingolipides capables d'inhiber les ILC (An et al., 2014). Il a également été rapporté que certaines souches de Clostridium induisaient la génération de Treg capables de diminuer la sévérité de colites et diarrhées dans des modèles murins (Atarashi et al., 2011). Les mécanismes par lesquels ces souches de Clostridium et de Bacteroides induisent des Treg reposent sur leurs capacités à métaboliser des acides gras à courtes chaînes (short-chain fatty acids SCFA) comme l'acétate, le propionate ou encore le butyrate connus pour augmenter l'expression de FoxP3 (Atarashi et al., 2013; Faith et al., 2014). De manière intéressante, une étude a montré que le butyrate pouvait aussi influencer la reconstitution immunitaire via le microbiote intestinal (Trompette et al., 2014) . Etant donné l'impact des SCFA sur la réponse immunitaire, nous avons investigué, au laboratoire, l'effet de l'administration de SCFA dans la GVHD murine. Pour cela, nous avons ajouté du propionate à l'eau de boisson des souris traitées par allo-CSH. Aucune différence de survie ni de score clinique n'a pu être observée dans ces expériences (données non publiées). L'induction de Treg par le propionate ou son impact sur la reconstitution immunitaire ont probablement un effet trop mineur pour pouvoir limiter l'inflammation dans ce contexte.

En plus des bactéries, nous sommes aux prémisses de la caractérisation des constituants viraux et fongiques présents au sein du microbiote intestinal. Il est fort probable que ces composants influencent également la réponse immunitaire et donc la réaction allogénique. Récemment, le rôle du mycobiome a été investigué dans différentes maladies (Huffnagle and Noverr, 2013; Iliev et al., 2012). En effet, certains PAMPs comme les chaînes de polysaccharides constituant les membranes fongiques tels que le β -glucane ou l' α -mannane, sont reconnus respectivement par les récepteurs Dectin-1 et Dectin-2 exprimés par les CPA (Brown et al., 2002; Netea et al., 2008). La reconnaissance de ces motifs entraîne des réponses de type Th17 et la sécrétion d'IL-17 et d'IL-22 participant au contrôle des pathogènes (Gessner et al., 2012; Saijo et al., 2010). L'IL-22 ainsi sécrétée peut d'ailleurs prendre part à l'exacerbation de l'inflammation des tissus dans ce contexte d'infection fongique (Lilly et al., 2012). Dans le contexte d'allo-CSH, la colonisation par Candida est associée à une augmentation de la sévérité de la GVHD. De manière

intéressante, les patients présentant un polymorphisme de Dectin-1, associé à la diminution de la réponse Th17 et à une augmentation de la colonisation par Candida, ne présentent pas de GVHD plus sévère (van der Velden et al., 2010). Ces résultats suggèrent donc que la réponse allogénique peut être aussi influencée par le mycobiome.

c) Vers une manipulation thérapeutique du microbiote ?

Etant donné que la dysbiose, c'est-à-dire les changements de composition du microbiote intestinal semble être associée à la sévérité de nombreuses maladies, la manipulation du microbiote des patients semble être une piste thérapeutique prometteuse (Surana and Kasper, 2014). Les principales stratégies visant à la manipulation thérapeutique du microbiote sont les suivantes : la prise d'aliments fermentables capables de favoriser certaines souches microbiennes (prébiotiques) ou plus directement l'administration orale de bactéries (probiotique) ou encore la transplantation fécale. Les exemples du succès de telles interventions sont multiples. L'administration probiotique d'une souche d'*Escherichia coli*, appelée Nissle 1917 et isolée durant la première guerre mondiale chez un soldat qui contrairement à son entourage ne souffrait pas de diarrhées, semble être une thérapie efficace chez des patients souffrant de colites ulcéraives (Kruis et al., 2004). L'utilisation de prébiotiques semble aussi efficace pour réduire les réponses inflammatoires dans des souris invalidées pour l'IL-10 et développant des colites spontanées (Devkota et al., 2012). Enfin, l'utilisation de transplantation fécale dans le traitement de plusieurs maladies comme pour traiter les colites dues à *Clostridium difficile* dans la maladie inflammatoire de l'intestin semble prometteuse (Pamer, 2014; van Nood et al., 2013; Zhang et al., 2013). Dans le contexte d'allo-CSH, l'administration probiotique de Lactobacilles aux souris peut diminuer la GVHD (Gerbitz et al., 2004; Jenq et al., 2012). Malgré ces avancés, il est tout de même important de rappeler que les différences des microbiotes présents chez l'homme et dans la souris ainsi que la diversité des traitements antibiotiques administrés aux patients traités par allo-CSH limite la transposition des résultats obtenus grâce à des modèles murins pour étudier les relations microbiote/réponse allogénique.

B. CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a permis de confirmer l'impact délétère de l'IL-22 issue du donneur en allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Même si de nombreuses questions restent à élucider avant de pouvoir conclure sur le ciblage de l'IL-22 après allo-CSH, ce travail a permis de montrer la complexité fonctionnelle de la cytokine IL-22 et ouvre le champ d'investigation telle que l'inhibition de l'axe STAT1/CXCL10 dans les cellules du receveur ou encore la manipulation de la composition du microbiote intestinal pour moduler le développement de la GVHD.

Bibliographie

A

- Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8, 639-646.
- Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol* 3, 549-557.
- Aggarwal, S., Xie, M.H., Maruoka, M., Foster, J., and Gurney, A.L. (2001). Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *J Interferon Cytokine Res* 21, 1047-1053.
- An, D., Oh, S.F., Olszak, T., Neves, J.F., Avci, F.Y., Erturk-Hasdemir, D., Lu, X., Zeissig, S., Blumberg, R.S., and Kasper, D.L. (2014). Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. *Cell* 156, 123-133.
- Anasetti, C., Martin, P.J., Hansen, J.A., Appelbaum, F.R., Beatty, P.G., Doney, K., Harkonen, S., Jackson, A., Reichert, T., Stewart, P., and et al. (1990). A phase I-II study evaluating the murine anti-IL-2 receptor antibody 2A3 for treatment of acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 50, 49-54.
- Andoh, A., Zhang, Z., Inatomi, O., Fujino, S., Deguchi, Y., Araki, Y., Tsujikawa, T., Kitoh, K., Kim-Mitsuyama, S., Takayanagi, A., et al. (2005). Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 129, 969-984.
- Antin, J.H., and Ferrara, J.L. (1992). Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 80, 2964-2968.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., et al. (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500, 232-236.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., et al. (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* 331, 337-341.
- Auffermann-Gretzinger, S., Lossos, I.S., Vayntrub, T.A., Leong, W., Grumet, F.C., Blume, K.G., Stockerl-Goldstein, K.E., Levy, R., and Shizuru, J.A. (2002). Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 99, 1442-1448.
- Ajula, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., Reinhart, T.A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., et al. (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14, 275-281.

B

- Bachmann, M., Ulzibat, S., Hardle, L., Pfeilschifter, J., and Muhl, H. (2012). IFNalpha converts IL-22 into a cytokine efficiently activating STAT1 and its downstream targets. *Biochem Pharmacol* 85, 396-403.
- Bachmann, M., Ulzibat, S., Hardle, L., Pfeilschifter, J., and Muhl, H. (2013). IFNalpha converts IL-22 into a cytokine efficiently activating STAT1 and its downstream targets. *Biochemical pharmacology* 85, 396-403.
- Barker, J.N., Weisdorf, D.J., DeFor, T.E., Blazar, B.R., McGlave, P.B., Miller, J.S., Verfaillie, C.M., and Wagner, J.E. (2005). Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 105, 1343-1347.
- Barnes, D.W., Corp, M.J., Loutit, J.F., and Neal, F.E. (1956). Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J* 2, 626-627.
- Barnes, D.W., and Loutit, J.F. (1957). Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II. *Br J Haematol* 3, 241-252.
- Beelen, D.W., Elmaagacli, A., Muller, K.D., Hirche, H., and Schaefer, U.W. (1999). Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin

- alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood* 93, 3267-3275.
- Beelen, D.W., Haralambie, E., Brandt, H., Linzenmeier, G., Muller, K.D., Quabeck, K., Sayer, H.G., Graeven, U., Mahmoud, H.K., and Schaefer, U.W. (1992). Evidence that sustained growth suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute graft-versus-host disease after sibling marrow transplantation. *Blood* 80, 2668-2676.
- Beilhack, A., Schulz, S., Baker, J., Beilhack, G.F., Wieland, C.B., Herman, E.I., Baker, E.M., Cao, Y.A., Contag, C.H., and Negrin, R.S. (2005). In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood* 106, 1113-1122.
- Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007). T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8, 345-350.
- Betts, B.C., Abdel-Wahab, O., Curran, S.A., St Angelo, E.T., Koppikar, P., Heller, G., Levine, R.L., and Young, J.W. (2011). Janus kinase-2 inhibition induces durable tolerance to alloantigen by human dendritic cell-stimulated T cells yet preserves immunity to recall antigen. *Blood* 118, 5330-5339.
- Billingham, R.E. (1966). The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 62, 21-78.
- Blazar, B.R., Korngold, R., and Vallera, D.A. (1997). Recent advances in graft-versus-host disease (GVHD) prevention. *Immunol Rev* 157, 79-109.
- Blazar, B.R., and Murphy, W.J. (2005). Bone marrow transplantation and approaches to avoid graft-versus-host disease (GVHD). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 1747-1767.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Wagers, A., Loubeau, M., Isola, L.M., Lubrano, L., Najfeld, V., Phelps, R.G., Grosskreutz, C., Scigliano, E., et al. (2006). Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. *J Exp Med* 203, 2627-2638.
- Boniface, K., Bernard, F.X., Garcia, M., Gurney, A.L., Lecron, J.C., and Morel, F. (2005). IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 174, 3695-3702.
- Boniface, K., Guignouard, E., Pedretti, N., Garcia, M., Delwail, A., Bernard, F.X., Nau, F., Guillet, G., D'Agostino, G., Yssel, H., et al. (2007). A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin Exp Immunol* 150, 407-415.
- Bossard, C., Malard, F., Arbez, J., Chevallier, P., Guillaume, T., Delaunay, J., Mosnier, J.F., Tiberghien, P., Saas, P., Mohty, M., and Gaugler, B. (2012). Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Leukemia* 26, 1471-1474.
- Bouazzaoui, A., Spacenko, E., Mueller, G., Huber, E., Schubert, T., Holler, E., Andreesen, R., and Hildebrandt, G.C. (2011). Steroid treatment alters adhesion molecule and chemokine expression in experimental acute graft-vs.-host disease of the intestinal tract. *Exp Hematol* 39, 238-249 e231.
- Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K., Eichhorst, S.T., Otte, J.M., Diepolder, H., Marquardt, A., Jagla, W., Popp, A., et al. (2006). IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G827-838.
- Brestoff, J.R., and Artis, D. (2013). Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat Immunol* 14, 676-684.
- Brok, H.P., Heidt, P.J., van der Meide, P.H., Zurcher, C., and Vossen, J.M. (1993). Interferon-gamma prevents graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Immunol* 151, 6451-6459.
- Brown, G.D., Taylor, P.R., Reid, D.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Martinez-Pomares, L., Wong, S.Y., and Gordon, S. (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* 196, 407-412.
- Bucher, C., Koch, L., Vogtenhuber, C., Goren, E., Munger, M., Panoskaltsis-Mortari, A., Sivakumar, P., and Blazar, B.R. (2009). IL-21 blockade reduces graft-versus-host disease mortality by supporting inducible T regulatory cell generation. *Blood* 114, 5375-5384.

C

- Calcaterra, C., Sfondrini, L., Rossini, A., Sommariva, M., Rumio, C., Menard, S., and Balsari, A. (2008). Critical role of TLR9 in acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 181, 6132-6139.
- Capitini, C.M., Nasholm, N.M., Chien, C.D., Larabee, S.M., Qin, H., Song, Y.K., Klover, P.J., Hennighausen, L., Khan, J., and Fry, T.J. (2014). Absence of STAT1 in donor-derived plasmacytoid dendritic cells results in increased STAT3 and attenuates murine GVHD. *Blood*.
- Carlson, M.J., West, M.L., Coghill, J.M., Panoskaltsis-Mortari, A., Blazar, B.R., and Serody, J.S. (2009). In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood* 113, 1365-1374.
- Cash, H.L., Whitham, C.V., Behrendt, C.L., and Hooper, L.V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313, 1126-1130.
- Castello, S., Podesta, M., Mendifto, V.G., Ibatici, A., Pitto, A., Figari, O., Scarpati, D., Magrassi, L., Bacigalupo, A., Piaggio, G., and Frassoni, F. (2004). Intra-bone marrow injection of bone marrow and cord blood cells: an alternative way of transplantation associated with a higher seeding efficiency. *Exp Hematol* 32, 782-787.
- Cetkovic-Cvrlje, M., Roers, B.A., Schonhoff, D., Waurzyniak, B., Liu, X.P., and Uckun, F.M. (2002). Treatment of post-bone marrow transplant acute graft-versus-host disease with a rationally designed JAK3 inhibitor. *Leuk Lymphoma* 43, 1447-1453.
- Chakrabarti, S., Lees, A., Jones, S.G., and Milligan, D.W. (2000). Clostridium difficile infection in allogeneic stem cell transplant recipients is associated with severe graft-versus-host disease and non-relapse mortality. *Bone Marrow Transplant* 26, 871-876.
- Chakraverty, R., Cote, D., Buchli, J., Cotter, P., Hsu, R., Zhao, G., Sachs, T., Pitsillides, C.M., Bronson, R., Means, T., et al. (2006). An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *J Exp Med* 203, 2021-2031.
- Chakraverty, R., and Sykes, M. (2007). The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. *Blood* 110, 9-17.
- Chestovich, P.J., Uchida, Y., Chang, W., Ajalat, M., Lassman, C., Sabat, R., Busuttil, R.W., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2012). Interleukin-22: implications for liver ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 93, 485-492.
- Ciric, B., El-behi, M., Cabrera, R., Zhang, G.X., and Rostami, A. (2009). IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells. *J Immunol* 182, 5296-5305.
- Cohen, J.L., and Boyer, O. (2006). The role of CD4+CD25hi regulatory T cells in the physiopathology of graft-versus-host disease. *Curr Opin Immunol* 18, 580-585.
- Cooke, K.R., Hill, G.R., Gerbitz, A., Kobzik, L., Martin, T.R., Crawford, J.M., Brewer, J.P., and Ferrara, J.L. (2000). Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduces lung injury after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 70, 272-279.
- Couriel, D., Saliba, R., Hicks, K., Ippoliti, C., de Lima, M., Hosking, C., Khouri, I., Andersson, B., Gajewski, J., Donato, M., et al. (2004). Tumor necrosis factor-alpha blockade for the treatment of acute GVHD. *Blood* 104, 649-654.
- Couturier, M., Lamarthe, B., Arbez, J., Renauld, J.C., Bossard, C., Malard, F., Bonnefoy, F., Mohty, M., Perruche, S., Tiberghien, P., et al. (2013). IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect. *Leukemia* 27, 1527-1537.

D

- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., et al. (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 9, 1347-1355.

- Das, R., Komorowski, R., Hessner, M.J., Subramanian, H., Huettner, C.S., Cua, D., and Drobyski, W.R. (2010). Blockade of interleukin-23 signaling results in targeted protection of the colon and allows for separation of graft-versus-host and graft-versus-leukemia responses. *Blood* 115, 5249-5258.
- Devkota, S., Wang, Y., Musch, M.W., Leone, V., Fehlner-Peach, H., Nadimpalli, A., Antonopoulos, D.A., Jabri, B., and Chang, E.B. (2012). Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in IL10^{-/-} mice. *Nature* 487, 104-108.
- Down, J.D., and Yanch, J.C. (2010). Identifying the high radiosensitivity of the lungs of C57L mice in a model of total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Radiat Res* 174, 258-263.
- Dudakov, J.A., Hanash, A.M., Jenq, R.R., Young, L.F., Ghosh, A., Singer, N.V., West, M.L., Smith, O.M., Holland, A.M., Tsai, J.J., et al. (2012). Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice. *Science* 336, 91-95.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 10, 857-863.
- Dumoutier, L., de Heusch, M., Orabona, C., Satoh-Takayama, N., Eberl, G., Sirard, J.C., Di Santo, J.P., and Renaud, J.C. (2011). IL-22 is produced by gammaC-independent CD25+ CCR6+ innate murine spleen cells upon inflammatory stimuli and contributes to LPS-induced lethality. *Eur J Immunol* 41, 1075-1085.
- Dumoutier, L., Lejeune, D., Colau, D., and Renaud, J.C. (2001). Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J Immunol* 166, 7090-7095.
- Dumoutier, L., Louahed, J., and Renaud, J.C. (2000a). Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol* 164, 1814-1819.
- Dumoutier, L., Van Roost, E., Colau, D., and Renaud, J.C. (2000b). Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10144-10149.
- Durakovic, N., Bezak, K.B., Skarica, M., Radojcic, V., Fuchs, E.J., Murphy, G.F., and Luznik, L. (2006). Host-derived Langerhans cells persist after MHC-matched allografting independent of donor T cells and critically influence the alloresponses mediated by donor lymphocyte infusions. *J Immunol* 177, 4414-4425.

E

- Edinger, M., and Hoffmann, P. (2011). Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. *Curr Opin Immunol* 23, 679-684.
- Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., and Flavell, R.A. (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145, 745-757.
- Eriguchi, Y., Takashima, S., Oka, H., Shimoji, S., Nakamura, K., Uryu, H., Shimoda, S., Iwasaki, H., Shimono, N., Ayabe, T., et al. (2012). Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins. *Blood* 120, 223-231.
- Eriguchi, Y., Uryu, H., Nakamura, K., Shimoji, S., Takashima, S., Iwasaki, H., Miyamoto, T., Shimono, N., Hashimoto, D., Akashi, K., et al. (2013). Reciprocal expression of enteric antimicrobial proteins in intestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 19, 1525-1529.
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., et al. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 119, 3573-3585.

F

- Faaij, C.M., Lankester, A.C., Spierings, E., Hoogeboom, M., Bowman, E.P., Bierings, M., Revesz, T., Egeler, R.M., van Tol, M.J., and Annels, N.E. (2006). A possible role for CCL27/CTACK-CCR10 interaction in recruiting CD4 T cells to skin in human graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 133, 538-549.
- Faith, J.J., Ahern, P.P., Ridaura, V.K., Cheng, J., and Gordon, J.I. (2014). Identifying gut microbe-host phenotype relationships using combinatorial communities in gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 6, 220ra211.
- Ferrara, J.L., and Deeg, H.J. (1991). Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 324, 667-674.
- Ferrara, J.L., Harris, A.C., Greenson, J.K., Braun, T.M., Holler, E., Teshima, T., Levine, J.E., Choi, S.W., Huber, E., Landfried, K., et al. (2011). Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 118, 6702-6708.
- Ferrara, J.L., Levine, J.E., Reddy, P., and Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. *Lancet* 373, 1550-1561.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Louis, P., and Duncan, S.H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 577-589.
- Flynn, R., Du, J., Veenstra, R.G., Reichenbach, D.K., Panoskaltsis-Mortari, A., Taylor, P.A., Freeman, G.J., Serody, J.S., Murphy, W.J., Munn, D.H., et al. (2014). Increased T follicular helper cells and germinal center B cells are required for cGVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood* 123, 3988-3998.
- Foley, J.E., Mariotti, J., Ryan, K., Eckhaus, M., and Fowler, D.H. (2008). Th2 cell therapy of established acute graft-versus-host disease requires IL-4 and IL-10 and is abrogated by IL-2 or host-type antigen-presenting cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 959-972.
- Fowler, D.H., Kurasawa, K., Smith, R., Eckhaus, M.A., and Gress, R.E. (1994). Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice. *Blood* 84, 3540-3549.
- Frassoni, F., Gualandi, F., Podesta, M., Raiola, A.M., Ibatici, A., Piaggio, G., Sessarego, M., Sessarego, N., Gobbi, M., Sacchi, N., et al. (2008). Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol* 9, 831-839.
- Frassoni, F., Varaldo, R., Gualandi, F., Bacigalupo, A., Sambuceti, G., Sacchi, N., and Podesta, M. The intra-bone marrow injection of cord blood cells extends the possibility of transplantation to the majority of patients with malignant hematopoietic diseases. *Best Pract Res Clin Haematol* 23, 237-244.
- Frassoni, F., Varaldo, R., Gualandi, F., Bacigalupo, A., Sambuceti, G., Sacchi, N., and Podesta, M. (2010). The intra-bone marrow injection of cord blood cells extends the possibility of transplantation to the majority of patients with malignant hematopoietic diseases. *Best Pract Res Clin Haematol* 23, 237-244.
- Fu, J., Heinrichs, J., and Yu, X.Z. (2014). Helper T-Cell Differentiation in Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*.

G

- Ganguly, S., Ross, D.B., Panoskaltsis-Mortari, A., Kanakry, C.G., Blazar, B.R., Levy, R.B., and Luznik, L. (2014). Donor CD4+ Foxp3+ regulatory T cells are necessary for post-transplantation cyclophosphamide-mediated protection against GVHD in mice. *Blood*.
- Geboes, L., Dumoutier, L., Kelchtermans, H., Schurgers, E., Mitera, T., Renauld, J.C., and Matthys, P. (2009). Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum* 60, 390-395.
- Gerbitz, A., Schultz, M., Wilke, A., Linde, H.J., Scholmerich, J., Andreesen, R., and Holler, E. (2004). Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood* 103, 4365-4367.
- Gessner, M.A., Werner, J.L., Lilly, L.M., Nelson, M.P., Metz, A.E., Dunaway, C.W., Chan, Y.R., Ouyang, W., Brown, G.D., Weaver, C.T., and Steele, C. (2012). Dectin-1-dependent

- interleukin-22 contributes to early innate lung defense against *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 80, 410-417.
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., et al. (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 467, 967-971.
- Glocker, E.O., Kotlarz, D., Boztug, K., Gertz, E.M., Schaffer, A.A., Noyan, F., Perro, M., Diestelhorst, J., Allroth, A., Murugan, D., et al. (2009). Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 361, 2033-2045.
- Gordon, H.A. (1959). Morphological and physiological characterization of germfree life. *Ann N Y Acad Sci* 78, 208-220.
- Goswami, R., and Kaplan, M.H. (2011). A brief history of IL-9. *J Immunol* 186, 3283-3288.
- Gough, D.J., Messina, N.L., Clarke, C.J., Johnstone, R.W., and Levy, D.E. (2012). Constitutive type I interferon modulates homeostatic balance through tonic signaling. *Immunity* 36, 166-174.
- Gruenberg, B.H., Schoenemeyer, A., Weiss, B., Toschi, L., Kunz, S., Wolk, K., Asadullah, K., and Sabat, R. (2001). A novel, soluble homologue of the human IL-10 receptor with preferential expression in placenta. *Genes Immun* 2, 329-334.

H

- Hamada, H., Garcia-Hernandez Mde, L., Reome, J.B., Misra, S.K., Strutt, T.M., McKinstry, K.K., Cooper, A.M., Swain, S.L., and Dutton, R.W. (2009). Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol* 182, 3469-3481.
- Hanash, A.M., Dudakov, J.A., Hua, G., O'Connor, M.H., Young, L.F., Singer, N.V., West, M.L., Jenq, R.R., Holland, A.M., Kappel, L.W., et al. (2012). Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* 37, 339-350.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6, 1123-1132.
- He, S., Cao, Q., Qiu, Y., Mi, J., Zhang, J.Z., Jin, M., Ge, H., Emerson, S.G., and Zhang, Y. (2008). A new approach to the blocking of alloreactive T cell-mediated graft-versus-host disease by in vivo administration of anti-CXCR3 neutralizing antibody. *J Immunol* 181, 7581-7592.
- Heidegger, S., van den Brink, M.R., Haas, T., and Poeck, H. (2014). The role of pattern-recognition receptors in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Front Immunol* 5, 337.
- Heimesaat, M.M., Nogai, A., Bereswill, S., Plickert, R., Fischer, A., Loddenkemper, C., Steinhoff, U., Tchaptchet, S., Thiel, E., Freudenberg, M.A., et al. (2010). MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease. *Gut* 59, 1079-1087.
- Hepworth, M.R., Monticelli, L.A., Fung, T.C., Ziegler, C.G., Grunberg, S., Sinha, R., Mantegazza, A.R., Ma, H.L., Crawford, A., Angelosanto, J.M., et al. (2013). Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* 498, 113-117.
- Herrero, C., Hu, X., Li, W.P., Samuels, S., Sharif, M.N., Kotenko, S., and Ivashkiv, L.B. (2003). Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN-gamma. *J Immunol* 171, 5034-5041.
- Highfill, S.L., Rodriguez, P.C., Zhou, Q., Goetz, C.A., Koehn, B.H., Veenstra, R., Taylor, P.A., Panoskaltsis-Mortari, A., Serody, J.S., Munn, D.H., et al. (2010). Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 116, 5738-5747.
- Hill, D.A., and Artis, D. (2010). Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu Rev Immunol* 28, 623-667.

- Hill, G.R., and Ferrara, J.L. (2000). The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 95, 2754-2759.
- Hippen, K.L., Bucher, C., Schirm, D.K., Bearl, A.M., Brender, T., Mink, K.A., Waggie, K.S., Peffault de Latour, R., Janin, A., Curtsinger, J.M., et al. (2012). Blocking IL-21 signaling ameliorates xenogeneic GVHD induced by human lymphocytes. *Blood* 119, 619-628.
- Hirota, K., Duarte, J.H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D.J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., et al. (2011). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 12, 255-263.
- Hoegl, S., Bachmann, M., Scheiermann, P., Goren, I., Hofstetter, C., Pfeilschifter, J., Zwissler, B., and Muhl, H. (2011). Protective properties of inhaled IL-22 in a model of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44, 369-376.
- Hoffmann, P., Ermann, J., Edinger, M., Fathman, C.G., and Strober, S. (2002). Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 196, 389-399.
- Holler, E., Butzhammer, P., Schmid, K., Hundsrucker, C., Koestler, J., Peter, K., Zhu, W., Sporrer, D., Hehlgans, T., Kreutz, M., et al. (2014). Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic SCT: Loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal GvHD. *Biol Blood Marrow Transplant*.
- Holler, E., Rogler, G., Brenmoehl, J., Hahn, J., Herfarth, H., Greinix, H., Dickinson, A.M., Socie, G., Wolff, D., Fischer, G., et al. (2006). Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination. *Blood* 107, 4189-4193.
- Holler, E., Rogler, G., Herfarth, H., Brenmoehl, J., Wild, P.J., Hahn, J., Eissner, G., Scholmerich, J., and Andreesen, R. (2004). Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 104, 889-894.
- Holmes, M.A., Paulsen, W., Jide, X., Ratledge, C., and Strong, R.K. (2005). Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration. *Structure* 13, 29-41.
- Honda, K., and Littman, D.R. (2012). The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu Rev Immunol* 30, 759-795.
- Hooper, L.V., Littman, D.R., and Macpherson, A.J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 336, 1268-1273.
- Hossain, M.S., Jaye, D.L., Pollack, B.P., Farris, A.B., Tselenyane, M.L., David, E., Roback, J.D., Gewirtz, A.T., and Waller, E.K. (2011). Flagellin, a TLR5 agonist, reduces graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients while enhancing antiviral immunity. *J Immunol* 187, 5130-5140.
- Huber, S., Gagliani, N., and Flavell, R.A. (2012a). Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine. *Eur J Immunol* 42, 2238-2245.
- Huber, S., Gagliani, N., Zenewicz, L.A., Huber, F.J., Bosurgi, L., Hu, B., Hedl, M., Zhang, W., O'Connor, W., Jr., Murphy, A.J., et al. (2012b). IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* 491, 259-263.
- Huffnagle, G.B., and Noverr, M.C. (2013). The emerging world of the fungal microbiome. *Trends Microbiol* 21, 334-341.

I

- Iclozan, C., Yu, Y., Liu, C., Liang, Y., Yi, T., Anasetti, C., and Yu, X.Z. (2010). T helper17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 16, 170-178.
- Ihle, J.N., and Kerr, I.M. (1995). Jak and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11, 69-74.

- Ikeuchi, H., Kuroiwa, T., Hiramatsu, N., Kaneko, Y., Hiromura, K., Ueki, K., and Nojima, Y. (2005). Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum* 52, 1037-1046.
- Iliev, I.D., Funari, V.A., Taylor, K.D., Nguyen, Q., Reyes, C.N., Strom, S.P., Brown, J., Becker, C.A., Fleshner, P.R., Dubinsky, M., et al. (2012). Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science* 336, 1314-1317.
- Imado, T., Iwasaki, T., Kitano, S., Satake, A., Kuroiwa, T., Tsunemi, S., and Sano, H. (2010). The protective role of host Toll-like receptor-4 in acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 90, 1063-1070.
- Imanguli, M.M., Swaim, W.D., League, S.C., Gress, R.E., Pavletic, S.Z., and Hakim, F.T. (2009). Increased T-bet⁺ cytotoxic effectors and type I interferon-mediated processes in chronic graft-versus-host disease of the oral mucosa. *Blood* 113, 3620-3630.
- Inamoto, Y., Murata, M., Katsumi, A., Kuwatsuka, Y., Tsujimura, A., Ishikawa, Y., Sugimoto, K., Onizuka, M., Terakura, S., Nishida, T., et al. (2010). Donor single nucleotide polymorphism in the CCR9 gene affects the incidence of skin GVHD. *Bone Marrow Transplant* 45, 363-369.
- Inohara, N., Ogura, Y., Chen, F.F., Muto, A., and Nunez, G. (2001). Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 276, 2551-2554.
- Ivanov, II, Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., et al. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485-498.
- Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.
- Izaguirre, A., Barnes, B.J., Amrute, S., Yeow, W.S., Megjugorac, N., Dai, J., Feng, D., Chung, E., Pitha, P.M., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2003). Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Journal of leukocyte biology* 74, 1125-1138.

J

- Jankovic, D., Ganesan, J., Bscheider, M., Stickel, N., Weber, F.C., Guarda, G., Follo, M., Pfeifer, D., Tardivel, A., Ludigs, K., et al. (2013). The Nlrp3 inflammasome regulates acute graft-versus-host disease. *J Exp Med* 210, 1899-1910.
- Jasperson, L.K., Bucher, C., Panoskaltsis-Mortari, A., Mellor, A.L., Munn, D.H., and Blazar, B.R. (2009). Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality. *Blood* 114, 5062-5070.
- Jenq, R.R., Ubeda, C., Taur, Y., Menezes, C.C., Khanin, R., Dudakov, J.A., Liu, C., West, M.L., Singer, N.V., Equinda, M.J., et al. (2012). Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 209, 903-911.
- Jones, B.C., Logsdon, N.J., and Walter, M.R. (2008). Structure of IL-22 bound to its high-affinity IL-22R1 chain. *Structure* 16, 1333-1344.
- Jones, J.M., Wilson, R., and Bealmear, P.M. (1971). Mortality and gross pathology of secondary disease in germfree mouse radiation chimeras. *Radiat Res* 45, 577-588.

K

- Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H., and Golstein, P. (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265, 528-530.
- Kamada, N., and Nunez, G. (2013). Role of the gut microbiota in the development and function of lymphoid cells. *J Immunol* 190, 1389-1395.
- Kamanaka, M., Huber, S., Zenewicz, L.A., Gagliani, N., Rathinam, C., O'Connor, W., Jr., Wan, Y.Y., Nakae, S., Iwakura, Y., Hao, L., and Flavell, R.A. (2011). Memory/effectector

- (CD45RB^{lo}) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *The Journal of experimental medicine* 208, 1027-1040.
- Kappel, L.W., Goldberg, G.L., King, C.G., Suh, D.Y., Smith, O.M., Ligh, C., Holland, A.M., Grubin, J., Mark, N.M., Liu, C., et al. (2009). IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood* 113, 945-952.
- Kau, A.L., Ahern, P.P., Griffin, N.W., Goodman, A.L., and Gordon, J.I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 474, 327-336.
- Kernan, N.A., Collins, N.H., Juliano, L., Cartagena, T., Dupont, B., and O'Reilly, R.J. (1986). Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood* 68, 770-773.
- Kim, C.H., Rott, L.S., Clark-Lewis, I., Campbell, D.J., Wu, L., and Butcher, E.C. (2001). Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med* 193, 1373-1381.
- Kim, K.W., Kim, H.R., Park, J.Y., Park, J.S., Oh, H.J., Woo, Y.J., Park, M.K., Cho, M.L., and Lee, S.H. (2012). Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 64, 1015-1023.
- Korn, L.L., Thomas, H.L., Hubbeling, H.G., Spencer, S.P., Sinha, R., Simkins, H.M., Salzman, N.H., Bushman, F.D., and Laufer, T.M. (2014). Conventional CD4+ T cells regulate IL-22-producing intestinal innate lymphoid cells. *Mucosal Immunol*.
- Korngold, R., Marini, J.C., de Baca, M.E., Murphy, G.F., and Giles-Komar, J. (2003). Role of tumor necrosis factor-alpha in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia responses. *Biol Blood Marrow Transplant* 9, 292-303.
- Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R.P., and Pestka, S. (2001). Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J Immunol* 166, 7096-7103.
- Krenger, W., Snyder, K.M., Byon, J.C., Falzarano, G., and Ferrara, J.L. (1995). Polarized type 2 alloreactive CD4+ and CD8+ donor T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 155, 585-593.
- Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukas, M., Fixa, B., Kascak, M., Kamm, M.A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., et al. (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617-1623.
- Kumar, P., Thakar, M.S., Ouyang, W., and Malarkannan, S. (2013). IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection. *Mucosal Immunol* 6, 69-82.
- Kushida, T., Inaba, M., Hisha, H., Ichioka, N., Esumi, T., Ogawa, R., Iida, H., and Ikehara, S. (2001). Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. *Blood* 97, 3292-3299.

L

- Lampert, I.A., Moore, R.H., Huby, R., and Cohen, J. (1988). Observations on the role of endotoxin in graft-versus-host disease. *Prog Clin Biol Res* 272, 351-359.
- Lazarevic, V., and Glimcher, L.H. (2011). T-bet in disease. *Nat Immunol* 12, 597-606.
- Lee, C.G., Homer, R.J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang, X., Koteliansky, V., Shipley, J.M., Gotwals, P., Noble, P., Chen, Q., et al. (2001). Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med* 194, 809-821.
- Lee, T.H., Lee, J.Y., Park, S., Shin, S.H., Yahng, S.A., Yoon, J.H., Lee, S.E., Cho, B.S., Kim, Y.J., Lee, S., et al. (2013). Expression of SOCS1 and SOCS3 genes in human graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Res* 48, 16-23.
- Lee, Y.K., Mukasa, R., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2009). Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol* 21, 274-280.
- Lees, J.R., Azimzadeh, A.M., and Bromberg, J.S. (2011). Myeloid derived suppressor cells in transplantation. *Curr Opin Immunol* 23, 692-697.

- Leipe, J., Schramm, M.A., Grunke, M., Baeuerle, M., Dechant, C., Nigg, A.P., Witt, M.N., Vielhauer, V., Reindl, C.S., Schulze-Koops, H., and Skapenko, A. (2011). Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 70, 1453-1457.
- Lejeune, D., Dumoutier, L., Constantinescu, S., Kruijer, W., Schuringa, J.J., and Renaud, J.C. (2002). Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem* 277, 33676-33682.
- Leng, C., Gries, M., Ziegler, J., Lokshin, A., Mascagni, P., Lentzsch, S., and Mapara, M.Y. (2006). Reduction of graft-versus-host disease by histone deacetylase inhibitor suberonylanilide hydroxamic acid is associated with modulation of inflammatory cytokine milieu and involves inhibition of STAT1. *Exp Hematol* 34, 776-787.
- Levine, J.E. (2011). Implications of TNF-alpha in the pathogenesis and management of GVHD. *Int J Hematol* 93, 571-577.
- Li, H., Matte-Martone, C., Tan, H.S., Venkatesan, S., McNiff, J., Demetris, A.J., Jain, D., Lakkis, F., Rothstein, D., and Shlomchik, W.D. (2011). Graft-versus-host disease is independent of innate signaling pathways triggered by pathogens in host hematopoietic cells. *J Immunol* 186, 230-241.
- Liang, S.C., Nickerson-Nutter, C., Pittman, D.D., Carrier, Y., Goodwin, D.G., Shields, K.M., Lambert, A.J., Schelling, S.H., Medley, Q.G., Ma, H.L., et al. (2010). IL-22 induces an acute-phase response. *J Immunol* 185, 5531-5538.
- Lilly, L.M., Gessner, M.A., Dunaway, C.W., Metz, A.E., Schwiebert, L., Weaver, C.T., Brown, G.D., and Steele, C. (2012). The beta-glucan receptor dectin-1 promotes lung immunopathology during fungal allergy via IL-22. *J Immunol* 189, 3653-3660.
- Liu, Y., Yang, B., Ma, J., Wang, H., Huang, F., Zhang, J., Chen, H., and Wu, C. (2011). Interleukin-21 induces the differentiation of human Tc22 cells via phosphorylation of signal transducers and activators of transcription. *Immunology* 132, 540-548.
- Logsdon, N.J., Jones, B.C., Allman, J.C., Izotova, L., Schwartz, B., Pestka, S., and Walter, M.R. (2004). The IL-10R2 binding hot spot on IL-22 is located on the N-terminal helix and is dependent on N-linked glycosylation. *J Mol Biol* 342, 503-514.
- Logsdon, N.J., Jones, B.C., Josephson, K., Cook, J., and Walter, M.R. (2002). Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes. *J Interferon Cytokine Res* 22, 1099-1112.
- Lord, G.M., Rao, R.M., Choe, H., Sullivan, B.M., Lichtman, A.H., Luscinskas, F.W., and Glimcher, L.H. (2005). T-bet is required for optimal proinflammatory CD4+ T-cell trafficking. *Blood* 106, 3432-3439.
- Lorenz, E., Schwartz, D.A., Martin, P.J., Gooley, T., Lin, M.T., Chien, J.W., Hansen, J.A., and Clark, J.G. (2001). Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 7, 384-387.
- Luci, C., Reynders, A., Ivanov, II, Cognet, C., Chiche, L., Chasson, L., Hardwicke, J., Anguiano, E., Banchereau, J., Chaussabel, D., et al. (2009). Influence of the transcription factor RORgammat on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. *Nat Immunol* 10, 75-82.

M

- Ma, H., Lu, C., Ziegler, J., Liu, A., Sepulveda, A., Okada, H., Lentzsch, S., and Mapara, M.Y. (2011). Absence of Stat1 in donor CD4(+) T cells promotes the expansion of Tregs and reduces graft-versus-host disease in mice. *J Clin Invest* 121, 2554-2569.
- Ma, H.L., Liang, S., Li, J., Napierata, L., Brown, T., Benoit, S., Senices, M., Gill, D., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., et al. (2008). IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest* 118, 597-607.
- Magenau, J.M., Qin, X., Tawara, I., Rogers, C.E., Kitko, C., Schlough, M., Bickley, D., Braun, T.M., Jang, P.S., Lowler, K.P., et al. (2010). Frequency of CD4(+)CD25(hi)FOXP3(+)

- regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 16, 907-914.
- Malard, F., Bossard, C., Brissot, E., Chevallier, P., Guillaume, T., Delaunay, J., Mosnier, J.F., Moreau, P., Gregoire, M., Gaugler, B., and Mohty, M. (2013). Increased plasmacytoid dendritic cells and RORgammat-expressing immune effectors in cutaneous acute graft-versus-host disease. *J Leukoc Biol* 94, 1337-1343.
- Mapara, M.Y., Leng, C., Kim, Y.M., Bronson, R., Lokshin, A., Luster, A., and Sykes, M. (2006). Expression of chemokines in GVHD target organs is influenced by conditioning and genetic factors and amplified by GVHR. *Biol Blood Marrow Transplant* 12, 623-634.
- Martin, B., Hirota, K., Cua, D.J., Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2009). Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* 31, 321-330.
- Martin, G.H., Gregoire, S., Landau, D.A., Pilon, C., Grinberg-Bleyer, Y., Charlotte, F., Mege, J.P., Chatenoud, L., Salomon, B.L., and Cohen, J.L. (2013a). In vivo activation of transferred regulatory T cells specific for third-party exogenous antigen controls GVH disease in mice. *Eur J Immunol* 43, 2263-2272.
- Martin, J.C., Beriou, G., Heslan, M., Chauvin, C., Utriainen, L., Aumeunier, A., Scott, C.L., Mowat, A., Cerovic, V., Houston, S.A., et al. (2013b). Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal Immunol* 7, 101-113.
- Martin-Orozco, N., Chung, Y., Chang, S.H., Wang, Y.H., and Dong, C. (2009). Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur J Immunol* 39, 216-224.
- Mazmanian, S.K., Round, J.L., and Kasper, D.L. (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453, 620-625.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298-300.
- Mitani, Y., Takaoka, A., Kim, S.H., Kato, Y., Yokochi, T., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2001). Cross talk of the interferon-alpha/beta signalling complex with gp130 for effective interleukin-6 signalling. *Genes Cells* 6, 631-640.
- Mohty, M., Blaise, D., Faucher, C., Vey, N., Bouabdallah, R., Stoppa, A.M., Viret, F., Gravis, G., Olive, D., and Gaugler, B. (2005). Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 106, 4407-4411.
- Monteleone, G., Pallone, F., and Macdonald, T.T. (2009). Interleukin-21 (IL-21)-mediated pathways in T cell-mediated disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 185-191.
- Morgan, X.C., Tickle, T.L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K.L., Ward, D.V., Reyes, J.A., Shah, S.A., LeLeiko, N., Snapper, S.B., et al. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* 13, R79.
- Muhl, H. (2013). Pro-Inflammatory Signaling by IL-10 and IL-22: Bad Habit Stirred Up by Interferons? *Front Immunol* 4, 18.
- Munneke, J.M., Bjorklund, A.T., Mjosberg, J.M., Garming-Legert, K., Bernink, J.H., Blom, B., Huisman, C., van Oers, M.H., Spits, H., Malmberg, K.J., and Hazenberg, M.D. (2014). Activated innate lymphoid cells are associated with a reduced susceptibility to graft versus host disease. *Blood*.
- Munoz, M., Heimesaat, M.M., Danker, K., Struck, D., Lohmann, U., Plickert, R., Bereswill, S., Fischer, A., Dunay, I.R., Wolk, K., et al. (2009). Interleukin (IL)-23 mediates Toxoplasma gondii-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *J Exp Med* 206, 3047-3059.
- Murai, M., Yoneyama, H., Harada, A., Yi, Z., Vestergaard, C., Guo, B., Suzuki, K., Asakura, H., and Matsushima, K. (1999). Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 104, 49-57.
- Murphy, W.J., Welniak, L.A., Taub, D.D., Wiltrot, R.H., Taylor, P.A., Vallera, D.A., Kopf, M., Young, H., Longo, D.L., and Blazar, B.R. (1998). Differential effects of the absence of

- interferon-gamma and IL-4 in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Clin Invest* 102, 1742-1748.
- Musso, G., Gambino, R., and Cassader, M. (2011). Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annu Rev Med* 62, 361-380.

N

- Nagalakshmi, M.L., Rascle, A., Zurawski, S., Menon, S., and de Waal Malefyt, R. (2004). Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells. *Int Immunopharmacol* 4, 679-691.
- Nagem, R.A., Colau, D., Dumoutier, L., Renauld, J.C., Ogata, C., and Polikarpov, I. (2002). Crystal structure of recombinant human interleukin-22. *Structure* 10, 1051-1062.
- Nalle, S.C., Aimee Kwak, H., Edelblum, K.L., Joseph, N.E., Singh, G., Khramtsova, G.F., Mortenson, E.D., Savage, P.A., and Turner, J.R. (2014). Recipient NK cell inactivation and intestinal barrier loss are required for MHC-matched graft-versus-host disease. *Sci Transl Med* 6, 243ra287.
- Ness-Schwickerath, K.J., Jin, C., and Morita, C.T. (2010). Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human Vgamma2Vdelta2 T cells. *J Immunol* 184, 7268-7280.
- Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J., and Gow, N.A. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 6, 67-78.
- New, J.Y., Li, B., Koh, W.P., Ng, H.K., Tan, S.Y., Yap, E.H., Chan, S.H., and Hu, H.Z. (2002). T cell infiltration and chemokine expression: relevance to the disease localization in murine graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 29, 979-986.
- Nishimori, H., Maeda, Y., Teshima, T., Sugiyama, H., Kobayashi, K., Yamasuji, Y., Kadohisa, S., Uryu, H., Takeuchi, K., Tanaka, T., et al. (2012). Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17. *Blood* 119, 285-295.
- Nograles, K.E., Zaba, L.C., Guttman-Yassky, E., Fuentes-Duculan, J., Suarez-Farinis, M., Cardinale, I., Khatcherian, A., Gonzalez, J., Pierson, K.C., White, T.R., et al. (2008). Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol* 159, 1092-1102.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y.H., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., and Dong, C. (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29, 138-149.

O

- O'Neill, L.A., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 453-460.
- Ochoa-Reparaz, J., Mielcarz, D.W., Wang, Y., Begum-Haque, S., Dasgupta, S., Kasper, D.L., and Kasper, L.H. (2010). A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol* 3, 487-495.
- Oestreich, K.J., Huang, A.C., and Weinmann, A.S. (2011). The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns. *J Exp Med* 208, 1001-1013.
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., and Hymowitz, S.G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 29, 71-109.

P

- Paget, C., Ivanov, S., Fontaine, J., Renneson, J., Blanc, F., Pichavant, M., Dumoutier, L., Ryffel, B., Renauld, J.C., Gosset, P., et al. (2012). Interleukin-22 is produced by invariant natural killer T lymphocytes during influenza A virus infection: potential role in protection against lung epithelial damages. *J Biol Chem* 287, 8816-8829.

- Pai, S.Y., Truitt, M.L., and Ho, I.C. (2004). GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1993-1998.
- Paludan, S.R. (2000). Synergistic action of pro-inflammatory agents: cellular and molecular aspects. *J Leukoc Biol* **67**, 18-25.
- Pamer, E.G. (2014). Fecal microbiota transplantation: effectiveness, complexities, and lingering concerns. *Mucosal Immunol* **7**, 210-214.
- Pan, L., Delmonte, J., Jr., Jalonen, C.K., and Ferrara, J.L. (1995). Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood* **86**, 4422-4429.
- Penack, O., Holler, E., and van den Brink, M.R. (2010). Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood* **115**, 1865-1872.
- Pickert, G., Neufert, C., Leppkes, M., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Lehr, H.A., Hirth, S., Weigmann, B., Wirtz, S., et al. (2009). STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* **206**, 1465-1472.
- Piper, K.P., Horlock, C., Curnow, S.J., Arrazi, J., Nicholls, S., Mahendra, P., Craddock, C., and Moss, P.A. (2007). CXCL10-CXCR3 interactions play an important role in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease in the skin following allogeneic stem-cell transplantation. *Blood* **110**, 3827-3832.

Q

- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65.
- Qiu, J., Guo, X., Chen, Z.M., He, L., Sonnenberg, G.F., Artis, D., Fu, Y.X., and Zhou, L. (2013). Group 3 innate lymphoid cells inhibit T-cell-mediated intestinal inflammation through aryl hydrocarbon receptor signaling and regulation of microflora. *Immunity* **39**, 386-399.

R

- Radaeva, S., Sun, R., Pan, H.N., Hong, F., and Gao, B. (2004). Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* **39**, 1332-1342.
- Ramesh, R., Kozhaya, L., McKevitt, K., Djuretic, I.M., Carlson, T.J., Quintero, M.A., McCauley, J.L., Abreu, M.T., Unutmaz, D., and Sundrud, M.S. (2013). Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J Exp Med* **211**, 89-104.
- Ray, J.P., Marshall, H.D., Laidlaw, B.J., Staron, M.M., Kaech, S.M., and Craft, J. (2014). Transcription Factor STAT3 and Type I Interferons Are Corepressive Insulators for Differentiation of Follicular Helper and T Helper 1 Cells. *Immunity* **40**, 367-377.
- Reddy, P., and Ferrara, J.L. (2003). Role of interleukin-18 in acute graft-vs-host disease. *J Lab Clin Med* **141**, 365-371.
- Reddy, P., and Ferrara, J.L.M. (2008). Mouse models of graft-versus-host disease.
- Ren, X., Hu, B., and Colletti, L.M. IL-22 is involved in liver regeneration after hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**, G74-80.
- Reshef, R., Luger, S.M., Hexner, E.O., Loren, A.W., Frey, N.V., Nasta, S.D., Goldstein, S.C., Stadtmauer, E.A., Smith, J., Bailey, S., et al. (2012). Blockade of lymphocyte chemotaxis in visceral graft-versus-host disease. *N Engl J Med* **367**, 135-145.
- Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 313-323.
- Russell, J.H., and Ley, T.J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20**, 323-370.
- Rutz, S., Eidenschenk, C., and Ouyang, W. (2013). IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol Rev* **252**, 116-132.

S

- Sabat, R., Wallace, E., Endesfelder, S., and Wolk, K. (2007). IL-19 and IL-20: two novel cytokines with importance in inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets* 11, 601-612.
- Sabat, R., and Wolk, K. (2011). Research in practice: IL-22 and IL-20: significance for epithelial homeostasis and psoriasis pathogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges* 9, 518-523.
- Saijo, S., Ikeda, S., Yamabe, K., Kakuta, S., Ishigame, H., Akitsu, A., Fujikado, N., Kusaka, T., Kubo, S., Chung, S.H., et al. (2010). Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity* 32, 681-691.
- Sairafi, D., Uzunel, M., Remberger, M., Ringden, O., and Mattsson, J. (2008). No impact of NOD2/CARD15 on outcome after SCT. *Bone Marrow Transplant* 41, 961-964.
- Sanos, S.L., Bui, V.L., Mortha, A., Oberle, K., Heners, C., Johner, C., and Diefenbach, A. (2009). RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* 10, 83-91.
- Santini, S.M., Lapenta, C., Donati, S., Spadaro, F., Belardelli, F., and Ferrantini, M. (2011). Interferon-alpha-conditioned human monocytes combine a Th1-orienting attitude with the induction of autologous Th17 responses: role of IL-23 and IL-12. *PLoS One* 6, e17364.
- Satoh-Takayama, N., Vosshenrich, C.A., Lesjean-Pottier, S., Sawa, S., Lochner, M., Rattis, F., Mention, J.J., Thiam, K., Cerf-Bensussan, N., Mandelboim, O., et al. (2008). Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 29, 958-970.
- Savan, R., McFarland, A.P., Reynolds, D.A., Feigenbaum, L., Ramakrishnan, K., Karwan, M., Shirota, H., Klinman, D.M., Dunleavy, K., Pittaluga, S., et al. (2011). A novel role for IL-22R1 as a driver of inflammation. *Blood* 117, 575-584.
- Sawitzki, B., Brunstein, C., Meisel, C., Schumann, J., Vogt, K., Appelt, C., Curtsinger, J.M., Verneris, M.R., Miller, J.S., Wagner, J.E., and Blazar, B.R. (2014). Prevention of graft-versus-host disease by adoptive T regulatory therapy is associated with active repression of peripheral blood Toll-like receptor 5 mRNA expression. *Biol Blood Marrow Transplant* 20, 173-182.
- Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A.B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* 192, 1553-1562.
- Scheiermann, P., Bachmann, M., Goren, I., Zwissler, B., Pfeilschifter, J., and Muhl, H. (2013). Application of interleukin-22 mediates protection in experimental acetaminophen-induced acute liver injury. *Am J Pathol* 182, 1107-1113.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75, 7537-7541.
- Scholl, S., Sayer, H.G., Mugge, L.O., Kasper, C., Pietraszczyk, M., Kliche, K.O., Clement, J.H., and Hoffken, K. (2004). Increase of interleukin-18 serum levels after engraftment correlates with acute graft-versus-host disease in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *J Cancer Res Clin Oncol* 130, 704-710.
- Schreiber, S., Rosenstiel, P., Hampe, J., Nikolaus, S., Groessner, B., Schottelius, A., Kuhbacher, T., Hamling, J., Folsch, U.R., and Seegert, D. (2002). Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 51, 379-385.
- Schroder, K., and Tschoop, J. (2010). The inflammasomes. *Cell* 140, 821-832.
- Schwab, L., Goroncy, L., Palaniyandi, S., Gautam, S., Triantafyllopoulou, A., Mocsai, A., Reichardt, W., Karlsson, F.J., Radhakrishnan, S.V., Hanke, K., et al. (2014). Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat Med* 20, 648-654.

- Serafini, N., Klein Wolterink, R.G., Satoh-Takayama, N., Xu, W., Vosshenrich, C.A., Hendriks, R.W., and Di Santo, J.P. (2014). Gata3 drives development of RORgammat+ group 3 innate lymphoid cells. *J Exp Med* 211, 199-208.
- Sharif, M.N., Tassiulas, I., Hu, Y., Mecklenbrauker, I., Tarakhovsky, A., and Ivashkiv, L.B. (2004). IFN-alpha priming results in a gain of proinflammatory function by IL-10: implications for systemic lupus erythematosus pathogenesis. *J Immunol* 172, 6476-6481.
- Sherlock, J.P., Joyce-Shaikh, B., Turner, S.P., Chao, C.C., Sathe, M., Grein, J., Gorman, D.M., Bowman, E.P., McClanahan, T.K., Yearley, J.H., et al. (2012). IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR-gammat+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nat Med* 18, 1069-1076.
- Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Tripp, R.A., Chu, C., Quelle, F.W., Nosaka, T., Vignali, D.A., et al. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380, 630-633.
- Silverberg, M.S., Cho, J.H., Rioux, J.D., McGovern, D.P., Wu, J., Annese, V., Achkar, J.P., Goyette, P., Scott, R., Xu, W., et al. (2009). Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet* 41, 216-220.
- Simonian, P.L., Wehrmann, F., Roark, C.L., Born, W.K., O'Brien, R.L., and Fontenot, A.P. (2010). gammadelta T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *J Exp Med* 207, 2239-2253.
- Socie, G., and Blazar, B.R. (2009). Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside. *Blood* 114, 4327-4336.
- Sohnle, P.G., Hunter, M.J., Hahn, B., and Chazin, W.J. (2000). Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). *J Infect Dis* 182, 1272-1275.
- Song, M.M., and Shuai, K. (1998). The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem* 273, 35056-35062.
- Sonnenberg, G.F., Fouser, L.A., and Artis, D. (2011). Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol* 12, 383-390.
- Sonnenberg, G.F., Nair, M.G., Kirn, T.J., Zaph, C., Fouser, L.A., and Artis, D. (2010). Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med* 207, 1293-1305.
- Soroosh, P., and Doherty, T.A. (2009). Th9 and allergic disease. *Immunology* 127, 450-458.
- Spits, H., and Cupedo, T. (2012). Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol* 30, 647-675.
- Spits, H., and Di Santo, J.P. (2011). The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol* 12, 21-27.
- Spoerl, S., Mathew, N.R., Bscheider, M., Schmitt-Graeff, A., Chen, S., Mueller, T., Verbeek, M., Fischer, J., Otten, V., Schmickl, M., et al. (2014). Activity of therapeutic JAK 1/2 blockade in graft-versus-host disease. *Blood* 123, 3832-3842.
- Stacey, M.A., Marsden, M., Pham, N.T., Clare, S., Dolton, G., Stack, G., Jones, E., Klenerman, P., Gallimore, A.M., Taylor, P.R., et al. (2014). Neutrophils recruited by IL-22 in peripheral tissues function as TRAIL-dependent antiviral effectors against MCMV. *Cell host & microbe* 15, 471-483.
- Stephanou, A., and Latchman, D.S. (2005). Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors* 23, 177-182.
- Storb, R., Prentice, R.L., Buckner, C.D., Clift, R.A., Appelbaum, F., Deeg, J., Doney, K., Hansen, J.A., Mason, M., Sanders, J.E., et al. (1983). Graft-versus-host disease and survival in patients with aplastic anemia treated by marrow grafts from HLA-identical siblings. Beneficial effect of a protective environment. *N Engl J Med* 308, 302-307.
- Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A.K., Blumberg, R.S., Xavier, R.J., and Mizoguchi, A. (2008). IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 118, 534-544.
- Sullivan, K.M., Agura, E., Anasetti, C., Appelbaum, F., Badger, C., Bearman, S., Erickson, K., Flowers, M., Hansen, J., Loughran, T., and et al. (1991). Chronic graft-versus-host

- disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin Hematol* 28, 250-259.
- Sullivan, K.M., Mori, M., Sanders, J., Siadak, M., Witherspoon, R.P., Anasetti, C., Appelbaum, F.R., Bensinger, W., Bowden, R., Buckner, C.D., and et al. (1992). Late complications of allogeneic and autologous marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 10 Suppl 1, 127-134.
- Sun, K., Hsiao, H.H., Li, M., Ames, E., Bouchlaka, M., Welniak, L.A., Hagino, T., Jagdeo, J., Pai, C.C., Chen, M., et al. (2012). IFN-gamma receptor-deficient donor T cells mediate protection from graft-versus-host disease and preserve graft-versus-tumor responses after allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol* 189, 2033-2042.
- Surana, N.K., and Kasper, D.L. (2014). Deciphering the tete-a-tete between the microbiota and the immune system. *J Clin Invest* 124, 4197-4203.
- Sutton, C.E., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Brereton, C.F., Lavelle, E.C., and Mills, K.H. (2009). Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31, 331-341.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.

T

- Tait Wojno, E.D., and Artis, D. (2012). Innate lymphoid cells: balancing immunity, inflammation, and tissue repair in the intestine. *Cell Host Microbe* 12, 445-457.
- Takaoka, A., Mitani, Y., Suemori, H., Sato, M., Yokochi, T., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2000). Cross talk between interferon-gamma and -alpha/beta signaling components in caveolar membrane domains. *Science* 288, 2357-2360.
- Takatori, H., Kanno, Y., Watford, W.T., Tato, C.M., Weiss, G., Ivanov, II, Littman, D.R., and O'Shea, J.J. (2009). Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J Exp Med* 206, 35-41.
- Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380, 627-630.
- Taur, Y., Jenq, R.R., Perales, M.A., Littmann, E.R., Morjaria, S., Ling, L., No, D., Gobourne, A., Viale, A., Dahi, P.B., et al. (2014). The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 124, 1174-1182.
- Taur, Y., Xavier, J.B., Lipuma, L., Ubeda, C., Goldberg, J., Gobourne, A., Lee, Y.J., Dubin, K.A., Soccia, N.D., Viale, A., et al. (2012). Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 55, 905-914.
- Tawara, I., Liu, C., Tamaki, H., Toubai, T., Sun, Y., Evers, R., Nieves, E., Mathewson, N., Nunez, G., and Reddy, P. (2013). Influence of donor microbiota on the severity of experimental graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 19, 164-168.
- Tawara, I., Maeda, Y., Sun, Y., Lowler, K.P., Liu, C., Toubai, T., McKenzie, A.N., and Reddy, P. (2008). Combined Th2 cytokine deficiency in donor T cells aggravates experimental acute graft-vs-host disease. *Exp Hematol* 36, 988-996.
- Teshima, T., Ordemann, R., Reddy, P., Gagin, S., Liu, C., Cooke, K.R., and Ferrara, J.L. (2002). Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med* 8, 575-581.
- Tohyama, M., Yang, L., Hanakawa, Y., Dai, X., Shirakata, Y., and Sayama, K. (2012). IFN-alpha enhances IL-22 receptor expression in keratinocytes: a possible role in the development of psoriasis. *J Invest Dermatol* 132, 1933-1935.
- Toubai, T., Tawara, I., Sun, Y., Liu, C., Nieves, E., Evers, R., Friedman, T., Korngold, R., and Reddy, P. (2011). 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.

- Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 10, 864-871.
- Trompette, A., Gollwitzer, E.S., Yadava, K., Sichelstiel, A.K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L.P., Harris, N.L., and Marsland, B.J. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med* 20, 159-166.
- Turner, J.R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews Immunology* 9, 799-809.

U

- Unanue, E.R. (2002). Perspective on antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 185, 86-102.

V

- van Bekkum, D.W., Roodenburg, J., Heidt, P.J., and van der Waaij, D. (1974). Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *J Natl Cancer Inst* 52, 401-404.
- Van Belle, A.B., de Heusch, M., Lemaire, M.M., Hendrickx, E., Warnier, G., Dunussi-Joannopoulos, K., Fouser, L.A., Renauld, J.C., and Dumoutier, L. (2012). IL-22 is required for imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation in mice. *J Immunol* 188, 462-469.
- van den Brink, M.R., and Burakoff, S.J. (2002). Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol* 2, 273-281.
- van der Velden, W.J., Plantinga, T.S., Feuth, T., Donnelly, J.P., Netea, M.G., and Blijlevens, N.M. (2010). The incidence of acute graft-versus-host disease increases with Candida colonization depending the dectin-1 gene status. *Clin Immunol* 136, 302-306.
- van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M., Visser, C.E., Kuijper, E.J., Bartelsman, J.F., Tijssen, J.G., et al. (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile. *N Engl J Med* 368, 407-415.
- Varona, R., Cadenas, V., Gomez, L., Martinez, A.C., and Marquez, G. (2005). CCR6 regulates CD4+ T-cell-mediated acute graft-versus-host disease responses. *Blood* 106, 18-26.
- Vegran, F., Berger, H., Boidot, R., Mignot, G., Bruchard, M., Dosset, M., Chalmin, F., Rebe, C., Derangere, V., Ryffel, B., et al. (2014). The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nat Immunol* 15, 758-766.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9, 1341-1346.
- Viaud, S., Saccheri, F., Mignot, G., Yamazaki, T., Daillyere, R., Hannani, D., Enot, D.P., Pfirsichke, C., Engblom, C., Pittet, M.J., et al. (2013). The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* 342, 971-976.
- Vink, A., Warnier, G., Brombacher, F., and Renauld, J.C. (1999). Interleukin 9-induced in vivo expansion of the B-1 lymphocyte population. *J Exp Med* 189, 1413-1423.
- Vogelsang, G.B., Lee, L., and Bensen-Kennedy, D.M. (2003). Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med* 54, 29-52.
- Vossen, J.M., Heidt, P.J., van den Berg, H., Gerritsen, E.J., Hermans, J., and Dooren, L.J. (1990). Prevention of infection and graft-versus-host disease by suppression of intestinal microflora in children treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9, 14-23.

W

- Wang, P., Bai, F., Zenewicz, L.A., Dai, J., Gate, D., Cheng, G., Yang, L., Qian, F., Yuan, X., Montgomery, R.R., et al. (2012). IL-22 signaling contributes to West Nile encephalitis pathogenesis. *PLoS One* 7, e44153.
- Wang, Y., Godec, J., Ben-Aissa, K., Cui, K., Zhao, K., Pucsek, A.B., Lee, Y.K., Weaver, C.T., Yagi, R., and Lazarevic, V. (2014). The Transcription Factors T-bet and Runx Are Required for the Ontogeny of Pathogenic Interferon-gamma-Producing T Helper 17 Cells. *Immunity*.
- Warren, E.H., and Deeg, H.J. (2013). Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies. *Tissue Antigens* 81, 183-193.
- Weiss, B., Wolk, K., Grunberg, B.H., Volk, H.D., Sterry, W., Asadullah, K., and Sabat, R. (2004). Cloning of murine IL-22 receptor alpha 2 and comparison with its human counterpart. *Genes Immun* 5, 330-336.
- Welniak, L.A., Blazar, B.R., Anver, M.R., Wiltrot, R.H., and Murphy, W.J. (2000). Opposing roles of interferon-gamma on CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease: effects of conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 6, 604-612.
- Westekemper, H., Meller, S., Citak, S., Schulte, C., Steuhl, K.P., Homey, B., and Meller, D. (2010). Differential chemokine expression in chronic GVHD of the conjunctiva. *Bone Marrow Transplant* 45, 1340-1346.
- Wilhelm, K., Ganesan, J., Muller, T., Durr, C., Grimm, M., Beilhack, A., Krempel, C.D., Sorichter, S., Gerlach, U.V., Juttner, E., et al. (2010). Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med* 16, 1434-1438.
- Wilson, M.S., Feng, C.G., Barber, D.L., Yarovinsky, F., Cheever, A.W., Sher, A., Grigg, M., Collins, M., Fouser, L., and Wynn, T.A. (2010). Redundant and pathogenic roles for IL-22 in mycobacterial, protozoan, and helminth infections. *J Immunol* 184, 4378-4390.
- Wingard, J.R., Majhail, N.S., Brazauskas, R., Wang, Z., Sobocinski, K.A., Jacobsohn, D., Sorror, M.L., Horowitz, M.M., Bolwell, B., Rizzo, J.D., and Socie, G. (2011). Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 2230-2239.
- Witte, E., Witte, K., Warszawska, K., Sabat, R., and Wolk, K. (2010). Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 365-379.
- Wolk, K., Haugen, H.S., Xu, W., Witte, E., Wagstaff, K., Anderson, M., Vom Baur, E., Witte, K., Warszawska, K., Philipp, S., et al. (2009). IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol Med (Berl)* 87, 523-536.
- Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K., and Sabat, R. (2002). Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* 168, 5397-5402.
- Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., and Sabat, R. (2004). IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21, 241-254.
- Wolk, K., and Sabat, R. (2006). Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 367-380.
- Wolk, K., Witte, E., Hoffmann, U., Doecke, W.D., Endesfelder, S., Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H.D., Wittig, B.M., and Sabat, R. (2007). IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol* 178, 5973-5981.
- Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Docke, W.D., Kunz, S., Asadullah, K., Volk, H.D., Sterry, W., and Sabat, R. (2006). IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 36, 1309-1323.
- Wolk, K., Witte, E., Witte, K., Warszawska, K., and Sabat, R. (2010). Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol* 32, 17-31.
- Wolk, K., Witte, K., Witte, E., Proesch, S., Schulze-Tanzil, G., Nasilowska, K., Thilo, J., Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H.D., and Sabat, R. (2008). Maturing dendritic cells are an

important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. *J Leukoc Biol* 83, 1181-1193.

Wysocki, C.A., Jiang, Q., Panoskalsis-Mortari, A., Taylor, P.A., McKinnon, K.P., Su, L., Blazar, B.R., and Serody, J.S. (2005). Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood* 106, 3300-3307.

X

Xiao, X., Balasubramanian, S., Liu, W., Chu, X., Wang, H., Taparowsky, E.J., Fu, Y.X., Choi, Y., Walsh, M.C., and Li, X.C. (2012). OX40 signaling favors the induction of T(H)9 cells and airway inflammation. *Nat Immunol* 13, 981-990.

Xie, M.H., Aggarwal, S., Ho, W.H., Foster, J., Zhang, Z., Stinson, J., Wood, W.I., Goddard, A.D., and Gurney, A.L. (2000). Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem* 275, 31335-31339.

Xing, W.W., Zou, M.J., Liu, S., Xu, T., Wang, J.X., and Xu, D.G. (2011). Interleukin-22 protects against acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 75, 1290-1294.

Xu, W., Presnell, S.R., Parrish-Novak, J., Kindsvogel, W., Jaspers, S., Chen, Z., Dillon, S.R., Gao, Z., Gilbert, T., Madden, K., et al. (2001). A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9511-9516.

Y

Yang, L., Zhang, Y., Wang, L., Fan, F., Zhu, L., Li, Z., Ruan, X., Huang, H., Wang, Z., Huang, Z., et al. Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22. *J Hepatol* 53, 339-347.

Yeh, A.C., Brunner, A.M., Spitzer, T.R., Chen, Y.B., Coughlin, E., McAfee, S., Ballen, K., Attar, E., Caron, M., Preffer, F.I., et al. (2014). Phase I study of urate oxidase in the reduction of acute graft-versus-host disease after myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 20, 730-734.

Yi, T., Chen, Y., Wang, L., Du, G., Huang, D., Zhao, D., Johnston, H., Young, J., Todorov, I., Umetsu, D.T., et al. (2009). Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood* 114, 3101-3112.

Yi, T., Zhao, D., Lin, C.L., Zhang, C., Chen, Y., Todorov, I., LeBon, T., Kandeel, F., Forman, S., and Zeng, D. (2008). Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood* 112, 2101-2110.

Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., et al. (2009a). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* 31, 457-468.

Yu, H., Pardoll, D., and Jove, R. (2009b). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 9, 798-809.

Z

Zaki, M.H., Boyd, K.L., Vogel, P., Kastan, M.B., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.D. (2010). The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* 32, 379-391.

Zenewicz, L.A., and Flavell, R.A. (2011). Recent advances in IL-22 biology. *International Immunology* 23, 159-163.

Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Karow, M., and Flavell, R.A. (2007). Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 27, 647-659.

- Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Stevens, S., and Flavell, R.A. (2008). Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 29, 947-957.
- Zenewicz, L.A., Yin, X., Wang, G., Elinav, E., Hao, L., Zhao, L., and Flavell, R.A. (2013). IL-22 deficiency alters colonic microbiota to be transmissible and colitogenic. *J Immunol* 190, 5306-5312.
- Zhang, F.M., Wang, H.G., Wang, M., Cui, B.T., Fan, Z.N., and Ji, G.Z. (2013). Fecal microbiota transplantation for severe enterocolonic fistulizing Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 19, 7213-7216.
- Zhang, Y., Cobleigh, M.A., Lian, J.Q., Huang, C.X., Booth, C.J., Bai, X.F., and Robek, M.D. (2011). A proinflammatory role for interleukin-22 in the immune response to hepatitis B virus. *Gastroenterology* 141, 1897-1906.
- Zhao, K., Zhao, D., Huang, D., Yin, L., Chen, C., Pan, B., Wu, Q., Li, Z., Yao, Y., Shen, E., et al. (2014). Interleukin-22 Aggravates Murine Acute Graft-Versus-Host Disease by Expanding Effector T Cell and Reducing Regulatory T Cell. *J Interferon Cytokine Res.*
- Zheng, Y., Danilenko, D.M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., and Ouyang, W. (2007). Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 445, 648-651.
- Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F.J., and Ouyang, W. (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 14, 282-289.
- Zhu, J., Guo, L., Watson, C.J., Hu-Li, J., and Paul, W.E. (2001). Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol* 166, 7276-7281.
- Zohar, Y., Wildbaum, G., Novak, R., Salzman, A.L., Thelen, M., Alon, R., Barsheheshet, Y., Karp, C.L., and Karin, N. (2014). CXCL11-dependent induction of FOXP3-negative regulatory T cells suppresses autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 124, 2009-2022.

ANNEXES

Article 1: Histone deacetylase inhibitor valproic acid affects plasmacytoid dendritic cells phenotype and function

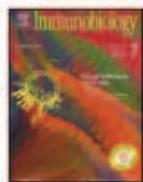
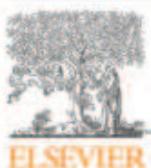
Jessy Arbez, **Baptiste Lamarthée**, Béatrice Gaugler, Philippe Saas

Immunobiology 01/2014; · 2.81 Impact Factor

Article 2: [Interleukin-22: its role in graft-versus-host-disease unraveled]

Béatrice Gaugler, **Baptiste Lamarthée**, Mélanie Couturier, Philippe Saas

Medecine sciences: M/S 29(6-7):577-9. · 0.56 Impact Factor



Histone deacetylase inhibitor valproic acid affects plasmacytoid dendritic cells phenotype and function

Jessy Arbez ^{a,b,c}, Baptiste Lamarthée ^{a,b,c}, Béatrice Gaugler ^{a,b,c,*}, Philippe Saas ^{a,b,c,d,1}

^a INSERM UMR1098, Besançon F25020, France

^b Université de Franche-Comté, Besançon F25000, France

^c EFS Bourgogne Franche-Comté, F25020 Besançon Cedex, France

^d Centre d'Investigation Clinique en Biothérapie CIC 1431, Plateforme de Biomonitoring, FHU INCREASE, Besançon F25020, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 November 2013

Received in revised form 19 February 2014

Accepted 24 March 2014

Available online 29 March 2014

Keywords:

Plasmacytoid dendritic cells

HDAC inhibitor

Cytokines

ABSTRACT

Objective: Plasmacytoid dendritic cells (PDC) represent a rare subset of dendritic cells specialized in the production of type I IFN in response to microbial pathogens. Recent data suggested that histone deacetylase (HDAC) inhibitors possess potent immunomodulatory properties both *in vitro* and *in vivo*. In this study, we assayed the ability of the HDAC inhibitor, valproic acid (VPA), to influence the phenotype and functional properties of human PDC isolated from peripheral blood.

Methods and results: We showed that VPA inhibited the production of IFN- α and the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 by CpG-activated PDC. VPA also affected the phenotype of PDC by reducing the expression of costimulatory molecules induced by CpG activation. Moreover, VPA reduced the capacity of CpG-stimulated PDC to promote CD4 $^{+}$ T cell proliferation and IFN- γ production, while enhancing the proportion of IL-10 positive T cells.

Conclusion: These results suggest that HDAC inhibition by VPA alters essential human PDC functions, highlighting the need for monitoring immune functions in cancer patients receiving HDAC inhibitors, but also making these drugs attractive therapies in inflammatory, and autoimmune diseases implicating PDC.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Plasmacytoid dendritic cells (PDC) represent a rare subset of dendritic cells specialized in the production of type I IFN in response to microbial pathogens (Rissoan et al., 1999; Celli et al., 1999; Siegal et al., 1999). Human PDC express Toll-like receptors (TLR), namely TLR-7 and TLR-9 that sense viral single-stranded RNA and unmethylated CpG DNA, respectively (Gilliet et al., 2008). Thus, IFN type I signature is associated with the pathogenesis of several autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE), psoriasis, Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis (Banchereau and Pascual, 2006; Farkas et al., 2001; Nestle et al., 2005; Ronnlblom and Eloranta, 2013). Moreover, PDC can be activated by self-DNA coupled to antimicrobial peptides, a mechanism contributing to the pathogenesis of psoriasis (Lande et al., 2007).

The functional capacity of PDC to induce immune responses may depend on the local microenvironment. Thus, PDC can be immunostimulatory, and induce potent Th1 responses (Cella et al., 2000). In contrast, PDC have been shown to promote tolerogenic T cells responses by inducing regulatory T (Treg) cells, especially in cancers (Sisirak et al., 2012). Acetylation of histones is an essential epigenetic mechanism controlling chromatin structure, DNA accessibility for transcription factors and gene expression. Histone deacetylases (HDAC) are enzymes involved in the compaction of the chromatin structure favoring gene silencing. Dysregulated HDAC expression has been linked to the pathogenesis of cancer and chronic inflammatory and autoimmune diseases (Rodriguez-Paredes and Esteller, 2011). HDAC inhibitors have been shown to exert anticancer activities notably in patients with hematologic malignancies (Minucci and Pellicci, 2006; Pratt, 2013; Lane and Chabner, 2009). In addition to the antitumor activities, HDAC inhibitors have been reported to have immunomodulatory properties both *in vitro* and *in vivo* (Leoni et al., 2002; Reddy et al., 2008).

We and others have previously reported the effect of HDAC inhibitors on the function of human monocyte-derived dendritic

* Corresponding author at: INSERM UMR1098, 1 Bd Fleming, F-25000 Besançon, France. Tel.: +33 381615615; fax: +33 381615800.

E-mail address: beatrice.gaugler@efs.sante.fr (B. Gaugler).

¹ These authors share senior authorship.

cells (Mo-DC) (Reddy et al., 2008; Frikeche et al., 2012a,b; Song et al., 2011). Thus, we reported that valproic acid (VPA) treatment of Mo-DC reduced their costimulatory activity and inflammatory cytokine release upon stimulation with TLR4 ligands (Frikeche et al., 2012a,b). In this study, we analyzed the effect of VPA on the phenotype and function of PDC.

Materials and methods

Media and reagents

RPMI-1640 supplemented with Sodium Pyruvate (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), non-essential

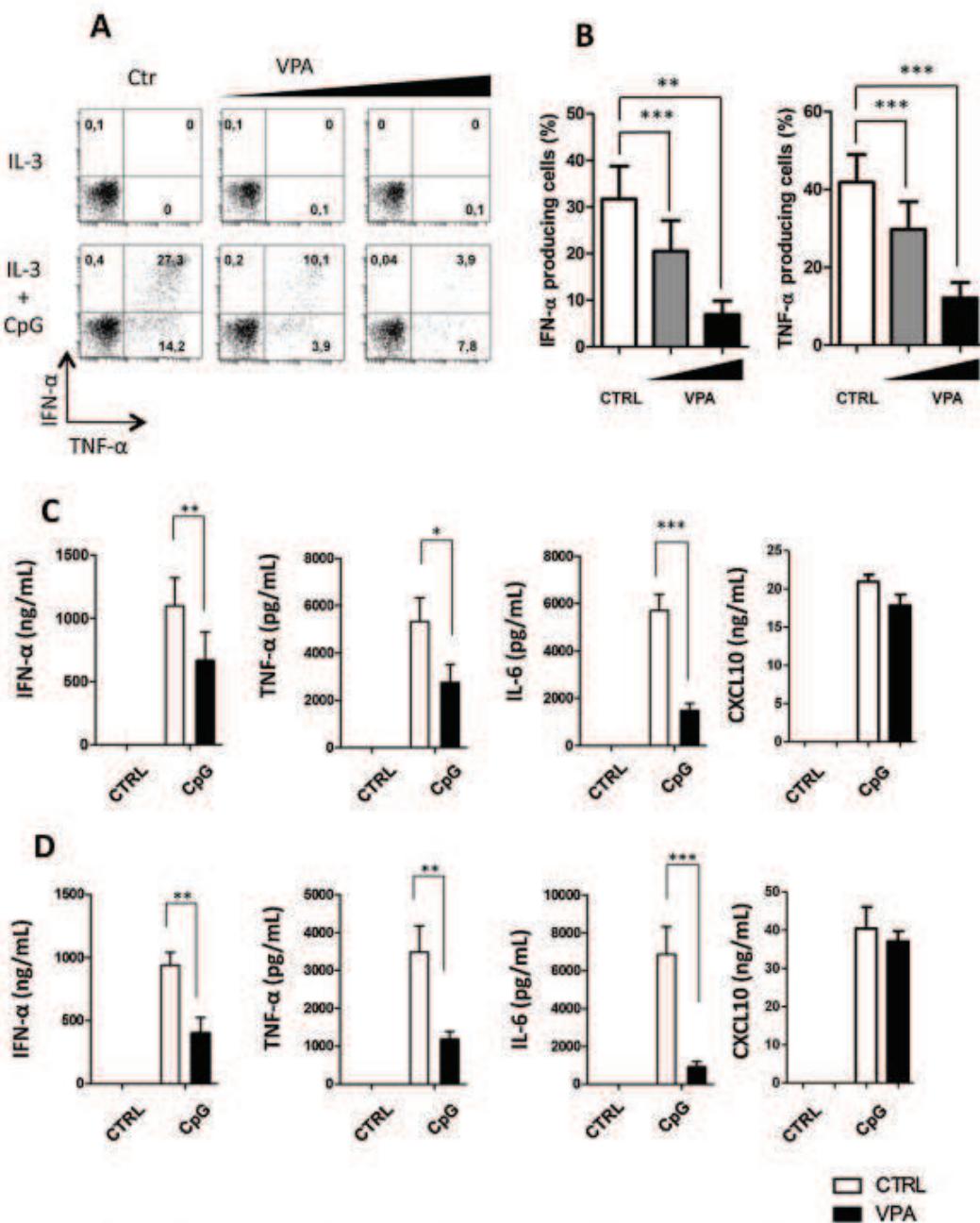


Fig. 1. VPA decreases IFN- α and proinflammatory cytokines by PDC. (A and B) Analysis of intracellular cytokines produced by PDC in the presence of 0.1 mM or 0.5 mM VPA. Total PBMC were stimulated with IL-3 and CpG2216 (IL-3+CpG) or IL-3 alone (IL-3). After 6 h, intracellular IFN- α and TNF- α were analyzed by flow cytometry by gating on BDCA2 and CD123 positive cells. (A) A representative experiment is shown. (B) Results are expressed as mean \pm SEM of the percentage of IFN- α (left panel) and TNF- α positive cells (right panel) [4 independent experiments]. (C and D) Freshly isolated PDC were cultured for 24 h (C) or 48 h (D) in the presence of 0.5 mM VPA and activated by CpG (CpG) or not (Ctrl). Supernatants were harvested before quantification by CBA for IFN- α , TNF- α and IL-6 or by Elisa for CXCL10. Mean \pm SEM are indicated ($n=4$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

amino-acids (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicillin, 100 ng/ml streptomycin (Gibco®, Life Technologies, Saint-Aubin, France) and heat-inactivated 10% fetal bovine serum (Gibco®), referred as complete culture medium was used for cell cultures throughout

the experiments. For PDC stimulation, we used 10 µg/ml CpG-ODN2216 (CpG-A, Invivogen, Cayla, Toulouse, France). Valproic acid (Sigma-Aldrich) was used at a concentration of 0.1–0.5 mM as indicated.

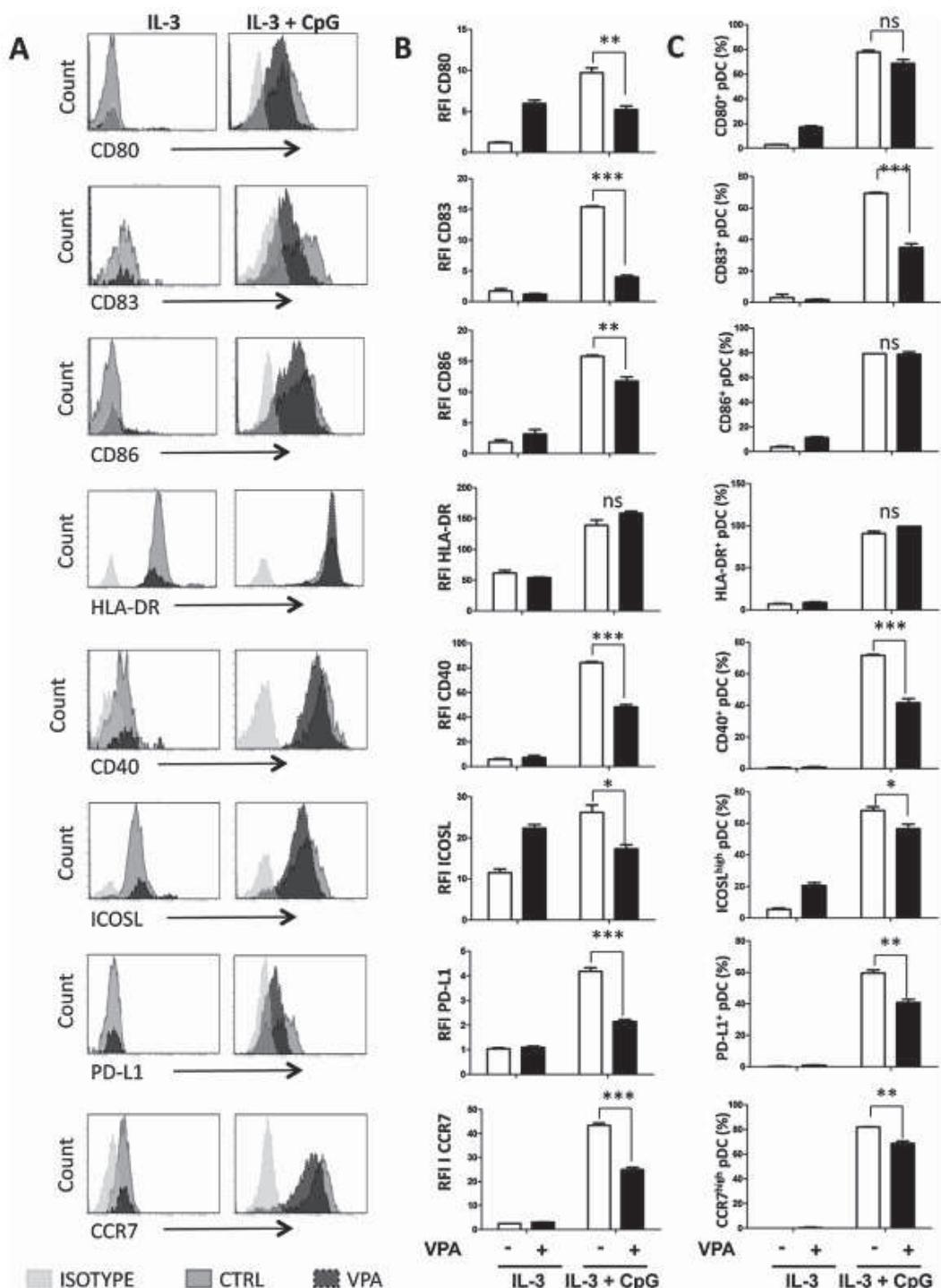


Fig. 2. Effect of VPA treatment on PDC phenotype. Isolated PDC were cultured for 24 h in the presence of VPA and IL-3 or IL-3 and CpG. Phenotypic analyses were performed by flow cytometry. (A) Data represent the percentage of cells positive for the indicated surface molecule in the presence of VPA (black) or control (dark gray) compared with the isotype control mAb (light gray). Data for PDC cultured in the presence of IL-3 (left panel) or IL-3+CpG (right panel) represent one of 4 independent experiments. (B and C) Data represent mean ± SEM of the RFI of the indicated surface marker (B) or the percentage of positive cells (C) ($n=4$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

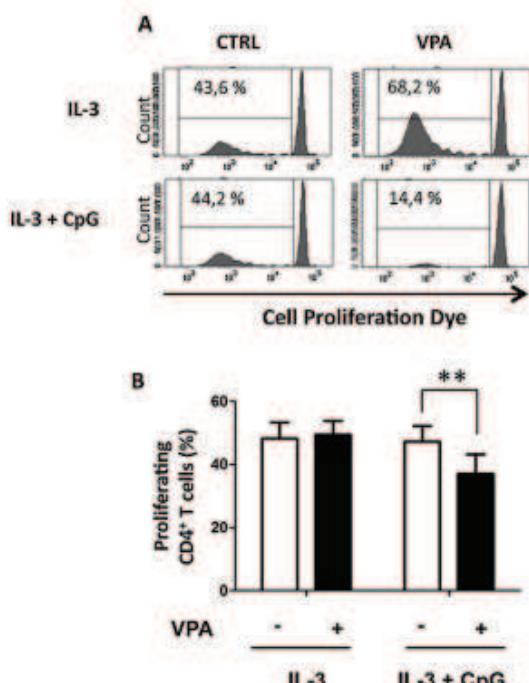


Fig. 3. Effect of VPA treatment on the PDC capacity to stimulate the proliferation of allogeneic naive CD4⁺ T cells. Naive CD4⁺ T cells were stained with the Cell proliferation Dye and cocultured with IL-3 or IL-3+CpG-stimulated-PDC treated or not with VPA. Proliferation was analyzed by flow cytometry at day 7 of culture. (A) A representative experiment out of 4 is shown. (B) Mean \pm SEM of the percentage of CD4⁺ T cells negative for the cell proliferation Dye are represented for 4 independent experiments. ** p < 0.01.

PDC isolation and culture

PBMC were obtained from buffy coats of healthy donors after informed consent (EFS Bourgogne Franche-Comté) by Ficoll density centrifugation. PDC were isolated by depletion of non-PDC followed by positive selection of BDCA4⁺ PDC using Diamond Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation kit II (Miltenyi Biotec, Paris, France) according manufacturer's instructions. Purity of isolated PDC, as determined by flow cytometry and BDCA2 staining was >97%. After isolation, PDC (10^5 cells/well in round-bottomed microplates) were cultured for 24 h or 48 h in complete medium in the presence of 10 ng/ml IL-3 (Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France), with or without 0.5 mM VPA. After 3 h, PDC were stimulated by adding 10 μ g/ml CpG-ODN2216.

Flow cytometry

PDC were harvested after 24 h or 48 h of culture and stained with the Fixable Viability Dye FVD-506 (eBiosciences, Paris, France) and then with the following fluorochrome-conjugated mouse monoclonal antibodies (mAb): FITC-CD80, APC-CD83, PE-ICOSL, PE-PDL1, V500-HLA-DR (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), Pacific Blue-CD86, PercP-Cy5.5-CD40, Pacific Blue-CCR7 (Biolegend, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Analysis was performed using FACSCanto II and FACSDiva software (BD Biosciences).

Cytokine production by PDC

Intracellular cytokine production analysis by PDC was performed by incubating PBMC in the presence of 0.5 mM VPA, then

stimulated for 6 h with 10 μ g/ml CpG2216. GolgiPlug (BD Biosciences) was added in the 3 last hours of culture. Cells were then harvested and stained with PEcy7-CD123, APC-BDCA2 before being permeabilized with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). Cytokine staining was performed with FITC IFN- α , PercP-Cy5.5-TNF- α .

ELISA and CBA assays

Cytokines IFN- α , TNF- α and IL-6 were quantified in supernatants of PDC cultures using BD cytometric bead array kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. CXCL10 was analyzed by ELISA (Biologen) according to the manufacturer's instructions.

Allogeneic CD4⁺ T cell stimulation

Naïve CD4⁺ T cells were isolated from PBMC by negative selection using a naïve CD4⁺ T cell Isolation kit II (Miltenyi Biotec). After isolation, CD4⁺ T cells were cocultured with PDC at a ratio of 2:1, in complete medium for 7 days in round-bottomed 96 well microplates. Cell proliferation was assessed using the eFluor[®]450 Cell proliferation Dye (eBiosciences, Paris, France) and analyzed by flow cytometry at day 7 of coculture. For detection of intracellular cytokine production by CD4⁺ T cells, cells were harvested after 7 days of culture with PDC and stimulated for 5 h with 25 ng/ml phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich) and 1 μ g/ml ionomycin (Sigma-Aldrich), with 1 μ l/ml Golgi Plug (BD Bioscience). Cells were then stained with eFluor[®]780 Fixable Viability Dye (eBiosciences) according to the manufacturer's instructions. Surface staining was performed using FITC-conjugated CD3 (from BD Biosciences), V500-CD4 and PE-CD8 antibodies (BD Biosciences), cells were then fixed and permeabilized using CytoFix/Perm Buffer (BD Biosciences) before staining with FITC-IL-10, PE/Cy7-IFN- γ , PercP/Cy5.5-TNF- α (Biologen), APC-IL-17A (eBioscience) specific mAb or the corresponding isotype controls. Analysis was performed using FACSCanto II and FACSDiva software (BD Biosciences).

Statistical analysis

Data were subjected to two-tailed Student's t-test analysis using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) and considered significant with a value of p < 0.05.

Results

VPA treatment represses IFN- α and proinflammatory cytokine production by PDC

We investigated the immunomodulatory potential of VPA on PDC. We first evaluated the effect of VPA treatment on the cytokine production by PDC, namely IFN- α . PDC were isolated from PBMC and pretreated for 3 h with VPA before stimulation with CpG2216 for 6 h. IFN- α and TNF- α were evaluated by intracellular staining of PDC. As shown in Fig. 1, we observed a significant decrease in both IFN- α and TNF- α -producing PDC in a dose-dependent manner (Fig. 1A and B). Similarly, the secretion of IFN- α by VPA-treated PDC was reduced in the supernatant at 24 h and 48 h of culture in the presence of CpG (Fig. 1C and D). However, the viability of PDC in the presence of VPA was not affected (% viable cells were 75.48 ± 7.5 for CpG PDC and 78.17 ± 7.29 for CpG⁺ VPA PDC, $p = 0.80$). We also observed a significant decrease of TNF- α and IL-6. In contrast, CXCL10 production was not impaired by VPA treatment (Fig. 1C).

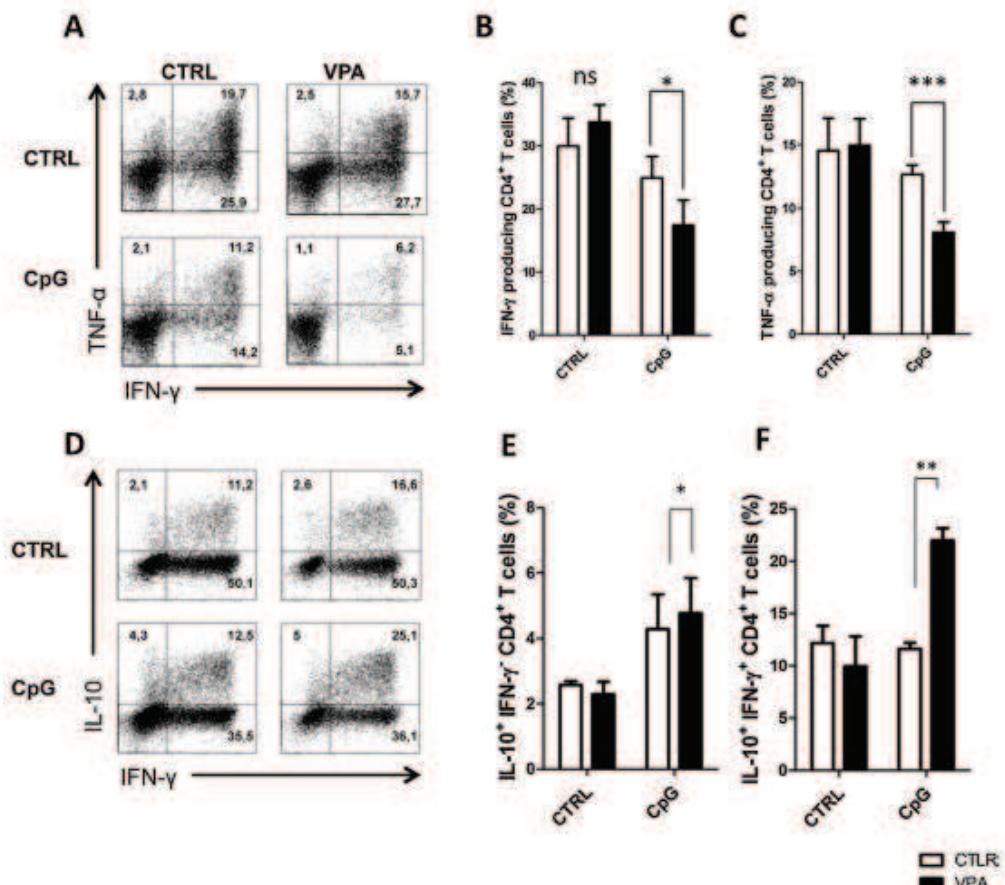


Fig. 4. Cytokine profile of CD4+ T cells cultured in the presence of VPA-treated PDC. Naive CD4+ T cells were cocultured for 7 days with VPA-treated PDC. Analysis of intracellular cytokines produced by CD4+ T cells was performed after 5 h of restimulation with PMA and ionomycin as indicated in methods. (A-C) Intracellular TNF- α and IFN- γ analysis on proliferating CD4+ T cells (gated on cell proliferation Dye negative cells). (A) A representative experiment out of 4 is shown. Mean \pm SEM of the percentage of IFN- γ (B) and TNF- α (C) positive cells are represented. (D and E) Analysis of intracellular IL-10 and IFN- γ detected in CD4+ T cells. (D) A representative experiment out of 4 independent experiments is shown. Mean \pm SEM of the percentage of IL-10* IFN- γ * CD4+ T cells (E) and IL-10* IFN- γ + CD4+ T cells (F) is represented. Data from 4 independent experiments are shown. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

VPA decreases costimulatory molecules expression on stimulated PDC

We next investigated whether VPA could affect the PDC phenotype after stimulation with CpG. Thus, the PDC phenotype was analyzed after 24 h of stimulation with CpG in the presence of VPA. We observed that expression of costimulatory molecules CD80, CD83, CD86, CD40 were markedly reduced in the presence of VPA, whereas HLA-DR expression was not modified (Fig. 2) on CpG-stimulated PDC. We also observed a decrease of PDL-1 and ICOSL, the latter being involved in the induction of Treg by PDC (Faget et al., 2012). We also observed a decrease of CCR7, suggesting that VPA treatment could affect the migratory capacity of PDC to lymphoid organs.

VPA-treated PDC have a reduced capacity to stimulate allogeneic naive CD4+ T cells

The decrease of costimulatory molecule expression on surface of CpG-stimulated PDC by VPA could affect PDC capacity to activate T cells. We performed coculture experiments of PDC with allogeneic naive CD4+ T cells in order to evaluate the functional impact of VPA treatment of PDC. When unstimulated PDC were used as stimulating cells, allogeneic CD4+ T cell proliferation was not affected. In contrast, proliferation of naive CD4+ T cells was significantly

reduced when cultured in the presence of CpG-stimulated PDC and pretreated with VPA (Fig. 3A and B). This result is in accordance with the reduced expression of costimulatory molecules after CpG stimulation and VPA treatment. We next investigated the cytokine profile produced by activated CD4+ T cells by performing analysis of intracellular cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-17A after 7 days of coculture. We detected very few IL-17A positive cells (data not shown). Interestingly, the proportion of IFN- γ * and TNF- α * CD4+ T cells was significantly reduced when CD4+ T cells were stimulated by CpG- and VPA-treated PDC (Fig. 4B–C). The decrease capacity of T cell proliferation or cytokine production may not result from the apoptosis of stimulating PDC activated in the presence of VPA, since we observed a similar viability between CpG-treated PDC and CpG+ VPA-treated PDC. We also observed a significant increase in the proportion of IL-10* CD4+ T cells when CD4+ T cells were stimulated by CpG- and VPA-treated PDC. Moreover, this increase in IL-10* CD4+ T cells was more pronounced in the IFN- γ * T cell fraction (Fig. 4D–F).

Discussion

In this study, we report that VPA, an HDAC inhibitor used for the treatment of hematologic malignancies, has a broadly impact on the phenotype and function of PDC, mainly by inhibiting CpG-mediated TLR-9 activation. We demonstrated that VPA impairs

IFN- α production by PDC in response to TLR-9 stimulation, as it was demonstrated for trichostatin A (TSA), another HDAC inhibitor (Salvi et al., 2010). IFN- α has a pleiotropic activity on immune effectors, thus the reduced capacity to produce type I IFN in the presence of VPA could consequently alter the differentiation of B cells into plasmablasts, activation of NK cells or CD8 $^{+}$ cytotoxic T cells (Colonna et al., 2004). The transcription factor IRF7 is essential in the regulation of type-I IFN (Honda et al., 2005). Previous report indicated that the HDAC inhibitor TSA was able to block IRF7 nuclear translocation in PDC (Salvi et al., 2010). In contrast, VPA has been shown to increase *Irif7* mRNA in macrophages (Litvak et al., 2012). *Irif7* is a target of foxo3, a negative regulator involved in the feedback loop of IFN type I regulation (Litvak et al., 2012). It would be important to determine if foxo3 expression is modulated by VPA in PDC and involved in the reduced IFN-I production by VPA-treated PDC. Also, TSA has been shown to upregulate the expression of Mi-2 β in murine bone-marrow derived macrophages exposed to LPS and involved in the regulation of IL-6 (Roger et al., 2011). Thus, whether PDC also upregulate Mi-2 β after VPA treatment remains to be explored. Also, VPA treatment did not affect the capacity to secrete CXCL10 by PDC, suggesting that their ability to recruit Th1 cells expressing CXCR3, the receptor for CXCL10 may not be altered. Our results demonstrated a significant reduction in costimulatory molecule expression in CpG-stimulated PDC exposed to VPA. This observation is in line with previous reports on human Mo-DC exposed to VPA (Reddy et al., 2008; Frikeche et al., 2012a,b) or to the HDAC inhibitor LBH589 (Song et al., 2011) as well as on murine macrophages (Roger et al., 2011). This reduction of costimulatory molecules on PDC by VPA may explain in part the reduced capacity of CpG-stimulated PDC exposed to VPA to sustain the proliferative capacity of naïve CD4 $^{+}$ T cells. We also observed that CD4 $^{+}$ T cells cultured in the presence of CpG and CpG-VPA-treated PDC have an increased capacity to secrete IL-10, which is in favor of the induction of regulatory T cells (Tr1) induction. However, we did not observe the induction of Foxp3 $^{+}$ on stimulated CD4 $^{+}$ T cells as well as the expression of Lag3 and CD49b, both of which are expressed by Tr1 cells (Gagliani et al., 2013). Interestingly, PDC have been described to promote Multiple Myeloma (MM) cell growth, survival, and drug resistance, by a mechanism depending on surface molecules and soluble factors (Chauhan et al., 2009). In this report, we found that VPA significantly decreases IL-6 production, involved in the growth and survival of MM cells. These results are in accordance with recent data demonstrating that HDAC inhibitors, in combination with bortezomib improved its therapeutic potential in MM patients (Pratt, 2013; Dimopoulos et al., 2013).

Thus, the immunomodulatory effects of VPA and other HDAC inhibitors might prove useful in different clinical settings where regulation of immunity is eagerly needed as in chronic inflammatory diseases (Glauben and Siegmund, 2011) or in graft-versus-host disease (GVHD) after allogeneic stem cell transplantation (Frikeche et al., 2012a,b; Choi and Reddy, 2011). In summary, our study suggests that HDAC inhibition by VPA significantly impairs the phenotype and function of PDC highlighting the need for a close monitoring of immune functions in cancer patients receiving HDAC inhibitors therapy. Also, it can be reasoned that HDAC inhibitors may have different roles in pathological compared with normal tissues where they can modulate PDC functions through interference in TLR-9 mediated proinflammatory signaling cascades, making them attractive therapeutic tools in inflammatory, and autoimmune diseases.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (Labex LipSTIC ANR-11-LABX-0021), the Etablissement Français du Sang (AO#2011-11) and the University of Franche-Comté (BQR 2013).

References

- Banchereau, J., Pascual, V., 2006. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 25, 383.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., Colonna, M., 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 5, 919.
- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., Colonna, M., 2000. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat. Immunol.* 1, 305.
- Chauhan, D., Singh, A.V., Brahmamandam, M., Carrasco, R., Bandi, M., Hidemitsu, T., Bianchi, G., Podar, K., Tai, Y.T., Mitsiades, C., Raje, N., Jaye, D.L., Kumar, S.K., Richardson, P., Munshi, N., Anderson, K.C., 2009. Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell* 16, 309.
- Choi, S., Reddy, P., 2011. HDAC inhibition and graft versus host disease. *Mol. Med.* 17, 404.
- Colonna, M., Trinchieri, G., Liu, Y.J., 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* 5, 1219.
- Dimopoulos, M., Siegel, D.S., Lonial, S., Qi, J., Hajek, R., Facon, T., Rosinol, L., Williams, C., Blacklock, H., Goldschmidt, H., Hungria, V., Spencer, A., Palumbo, A., Graef, T., Eid, J.E., Houp, J., Sun, L., Vuocolo, S., Anderson, K.C., 2013. Vorinostat or placebo in combination with bortezomib in patients with multiple myeloma (VANTAGE 088): a multicentre, randomised, double-blind study. *Lancet Oncol.* 14, 1129.
- Faget, J., Bendriss-Vermare, N., Gobert, M., Durand, I., Olive, D., Biota, C., Bacheliot, T., Treilleux, I., Goddard-Leon, S., Lavergne, E., Chabaud, S., Blay, J.Y., Caux, C., Menetrier-Caux, C., 2012. ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4 $^{+}$ T cells. *Cancer Res.* 72, 6130.
- Farkas, L., Beiske, K., Lund-Johansen, F., Brandtzæg, P., Jahnsen, F.L., 2001. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon-alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am. J. Pathol.* 159, 237.
- Frikeche, J., Peric, Z., Brisset, E., Gregoire, M., Gaugler, B., Mohty, M., 2012a. Impact of HDAC inhibitors on dendritic cell functions. *Exp. Hematol.* 40, 783.
- Frikeche, J., Simon, T., Brisset, E., Gregoire, M., Gaugler, B., Mohty, M., 2012b. Impact of valproic acid on dendritic cells function. *Immunobiology* 217, 704.
- Gagliani, N., Magnani, C.F., Huber, S., Gianolini, M.E., Pala, M., Licona-Limon, P., Guo, B., Herbert, D.R., Bulfone, A., Trentini, F., Di Serio, C., Bacchetta, R., Andreani, M., Brockmann, L., Gregori, S., Flavell, R.A., Roncarolo, M.G., 2013. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat. Med.* 19, 739.
- Gillet, M., Cao, W., Liu, Y.J., 2008. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 594.
- Glauben, R., Siegmund, B., 2011. Inhibition of histone deacetylases in inflammatory bowel diseases. *Mol. Med.* 17, 426.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., Taniguchi, T., 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetto, V., Chatterjee, B., Wang, Y.H., Homey, B., Cao, W., Su, B., Nestle, F.O., Zal, T., Mellman, I., Schroder, J.M., Liu, Y.J., Gillett, M., 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564.
- Lane, A.A., Chabner, B.A., 2009. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 27, 5459.
- Leoni, F., Zaliani, A., Bertolini, G., Porro, G., Pagani, P., Pozzi, P., Dona, G., Fossati, G., Sozzani, S., Azam, T., Butler, P., Fantuzzi, G., Goncharov, I., Kim, S.H., Pomerantz, B.J., Reznikov, L.L., Siegmund, B., Dinarello, C.A., Mascagni, P., 2002. The anti-tumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2995.
- Litvak, V., Ratnshny, A.V., Lampano, A.E., Schmitz, F., Huang, A.C., Raman, A., Rust, A.G., Bergenthaler, A., Aitchison, J.D., Aderem, A., 2012. A FOXO3-IRF7 gene regulatory circuit limits inflammatory sequelae of antiviral responses. *Nature* 490, 421.
- Minucci, S., Pellicci, P.G., 2006. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 38.
- Nestle, F.O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y.J., Gillett, M., 2005. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J. Exp. Med.* 202, 135.
- Pratt, G., 2013. Histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 14, 1038.
- Reddy, P., Sun, Y., Touhai, T., Duran-Strauck, R., Clouthier, S.G., Weisiger, E., Maeda, Y., Tawara, I., Krijanovski, O., Gatza, E., Liu, C., Malter, C., Mascagni, P., Dinarello, C.A., Ferrara, J.L., 2008. Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 2562.

- Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., Liu, Y.J., 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283, 1183.
- Rodriguez-Paredes, M., Esteller, M., 2011. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat. Med.* 17, 330.
- Roger, T., Lugrin, J., Le Roy, D., Goy, G., Mombelli, M., Koessler, T., Ding, X.C., Chanson, A.L., Reymond, M.K., Miconnet, I., Schrenzel, J., Francois, P., Calandra, T., 2011. Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection. *Blood* 117, 1205.
- Romblom, Eloranta, M.L., 2013. The interferon signature in autoimmune diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* 25, 248.
- Salvi, V., Bosisio, D., Mitola, S., Andreoli, L., Tincani, A., Sozzani, S., 2010. Trichostatin A blocks type I interferon production by activated plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* 215, 756.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., Liu, Y.J., 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835.
- Sisirak, V., Faget, J., Gobert, M., Goutagny, N., Vey, N., Treilleux, I., Renaudineau, S., Poyer, G., Labidi-Galy, S.I., Goddard-Leon, S., Durand, I., Le Mercier, I., Bajard, A., Bachelot, T., Puisieux, A., Puisieux, I., Blay, J.Y., Menetrier-Caux, C., Caux, C., Bendriess-Vermare, N., 2012. Impaired IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer Res.* 72, 5188.
- Song, W., Tai, Y.T., Tian, Z., Hidemitsu, T., Chauhan, D., Nanjappa, P., Exley, M.A., Anderson, K.C., Munshi, N.C., 2011. HDAC inhibition by LBH589 affects the phenotype and function of human myeloid dendritic cells. *Leukemia* 25, 161.

NOUVELLE

Interleukine 22**Son rôle dans la maladie du greffon contre l'hôte**

Béatrice Gaugler, Baptiste Lamarthée, Mélanie Couturier, Philippe Saas

Inserm UMR1098, Établissement français du sang (EFS)
Bourgogne Franche-Comté, université de Bourgogne
Franche-Comté, 1, boulevard Fleming, 25020 Besançon,
France.
beatrice.gaugler@efs.sante.fr

► L'allogreffe de cellules hématopoïétiques est une thérapeutique pour les patients atteints d'hémopathies malignes. Le nombre de ces allogreffes est en constante augmentation du fait, notamment, de la diversification des sources de greffon et de l'utilisation de conditionnements prégreffes ayant une toxicité réduite ce qui permet de les appliquer à des patients plus âgés [1]. Cependant, la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) reste une complication majeure de ces greffes et entraîne une morbidité et une mortalité importantes [1]. La GVHD aiguë correspond à une réponse immune inflammatoire exacerbée qui conduit à la destruction des tissus sains du receveur par les cellules immunitaires du donneur. Les études pionnières de l'équipe de Ferrara [2] ont proposé un modèle physiopathologique de la GVHD aiguë comprenant trois étapes, au cours desquelles les systèmes immunitaires inné et adaptatif interagissent : (1) l'activation des cellules présentatrices de l'antigène de l'hôte par les cytokines inflammatoires, (2) l'activation des lymphocytes T du donneur, et (3) la phase effectrice conduisant à la destruction des tissus cibles [2]. Les modèles expérimentaux animaux ont mis en évidence la contribution des lipopolysaccharides (LPS) bactériens qui sont libérés au niveau de la barrière intestinale lésée par le conditionnement prégreffe, et qui vont déclencher la cascade d'activation immunitaire [2].

L'interleukine-22 : des propriétés contrastées entre inflammation et protection des tissus

L'interleukine 22 (IL-22) est une cytokine essentielle à la défense de l'organisme contre les pathogènes extracellulaires au niveau des muqueuses. Elle est produite aussi bien par des cellules de l'immunité innée qu'adaptative. Ainsi, les lymphocytes T CD4⁺ (Th1, Th17, Th22) [3], les lymphocytes T γδ, les cellules NKT (natural killer T cells), ainsi que les cellules lymphoïdes de l'immunité innée CD3⁺ (innate lymphoid cells [ILC], et lymphoid tissue inducer [LTi]) sont autant de sources d'IL-22. L'IL-22 se lie à son récepteur IL-22R formé de l'IL-22R1 et IL-10R2, qui induit la cascade de signalisation de STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*). Le récepteur IL-22R n'est pas exprimé sur les cellules hématopoïétiques ; il est exclusivement présent sur des cellules épithéliales de tissus comme la peau, l'intestin, le côlon et le poumon. D'un point de vue fonctionnel, l'IL-22 participe à l'homéostasie des tissus en permettant la prolifération des cellules épithéliales contribuant ainsi à maintenir ou restaurer l'intégrité de la barrière épithéliale. L'IL-22 induit la synthèse de protéines antimicrobiennes dans la peau et les muqueuses, comme par exemple les protéines S100, les bêta-défensines et les protéines REG (regenerating) [4]. Enfin, l'IL-22 permet la production de médiateurs inflammatoires comme l'IL-6, IL-1β, le G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), ou des chimiokines CXCL1 et CXCL9. Une dérégulation de la

signalisation de la cascade IL-22/IL-22R est impliquée dans plusieurs pathologies comme le psoriasis et des maladies inflammatoires de l'intestin [5].

Quelle contribution de l'IL-22 au développement de la maladie du greffon contre l'hôte ?

Compte tenu des propriétés de l'IL-22 dans les tissus qui sont le plus souvent la cible de la GVHD, nous avons évalué sa contribution au développement de cette maladie dans un modèle expérimental de GVHD aiguë. Les souris irradiées reçoivent de la moelle osseuse allogénique et des lymphocytes T capables d'induire la GVHD issus soit de souris sauvages, soit déficientes en IL-22. Il apparaît que les souris qui reçoivent des lymphocytes T déficients en IL-22 développent une maladie moins sévère, et leur mortalité est diminuée [6]. L'IL-22 participe à la sévérité de la GVHD en favorisant l'inflammation systémique, mais aussi locale au niveau des organes cibles [6]. Dans ce modèle, la moindre sévérité de la maladie est associée à une augmentation des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) [6], ces derniers pouvant être responsables de l'effet protecteur observé en absence d'IL-22 dans les lymphocytes T du donneur. Une autre étude a montré que les ILC localisées dans l'intestin des souris receveuses persistent après greffe et sécrètent de l'IL-22 lorsqu'elles sont activées par l'IL-23 [7]. Cette étude montre que la GVHD intestinale détruit les ILC qui participent à la protection des cellules souches intestinales, et que la disparition de

ces cellules souches est plus accentuée en absence d'IL-22 dérivée de l'hôte [7]. Ainsi, l'IL-22 produite par les ILC intestinales du receveur permettrait de maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal dans un contexte inflammatoire et d'une réponse allogénique, et diminuerait la pathologie liée à la GVHD. Ces résultats confortent ceux décrivant le rôle protecteur de l'IL-22 dans les modèles de colites inflammatoires [8]. Ainsi, l'IL-22 produite soit par les ILC du receveur, soit par les lymphocytes T du donneur, peut avoir des effets opposés dans le développement de la GVHD (Figure 1). Il est donc important de

déterminer quel effet est dominant dans un contexte clinique d'allogreffe pour envisager une approche thérapeutique d'administration ou de neutralisation de l'IL-22. Cependant, les effets de l'IL-22 semblent multiples et complexes après la greffe, rendant difficile l'approche thérapeutique visant à neutraliser cette cytokine. En effet, une étude récente a montré que l'IL-22 produite par les cellules ILC ROR γ T $^+$ (*retinoid-related orphan receptor*) CCR6 $^+$ NKp46 $^+$ du thymus est nécessaire pour induire la régénération thymique après une irradiation corporelle totale dans un modèle expérimental [9, 10]. La neutralisation

de l'IL-22 postgreffe pourrait avoir un impact direct sur la régénération du thymus potentiellement endommagé à la suite du conditionnement prégreffe, et influencer négativement la reconstitution immunitaire. D'autre part, les effets de l'IL-22 peuvent être neutralisés *in vivo* grâce à l'expression de son récepteur soluble, l'IL-22 binding protein (IL-22BP). L'IL-22BP est exprimée dans les poumons, la peau, la rate et le côlon [11], mais son importance et son rôle *in vivo* restent peu connus. Une étude récente montre que l'IL-22BP est fortement exprimée par les cellules dendritiques au niveau du côlon dans des conditions d'homéostasie, et qu'elle joue un rôle crucial dans le contrôle de l'inflammation et de la tumorigénèse qui est associée [12]. Ces observations ajoutent un niveau de complexité supplémentaire dans la régulation fonctionnelle de l'IL-22 et pourraient rendre compte des résultats divergents rapportés dans les modèles de greffe allogénique de cellules hématopoïétiques et d'inflammation. L'expression de l'IL-22BP est régulée via l'IL-18 et l'inflamasome [12]. La participation de l'IL-22BP reste à explorer dans le contexte de GVHD.

Rôle de l'interleukine-22 dans la GVHD : quelle influence du microbiote ?

Le conditionnement prégreffe combinant chimiothérapies et irradiation contribue aux lésions de l'épithélium intestinal, favorisant l'exposition systémique aux produits microbien normalement séquestrés au niveau de la lumière intestinale [2]. Des études récentes menées dans des modèles murins et chez l'homme ont montré que la GVHD est associée à une modification du microbiote en faveur des souches de la famille des lactobacilles [13]. Cette modification du microbiote pourrait être le résultat de la destruction des cellules de Paneth qui produisent les peptides antimicrobiens [14]. Il est probable que l'absence d'IL-22 favorise

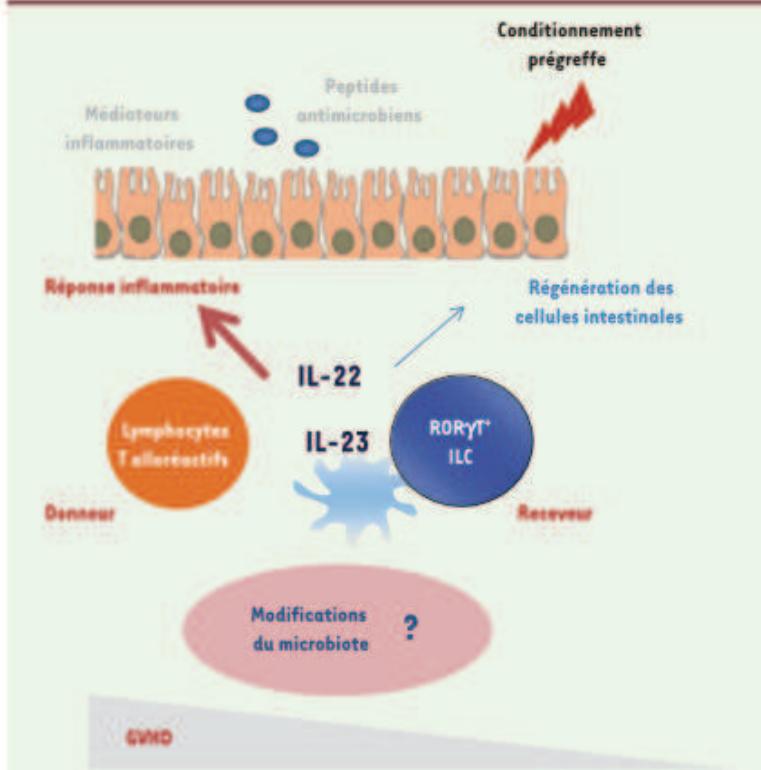


Figure 1. Rôle de l'IL-22 dans la maladie digestive du greffon contre l'hôte. L'IL-22 est produite après la greffe par les ILC du receveur [7] ou par les lymphocytes T alloréactifs du donneur [8]. L'IL-22 sécrétée par les lymphocytes T du donneur au moment de la greffe participe à la réponse inflammatoire dans les tissus cibles de la GVHD (maladie du greffon contre l'hôte) et favorise l'alloréactivité. Cependant, l'IL-22 produite par les ILC radiorésistantes ROR γ T $^+$ du receveur pourrait aussi avoir des effets bénéfiques après la greffe en participant à la régénération de l'épithélium intestinal et du thymus. Le microbiote peut être modifié selon la présence ou non de l'IL-22 et influencer aussi la maladie. Il reste à déterminer comment sont intégrées ces fonctions antagonistes de l'IL-22 et quels effets dominent après la greffe.



la colonisation d'espèces bactériennes différentes. Comme le microbiote est important dans la génération des réponses lymphocytaires Th17 et Treg au niveau intestinal [15, 16], il reste à déterminer si la modification du microbiote en absence d'IL-22 pourrait favoriser l'expansion de Treg, modulant ainsi la sévérité de la maladie (*Figure 1*). L'implication de la réponse immunitaire innée dans le développement de la GVHD intestinale, le rôle du microbiote et les effets pro-inflammatoires ou protecteurs de l'IL-22 n'ont pas encore livré tous leurs secrets dans la physiopathologie de cette maladie.

Interleukin-22: its role in graft-versus-host-disease unraveled

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- 1 Jouet JP. La greffe de moelle osseuse, d'un siècle à l'autre. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 447-8.
- 2 Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009 ; 373 : 1550-61.
- 3 Yssel H, Benussan A. Existe-t-il dans la peau une nouvelle population lymphocytaire Th22 distincte des lymphocytes Th17 ? *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 12-4.
- 4 Walk K, Kunz S, Witte E, et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004 ; 21 : 341-54.
- 5 Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol* 2011 ; 12 : 383-90.
- 6 Couturier M, Lamarthe B, Arbez J, et al. IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect. *Leukemia* 2013 ; doi: 10.1038/leu.39.
- 7 Hanash AM, Duddukov JA, Huo G, et al. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft-versus host disease. *Immunity* 2012 ; 37 : 339-50.
- 8 Zenewicz LA, Flavell RA. IL-22 and inflammation: leukin' through a glass onion. *Eur J Immun* 2008 ; 38 : 3265-8.
- 9 Duddukov JA, Hanash AM, Jeng RR, et al. Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice. *Science* 2012 ; 336 : 91-5.
- 10 Williams L, Bosselut R. Interleukine 22 – Une nouvelle piste vers la régénération thymique *in vivo* ? *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 11-4.
- 11 Dumoutier L, Lejeune O, Colau D, Renaud JC. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J Immunol* 2001 ; 166 : 7090-5.
- 12 Huber S, Gagliani N, Zenewicz LA, et al. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* 2012 ; 491 : 259-63.
- 13 Jeng RR, Ubeda C, Taur Y, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2012 ; 209 : 903-11.
- 14 Enguchi Y, Takashima S, Oku H, et al. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins. *Blood* 2012 ; 120 : 223-31.
- 15 Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* 2011 ; 331 : 337-41.
- 16 Boulaiz N, Hand TW, Naik S, Belkaid Y. Microbiote et lymphocytes T: les meilleurs ennemis. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 349-52.

NOUVELLE

Les chaperons pharmacologiques Une nouvelle approche thérapeutique des maladies génétiques

Dominique P. Germain, Karelle Benistan, Lucia Echevarria

Rôle de l'α-galactosidase A dans la maladie de Fabry

La maladie de Fabry (*online mendelian inheritance in man* [OMIM] 301500) est une maladie de surcharge de transmission génétique liée au chromosome X, due au déficit en α-galactosidase A (α-Gal A, EC 3.2.1.22) lysosomale, une hydrolase acide. Le déficit enzymatique conduit à l'accumulation du globotriaosylcéramide (Gb₃ ou CD77) dans les lysosomes de tous les tissus de l'organisme. La forme classique de la maladie débute dans l'enfance par des acroparesthésies, des angiothématomes, des douleurs abdominales et une microalbuminurie. Avec l'âge, l'affection évo-

lue vers une maladie multisystémique avec insuffisance rénale et complications cardiovasculaires (cardiomyopathie hypertrophique, arythmie) et cérébrovasculaires (accidents vasculaires cérébraux) réduisant l'espérance de vie [1]. Actuellement, deux thérapies enzymatiques substitutives sont disponibles pour traiter les patients atteints de maladie de Fabry [2, 3]. Des bénéfices cliniques ont été démontrés, mais l'efficacité de l'enzymothérapie reste incomplète et son coût élevé. Les thérapies enzymatiques substitutives s'accompagnent par ailleurs de contraintes liées à leur mode d'administration (perfusions à vie chaque

Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines (UVSQ), UFR des sciences de la santé Simone Veil, 78180 Montigny, France.

dominique.germain@uvsq.fr

deux semaines) et d'effets secondaires liés à la production d'anticorps contre l'enzyme exogène.

Dans de nombreuses maladies lysosomales, dont la maladie de Fabry, des mutations faux-sens conduisent à un mauvais repliement de la protéine et un défaut de sa structure tridimensionnelle [4]. En conséquence, l'hydrolase acide est dégradée prématièrement par les systèmes de contrôle de qualité associés au réticulum endoplasmique (ERAD, *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) [4] même si les mutations ne compromettent pas son activité catalytique [5].

Résumé

L'interleukine-22 dans la maladie du greffon contre l'hôte après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) reste la complication majeure de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH). La GVHD résulte de l'activation de la réponse immunitaire et de la reconnaissance d'alloantigènes par les lymphocytes T (LT) du donneur, entraînant ainsi des lésions tissulaires principalement au niveau de la peau, des intestins et du foie. L'interleukine-22 (IL-22) est une cytokine sécrétée par les LT Th1, Th17 et les cellules de l'immunité innée (ILC). Compte tenu des propriétés de l'IL-22 dans les tissus cibles de la GVHD, nous avons évalué sa contribution dans la physiopathologie de la maladie à l'aide de modèles expérimentaux murins. Il apparaît que les souris qui reçoivent des lymphocytes T invalidés pour l'IL-22 développent une maladie moins sévère, et leur mortalité est diminuée. L'IL-22 issue du greffon participe donc à la sévérité de la GVHD en favorisant l'inflammation systémique, mais aussi locale au niveau des organes cibles. De plus, dans les intestins, l'IL-22 agit en synergie avec les interférons de type I pour amplifier l'inflammation de type Th1 au cours de la GVHD. Chez l'homme, la GVHD est associée à une modification du microbiote intestinal. Nous avons montré que l'absence d'IL-22 semble favoriser la colonisation de lactobacilles au détriment de clostridium, ce qui pourrait également participer à la diminution de la GVHD intestinale. Enfin, nous avons montré que l'effet anti-tumoral est préservé malgré l'absence d'IL-22. Ces résultats permettent donc d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement de la GVHD.

Abstract

Interleukine-22 in graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation

Graft-versus-host disease (GVHD) is still the major complication after allogeneic stem cell transplantation. GVHD results from the activation of the immune response and the recognition by donor T cells of alloantigens leading to tissue injury, especially in skin, gut and liver. Interleukin-22 (IL-22) is a cytokine secreted by CD4+ T cells Th1 and Th17 but also by innate lymphoid cells (ILC). Given that IL-22 functions in the GVHD target tissues, we investigated its contribution in GVHD physiopathology using mouse experimental models. We showed that IL-22 deficiency in donor cells reduced the severity of GVHD by limiting systemic and local inflammation. Moreover, in the large intestine, IL-22 acts in synergy with type I interferon to increase Th1-like inflammation. In humans, GVHD severity is associated with microbial modification in the intestine. We demonstrated that IL-22 deficiency in donor cells seems to favor lactobacillus colonization instead of clostridium. These changes of microbiota composition may reduce the severity of intestinal GVHD. Finally, we showed that the antitumor effect is preserved even in absence of IL-22 donor cells. Overall, our data support the design of new clinical approaches aiming to target IL-22 pathways in GVHD patients.