



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## AVERTISSEMENT

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

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

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

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

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

## **Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

### **Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

**Par Allan BERTRAND**

## **Rôle des cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) dans les syndromes myélodysplasiques / Leucémies aiguës myéloïdes dans le contexte de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques**

**Jeudi 14 Décembre 2023**

### **Membres du jury :**

<b>Président :</b>	<b>Pr Eric SOLARY</b>	<b>Centre Gustave Roussy, Villejuif</b>
<b>Rapporteurs :</b>	<b>Pr Frédéric BARON</b>	<b>Service Hématologie Clinique, Liège</b>
	<b>Pr Bernard BONNOTTE</b>	<b>Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Dijon</b>
<b>Invitées :</b>	<b>Pr Sophie PARK</b>	<b>Service Hématologie Clinique, Grenoble</b>
	<b>Pr Natalia DE ISLA</b>	<b>Laboratoire IMoPA Nancy Université</b>
<b>Directrice :</b>	<b>Pr Marie-Thérèse RUBIO</b>	<b>Laboratoire IMoPA Nancy Université</b>
<b>Co-directrice :</b>	<b>Pr Maud D'AVENI</b>	<b>Laboratoire IMoPA Nancy Université</b>

---

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

## REMERCIEMENTS

**À notre président du jury, Monsieur le Professeur Eric Solary,**

Nous tenons à vous exprimer notre profonde gratitude pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury et d'évaluer ce travail. Soyez assuré de notre plus grande reconnaissance pour votre précieuse contribution à cette thèse.

**À notre juge et rapporteur, Monsieur le Professeur Frédéric Baron,**

Nous vous remercions d'avoir accepté de juger et rapporter ce travail. Nous vous remercions du temps que vous nous accordez. Soyez assuré de ma plus grande reconnaissance.

**À notre juge et rapporteur, Monsieur le Professeur Bernard Bonnotte,**

Nous vous remercions d'avoir accepté de juger et rapporter ce travail. Nous vous remercions du temps que vous nous accordez. Soyez assuré de ma plus grande reconnaissance.

**À notre juge, Monsieur le Professeur Sophie Spark,**

Nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail, et d'avoir pu vous libérer pour le jour de la soutenance malgré vos activités. Soyez assuré de ma plus grande reconnaissance.

**À notre juge, Madame le Professeur Natalia de Isla,**

Nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie pour votre temps et pour votre expertise en métabolisme qui m'ont permis de progresser. Votre calme et votre bienveillance ont été source d'encouragements tout au long de ma thèse. Soyez assuré de ma plus grande reconnaissance.

**À ma directrice de thèse, Madame le Professeur Marie-Thérèse Rubio,**

Je vous remercie pour votre confiance et de m'avoir accepté dans votre équipe. Votre rigueur et votre passion pour la recherche sont une réelle source de motivation. Malgré votre emploi du temps surchargé, vous avez su instaurer une ambiance de travail dynamique, et à guider votre équipe de recherche à travers les publis.

**À ma co-directrice de thèse, Madame le Docteur Maud D'Aveni-Piney,**

Je te remercie pour ta confiance accordée en début de thèse. Tu as toujours su libérer du temps dans ton emploi du temps très chargé afin de m'aider à avancer tout au long de ces années. Tu m'as énormément apporté, que ce soit par tes connaissances ou par ta rigueur, tu es un réel exemple. J'espère en échange t'avoir apporté des réponses à tes épatantes cellules que sont les MDSC, même si je sais que tout n'a pas été parfait. Je garderai toujours d'excellents souvenirs à tes côtés, et te remercie pour l'opportunité que tu m'as offerte.

**Au Professeur Nguyen et au Docteur Moulin,** je vous remercie pour votre participation et conseils durant mes comités de suivi de thèse.

**Au Professeur Jean-Yves Jouzeau,** je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire ainsi que pour votre soutien au cours de ces années.

**Au Docteur Sophie Rahuel-Clermont directrice de l'école doctorale BioSE,** je vous remercie pour votre soutien au cours de ces différentes années passées.



**A Anne Bé,** je te remercie d'avoir appris à voler à ton piou piou. Je me souviendrai toujours de ta passion, de ta bonne humeur à toute épreuve, ainsi que de tes nombreux encouragements qui m'ont aidé à avancer et à garder le sourire. Les MDSC ont la chance de t'avoir, bien qu'elles ne soient pas tout le temps coopératives. Mais c'est aussi pour ça que tu les aimes autant !

**A Naceur Chariff,** je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apporté au cours de ces années ! Que ce soit concernant les protocoles, les commandes urgentes, mon incompréhension devant le mélomélo des financements, tu as toujours su te montrer très patient. Je te remercie pour les bons moments passés ensemble au cours de ces années.

**Aux docteurs Cécile Pochon et Pascal Reboul,** je vous remercie pour vos partages d'expériences, et de vos conseils au cours des années.

**Au professeur Céline Huselstein,** je vous remercie de m'avoir permis de mettre un pied au laboratoire lorsque j'étais en master, qui m'offrira par la suite l'opportunité de continuer en thèse.

**Au Docteur Huguette Louis,** merci pour toute ton aide, et surtout ta patience à mes nombreuses venues dans ton bureau ! Malheureusement pour toi il reste encore pas mal de doctorants équipe6 à devoir supporter derrière... Adios !

**A Sébastien Hergalant, Romain Piucco et Ghislain Fievet,** je vous remercie pour votre participation, et vos nombreuses connaissances en bio-info que vous nous avez partagées.

**Au service d'hématologie de Nancy,** je vous remercie pour votre patience à mes nombreuses venues au sein de votre service, et pour vos sourires en toute circonstance qui m'ont aidé tout au long de la thèse.

**Aux docteurs Alice Aarnink, Michael Peres et Adele Dhuyser,** je vous remercie pour toute votre aide concernant le Multiplexing, qui m'a permis d'appréhender ces manip de manière beaucoup plus sereine.

**Aux membres du laboratoire IMoPA, (Ghislaine, Nadia, Christophe, Karine, Marie-Hélène, Déborah, Laurent),** merci pour votre aide au cours de ces années.

**A ma maman,** merci pour ton soutien inconditionnel à travers les années, d'avoir toujours été présente lorsque j'avais besoin de toi. Merci de toujours m'avoir encouragé dans ce que je faisais, et de toujours avoir cru en moi. Je n'en serais certainement pas arrivé là aujourd'hui sans toi.

**A mon frère Anthony et à la big Poiscaille,** merci pour les samedis midi à m'héberger lorsque je devais aller au labo le matin, ainsi qu'à tes venues soudaines au labo pour une livraison de croissant. Désolé que vous n'ayez pas pu voir les souris, mais Poisson est aussi imposant que mignon.

**A ma sœur Alisson et à Rami et Nala,** merci de nous avoir fait visiter Paris et pour les week ends passés ensemble. Bien que trop rare, revoir la grosse tête de Rami et devoir courir après Nala ont

toujours été une grande source de plaisir. Je compte maintenant sur toi pour corriger mon diapo de soutenance !

**A Jordan et Marine**, merci pour toutes ces après-midis jeu passées ensemble lors des lendemains un peu compliqués. 8 ans que tu me supportes Jordan, je sais que les premiers mois sans moi seront compliqués mais il faut que tu restes fort.

**A Romain et Nathan**, aux deux big nooblards d'IMoPA, merci pour les bons moments passés au labo, ainsi qu'aux autres moments passés en dehors du labo... Une ambiance de travail saine s'est naturellement développée notamment en culture cell, après tout nous faisons tous les 3 parties de l'équipe6...

**A Adrien et Valentine**, les deux anciens qui ont été présents dès le début, merci pour tous les bons moments passés ensemble. Les mots doux d'Adrieng lu par la Sudiste de Valengtine, ainsi que votre œuvre d'art à base de fléchette de nerf resteront dans ma mémoire...

**A Laura et Alizée**, je ne vous remercierai jamais assez pour toute l'aide que vous m'avez apporté avec le suivi quotidien des patients, et pour tout le soutien que vous m'avez apporté au cours des années et toujours dans la bonne humeur ! Les MDSC ont la chance de te découvrir Laura, mais je ne suis pas sûr de devoir te remercier Alizée pour m'avoir fait découvrir Isaac...

**A Patrice**, merci pour toutes ces soirées passées ensemble à chanter pipe et pipe et jambe de bois, chacune d'entre elle étant toujours un pur moment de plaisir et de pêche. J'ai déjà hâte de lire tes prochaines cartes postales.

**A Romain, Thibault et Féfé**, merci pour ces soirées qui ne m'ont probablement pas aidées à avancer dans ma thèse, mais qui m'ont permis de tenir le coup et à repartir de plus belle.

**A Thomas**, merci pour ton aide au cours de ces années, pour ces débats autour du métabolisme des MDSC. J'espère sincèrement que ta fin de thèse se passera bien.

A toutes les personnes que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ma thèse, à **Alexandra**, qui 2 ans après t'avoir montré le tri des LT, débarque dans l'équipe pour changer drastiquement le cours de ma thèse. A Théa, malgré tes goûts footballistiques + que discutables, à **Elodie, Christina, Alexandre, Cindy, Océane, Preeti, Daï, Maude, Marie, Qian**, je vous remercie pour tous les bons moments passés ensemble.

*« La thèse est comme un teckel : un long parcours, mais qui réserve une grande satisfaction à la fin. »*

## TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES TABLEAUX .....	10
LISTE DES ABREVIATIONS .....	11
Introduction.....	14
I. Les syndromes myélodysplasiques.....	14
A. Epidémiologie.....	14
B. Les outils du diagnostic .....	14
1. Examen cytomorphologique .....	14
2. Cytogénétique classique.....	14
3. Séquençage nouvelle génération .....	15
4. Cytométrie en flux.....	15
C. Progression du SMD vers la LAM.....	15
D. Classification et pronostic .....	17
1. Systèmes de classification des SMD .....	17
2. Evaluation du risque d'évolution du SMD.....	19
E. Pathogénèse des SMD.....	20
1. Mutations génétiques et anomalies cytogénétiques .....	20
a. Facteurs d'épissage des ARN messagers (ARNm) .....	21
b. Régulateurs épigénétiques.....	21
c. Cohésine .....	22
d. Caryotype .....	23
2. Le microenvironnement médullaire.....	24
a. Structure et régulation de la niche des cellules souches hématopoïétiques dans le contexte physiologique .....	24
i. Les cellules stromales mésenchymateuses et cellules issues de leur différenciation 25	
ii. Les cellules issues de l'hématopoïèse .....	26
iii. Les autres acteurs.....	27
b. Influence du microenvironnement médullaire modifié dans le SMD .....	29
i. Altération des cellules stromales mésenchymateuses dans les SMD.....	30
ii. Induction d'un microenvironnement médullaire malin afin de soutenir les CSH de SMD31	
c. Modèles murins d'études des SMD.....	34
F. Soins et traitements des SMD .....	36
1. Stratégies thérapeutiques .....	36

2.	L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-HSCT).....	36
a.	Sélection du donneur .....	37
b.	Conditionnement.....	37
c.	Mécanismes de rechute post greffe.....	38
i.	Perte ou inhibition de l'expression des molécules HLA à la surface des cellules leucémiques .....	38
ii.	Induction de l'expression de molécules inhibitrices à la surface des cellules leucémiques .....	39
iii.	Production de cytokines et de molécules anti-inflammatoires et immunosuppressives.....	39
II.	Les cellules myéloïdes suppressives.....	40
A.	Définition des MDSC.....	40
1.	Modèle d'expansion et de différenciation des MDSC.....	41
2.	Voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans la première étape d'expansion des MDSC .....	42
3.	Voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans la seconde étape d'activation des MDSC.....	43
B.	Mécanismes d'action des MDSC .....	44
1.	Stress oxydatif et déplétion des acides aminés essentiels.....	45
2.	Expression de molécules inhibitrices à la surface des MDSC.....	46
3.	Altération de la migration des LT vers la tumeur et les ganglions .....	46
4.	Altération de la fonctionnalité des LT par la production d'adénosine.....	46
5.	Induction et recrutement de LT régulateurs et de B régulateurs .....	47
C.	Les MDSC en hématologie.....	47
1.	Les MDSC dans les SMD non greffés .....	47
2.	MDSC dans le contexte de l'allogreffe de CSH (annexe 1, revue de la littérature).....	48
	Problématique et objectifs de la thèse .....	49
	Matériels et méthodes .....	51
I.	Etude de la reconstitution immunitaire des receveurs en post-greffe .....	51
A.	Etude de la reconstitution lymphocytaire et des MDSC post greffe dans le sang périphérique	51
B.	Analyses des données de cytométrie en flux .....	54
II.	Etude des propriétés fonctionnelles des MDSC et caractérisation lors de la reconstitution immunitaire post greffe .....	55
A.	Tri immunomagnétique des MDSC de moelle osseuse et de sang périphérique .....	55
B.	Contrôle qualité du tri immunomagnétique HLA-DR <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup> .....	56
C.	Etude des propriétés immunosuppressives des MDSC in vitro.....	56
1.	Tri et marquage CFSE des LT .....	56

2. Activation des LT CD3 <sup>+</sup> .....	57
3. Etude des mécanismes d'action des MDSC.....	57
D. Etude des propriétés immunosuppressives des MDSC in vivo .....	58
E. Dosage de la production de ROS intra-cellulaire.....	59
F. Etude de l'inflammasome NLRP3 .....	59
G. Etude du microenvironnement cytokinique .....	60
H. Etude de l'impact des CSM sur les MDSC.....	61
1. Isolation et culture des CSM.....	61
2. Culture des CSM avec des MDSC de patients SMD .....	61
I. Single cell .....	62
Résultats .....	63
I. Etude de la reconstitution immunitaire lymphoïde et myéloïde post greffe .....	63
A. Cohorte d'étude .....	63
B. Analyses de la reconstitution en MDSC post greffe .....	65
C. Analyses de la reconstitution lymphocytaire post greffe.....	67
II. Etude des mécanismes immunorégulateurs des MDSC post greffe .....	70
A. Etude des propriétés immunosuppressives post greffe des MDSC .....	70
1. Evaluation des propriétés des MDSC in vitro .....	70
2. Evaluation des propriétés des MDSC in vivo .....	73
3. Caractérisations de la production de ROS et de l'inflammasome des MDSC .....	75
4. Etude de l'impact des MDSC sur le microenvironnement via la sécrétion de cytokines ..	78
5. Induction des propriétés immunosuppressives des MDSC de patient sans rechute via la simulation du microenvironnement SMD .....	79
B. Corrélation entre MDSC et différenciation lymphocytaire au cours de la reconstitution post greffe .....	81
C. Analyse RNAseq.....	82
Discussion et perspectives .....	83
I. Analyse de la reconstitution immunitaire en lien avec la rechute post-greffe.....	83
II. Rôle et caractérisation des MDSC en post-greffe .....	84
Conclusion .....	90
Bibliographie.....	91
Annexe 1, revue de la littérature : Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Context of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation .....	123
Annexe 2, article soumis : Highly immunosuppressive myeloid cells correlate with early relapse after allogeneic stem cell transplantation .....	134

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution des mutations génétiques du SMD vers la LAM (Menssen et Walter 2020) .....	16
Figure 2: Différentes évolutions clonales possibles lors de l'évolution du SMD vers la LAM (Menssen et Walter 2020).....	17
Figure 3: Classification des SMD par l'OMS en 2022, d'après (Khoury et al. 2022) .....	18
Figure 4: Système de notation de l'IPSS-M (Bernard et al. 2022) .....	20
Figure 5: Classification des gènes mutés dans le syndrome myélodysplasique (Kennedy et Ebert 2017). .....	21
Figure 6: Les régulateurs de l'épigénétique mutés chez les SMD (Ogawa 2019).....	22
Figure 7: Complexe multiprotéique de la cohésine impliquée dans la stabilisation de l'ADN (Ogawa 2019).....	23
Figure 8: Niches des cellules souches hématopoïétiques (Pinho et Frenette 2019) .....	24
Figure 9: Environnement cellulaire et moléculaire influençant les CSH au sein de la moelle osseuse (Pinho et Frenette 2019) .....	28
Figure 10: Rôle du microenvironnement médullaire dans la genèse et l'évolution des SMD (Mian et Bonnet 2021) .....	29
Figure 11: Association entre l'inflammaging et l'évolution des CHIP vers l'émergence d'un SMD (Mian et Bonnet 2021).....	33
Figure 12: Mécanismes impliqués dans la rechute post greffe, d'après (Zeiser et Vago 2019) .....	38
Figure 13: Signaux impliqués dans la génération de MDSC (Bizymi et al. 2019) .....	41
Figure 14: Mécanismes immunosuppresseurs et cibles des MDSC (Yuhui Yang et al. 2020) .....	44
Figure 15: Principaux mécanismes de suppression immunitaire des LT médiés par les MDSC.....	45
Figure 16: Cohorte d'étude .....	63
Figure 17: Stratégies d'analyse en cytométrie en flux des MDSC en méthodes supervisée et non supervisée.....	65
Figure 18: Reconstitution immunitaire dans le sang des sous populations de MDSC en fonction de la survenue de la rechute dans les 6 mois post-greffe .....	66
Figure 19: Stratégies d'analyse en cytométrie en flux des sous populations lymphocytaires en méthodes supervisée et non supervisée.....	68
Figure 20: Reconstitution immunitaire des sous populations de LT dans le sang périphérique dans les 6 premiers mois après une allogreffe de CSH .....	69
Figure 21: Activation des lymphocytes par des microbilles CD3/CD28 .....	70
Figure 22: Observations au microscope de l'activation des LT en présence de microbilles CD3/CD28	70
Figure 23: Etude in vitro des propriétés des MDSC issues de patients sans rechute précoce (bleu) versus en rechute précoce (rouge).....	71
Figure 24: Exemple d'analyse par cytométrie en flux des capacités immunosuppressives des MDSC	72
Figure 25: Analyses de l'apoptose des LT après coculture.....	73
Figure 26: Propriétés in vivo des MDSC issues des patients allogreffés. ....	73

Figure 27: Coupes histologiques d'organes de souris NSG ciblés par la GVH .....	74
Figure 28: Evaluation de la production de ROS intracellulaire des MDSC issues du sang périphérique et de la moelle osseuse de patients en rechute vs sans rechute (dans les trois premiers mois post-greffe) .....	75
Figure 29: Evaluation de l'inflammasome dans les MDSC issues du sang périphérique et de la moelle osseuse de patients en rechute vs sans rechute .....	76
Figure 30: Evaluation de l'état de l'inflammasome des MDSC via l'utilisation de l'Ac anti ASC.....	77
Figure 31: Evaluation du taux en cytokines dans les surnageants de coculture et dans les microenvironnements des MDSC.....	78
Figure 32: Evaluation des propriétés immunosuppressives de MDSC de patient sans rechute après modulation de l'inflammasome NLRP3 .....	79
Figure 33: Evaluation des propriétés immunosuppressives de MDSC de patients sans rechute après traitement par les alarmines SA100A8/S100A9 .....	80
Figure 34: Evaluation des propriétés immunosuppressives de MDSC de patient sans rechute après incubation avec des CSM de patient SMD, ou des CSM témoin .....	80
Figure 35: Corrélation entre l'abondance de MDSC et les sous populations lymphocytaires exprimant des marqueurs d'épuisement à J30 dans le groupe rechute (n=6 à gauche) et le groupe sans rechute (n=14 à droite).....	81



## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1: Panel d'anticorps LT.....</i>	<i>51</i>
<i>Tableau 2: Panel d'anticorps LT épuisés.....</i>	<i>52</i>
<i>Tableau 3: Panel d'anticorps MDSC.....</i>	<i>52</i>
<i>Tableau 4: Panel d'Ac du panel Evade.....</i>	<i>53</i>
<i>Tableau 5: Critères d'évaluations du score clinique de GvH.....</i>	<i>58</i>
<i>Tableau 6: Panels cytokiniques étudiés dans les surnageants de coculture MDSC / LT activés, ou dans le sang périphérique et la moelle osseuse des patients. ....</i>	<i>60</i>
<i>Tableau 7: Caractéristiques des patients. ....</i>	<i>63</i>

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>Ag</b>	Antigène
<b>Allo-HSCT</b>	Allogreffe de cellule souche hématopoïétique
<b>Arg-1</b>	Arginase 1
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messager
<b>ASXL1</b>	<i>Additional Sex Combs Like 1</i>
<b>CAFC</b>	<i>Cobblestone area-forming cells</i>
<b>CAR</b>	<i>CXCL12-Abundant reticular cells</i>
<b>CFSE</b>	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
<b>ChIP</b>	<i>Clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i>
<b>CMF</b>	Cytométrie en flux
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CMP</b>	Progéniteur commun myéloïde
<b>CSF1R</b>	<i>Colony-Stimulating Factor 1 Receptor</i>
<b>CSH</b>	Cellule souche hématopoïétique
<b>CSM</b>	Cellule souche mésenchymateuse
<b>CTLA-4</b>	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>
<b>DAMP</b>	<i>Danger associated molecular pattern</i>
<b>DARC</b>	<i>Duffy antigen receptor for chemokines</i>
<b>DNMT3A</b>	<i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>
<b>EZH2</b>	<i>Enhancer Of Zeste 2</i>
<b>FAB</b>	<i>French-American-British group</i>
<b>FGF-β</b>	<i>Fibroblast growth factor</i>
<b>FISH</b>	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
<b>FLT3</b>	<i>Fms like tyrosine kinase</i>
<b>G-CSF</b>	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
<b>GVH</b>	<i>Graft vs host</i>
<b>GVL</b>	<i>Graft vs leukemia</i>



<b>HGF</b>	<i>Hepatocyte growth factor</i>
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigens</i>
<b>HMGB1</b>	<i>High mobility group box protein 1</i>
<b>HSP70</b>	<i>Heat Shock Protein 70</i>
<b>IDH1/2</b>	<i>Isocitrate dehydrogenases</i>
<b>IDO1</b>	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase-1</i>
<b>IL1RAP</b>	<i>IL1 receptor accessory protein</i>
<b>iNOS</b>	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
<b>IPSS</b>	<i>International Prognostic Scoring System</i>
<b>IPSS-M</b>	<i>Molecular-IPSS</i>
<b>IPSS-R</b>	<i>Revised-IPSS</i>
<b>ISCT</b>	<i>International Society for Cell &amp; Gene Therapy</i>
<b>LAM</b>	<i>Leucémie aiguë myéloïde</i>
<b>LMMC</b>	<i>Leucémie myélo-monocytaire chronique</i>
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharide</i>
<b>LT</b>	<i>Lymphocyte T</i>
<b>M-CSF</b>	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>MDSC</b>	<i>Myeloid derived suppressor cells</i>
<b>MDS-LB-MLD</b>	<i>MDS low blast multiple lineage dysplasia</i>
<b>MDS-LB-SLD</b>	<i>MDS low blast single lineage dysplasia</i>
<b>MGG</b>	<i>May Grunwald Giemsa</i>
<b>NFκB</b>	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
<b>NMA</b>	<i>Non myeloablative conditioning</i>
<b>NOX-2</b>	<i>NADPH oxidase 2</i>
<b>NSG</b>	<i>NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ</i>
<b>OMS</b>	<i>Organisation mondiale de la santé</i>
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-Buffered saline</i>
<b>PDX</b>	<i>Patient Derived Xenograft</i>



PGE2	Prostaglandine E2
PNT	Peroxynitrite
PRC2	<i>Polycomb répressif complexe 2</i>
RIC	<i>Reduced intensity conditioning</i>
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rPTH	<i>recombinant Parathyroid Hormone</i>
RTC	<i>Reduced toxicity conditioning</i>
SASP	<i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SMC1A	<i>Structural maintenance of chromosomes 1A</i>
SMD	Syndrome myélodysplasique
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
SNS	Système nerveux sympathique
STAG1/2	<i>Stromal Antigen</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
TAM	<i>Tumor Associated Macrophages</i>
T <sub>CM</sub>	LT centraux mémoires
T <sub>EM</sub>	LT effecteurs mémoires
T <sub>EMRA</sub>	LT effecteurs mémoires terminaux
TET2	<i>Ten eleven translocation 2</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
T <sub>N</sub>	LT naïf
TNFR2	<i>Tumor necrosis factor receptor 2</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
Treg	Lymphocyte T régulateur
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
β-AR	Récepteur adrénergique β

## Introduction

### I. Les syndromes myélodysplasiques

#### A. Epidémiologie

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) constituent un groupe hétérogène d'hémopathies clonales acquises de la cellule souche hématopoïétique (CSH) dans lequel la CSH acquiert des mécanismes de prolifération et d'apoptose dérégulés avec des défauts de maturation. Les SMD sont classiquement caractérisés par une hématopoïèse inefficace révélée par des cytopénies sanguines (Adès, Itzykson, et Fenaux 2014) contrastant avec une moelle osseuse très riche. L'évolution se fait dans 30% des cas vers une leucémie aiguë myéloïde (LAM) (Corey et al. 2007) (Raza et Galili 2012). Actuellement, environ 10% des LAM diagnostiquées sont secondaires à un SMD (Sperling, Gibson, et Ebert 2017). Dans les pays occidentaux, l'incidence des SMD est estimée de 40 à 50 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants à partir de 60 ans (Neukirchen et al. 2011) (Ma 2012). Un algorithme développé par le NCI (US National Cancer Institute) atteste que l'incidence des SMD est au-delà de 70 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants après 70 ans (Cogle et al. 2011). Si l'incidence augmente avec l'âge (86% des patients atteints de SMD ont plus de 60 ans au moment du diagnostic), on note une incidence discrètement supérieure chez les hommes et les personnes de race blanche (Zeidan et al. 2019).

#### B. Les outils du diagnostic

##### 1. Examen cytomorphologique

Le diagnostic d'un SMD repose sur l'observation et la caractérisation des cellules issues d'aspiration médullaire (myélogramme) par un microscope optique (examen cytomorphologique après coloration spécifique de May Grunwald Giemsa ou MGG), ou plus rarement sur une biopsie ostéo-médullaire (examen histopathologique). La biopsie ostéo-médullaire peut être réalisée dans le cas où l'aspiration pour le myélogramme serait pauvre voire infructueuse (de Swart et al. 2017) (Orazi 2007). La coloration de Perls est une coloration cytochimique permettant l'identification de fer sur le frottis médullaire par le bleu de Prusse. Les sidéroblastes sont des érythroblastes contenant des granulations colorées par le bleu de Prusse disposées en anneau autour du noyau, caractéristiques d'une entité de SMD (Malcovati et Cazzola 2013).

##### 2. Cytogénétique classique

Les analyses cytogénétiques sur cellules hématopoïétiques aspirées par la ponction médullaire mettent en évidence, dans 50% des cas, l'ajout ou la délétion d'une partie ou de la totalité d'un chromosome et très rarement la translocation entre deux chromosomes. Il n'est pas rare d'observer des caryotypes dits complexes lorsqu'au moins trois anomalies cytogénétiques sont présentes. Ces

anomalies cytogénétiques (ou caryotypiques) sont essentielles pour confirmer le diagnostic (on parle alors d'anomalies cytogénétiques récurrentes des SMD), mais aussi pour évaluer le pronostic et orienter la thérapeutique. Ces aberrations chromosomiques sont observables par le marquage standard des chromosomes pour réaliser un caryotype (Tiu et al. 2011), ou plus finement par l'analyse par FISH (fluorescent in situ hybridization) qui permet d'investiguer des altérations chromosomiques cryptiques.

### 3. Séquençage nouvelle génération

La technologie de séquençage haut débit permet aujourd'hui de détecter plusieurs aberrations génomiques selon un panel de gènes mutés de façon récurrente au sein des SMD. Parmi les gènes cibles, les gènes de la régulation épigénétique (méthylation de l'ADN, histone), de certains facteurs de transcription ou encore du spliceosome sont les plus fréquemment mutés. L'identification et l'analyse de ces mutations seront plus détaillées dans la suite du manuscrit. La sensibilité de cette technique est de détecter les mutations présentes dans seulement 1% des cellules (Link et al. 2011).

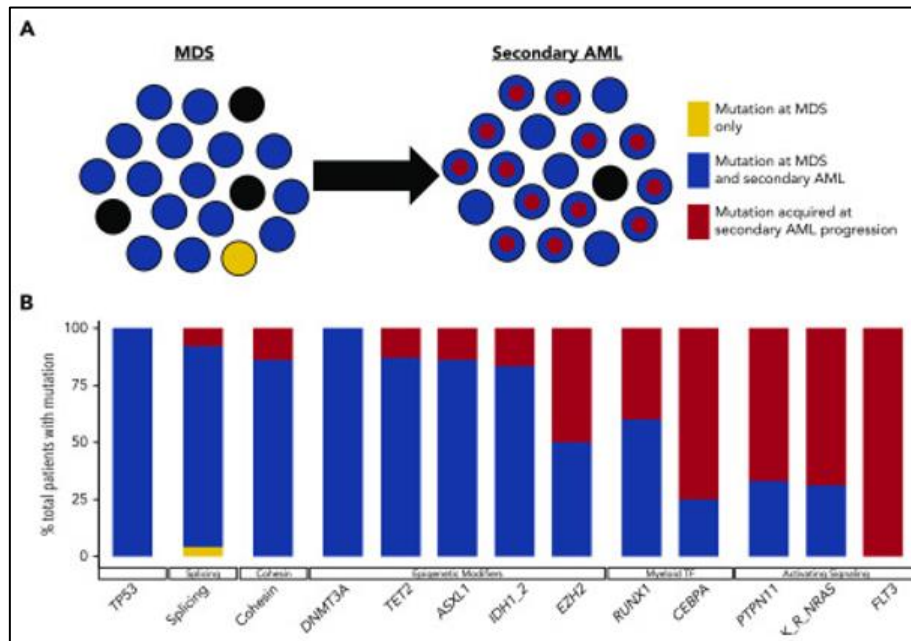
### 4. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux multiparamétrique (CMF) destinée à analyser le phénotype des cellules, n'est à ce jour pas recommandée de façon systématique. Plusieurs scores ont été élaborés en fonction de l'expression aberrante de certains marqueurs sur les cellules immatures hématopoïétiques (Della Porta et al. 2012) (Alhan et al. 2016). La CMF pourrait devenir un outil diagnostique dans l'identification de MDS dans les années à venir. Elle permet l'identification de plusieurs populations cellulaires anormales dont les cellules myéloïdes immatures et les progéniteurs monocytiques via des expressions aberrantes de CD45, CD34, CD117, HLA-DR, CD33, CD11b et CD15. L'identification de l'altération du compartiment érythroïde est également possible via l'évaluation de la diminution des expressions de CD36 et CD71 (Westers et al. 2012). La CMF permet également d'identifier une entité frontière SMD/syndrôme myéloprolifératif appelée la leucémie myélo-monocytaire chronique (LMMC). L'étude des monocytes sanguins (sur le profil d'expression membranaire de CD14 et CD16) permet d'identifier trois sous-types de monocytes : les monocytes classiques (CD14+/CD16-), les monocytes intermédiaires (CD14+/CD16+) et les monocytes non classiques (CD14faible/CD16+). Dans la LMMC, la proportion de monocytes classiques est supérieure ou égale à 94% (Selimoglu-Buet D et al. Blood 2015).

### C. Progression du SMD vers la LAM

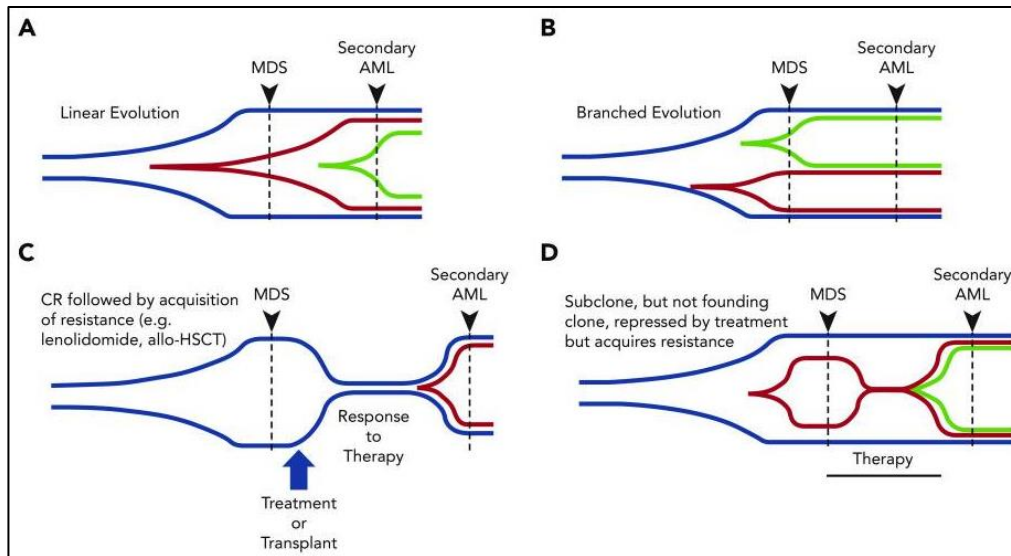
Environ 30% des patients atteints de SMD vont évoluer vers une LAM appelée « LAM secondaire au SMD ». Ces LAM secondaires sont souvent considérées avec un pronostic plus sombre que les LAM de

novo (Granfeldt Østgård et al. 2015). Ce pronostic plus sombre est en lien avec l'acquisition d'anomalies génétiques de plus mauvais pronostic. Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons principalement aux LAM secondaires qui seront plus communément nommées « LAM ».



**Figure 1 : Evolution des mutations génétiques du SMD vers la LAM (Menssen et Walter 2020).** A) Représentation de l'accumulation des mutations génétiques du SMD vers la LAM. Les cellules noires sont les cellules sans mutation. Les cellules jaunes acquièrent une mutation dans le SMD. Les cellules bleues acquièrent une mutation lors du SMD et vont devenir le clone principal qui sera observé après l'évolution en LAM. Les cellules bleues et rouges sont des clones qui auront acquis une autre mutation afin de former un sous clone en abondance, et de progresser vers la LAM. B) Pourcentage des patients avec une mutation uniquement présente dans le SMD (Jaune), avec une mutation présente dans le SMD et persistante dans la LAM (Bleu), avec une mutation uniquement présente dans la LAM (Rouge).

De manière générale, les mutations observées au sein de gènes impliqués dans les modifications épigénétiques tel que *TET2* ou dans la régulation du cycle cellulaire tel que *TP53* sont principalement observés dans les SMD (Sperling, Gibson, et Ebert 2017). L'acquisition de mutations dans les gènes de facteur de transcription tels quel *RUNX1*, *CEBPA* ou les gènes d'activation de la signalisation comme *FLT3* (fms like tyrosine kinase) sont principalement observés au stade de LAM, laissant envisager que l'acquisition de mutations additionnelles permettent l'évolution du SMD vers la LAM (Papaemmanuil et al. 2013) (Lindsley et al. 2015). Comme présenté dans la **Figure 2**, l'acquisition de mutations supplémentaires à l'origine de l'émergence de sous clones lors de l'évolution en LAM, peut émerger sous thérapie.



**Figure 2: Différentes évolutions clonales possibles lors de l'évolution du SMD vers la LAM (Menssen et Walter 2020).** Le clone bleu correspond au clone dominant lors du SMD, alors que les sous clones rouge et vert correspondent aux sous clones qui émergent lors de l'évolution vers la LAM. A) Les sous clones se développent de façon séquentielle. B) Les sous clones se développant de façon concomitante. C) Emergence d'un sous clone fondateur d'une LAM secondaire suite à l'acquisition de mutations supplémentaires après un traitement donné à visée réductrice du clone SMD (lenalidomide...). D) Emergence d'un nouveau sous clone suite à l'acquisition de mutations supplémentaires consécutives à l'acquisition de résistance à un traitement donné.

## D. Classification et pronostic

### 1. Systèmes de classification des SMD

Le groupe FAB (French-American-British group) a proposé la première classification des SMD, reposant sur des critères clinico-biologiques: l'anémie réfractaire, la proportion de blastes dans le sang et la moelle osseuse, la présence ou non de sidéroblastes en couronne dans la moelle (Bennett et al. 1982). L'organisation mondiale de la santé (OMS) a par la suite réorganisé les critères une première fois en 2001 (Vardiman, Harris, et Brunning 2002), puis en 2008 (Vardiman et al. 2009), 2016 (Arber et al. 2016), et très récemment en 2022 (Khoury et al. 2022). Les SMD constituant un groupe extrêmement hétérogène, l'actualisation régulière de sa classification fait toujours suite aux avancées dans la compréhension de la maladie. Ces actualisations sont indispensables pour identifier différentes entités clinico-biologiques regroupées selon leur physiopathologie, leur pronostic et la sanction thérapeutique qui en découle.

Nom	% de blastes dans la moelle osseuse (BM) et dans le sang périphérique (PB)	Cytogénétique	Mutations
<b>World Health Organization Classification de 2022</b>			
<b>MDS with defining genetic abnormalities</b>			
MDS with low blasts and isolated 5q deletion (MDS-5q)	<5% BM and <2% PB	5q deletion alone, or with 1 other abnormality other than monosomy 7 or 7q deletion	
MDS with low blasts and SF3B1 mutation <sup>a</sup> (MDS-SF3B1)		Absence of 5q deletion, monosomy 7, or complex karyotype	SF3B1
MDS with biallelic TP53 inactivation (MDS-biTP53)	<20% BM and PB	Usually complex	Two or more TP53 mutations, or 1 mutation with evidence of TP53 copy number loss or cnLOH
<b>MDS, morphologically defined</b>			
MDS with low blasts (MDS-LB)	<5% BM and <2% PB		
MDS, hypoplastic <sup>b</sup> (MDS-h)			
MDS with increased blasts (MDS-IB)			
MDS-IB1	5–9% BM or 2–4% PB		
MDS-IB2	10–19% BM or 5–19% PB or Auer rods		
MDS with fibrosis (MDS-f)	5–19% BM; 2–19% PB		

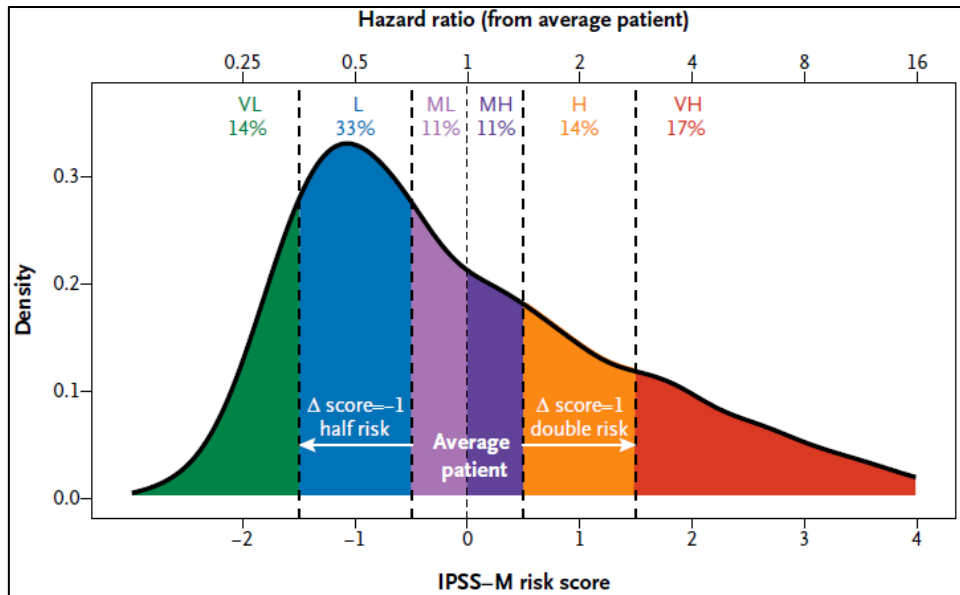
**Figure 3: Classification des SMD par l'OMS en 2022, d'après (Khoury et al. 2022).** Identification d'entités clairement définies sur la génétique : anomalie cytogénétique avec perte du bras long du chromosome 5 (5q-), détection de la mutation SF3B1 qui supplante l'observation d'au moins 15% de sidéoblastes en couronne (a) sur le frottis médullaire (entité SMD SF3B1) et la mutation bi-allélique de TP53. Identification d'entités encore morphologiquement définies avec l'importance du pourcentage de blastes <20% (b) et l'introduction de la biopsie médullaire pour déterminer dans certains cas la présence de fibrose médullaire.

Contrairement à la classification OMS 2016 dans laquelle l'observation de la cytomorphologie sanguine et médullaire (autrement dit le nombre de cytopénies observées à l'hémogramme et de lignées dysplasiques observées au myélogramme) jouaient un rôle majeur, la classification de 2022 concède une part importante aux variables génétiques. Cette modification est le corollaire d'études menées sur des entités distinctes en 2016 comme le MDS-LB-SLD (MDS low blast single lineage dysplasia) et les MDS-LB-MLD (MDS low blast multiple lineage dysplasia) concluant à des médianes de survie identiques (Y. Zhang et al. 2022), suggérant que la classification de 2016 n'était pas assez discriminante. Aujourd'hui, les SMD sont définis cytogénétiquement avec les délétions isolées 5q (MDS-5q), génétiquement avec les mutations SF3B1 (MDS-SF3B1) et l'inactivation bi-allélique TP53 (MDS bi allélique TP53) distinguant des entités délimitées par une physiopathologie et un pronostic plus homogène. On note que la classification OMS 2022 considère toujours l'importance du pourcentage de blastes médullaires. A noter qu'au-delà de 10% de blastes médullaires, certaines anomalies caryotypiques ou génétiques récurrentes des LAM font discuter un reclassement des SMD en LAM

confirmant le poids important de la génétique dans la compréhension de ces hémopathies myéloïdes (Estey, Hasserjian, et Döhner 2022). Témoin de l'avancée de la compréhension des SMD, l'OMS retire les « SMD inclassables ». Par ailleurs, les sous types de SMD hypoplasiques ou excès de blastes avec fibrose ont été intégrés, témoignant de l'importance de la biopsie médullaire dans certains cas.

## *2. Evaluation du risque d'évolution du SMD*

Face à la grande hétérogénéité du syndrome myélodysplasique, de nombreuses équipes ont travaillé sur les paramètres à prendre en compte au diagnostic pour appréhender le pronostic d'un patient nouvellement diagnostiqué et lui proposer une offre de soins adaptée. En 1987, l'International Prognostic Scoring System (IPSS) basé sur une cohorte de 816 patients, a été le premier score d'intérêt clinique. L'évaluation du pourcentage de blastes médullaires, la cytogénétique, ainsi que le nombre de cytopénies étaient les éléments déterminants du calcul de l'IPSS. Par la suite, l'IPSS-R (Revised-IPSS) a été proposé en 2012 avec une discrimination plus fine (en 5 groupes versus 3) du pronostic cytogénétique. Le score IPSS-R issu de l'analyse de bases de données internationales rassemblant 7012 patients, accorde alors plus de poids à la cytogénétique (Greenberg et al. 2012). Néanmoins, l'analyse de mutations somatiques récurrentes de certains SMD révélées dans plusieurs études comme un important biomarqueur du SMD (Haferlach et al. 2014) (Papaemmanuil et al. 2013) n'était pas intégrée dans ces scores. Nous citerons la découverte de la mutation de *SF3B1* avec une excellente valeur prédictive positive (>90%) d'un SMD avec sidéroblastes en couronne et un faible risque d'évolutivité vers un SMD de plus haut risque ou une LAM secondaire. C'est tout récemment que l'étude sur une cohorte de 2957 patients provenant de 24 centres a permis l'émergence du score IPSS-M (Molecular-IPSS), qui s'appuie toujours sur les cytopénies, le pourcentage de blastes médullaires et la cytogénétique, mais intègre également les données génétiques de mutations somatiques récurrentes des hémopathies myéloïdes (Bernard et al. 2022). L'IPSS-M est un modèle de calcul complexe prenant en compte l'ensemble de ces informations et qui discrimine 6 sous-groupes et reclasse jusqu'à 50% des patients (classés selon les anciens scores).



**Figure 4: Système de notation de l'IPSS-M (Bernard et al. 2022).** Diagramme de densité représentant le score IPSS-M de 2701 patients. VL: Very Low. L: Low. ML: Moderate Low. H: High. VH: Very High.

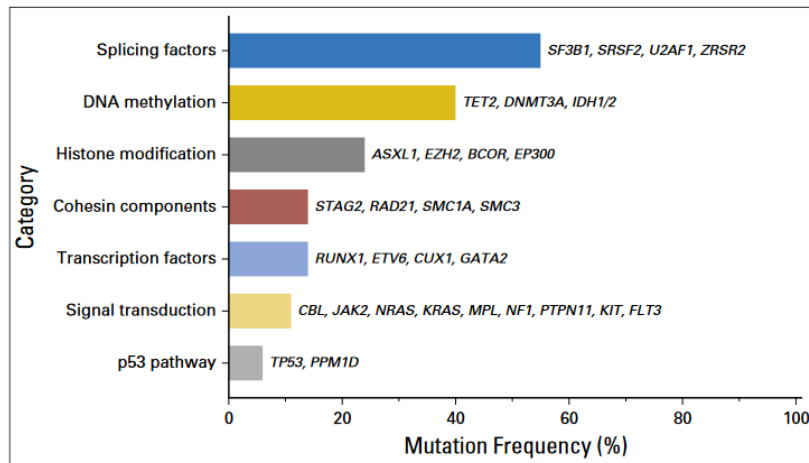
L'IPSS-M a été validé sur plusieurs cohortes (Sauta et al. 2023) (Aguirre et al. 2023). Afin de simplifier son calcul en clinique, une application est disponible en accès libre sur un site internet (<https://mds-risk-model.com/>).

#### E. Pathogénèse des SMD

L'implication de modifications génétiques clonales et épigénétique est largement décrite dans la pathogénèse des SMD (Hosono 2019). Nous exposerons également les données montrant le rôle majeur du microenvironnement médullaire pro-inflammatoire dans l'émergence des SMD.

##### 1. Mutations génétiques et anomalies cytogénétiques

Au cours des dernières années, une compréhension approfondie du profil mutationnel somatique associé au SMD a pu être établie. Ces avancées ont été possibles grâce à l'expansion de technologies de pointe telles que le séquençage à haut débit. Plusieurs études ont rapporté, chez plus de 80% des patients atteints de SMD, l'occurrence d'au moins une mutation somatique impliquant un gène de la régulation épigénétique, de la transduction du signal ou codant pour certains facteurs de transcription (Haferlach et al. 2014) (Papaemmanuil et al. 2013).



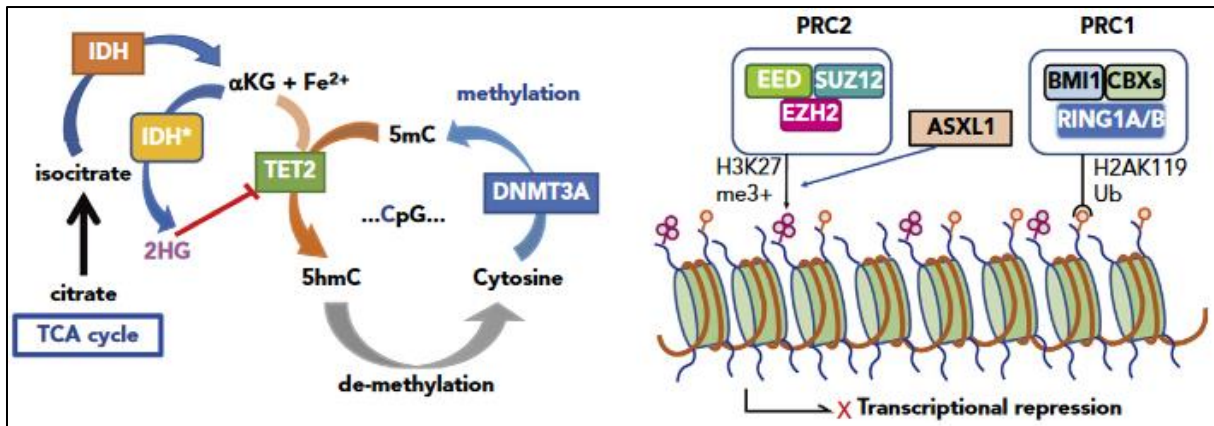
**Figure 5: Classification des gènes mutés dans le syndrome myélodysplasique (Kennedy et Ebert 2017).** Les gènes mutés peuvent être classés dans 7 grandes catégories : le spliceosome, la méthylation de l'ADN, la modification des histones, les cohésines, les facteurs de transcription, la transduction du signal et le cycle cellulaire avec la protéine p53.

#### a. Facteurs d'épissage des ARN messagers (ARNm)

Lors de la synthèse des ARNm par le mécanisme de transcription de l'ADN, l'épissage constitue l'étape d'excision des introns. En effet, les introns sont des séquences non codantes qui ne sont pas retrouvées au sein des ARNm matures. L'épissage est effectué par un complexe nucléoprotéique appelé spliceosome. Le spliceosome est un complexe de plusieurs sous-unités constituées de ribonucléoprotéines (snRNP). Ces RNP contiennent notamment des snRNA (small nuclear RNA) ayant pour rôle de reconnaître les séquences à épisser. U1 et U2 sont 2 snRNP majeures du processus d'épissage. Les facteurs d'épissage les plus fréquemment mutés dans les SMD composent ou interagissent avec U2. On peut notamment citer SF3B1, SRSF2, U2AF1 et ZRSR2 (Ogawa 2019), ou encore, dans une moindre mesure, U2AF2, SF1 et SF3A1 (Wahl, Will, et Lührmann 2009).

#### b. Régulateurs épigénétiques

La méthylation de l'ADN et les modifications des histones (méthylation, acétylation, phosphorylation) sont des mécanismes épigénétiques qui permettent de réguler l'expression des gènes. Elles influencent l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription, et donc l'activation ou la répression de sa transcription (Moore, Le, et Fan 2013).



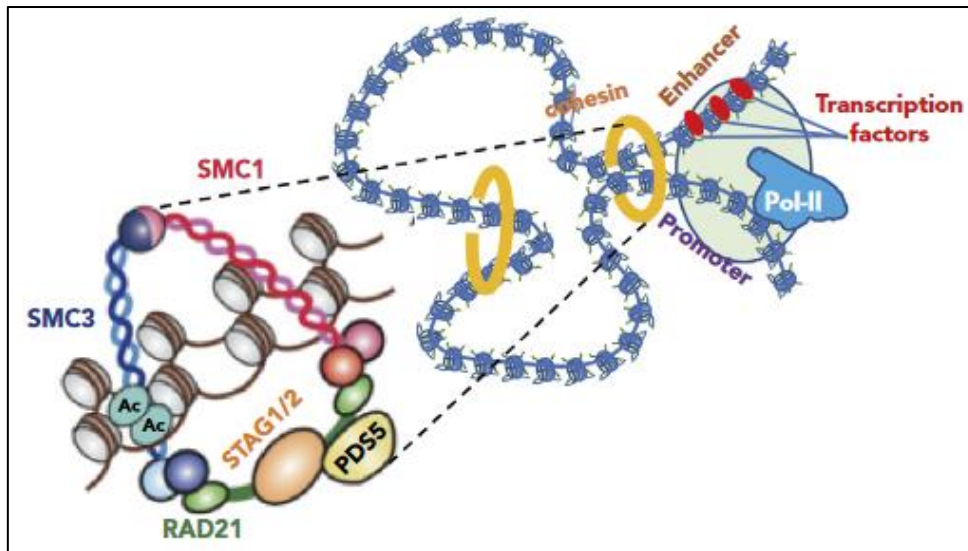
*Figure 6: Les régulateurs de l'épigénétique mutés chez les SMD (Ogawa 2019). Représentation, à gauche, des principaux acteurs du processus de méthylation et de déméthylation des îlots CpG. Représentation, à droite, des mécanismes de modification des histones.*

La méthylation de l'ADN est un processus qui consiste à ajouter un groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>) sur les bases de l'ADN, principalement sur les cytosines des îlots CpG. Les îlots CpG constituent des régions régulatrices de la transcription des gènes et donc des promoteurs. TET2 (Ten eleven translocation 2), DNMT3A (DNA methyltransferase 3 alpha) et IDH1/2 (Isocitrate dehydrogenases) sont 3 enzymes indispensables à la méthylation de l'ADN. Elles sont toutes les trois fréquemment mutées dans les SMD.

EZH2 (Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit) et ASXL1 (Additional Sex Combs Like 1) sont deux protéines jouant un rôle majeur dans la régulation de l'expression génique et sont fréquemment mutées dans certains types de leucémies aigues myéloïdes (Raza et Galili 2012). EZH2 est une sous unité de PRC2 (Polycomb répressif complexe 2), qui est un complexe responsable de la méthylation des histones (Khan et al. 2013). ASXL1 est une sous-unité non catalytique de PRC2 indispensable à la stabilité et à l'activité du complexe (Medina, Delma, et Yang 2022).

### c. Cohésine

La cohésine est un complexe multiprotéique qui prend la forme d'un anneau fermé. Il est constitué de SMC1A (Structural maintenance of chromosomes 1A), SMC3, RAD21, STAG1 (Stromal Antigen 1) et STAG2 (Stromal Antigen 2). Ces dernières sont recrutées au niveau de la chromatine pour réguler l'expression des gènes. La cohésine s'associe aux chromosomes en « piégeant » l'ADN à l'intérieur de son anneau et assure ainsi la cohésion des chromatides sœurs. L'ouverture de l'anneau déclenche le début de l'anaphase (Gruber et al. 2006).



**Figure 7: Complexe multiprotéique de la cohésine impliquée dans la stabilisation de l'ADN (Ogawa 2019).** L'anneau de la cohésine constituée de SMC1A, SMC3 ainsi que de STAG1/3 permet d'assurer la cohésion des chromatides sœurs, et ainsi la bonne régulation de l'expression des gènes.

Plusieurs études ont démontré l'occurrence récurrente des mutations dans plusieurs composants du complexe de la cohésine au sein des SMD (Thota et al. 2014). Ces mutations peuvent favoriser une transcription aberrante en favorisant l'accès de nombreux facteurs de transcription dans des régions promotrices (Kon et al. 2013) (Ogawa 2019).

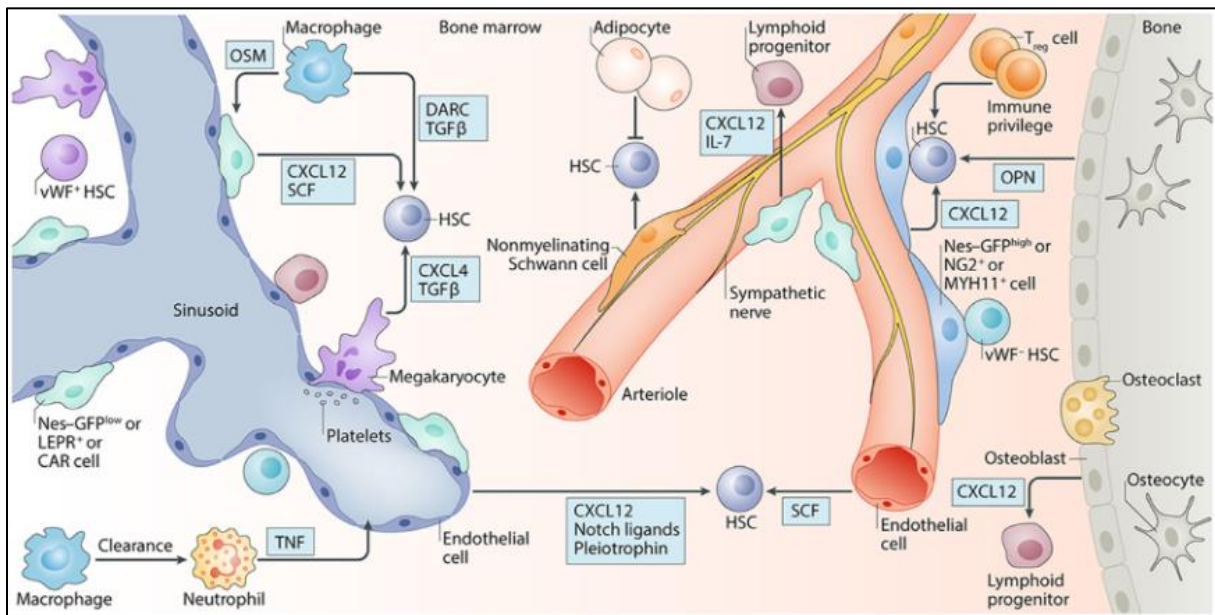
#### d. Caryotype

Les anomalies cytogénétiques (ou caryotypiques) jouent un rôle pronostic crucial (Haase 2008) (Haase et al. 2007). Une des premières anomalies chromosomiques récurrentes décrite dans les SMD est la délétion interstitielle du bras long du chromosome 5 (del 5q). Lorsqu'elle est isolée, cette anomalie définit le syndrome « 5q- » Elle se caractérise par une délétion de taille variable, incluant au minimum la région 5q31q32, riche en gènes exprimés dans les cellules souches et précurseurs myéloïdes. La délétion de cette région est considérée comme nécessaire et suffisante pour l'apparition de la pathologie. La perte de fonction partielle de la protéine RPS14 (membre du complexe protéique de la sous-unité ribosomale 40S) entraîne un défaut dans la transformation des ARN pré-ribosomiaux, à l'origine d'une anémie en lien avec une hypoplasie de la lignée érythroïde. Les patients atteints de syndrome 5q- présentent une bonne réponse thérapeutique au lenalidomide dont l'activité touche directement le clone mutant. L'acquisition d'une mutation de TP53 (tumor protein 53) (Hosono et al. 2016) est corrélée à une moins bonne réponse au traitement par lenalidomide et à un risque accru d'évolution vers un SMD de haut risque ou une leucémie aiguë secondaire (Ebert et al. 2008).

2. Le microenvironnement médullaire

L'évolution de l'hématopoïèse clonale vers un SMD dépend de son microenvironnement médullaire. Dans un premier temps une mutation initiale telles que TET2, DNMT3A, ou ASXL1, survient dans la CSH. Or, si on considère qu'il y a entre  $10^5$  et  $10^6$  CSH chez l'homme et qu'une CSH se divise en moyenne une fois par an (certaines ne se divisent jamais, mais le taux de division peut augmenter dépendamment des besoins de l'organisme), l'émergence d'une mutation dans une séquence codante du génome est extrêmement rare. Certains modèles mathématiques concluent même que l'émergence d'un SMD devrait prendre plusieurs centaines d'années (Lee-Six et al. 2018). Par conséquent, la plupart des clones responsables d'une hématopoïèse clonale observés dès l'âge de 60 ans, ont dû être sélectionnés positivement (Watson et al. 2020), suggérant le rôle du microenvironnement médullaire dans la facilitation de l'émergence de certains clones. Nous allons décrire le microenvironnement médullaire à l'état physiologique pour aborder ensuite le microenvironnement médullaire pro-inflammatoire dans les SMD.

a. Structure et régulation de la niche des cellules souches hématopoïétiques dans le contexte physiologique



**Figure 8: Niches des cellules souches hématopoïétiques (Pinho et Frenette 2019).** Représentation schématique des différents compartiments de CSH au sein de la moelle osseuse et influence de chaque acteur de l'environnement sur les CSH. A gauche, on observe la niche vasculaire proche du sinusoiède avec le rôle prédominant des macrophages, mégacaryocytes, cellules périsvasculaires. A droite, on observe la niche endostéale avec le rôle prédominant de l'ostéoblaste.

La niche hématopoïétique est un site micro-anatomique nécessaire à la CSH pour maintenir sa quiescence, sa multipotence et l'entrée en différenciation grâce à des interactions complexes (molécules de surface, molécules sécrétées et métabolites) avec les cellules environnantes. Historiquement, une niche endostéale fut décrite pour la première fois en 2003. Un modèle murin

transgénique dans lequel le récepteur de l'hormone parathyroïdienne (rPTH) est constitutivement actif dans les ostéoblastes présentait une augmentation du nombre de trabécules osseuses s'accompagnant d'une augmentation du nombre de CSH (Calvi et al. 2003). La stimulation par l'hormone parathyroïdienne induisait une augmentation du nombre d'ostéoblastes ayant pour conséquence d'augmenter le pool de CSH laissant conclure (à tort) que la niche endostéale était la niche privilégiée du support à l'hématopoïèse. Plus tard, par des approches immunohistochimiques, il a été observé que les CSH co-localisaient aussi avec les vaisseaux de la moelle osseuse suggérant l'existence d'une niche périvasculaire. Notamment, la chimiokine CXCL12 exprimée près des vaisseaux était essentielle à l'hématopoïèse (2006). Au fil des différents travaux, les CSH ont été décrites alternativement en dormance dans la niche endostéale à proximité de la surface osseuse, ou en prolifération et différenciation dans la niche centrale constituée de vaisseaux sinusoides (meilleur apport en oxygène et en nutriments) (Nombela-Arrieta et al. 2013) (Ding et Morrison 2013). L'observation microscopique d'un fémur entier de souris et l'analyse du transcriptome sur cellule unique au sein de la niche ont permis de nuancer progressivement ce modèle dual de niche. En effet, au sein du stroma, on observe une certaine hétérogénéité des cellules. Par exemple, les CSH observées dans la niche vasculaire vont pouvoir se différencier en cellules pro-B près des cellules péri-sinusoidales, qui sécrètent les facteurs essentiels aux cellules pro-B. L'hématopoïèse est donc un processus de différenciation continue où la CSH peut interagir en même temps et différenciellement avec son microenvironnement selon son programme et sa polarisation (Aurrand-Lions et Mancini 2018). Ainsi, la CSH peut être en état de quiescence, et néanmoins être rapidement modulée vers des capacités de prolifération dans le but de répondre à un stress, tout en gardant une capacité d'adaptation et revenir dans un état de dormance une fois le stress résolu (Schuettpelz et Link 2013). Nous allons voir que le CSH et les progéniteurs hématopoïétiques peuvent être moduler au sein de ces niches par des cellules stromales mésenchymateuses (plusieurs sous-types) mais aussi des cellules hématopoïétiques.

i. Les cellules stromales mésenchymateuses et cellules issues de leur différenciation

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont décrites selon l'ISCT (International Society for Cell & Gene Therapy) comme des cellules adhérentes au plastique, qui expriment les marqueurs CD105, CD90 et CD73, et à l'inverse n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques tels que CD45 (leucocyte), CD34 (cellule primitive de l'hématopoïèse), CD14 et CD11b (monocyte), CD79a et CD19 (Lymphocyte B), ainsi que le marqueur HLA de classe II (HLA-DR). En plus de ce phénotype précis, les CSM doivent avoir la capacité de se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes (Frenette et al. 2013). Elles sont observées dans des tissus adultes (moelle osseuse, tissu adipeux, pulpe dentaire...) et tissus fœtaux et périnataux. Il existe au sein de la moelle osseuse plusieurs sous

populations de cellules stromales mésenchymateuses, incluant des cellules stromales périvasculaires, qui sont extrêmement proches des cellules souches mésenchymateuses. Concernant les CSM de la moelle osseuse, au-delà de cette définition essentiellement basée sur des observations *in vitro*, leur rôle de soutien à l'hématopoïèse a été mis en évidence. L'équipe de Sacchetti (Sacchetti et al. 2007) a démontré leurs capacités à générer une niche hématopoïétique extra-médullaire (hétérotopique) après transplantation sous cutanée chez la souris de CSM CD146<sup>+</sup> (CSM périvasculaires) grandes productrices d'angiopoïétin-1. Un peu plus tard, la même observation était faite avec des CSM fœtales CD105<sup>+</sup> injectées dans la capsule rénale d'un modèle murin. Ces CSM pouvaient recruter des vaisseaux sanguins dérivés de l'hôte et produire de l'os ectopique dérivé via un intermédiaire cartilagineux pour générer une cavité médullaire peuplée de CSH (Chan et al. 2009). Les CSM périvasculaires sont connues depuis longtemps pour jouer un rôle clé dans la formation du microenvironnement, tant par leur expression de facteurs pro-hématopoïétiques, que de leur capacité de différenciation vers le lignage ostéoblastique (Ding et al. 2012) (Greenbaum et al. 2013) (Decker et al. 2018) (Zhu et al. 2007) (Greenbaum et al. 2013). Plus récemment, c'est plusieurs sous-populations de CSM qui ont été décrites dans la niche hématopoïétique, impliquées dans la régulation de l'hématopoïèse, mais également dans la formation et la régénération du squelette. Les cellules réticulaires exprimant fortement CXCL12 (CAR, CXCL12-abundant reticular cells) seraient à l'origine des autres sous-populations de CSM. Ces cellules CD45<sup>-</sup> / CD271<sup>+</sup> / CD200<sup>+</sup> sont caractérisées par la présence du récepteur à la Leptine (LepR<sup>+</sup> cells) (B. O. Zhou et al. 2014). Les CAR sont sources de Stem Cell Factor (SCF) ainsi que de CXCL12 (ligand principal de CXCR4 (CXC-chemokine receptor 4) (Ding et al. 2012) (Ding et Morrison 2013). Des sphéroïdes dérivés des cellules de type CAR ont une angiogenèse abondante, sécrètent des cytokines pro-niche et récapitulent spontanément *in vitro* la formation osseuse précoce (Fievet et al. 2022).

## ii. Les cellules issues de l'hématopoïèse

Au-delà des cellules du stroma, un certain nombre de cellules hématopoïétiques peuvent moduler la CSH et les progéniteurs hématopoïétiques. Tout d'abord, nous pouvons citer les macrophages. Le modèle murin transgénique Mafia (Macrophage-Fas-induced apoptosis) qui permet la déplétion des macrophages via l'expression inductible de Fas dans les cellules macrophagiques CSF1R positives (Colony-Stimulating Factor 1 Receptor) (Winkler et al. 2010) a permis d'observer les conséquences *in vivo* de la déplétion de macrophages sur les CSH. L'utilisation de ce modèle qui illustre la déplétion des macrophages au sein de la moelle osseuse a mis en évidence une inhibition de la rétention des CSH au sein de la niche hématopoïétique, associée à leur mobilisation dans le sang périphérique. Par la suite, les études des équipes de Dutta (Dutta et al. 2015) et de Hur (Hur et al. 2016) démontreront que la rétention et le maintien en quiescence des CSH au sein de la niche par les macrophages, se font

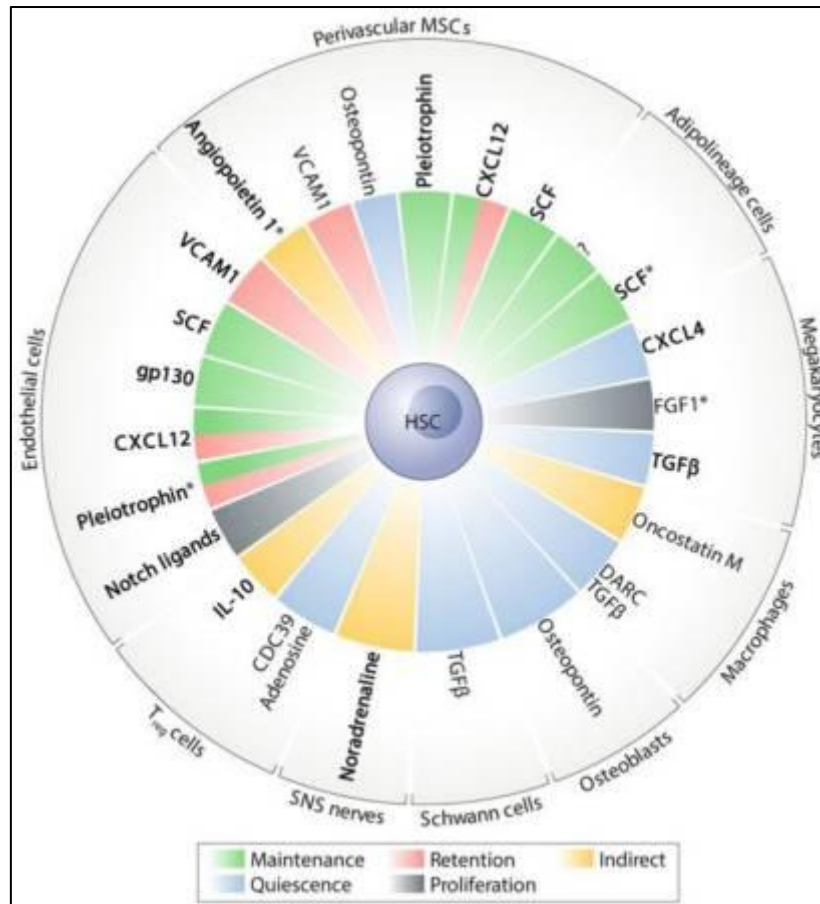
respectivement par l'expression de VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein 1), et de DARC (Duffy antigen receptor for chemokines) à la surface membranaire de macrophages.

Les mégacaryocytes ainsi que les lymphocytes T régulateurs (Treg) permettent également de maintenir les CSH dans un état de quiescence. Les mégacaryocytes vont sécréter du TGF $\beta$ 1, du CXCL4 ainsi que de la thrombopoïétine. Si la sécrétion de thrombopoïétine peut être palliée par d'autres cellules (Decker et al. 2018), la déplétion du microenvironnement en mégacaryocytes mène à la prolifération des CSH (Bruns et al. 2014). Par ailleurs, de la même manière que les ostéoblastes dans un modèle de stress, les mégacaryocytes induisent l'expansion des CSH afin de permettre leur régénération (M. Zhao et al. 2014). Le lymphocyte T régulateur (Treg) permet le maintien en quiescence des CSH via la production d'adénosine (Hirata et al. 2018). De plus, à travers la sécrétion de cytokines anti inflammatoires telles que l'IL10, il induit une niche immunologiquement protégée, mais qui pourrait également jouer un rôle clé dans le développement de cellules néoplasiques dans les hémopathies malignes puisque l'expansion de Treg est corrélée aux SMD de haut risque (Kordasti et al. 2007).

### iii. Les autres acteurs

Les cellules endothéliales qui tapissent les artérioles et les sinusoides jouent aussi un rôle de maintien de la CSH (Greenbaum et al. 2013) (C. Xu et al. 2018). L'expression de VCAM-1 à leur surface membranaire est impliquée dans l'ancrage de la CSH au sein de la niche (Zohren et al. 2008), et la sécrétion de SCF ou certaines cytokines seraient essentielles dans la régénération des CSH dans un contexte d'irradiation (Himburg et al. 2018).

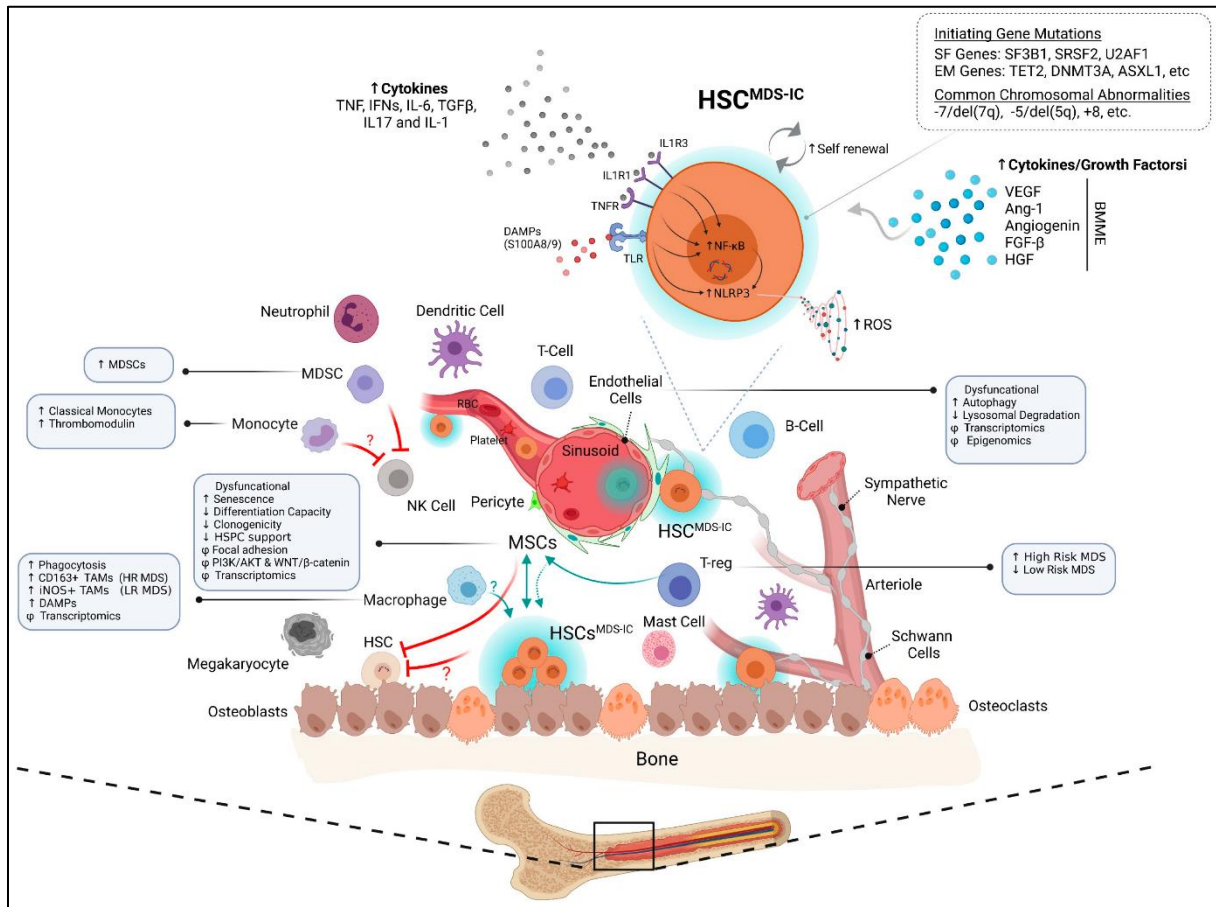
Le système nerveux sympathique (SNS) à travers la sécrétion de noradrénaline qui va se fixer sur les récepteurs adrénergiques  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 ( $\beta$ -AR) des cellules stromales mésenchymateuses, va entraîner l'inhibition de la sécrétion de CXCL12 par ces cellules, et ainsi permettre la migration des CSH dans le sang périphérique (Scheiermann et al. 2012). Les cellules de Schwann qui enveloppent et myélinisent les nerfs du SNS, permettent le maintien en quiescence des CSH par la sécrétion de TGF $\beta$  (Yamazaki et al. 2011).



**Figure 9: Environnement cellulaire et moléculaire influençant les CSH au sein de la moelle osseuse (Pinho et Frenette 2019).** Synthèse de l'ensemble des cellules impliquées dans la régulation de la CSH, ainsi que les moyens moléculaires utilisés. Les couleurs témoignent de l'influence exercée sur les CSH. \*Implication moléculaire dans la régénération des CSH.

Au total, le microenvironnement médullaire joue un rôle important dans la régulation de l'hématopoïèse. Les travaux publiés à ce jour montrent que ce microenvironnement est extrêmement complexe : relié au système nerveux, composé de stroma et d'un système immunitaire résident. Ce microenvironnement joue un rôle pivot dans l'évolution du SMD.

b. Influence du microenvironnement médullaire modifié dans le SMD



**Figure 10: Rôle du microenvironnement médullaire dans la genèse et l'évolution des SMD (Mian et Bonnet 2021).** Le microenvironnement médullaire est une niche extrêmement complexe regroupant de nombreux types cellulaires tels que les cellules souches hématopoïétiques (CSH), les cellules endothéliales, les ostéoclastes, les ostéoblastes, les cellules de Schwann et les cellules stromales mésenchymateuses (CSM). Des cellules immunitaires telles que les cellules suppressives dérivées de la moelle osseuse (MDSC), les cellules T régulatrices (T-regs), les cellules dendritiques, les neutrophiles, les cellules NK, les monocytes et les macrophages contribuent également à l'environnement immunitaire. Les interactions complexes entre ces différentes cellules et les dysfonctionnements observés, tels que la suppression des CSH normales par les cellules SMD-initiatrices (SMD-IC), les dysfonctionnements des CSM et des cellules endothéliales, ainsi que la présence d'une inflammation et de facteurs perturbateurs dans la moelle osseuse, contribuent à la pathogenèse du SMD.

Une étude récente sur le plasma de moelle osseuse de 215 patients atteints de SMD objectivait qu'un niveau d'alarmines S100A8/A9 plus élevé dans le plasma de moelle était corrélé à une moins bonne survie globale (du fait d'une augmentation du risque de transformation en LAM). Ce niveau élevé d'alarmines corrélé avec un métabolisme des lymphocytes T CD8+ et de cellules NK modifiés avec des fonctions cytotoxiques altérées (Y.-H. Wang et al. 2023). Ainsi, au-delà des profils mutationnels somatiques différents qui expliquent en partie l'évolutivité des SMD, les voies de signalisation pro-inflammatoires dérégulées (S100A8/9, IL-6, IL-1...) chez certains patients corréleraient avec un pronostic plus sombre (Bolouri et al. 2022). A ce jour, aucun paramètre reflétant le microenvironnement médullaire n'a été considéré comme un élément du diagnostic ou du pronostic consensuellement reconnu dans la classification des SMD.

Toutefois, il a été montré que le clone mutant ou progéniteur pré-leucémique exprime une dérégulation de l'inflammasome et des voies de l'immunité innée. De même, au sein du microenvironnement médullaire (du fait de l'âge, de désordres auto-immuns, d'infections chroniques) il est observé une inflammation systémique, caractérisée par une augmentation des alarmines S100A8/A9 et des cytokines pro-inflammatoires. Les CSH mutées vont avoir un avantage compétitif sur les CSH non mutées. Les cellules mutées TET2 présentent une meilleure prolifération ainsi qu'une apoptose réduite au sein d'un microenvironnement inflammatoire par rapport aux cellules non mutées, via la voie de signalisation TLR-TRAF6 ainsi que de la voie NF-KB non canonique (Cai et al. 2018). En revanche, l'environnement inflammatoire supprime les CSH normales. Plusieurs études ont montré que les signaux inflammatoires altéraient l'état de quiescence des CSH et diminuaient leur capacité de renouvellement (Takizawa et al. 2017) avec une apoptose accrue (Mirantes, Passegué, et Pietras 2014) (Platanias 2005). Avec le temps, la CSH mutée, pré-leucémique, acquiert des mutations additionnelles qui vont conduire au développement d'un SMD (Friedrich et Kosmider 2022). A ce stade, le mutant a un avantage compétitif et présente une hématopoïèse inefficace. Parmi toutes ces étapes, l'altération du microenvironnement médullaire afin de promouvoir et de sélectionner les progéniteurs leucémiques résulte d'interactions complexes dont une partie sont présentées ci-dessous (Teodorescu et al. 2020).

i. Altération des cellules stromales mésenchymateuses dans les SMD

Chez l'Homme, la présence d'anomalies génétiques dans les cellules stromales mésenchymateuses du microenvironnement médullaire a été débattue (Rathnayake, Goonasekera, et Dissanayake 2016), (Z.-G. Zhao et al. 2012). Des biopsies osseuses de patients atteints de SMD ont dans un premier temps démontré une diminution de la minéralisation de la matrice osseuse (Mellibovsky et al. 1996), suggérant une diminution de la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses vers la voie ostéogénique (Geyh et al. 2013). Les CSM dérivées de patients SMD présentent des capacités de croissance et de prolifération considérablement réduites (Varga et al. 2007). La différenciation ostéogénique est significativement réduite comme le suggèrent les colorations cytochimiques l'expression réduite d'Osterix et d'Osteocalcin. Ceci est associé à des modifications épigénétiques spécifiques (notamment le profil de méthylation) qui séparent clairement les CSM de patients SMD *versus* les CSM de contrôles sains aboutissant à une expression altérée de molécules clés impliquées dans l'interaction avec les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques, en particulier l'ostéopontine, Jagged1, Kit-ligand et angiopoïétine ainsi que plusieurs chimiokines (Geyh et al. 2013). Sur le plan fonctionnel, les cultures *in vitro* de cellules souches et progénitrices CD34+ sur stroma monocouche de CSM issues de patients SMD objectivent que la fréquence de cellules formant des « cobblestone area-forming cells » (CAFC) ou colonies précoces ou tardives était significativement

inférieure ; ceci était associé à des altérations dans les capacités de différenciation des CSH (Ferrer et al. 2013) (Pavlaki et al. 2014), ainsi qu'un échec d'implantation de ces CSH cultivées dans des modèles murins (Poon et al. 2019). Par ailleurs, une sénescence répllicative prématurée a été démontrée par l'augmentation des cellules positives à la  $\beta$ -galactosidase (Ferrer et al. 2013), notamment en lien avec un dérèglement de certaines voies de signalisation telle que WNT/ $\beta$ -caténine (Pavlaki et al. 2014). En résumé, ces études *in vitro* chez l'Homme objectivent que les CSM des patients SMD ont des propriétés définies par l'ISCT altérées avec un rôle de soutien à l'hématopoïèse également altéré.

*In vivo*, dans des modèles murins, la délétion de Dicer1 (enzyme impliquée dans le traitement de l'ARN) au sein des CSM peut reproduire un modèle expérimental de SMD capable d'évoluer en LAM (Raaijmakers et al. 2010). La délétion de Dicer1 entraîne également une inhibition de l'expression de SBDS (SBDS Ribosome Maturation Factor), qui induit l'expression de p53 et la sécrétion de molécules pro inflammatoires S100A8 S100A9 qui altèrent l'hématopoïèse via un stress génotoxique des CSH (Zambetti et al. 2016). Néanmoins, le rôle de Dicer1 dans les SMD est discuté chez l'Homme, notamment l'étude menée par l'institut national du cancer n'a pas trouvé de corrélation entre la délétion de Dicer1 et les patients atteints de SMD (Vasta et al. 2021). Aujourd'hui il est donc impossible de conclure sur les altérations observées au sein des cellules stromales mésenchymateuses de patients SMD. Sont-elles des défauts intrinsèques (altération de la CSM favorisant le SMD) ou extrinsèques (acquisition d'anomalies en lien avec le clone hématopoïétique) ?

ii. Induction d'un microenvironnement médullaire malin afin de soutenir les CSH de SMD

Les autres acteurs du microenvironnement médullaire sont aussi modifiés dans les SMD.

Les cellules endothéliales : l'observation d'un enrichissement du réseau vasculaire dans la moelle osseuse des patients SMD corrélée à l'infiltration par les myéloblastes (C. K. Kim et al. 2016) semble dépendante de facteurs de croissance angiogéniques tels que le VEGF (Vascular endothelial growth factor), l'angiopoïétine 1, l'angiogénine mais aussi le FGF- $\beta$  (Fibroblast growth factor) et l'HGF (Hepatic growth factor) (X. Feng et al. 2011) (Alexandrakis et al. 2005). Ainsi, la sécrétion de VEGF stimule la cellule endothéliale et donc le réseau vasculaire par voie autocrine, mais influence aussi la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques par voie paracrine (Bellamy et al. 2001). En effet, le VEGF induit l'entrée en cycle cellulaire de la CSH, augmente leur capacité migratoire et promeut une différenciation déficiente (perte de la capacité d'assurer l'ensemble du compartiment sanguin et augmentation de l'apoptose qui est caractéristique des SMD) (Itkin et al. 2016).

L'inflammation chronique : L'hématopoïèse clonale augmente le risque de développer une hémopathie maligne myéloïde de type syndrome myélodysplasique (SMD) / leucémie aiguë myéloïde (LAM) de l'ordre de 0,5 % à 1,0 % par an (Genovese et al. 2015). Ainsi, le développement d'une

hématopoïèse clonale est nécessaire mais non suffisant pour expliquer la pathogénèse d'un SMD. L'exploration récente du microenvironnement médullaire a apporté des éléments clés de la pathogénèse du SMD (Caiado, Pietras, et Manz 2021). Il s'agit d'un microenvironnement pro-inflammatoire qui est favorisé avec l'âge. En effet, dans des modèles animaux précliniques, l'activation soutenue par l'IFN- $\alpha/\gamma$  au cours d'une infection chronique, altère la fonction de la CSH saine (Morales-Mantilla et King 2018), et la signalisation chronique par TNF- $\alpha$  a été reliée au développement du SMD (Lambert, Wu, et Aanei 2016). Un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP : (IL-1, TNF et IL-6) biaise la différenciation hématopoïétique (Verovskaya et al. 2013) et l'hyperactivation de voies de signalisation de l'immunité innée (par exemple Myd 88/IRAK et TRAF6, TLR) favorise l'émergence d'hémopathies myéloïdes.

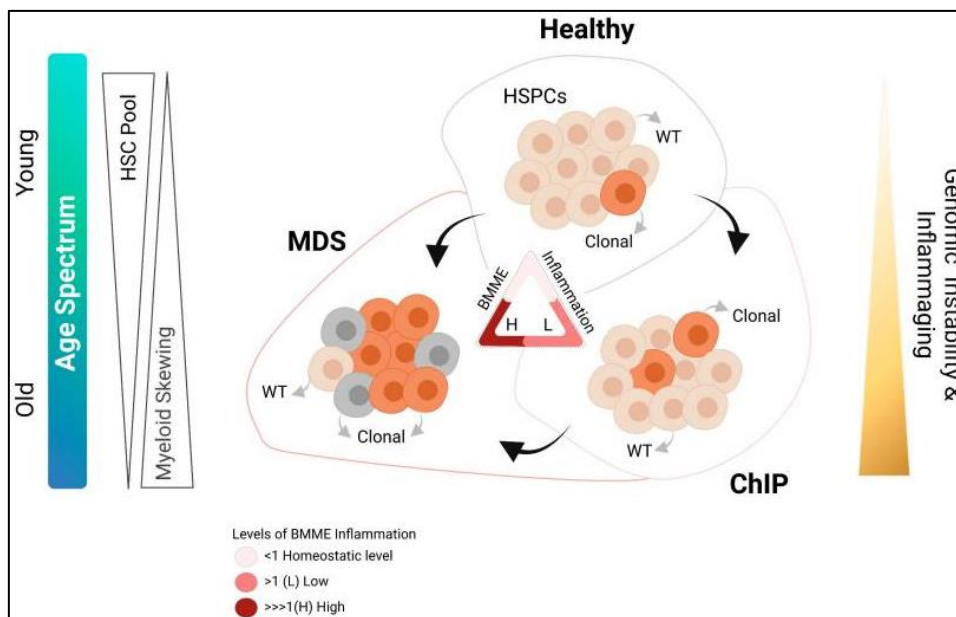
L'inflammation chronique a un rôle indispensable dans l'acquisition d'une dominance clonale ainsi que dans la progression tumorale. Elle induit d'une part un épuisement de la CSH normale (non mutée) qui conduit à la déplétion du pool de CSH au sein de la moelle osseuse (Takizawa et al. 2017) (Essers et al. 2009). L'augmentation de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  ou encore l'IL-6 (Pietras et al. 2016) (Baldrige et al. 2010) décrite dans le paragraphe précédent, et l'augmentation d'expression de récepteurs aux molécules pro inflammatoires tels que IL1RAP (IL-1 receptor accessory protein) (Barreyro et al. 2012), ou certains TLR (Toll like receptor) sont décrits dans les SMD (Starczynowski et al. 2010). Au cours de ces dernières années, les DAMP (danger associated molecular pattern) qui comprennent les alarmines S100A8 et S100A9 ont été décrits comme augmentés chez les patients SMD, en plus d'être associés à un mauvais pronostic (Giudice et al. 2019) (Y.-H. Wang et al. 2023). L'accumulation d'alarmines S100A8/A9 au sein de la moelle osseuse permet l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3. L'inflammasome NLRP3 dérégulé dans les SMD entraîne le recrutement d'une protéine adaptatrice appelée ASC, véritable chef d'orchestre de la mort cellulaire inflammatoire, autrement appelée pyroptose, qui est à la base de l'hématopoïèse inefficace dans les SMD de faible risque (Basiorka et al. 2016). Ainsi, l'exploration de l'inflammasome nous apprend :

- (1) L'activation de NLRP3 est corrélée à la présence des mutations TET2, DNMT3A, ASXL1, EZH2, SF3B1, SRSF2, U2AF1 et del5q.
- (2) ASC active d'une part la caspase 1 (induction de la fragmentation de l'ADN et rupture de la membrane cellulaire), d'autre part la voie canonique IRAK4/NFKB et génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Zambetti et al. 2016). La détection d'ADN mitochondrial oxydé par les ROS produites, est un biomarqueur de SMD. La forte détection de ASC speck (agrégat moléculaire) dans les cellules immatures hématopoïétiques est corrélée à un SMD de bas risque et à la réponse attendue à l'EPO.

Les dommages à l'ADN générés contribuent à l'instabilité génomique des SMD, et leur accumulation peuvent faire évoluer la maladie vers la LAM.

(3) L'inhibition des molécules impliquées dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 ouvrent des perspectives de nouvelles thérapeutiques.

De plus, l'équipe de Daniel Starczynowski a montré qu'un état pro-inflammatoire intrinsèque de la CSH mutée (dérégulation de TRAF6+), favoriserait l'activation chronique de la voie non canonique de NF- $\kappa$ B (par A20, une enzyme clé dans l'ubiquitination) et aboutirait au contraire à un avantage prolifératif compétitif clonal (Muto et al. 2020).



**Figure 11: Association entre l'inflammaging et l'évolution des CHIP vers l'émergence d'un SMD (Mian et Bonnet 2021).** Emergence des CHIP associées à l'inflammaging chez des personnes avec un microenvironnement médullaire inflammé. Evolution possible de ces CHIP vers un SMD avec l'acquisition de mutations supplémentaires ou suite à une sélection clonale possible dû à un microenvironnement médullaire très inflammé.

L'émergence d'un clone de cellules mutées (souvent <2%), peut s'observer chez une personne sans SMD (absence de dysplasie ou cytopénies). Ces clones hématopoïétiques avec un Potentiel Indéterminé (CHIP) sont plus souvent observés avec l'âge (Steensma et al. 2015). Néanmoins, si l'identification de ces CHIP n'est pas synonyme de maladie SMD, les personnes possédant ces CHIP ont 10 fois plus de risque de développer une hémopathie myéloïde (Genovese et al. 2014) (Jaiswal et al. 2014).

Cellules de l'immunité : plusieurs études translationnelles ont posé la question d'une éventuelle corrélation entre le système immunitaire résident médullaire et le pronostic du SMD. Nous citerons l'augmentation de l'infiltration médullaire par des monocytes classiques (A. Wu et al. 2021) (Selimoglu-Buet et al. 2017), notamment avec l'expression de thrombomoduline (CD141) membranaire chez les

patients SMD (van Leeuwen-Kerkhoff et al. 2020), protéine suspectée dans la polarisation des LT naïfs vers une différenciation en LT régulateurs ou en LT helper de type 2, qui inhibent la surveillance immunitaire cytotoxique. Cette observation est cohérente avec une proportion de Tregs médullaires augmentée dans les SMD de haut risque (Kordasti et al. 2007) (Fozza et al. 2012) (Kotsianidis et al. 2009). Sur le plan mécanistique, des monocytes cultivés *in vitro* sur une culture monocouche de CSM dérivées de patients SMD, peuvent acquérir le phénotype, le métabolisme, ainsi que les propriétés immunosuppressives (inhibition de la prolifération des LT et suppression de la cytotoxicité des lymphocytes NK) caractéristiques de MDSC (Myeloid derived suppressor cells) (Sarhan et al. 2020). Ces MDSC décrites comme indispensables dans la progression des cancers (Kusmartsev et Gabrilovich 2006), ont été directement impliquées dans la genèse du SMD dans un modèle murin transgénique pour l'alarmine S100A9 se liant au CD33 fortement exprimé à la membrane des MDSC (Chen et al. 2013). Chez l'homme, les MDSC sont décrites comme ne dérivant pas du clone malin, Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>-</sup> CD33<sup>++</sup> avec une susceptibilité accrue aux alarmines et aux signaux de danger par leur surexpression des TLR. En réponse elles vont aussi sécréter des alarmines, qui par un effet autocrine et paracrine vont amplifier l'activation des voies de l'inflammation. Les MDSC sont surtout décrites dans les SMD de faible risque, en revanche, le rôle joué dans l'échappement du SMD au contrôle par le système immunitaire n'est pas bien défini.

### c. Modèles murins d'études des SMD

Les modèles murins d'étude du SMD sont nombreux. Les premiers modèles murins transgéniques se sont attachés à reproduire les principales anomalies initialement décrites : une moelle osseuse riche et dysplasique contrastant avec des cytopénies périphériques. Le modèle murin utilisant le gène de fusion NUP98-HOXD13 permet de reproduire toutes les caractéristiques clés des SMD dont notamment des cytopénies sanguines, une dysplasie et une apoptose accrue des cellules de la moelle osseuse, ainsi qu'une possible transformation en leucémie aigüe (Lin et al. 2005). Ce modèle NUP98-HOXD13 constitue un bon modèle préclinique pour l'évaluation de la thérapie et de la biologie des SMD. Aussi, le modèle murin APC<sup>+/-</sup> développe un modèle de SMD/syndrome myéloprolifératif. APC est un régulateur négatif de la voie de signalisation Wnt, situé dans la région chromosomique 5q. Si aucun défaut d'hématopoïèse n'est observé à l'état stable chez ces souris, la transplantation en série des cellules de la moelle osseuse des souris a montré de faibles capacités d'hématopoïèse à long terme chez les souris receveuses suite à la perte de la population CSH quiescente (Lane et al. 2010). Ce modèle démontre que la perte de fonction d'APC peut contribuer au phénotype observé chez les patients del(5q). Par ailleurs, certains gènes impliqués dans les SMD tels que *TP53*, *RUNX1* ou encore *TET2* ont directement été mutés/invalidés dans d'autres modèles murins.

Malheureusement, tous ces modèles ne reflètent pas l'hétérogénéité de la pathologie. Un modèle intéressant qui a permis de mieux refléter un SMD est le modèle de mutation *Srsf2* hémizygote inductible par Recombinase Cre chez des souris adultes, qui correspond à la même mutation *Srsf2* hémizygote retrouvé chez des patients SMD, et qui vient impacter le mécanisme d'épissage ainsi que le complexe de spliceosome (S. C.-W. Lee et al. 2016). Enfin, il est également possible d'induire un modèle de SMD en exposant les souris à des produits chimiques cancérigènes ou à des radiations ionisantes (W. Li et Schnatter 2018).

Enfin nous citerons les « souris humanisées », c'est à dire les modèles de xénotransplantation de cellules de patients (PDX, Patient Derived Xenograft models). Tout d'abord, dans le modèle murin NOD/SCID- $\beta 2m^{-/-}$ , il a été montré que la prise de greffe de cellules dérivées de patients (CD34+ provenant de six patients ayant un SMD) est augmentée lors d'une co-injection intra-médullaire d'un mélange de lignée cellulaire stromale (HS5 ou HS27a) (Kerbaux et al. 2004). Plus tard, l'équipe de Medyouf (Medyouf et al. 2014) démontrera à l'aide du modèle NSG (NOD-scid IL2Rgamma<sup>null</sup>) que la prise de greffe de CSH dérivées de SMD est meilleure en association avec des CSM issues de SMD comparé à des CSM saines. Le modèle NSG est actuellement le modèle de xéno greffe le plus utilisé grâce à un profond déficit de l'immunité adaptative (absence de différenciation lymphocytaire B et T et possible absence de leur activation), ainsi que de l'immunité innée (absence de génération de NK) par défaut d'expression (knock-out) de la chaîne gamma du récepteur de l'interleukine 2 couplée à un fond génétique NOD-SCID (Shultz et al. 2005). Toutefois la prise de greffe des cellules humaines est rapidement orientée vers une différenciation lymphoïde qui fait de ce modèle un bon modèle pour l'étude de l'allo réactivité des LT humains vis-à-vis des organes cibles murins (peau, foie, tube digestif) appelée GVH expérimentale reflet d'une xénoréactivité. Aujourd'hui, il existe des modèles PDX avec la capacité de production de cytokines humaines indispensables à une hématopoïèse à long terme et un soutien à la myélopoïèse tels que la souris triple transgénique NSG-SGM (knock-in pour *IL3, CSF2, KITLG*) pour l'expression de IL-3, GM-CSF et SCF (Nicolini et al. 2004) ou plus récemment le modèle MISTRG. Ce modèle développé par l'équipe de Rongvaux (Rongvaux et al. 2014), est une souris sur fond génétique immunodéficientes *Rag2-/-Il2rg-/-*, dans laquelle les gènes codant pour le M-CSF, l'IL-3, le GM-CSF et la TPO humains sont introduits dans leurs loci murins respectifs. Ces souris sont appelées MITRG ou MISTRG lorsqu'elles portent également un transgène codant pour le SIRP $\alpha$  humain qui se lie au CD47 (pour supprimer la phagocytose des cellules exprimant CD47).

## F. Soins et traitements des SMD

### 1. *Stratégies thérapeutiques*

Plusieurs traitements peuvent être envisagés en fonction du risque d'évolutivité du SMD. Schématiquement, le SMD de score IPSS < 1.5 ou R-IPSS < 4 est considéré de faible risque. Pour ces SMD de faible risque, il s'agit d'améliorer la qualité de vie et donc de lutter contre les cytopénies en repoussant l'échéance du recours aux transfusions itératives. L'administration d'un agent stimulant l'érythropoïèse est une des principales options afin de compenser l'anémie qui est le principal symptôme chez 80% des patients. Plusieurs études témoignent de l'efficacité des agents stimulants de l'érythropoïèse (Jädersten et al. 2008), dont une étude suédoise indiquant que la combinaison avec du G-CSF permettait d'augmenter la réponse au traitement (Jädersten et al. 2005). Pour les SMD de haut risque (IPSS ≥ 1.5 et R-IPSS ≥ 4), il est envisagé des traitements à base d'agents hypométhylants (azacitidine, décitabine). Depuis plusieurs années, l'adjonction d'une autre thérapeutique aux agents hypométhylants a été étudiée afin de promouvoir de meilleurs résultats, mais aucune association n'a clairement démontré un bénéfice significatif sur la survie globale des patients. Les agents hypométhylants ne permettent pas de rémission complète de la maladie (Fenaux et al. 2009). L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (ou allo-HSCT) reste depuis plusieurs années la seule thérapie qui propose un espoir de guérison complète pour ces patients. Malheureusement il s'agit d'une procédure lourde avec une toxicité non négligeable (Kröger et al. 2017), qui augmente avec l'âge et les comorbidités du patient (Garcia-Manero, Chien, et Montalban-Bravo 2020).

### 2. *L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-HSCT)*

L'allo-HSCT permet par l'injection intraveineuse de CSH issues d'un donneur volontaire sain, d'atteindre deux objectifs principaux :

- i) remplacer l'hématopoïèse maligne du patient par une hématopoïèse normale, pour cela plusieurs sources de CSH saines sont possibles : le sang périphérique contenant la mobilisation des CSH par le G-CSF (source la plus fréquemment utilisée), la moelle osseuse, ainsi que le sang de cordon ombilical (Hölig et al. 2009) (Wieduwilt et al. 2022) ;
- ii) véhiculer un effet anti-tumoral par le système immunitaire du donneur. La présence de LT immunologiquement compétents dans le greffon, capable de médier une réaction contre les antigènes (Ag) étrangers et ainsi contre les cellules malignes résiduelles du receveur, correspond à l'effet GvL (Greffon vs Leucémie) (Eibl et al. 1996). Néanmoins, les LT peuvent également se diriger contre les Ag présents à la surface des organes sains du receveur, entraînant la maladie du greffon contre l'hôte (GvH) (Stern et al. 2014).

#### a. Sélection du donneur

La compatibilité entre le donneur et le receveur repose sur l'expression commune du HLA (Human Leukocyte Antigens) à la surface des cellules, et notamment le HLA de classe I (Ag HLA-A, B, C) ainsi que le HLA de classe II (Ag HLA-DQ, DR, DP). Les gènes codant pour le HLA sont sur le chromosome 6. La fonction du HLA de classe I est de présenter les peptides de 8 à 9 acides aminés aux LT CD8<sup>+</sup>, la fonction du HLA de classe II, est de présenter les Ag de 10 à 30 acides aminés aux LT CD4<sup>+</sup> (Gfeller et Bassani-Sternberg 2018). Chaque individu reçoit un haplotype paternel et un haplotype maternel (groupe d'allèles de différents loci situés sur un même chromosome et habituellement transmis ensemble). La compatibilité entre donneur et receveur est souhaitée sur 10 locus des molécules HLA-A, B, C, DQ, DR. Il existe plusieurs types de greffes :

- Les greffes géno-identiques. Le patient et le donneur, issus de la même famille (fratrie), ont une compatibilité HLA 10/10 puisqu'ils possèdent les mêmes haplotypes parentaux.
- Les greffes phéno-identiques. Le patient et le donneur ne font pas partie de la même famille mais possèdent tout de même une compatibilité HLA 10/10.
- Les greffes alternatives qui comprennent les greffes de sang de cordon placentaire, les greffes avec un donneur volontaire sain présentant une compatibilité HLA 9/10 et les greffes haplo-identiques (où le patient et le donneur font partie de la même famille mais ne possèdent qu'un haplotype en commun).

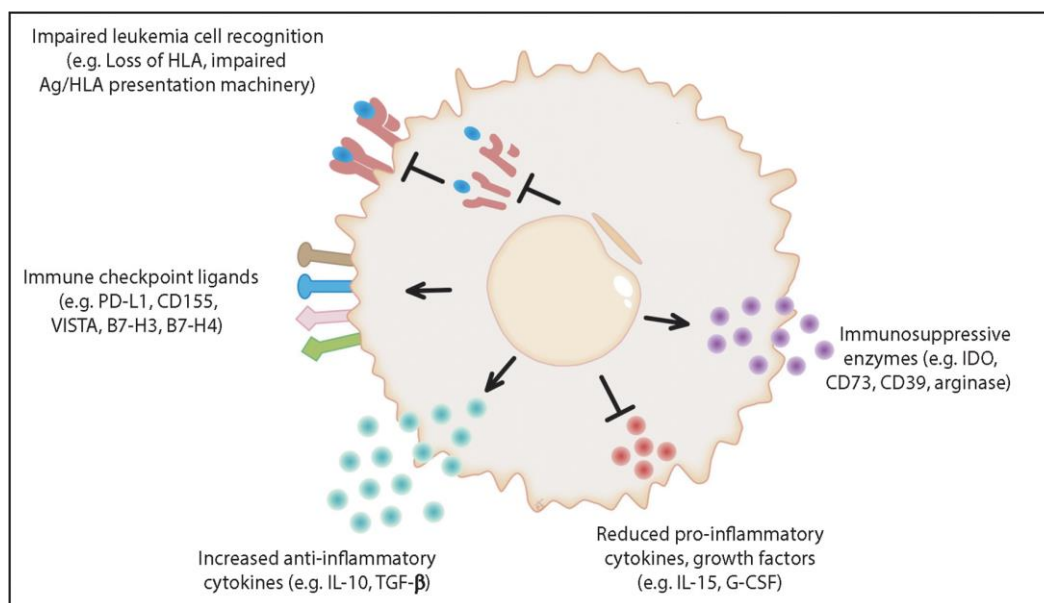
#### b. Conditionnement

Avant l'injection du greffon de CSH, un conditionnement du receveur est nécessaire pour atteindre plusieurs pré-requis à la greffe. Le conditionnement détruit l'hématopoïèse du receveur (avec plus ou moins d'intensité), réduit le nombre de cellules malignes résiduelles ainsi que le nombre de cellules immunitaires du patient afin d'éviter le rejet de la greffe. Le choix du conditionnement va dépendre de la pathologie hématologique et des comorbidités du patient. Historiquement, les premiers conditionnements étaient myélo-ablatifs (MA) comprenant une irradiation corporelle totale à la dose de 12 Gray (ou l'administration de busulfan à 3,2mg/kg pendant 4 jours) associée à de fortes doses de cyclophosphamide (Nagler et al. 2013) (Nagler et Shimoni 2019). Néanmoins, les conditionnements myéloablatifs sont associés à d'importantes toxicités d'organes, limitant leur utilisation chez les patients âgés et/ou fragiles. C'est pourquoi le développement de conditionnements d'intensité modérée ont été développés. Par décroissance d'intensité, nous citerons les conditionnements myéloablatifs à toxicité réduite (RTC), d'intensité réduite (RIC) et non myéloablatifs (NMA). Dans ces conditionnements, le but n'est pas de détruire l'ensemble des CSH du patient, mais de créer un

environnement favorable pour que les CSH transplantées puissent s'implanter et proliférer afin de remplacer progressivement les CSH du patient (Nagler et Shimoni 2019).

### c. Mécanismes de rechute post greffe

La rechute post-greffe de l'hémopathie sous-jacente survient dans environ 30% des cas. Dans certains SMD de haut risque (notamment de haut risque cytogénétique) la rechute survient dans plus de 60% des cas, avec une survie globale post-greffe décevante (nous citerons une survie globale de 4-6 mois dans les SMD avec caryotype complexe et mutation bi-allélique de TP53, (Yoshizato et al. 2017)). L'un des principaux mécanismes de la rechute est l'échappement de la cellule tumorale au contrôle par les LT du donneur (Rovatti et al. 2020).



**Figure 12: Mécanismes impliqués dans la rechute post greffe, d'après (Zeiser et Vago 2019).** La cellule tumorale résiduelle peut employer plusieurs mécanismes d'échappement au contrôle par le système immunitaire du donneur. Des mécanismes membranaires d'altération de la reconnaissance par les LT à travers la suppression ou l'inhibition du HLA et l'expression de molécules inhibitrices. Des mécanismes solubles de production de cytokines anti-inflammatoires, d'enzymes immunosuppressives et d'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires.

#### i. Perte ou inhibition de l'expression des molécules HLA à la surface des cellules leucémiques

Le système HLA exprimé à la surface des cellules leucémiques présente les Ag d'histocompatibilité mineurs aux LT du donneur. Dans le cadre des greffes haplo identiques, l'expression d'un haplotype HLA différent par les cellules leucémiques est une cible de l'alloréactivité des LT du donneur. Ainsi, l'équipe de L.Vago a rapporté que la perte de l'expression des molécules HLA incompatibles à la surface des cellules leucémiques, était observée dans 30% des cas de rechute post greffe chez les receveurs de greffes haplo identiques (Vago et al. 2009). Cette perte de l'haplotype explique l'échappement au contrôle des LT. Leur étude a permis d'observer une perte d'hétérozygotie du chromosome 6 correspondant aux gènes codant pour les molécules HLA. Cette disomie somatique uniparentale (UPD)

est une aberration chromosomique courante dans de nombreuses tumeurs solides mais aussi hématologiques, et consiste en une homozygotie acquise sans perte de matériel génétique suite à la copie de la partie chromosomique homologue de la partie manquante (Makishima et Maciejewski 2011). Ainsi, les cellules leucémiques perdent l'expression des molécules HLA incompatibles, sans réduire l'intensité d'expression du HLA de classe I, pour ne pas induire la mort cellulaire par les cellules NK qui s'activeraient et deviendraient cytotoxiques en détectant une perte du signal HLA de classe I. Ce phénomène survient probablement consécutivement à la pression immunologique sélective menée par les LT du donneur (Vago et al. 2012).

Globalement, 5 à 10% des rechutes post transplantation (en condition HLA compatible ou non) sont associées à l'inhibition de l'expression membranaire du HLA à la surface des cellules leucémiques (Toffalori et al. 2019) (Christopher et al. 2018). Ceci démontre l'importance de la présentation des Ag mineurs d'histocompatibilités dans le cadre des greffes compatibles (Lansford et al. 2018).

#### ii. Induction de l'expression de molécules inhibitrices à la surface des cellules leucémiques

L'échappement au système immunitaire peut résulter aussi de l'apparition de protéines membranaires inhibitrices de la réponse lymphocytaire (Norde et al. 2011). Ainsi, selon les études, jusqu'à 40% des cas de rechutes post-greffe étaient associés à une augmentation de PD-L1, B7-H3 (CD276) et CD155 à la membrane des cellules leucémiques, capables d'altérer et inhiber les propriétés des LT (Toffalori et al. 2019) ainsi que celles des NK (Sanchez-Correa et al. 2012). Les LT épuisés présentent un phénotype PD1<sup>+</sup> TIM3<sup>+</sup> LAG3<sup>+</sup>. L'émergence de ces LT épuisés, corrélée à l'augmentation de l'expression de PD-L1 par les cellules leucémiques, a été rapportée dans la rechute post-greffe (H. Yang et al. 2014). Toutefois, ces mécanismes directs (interaction cellule-cellule entre les cellules souches leucémiques et inhibition des LT du donneur) ne sont pas les seuls à déterminer la rechute post greffe. Un microenvironnement médullaire favorable à la rechute est aussi probable.

#### iii. Production de cytokines et de molécules anti-inflammatoires et immunosuppressives

Un microenvironnement médullaire modulé en cytokines régulatrices ou pro-inflammatoires a été rapporté. *In vitro*, le TGF- $\beta$  a un rôle déterminant dans le maintien de la cellule souche leucémique démontré dans certains modèles de leucémie myéloïde chronique (Naka et al. 2010). Par ailleurs, des profils différents de production intra-cellulaire par les cellules leucémiques d'IL-10, IL-4 et IFN- $\gamma$  ont été rapportés entre différents groupes (leucémie aiguë myéloïde avec +/- signes de dysplasie et leucémie aiguë lymphoïde) (H. H. Park et al. 2006). En revanche, dans le contexte de l'allogreffe de CSH, l'administration de sorafenib (un inhibiteur de FLT3) réduit l'expression du facteur de transcription ATF4 dans les cellules leucémiques. ATF4, normalement, bloque l'activation de l'interferon regulatory factor 7 (IRF7). IRF7 ainsi activé déclenche la transcription de l'IL-15 dans les

cellules leucémiques ce qui active les LT et stimule l'élimination des cellules leucémiques par les LT. Une augmentation d'IL-15 détectée dans le sérum des patients répondeurs est corrélée à une augmentation dans les capacités respiratoires mitochondriales des LT (Mathew et al. 2018).

De plus les cellules leucémiques expriment des enzymes immunorégulatrices telles que IDO1 (indoleamine 2,3-dioxygénase-1) et Arg-1 (arginase) qui déplètent le microenvironnement en acides aminés essentiels au système immunitaire résident. IDO1 catabolise le tryptophane en métabolites toxiques tels que l'acide kynurénique et les kynurénines altérant la survie et les propriétés métaboliques des LT (Munn et al. 2005). Arginase catabolise la L-arginine indispensable à la fonction des LT induisant leur inhibition de la prolifération, en plus de polariser les macrophages vers un phénotype suppressif M2 (Mussai et al. 2013). Deux ectonucléotidases produites par les cellules leucémiques permettraient aussi d'induire un microenvironnement favorable à la rechute, avec l'expression de CD73 ainsi que de CD39 (Serra et al. 2011) (Dulphy et al. 2014).

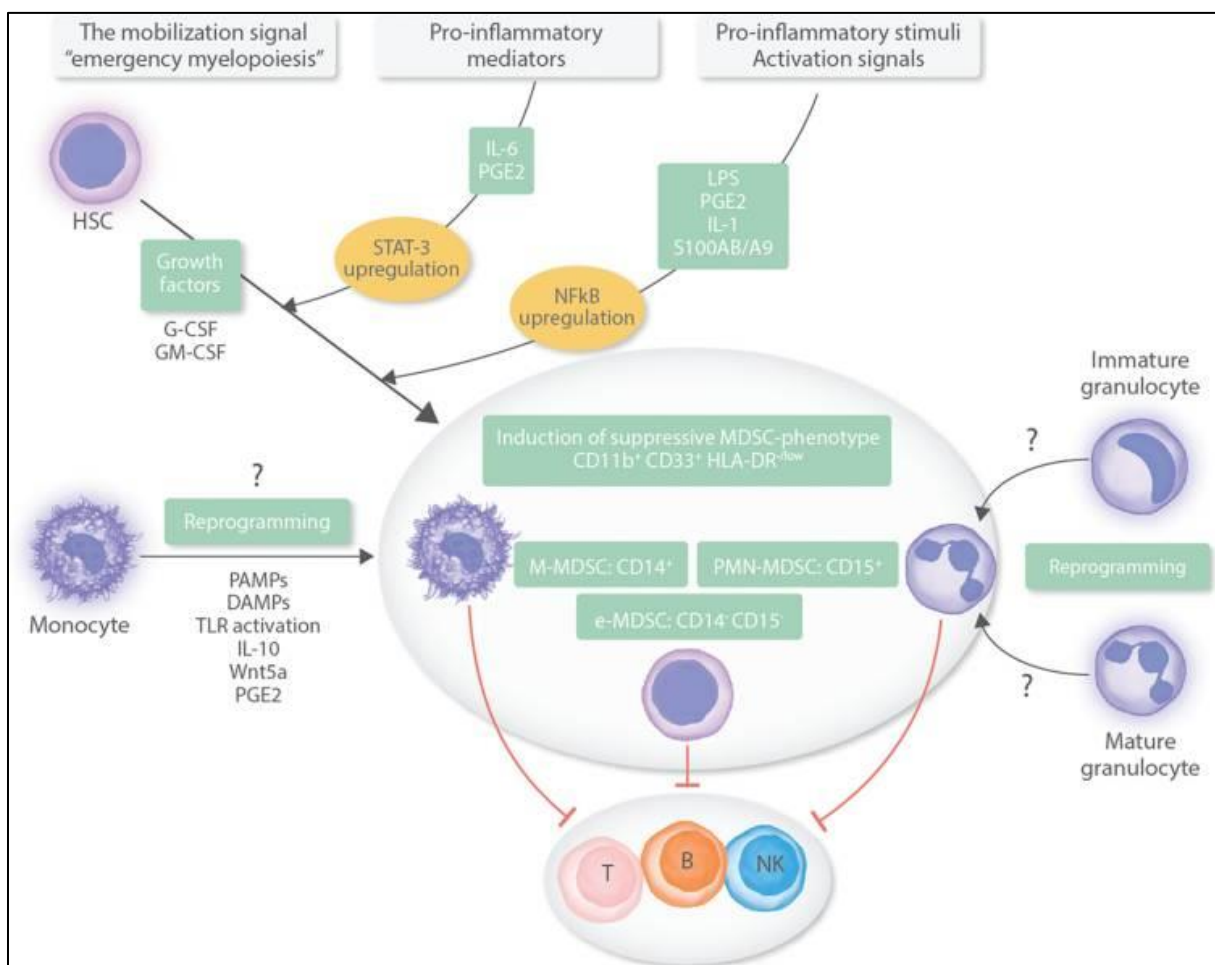
## II. Les cellules myéloïdes suppressives

### A. Définition des MDSC

A la fin des années 70, une population cellulaire naturellement immunosuppressive a été décrite pour la première fois dans un modèle murin après une irradiation lymphoïde totale (Roder et al. 1978). Ces cellules étaient capables d'inhiber les réponses de LT *in vivo* et *in vitro* sans tenir compte des restrictions par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Il faudra attendre 2007 pour que le terme MDSC pour « Myeloid derived suppressor cells » soit donné à cette population d'origine myéloïde avec des propriétés immunosuppressives (Gabrilovich et al. 2007). Cette terminologie permettra de regrouper un ensemble de cellules plus ou moins précisément définies sur le plan phénotypique, décrites principalement dans le cancer puis dans l'inflammation chronique, les infections, les maladies auto immunes et récemment en hématologie (Greten, Manns, et Korangy 2011). Si les MDSC sont consensuellement décrites dans le domaine de la cancérologie solide comme pourvoyeuses de croissance tumorale par leurs propriétés immunosuppressives diverses (Schoupe et al. 2013), et par leur support à l'angiogenèse utile à la survie des cellules tumorales (Condamine et al. 2015) (Solito et al. 2014) la caractérisation des MDSC dans d'autres domaines (maladies auto-immunes, inflammation, hémopathie) est plus complexe. En effet, en 2015 un consortium de 23 laboratoires experts définit les MDSC sur des critères immunophénotypiques observés dans des tumeurs solides (Damuzzo et al. 2015). Les MDSC sont consensuellement définies chez la souris par la coexpression du CD11b et du Gr1. L'antigène de différenciation myéloïde Gr1 possède deux isoformes, le Ly6C et le Ly6G (Youn et al. 2008). Les cellules CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> sont monocytaires, dites « M-MDSC » et les cellules CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>faible</sup>Ly6G<sup>+</sup> sont granulocytaires dites « G-MDSC ». L'absence

d'équivalent humain du Gr1 nécessite le recours à d'autres marqueurs. Mais finalement, la définition phénotypique des MDSC chez l'Homme est peu spécifique, basée essentiellement sur la négativité de marqueurs (HLA-DR-, lineage -) et la double positivité de marqueurs myéloïdes (CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup>). Elles sont dites granulocytaires lorsqu'elles sont CD15<sup>+</sup> mais CD14<sup>-</sup> ; monocytaires lorsqu'elles sont CD15<sup>-</sup> CD14<sup>+/</sup> et promyélocytaires ou « early stage » lorsqu'elles sont CD15<sup>-</sup> et CD14<sup>-</sup> (Bronte et al. 2016) (Mandruzzato et al. 2016). Toutefois, leur fragilité à la culture cellulaire et aux manipulations de congélation/décongélation, leur plasticité en fonction du micro-environnement, et l'absence de marqueur spécifique de propriétés suppressives, font de ces cellules une population très hétérogène. Nous allons résumer les connaissances sur les MDSC en cancérologie solide pour introduire les MDSC dans le contexte de l'hématologie et l'intérêt qu'a porté mon laboratoire d'accueil à comprendre comment ces cellules pourraient représenter un des mécanismes d'échappement de la cellule leucémique au contrôle par le système immunitaire du donneur.

### 1. Modèle d'expansion et de différenciation des MDSC



**Figure 13: Signaux impliqués dans la génération de MDSC (Bizymi et al. 2019).** La génération de MDSC est classiquement décrite en deux étapes. 1/ Le signal d'expansion des progéniteurs myéloïdes associé à l'inhibition de leur différenciation terminale via la libération de facteurs de croissance par le microenvironnement tumoral et l'induction de l'expression de Stat3 par les médiateurs pro-inflammatoires. 2/ Le signal d'activation convertissant les progéniteurs myéloïdes en MDSC

fonctionnelles médiées par les stimuli du microenvironnement. HSC (hematopoietic stem cell), G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), PGE2 (prostaglandine E2), LPS (Lipopolysaccharide), NFκB (nuclear factor-kappa B), PAMP (Pathogen associated molecular patterns), DAMP (Damage-associated molecular patterns), TLR (Toll-like receptor).

Dans des conditions physiologiques, la myélopoïèse est induite par des facteurs de croissance tels que le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), le G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) et le M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) qui vont permettre la différenciation du progéniteur commun myéloïde (CMP) en cellules granulocytaires (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles), les monocytes et macrophages. Dans le cancer, ces facteurs semblent produits en plus grande quantité et vont favoriser une myélopoïèse perturbée (Gabrilovich, Ostrand-Rosenberg, et Bronte 2012) (Marvel et Gabrilovich 2015). Certaines cellules myéloïdes restent bloquées à un stade immature et vont être appelées « Myeloid Derived Suppressor Cells » ou « MDSC ». Lorsqu'elles vont migrer au sein de microenvironnements pathologiques, elles vont acquérir des propriétés immunosuppressives (Condamine et Gabrilovich 2011) (Condamine, Mastio, et Gabrilovich 2015). Ainsi, il est communément décrit une première étape d'expansion des cellules myéloïdes immatures, puis une étape d'activation ; deux étapes indispensables pour l'émergence des MDSC (**Figure 13**).

## 2. Voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans la première étape d'expansion des MDSC

L'expression du facteur de transcription STAT3 est induite par cet ensemble de facteurs de croissance (GM-CSF, G-CSF, M-CSF) et de médiateurs pro inflammatoires tels que l'IL-6, PGE2 (prostaglandine E2), HGF (hepatocyte growth factor), ou encore l'IL-11 (Condamine, Mastio, et Gabrilovich 2015) (Gabrilovich et Nagaraj 2009). Des modèles murins ont permis de montrer l'importance de STAT3 dans l'induction ainsi que dans la prolifération des MDSC puisque l'injection d'un inhibiteur de STAT3 bloque la prolifération des MDSC (Xin et al. 2009). L'induction de STAT3 permet l'inhibition de l'expression d'IRF8 (Interferon regulatory factor 8), initialement produit dans les CMP, essentiel dans la différenciation des cellules myéloïdes vers la lignée granulocytaire (Waight et al. 2013). Ainsi il a été observé une corrélation inverse entre le niveau d'expression d'IRF8 et le nombre de MDSC circulantes chez les patients (Stewart et al. 2009). Par ailleurs, l'inhibition d'IRF8 est associée à l'inhibition de Fas à la surface des cellules, permettant aux MDSC une protection contre le mécanisme de mort cellulaire médié par les LT cytotoxiques exprimant FAS-ligand (Xiaolin Hu et al. 2013). STAT3 permet également l'induction de l'isoforme C/EBPβ (CCAAT-enhancer-binding protein β), qui interfère avec le promoteur *Myc*, et joue un rôle dans la croissance et la prolifération cellulaire des MDSC. Enfin STAT3 joue un rôle important dans l'acquisition de propriétés immunosuppressives en favorisant la formation du

complexe NADPH (p47, gp96, S100A9) (Pingyan Cheng et al. 2008) et la production de ROS (Corzo et al. 2009), (Srikrishna 2011).

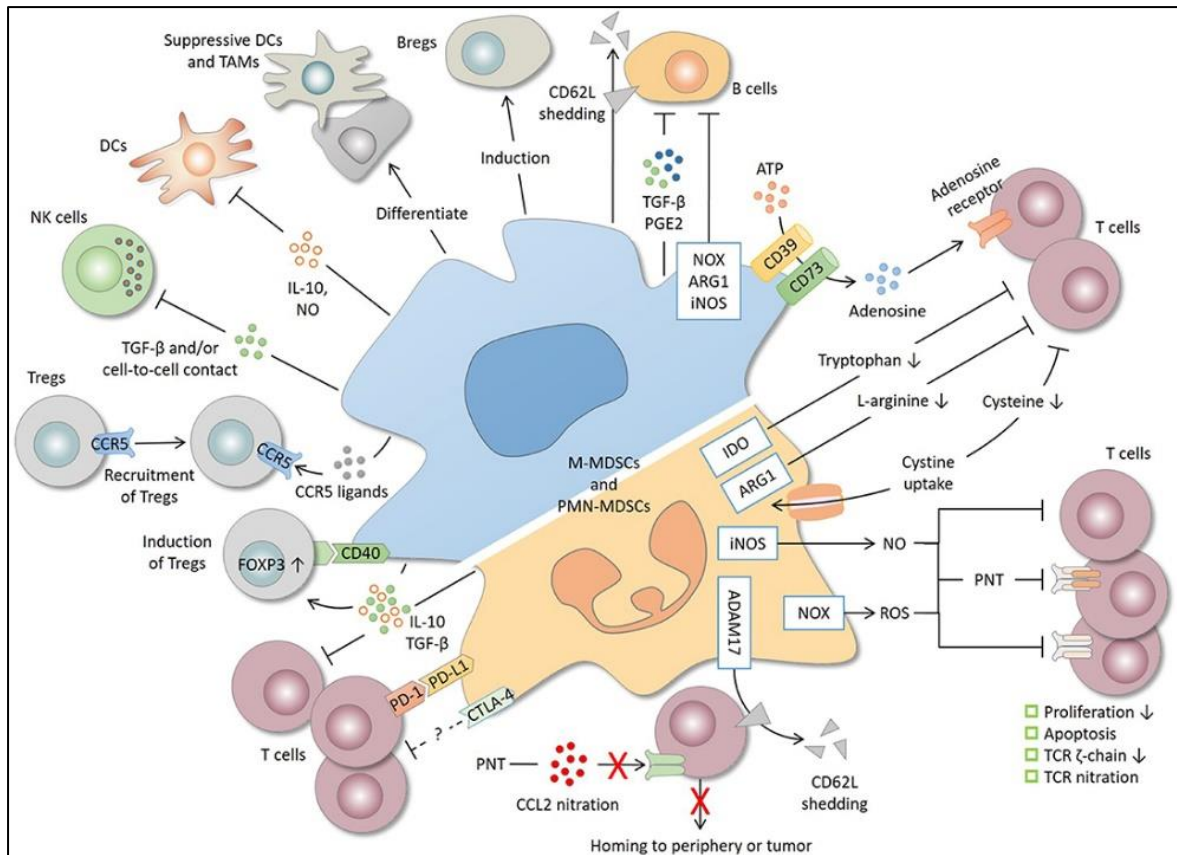
### 3. *Voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans la seconde étape d'activation des MDSC*

Le second signal destiné à l'activation des MDSC est principalement médié par des cytokines pro-inflammatoires du microenvironnement tumoral. Plusieurs médiateurs de l'inflammation dont les ligands des TLR tels que le LPS, les alarmines S100A8/A9, le TNF- $\alpha$  ou encore l'IL-1 $\beta$  induisent la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Dans des modèles murins, le rôle des TLR et leurs nombreux ligands potentiels ont été explorés. La stimulation des TLR permet le recrutement de MyD88 (Arora et al. 2010), nécessaire à l'activation de NF- $\kappa$ B et corrélée à l'accumulation de MDSC (Delano et al. 2007). En revanche, l'inactivation de *Myd88* aboutit à l'émergence de MDSC avec des capacités immunosuppressives fortement réduites (Liu et al. 2010) (Hong et al. 2013). L'activation des TLR via le TNF $\alpha$  permet d'induire l'expression d'iNOS (Oxyde nitrique synthase induite) et la production de ROS (Xin Hu et al. 2014). D'autres études démontrent l'augmentation des capacités de production de peroxy-nitrite par les MDSC lors du recrutement d'IL-1 $\beta$  et de l'activation de NF- $\kappa$ B (Lu et al. 2011), ainsi que l'inhibition de la caspase 8 dans les MDSC médiée par C-FLIP à travers l'activation de NF- $\kappa$ B par TNFR2 (Tumor necrosis factor receptor 2) (X. Zhao et al. 2012). Enfin, les exosomes dérivés des sites tumoraux enrichis en HSP70 (Heat Shock Protein 70) permettent la phosphorylation de STAT3 via la voie de signalisation TLR2-MyD88, entraînant l'induction des propriétés immunosuppressives des MDSC (Diao et al. 2015). Mais certains modèles d'activation des TLR permettraient d'inhiber les propriétés immunosuppressives des MDSC (H. Wu et al. 2012) (Yi Yang et al. 2013). L'activation de STAT1 via stimulation par l'IFN $\gamma$  permet l'induction de l'expression d'iNOS ainsi que de l'arginase 1, deux mécanismes impliqués dans les propriétés immunosuppressives des MDSC (Movahedi et al. 2008) notamment les M-MDSC (Schoupe et al. 2013). La voie de signalisation de STAT6 induite par la stimulation de IL-4R $\alpha$  (Interleukin-4 Receptor  $\alpha$ ) via IL-4 ou IL-13 permet l'expression de l'arginase 1 (Bronte et al. 2003) serait privilégiée dans les G-MDSC. Le microenvironnement tumoral hypoxique riche en HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factors 1 $\alpha$ ) amplifie les propriétés immunosuppressives des MDSC à travers une plus forte expression de PD-L1, ou en induisant les activités de IDO, Arg1 et iNOS (Noman et al. 2014) (Noman et al. 2015) et en favorisant leur différenciation en TAM (Tumor-associated macrophages) (Corzo et al. 2010). Les TAM dérivés de MDSC sont constamment régénérés par le recrutement de nouveaux MDSC (Cortez-Retamozo et al. 2012). Cette grande plasticité des MDSC rend leur exploration complexe, dépendante des différents microenvironnements tumoraux.

Néanmoins, l'altération de la différenciation finale des progéniteurs myéloïdes n'est pas le seul moyen d'induire des MDSC. La reprogrammation de cellules myéloïdes matures et fonctionnelles du

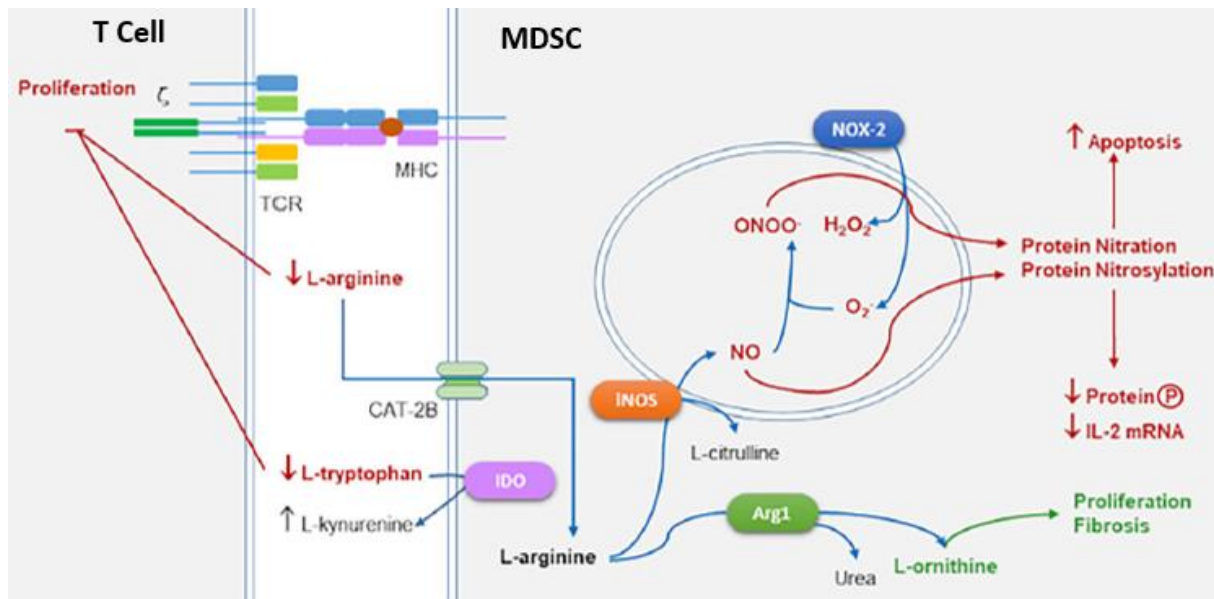
microenvironnement tumoral vers un phénotype MDSC, a été décrit. La boucle de production et de stimulation autocrine de PGE2 décrite préalablement, a également été identifiée au sein de population monocytaire, les convertissant en MDSC suite à l'augmentation d'iNOS (Mao et al. 2013). L'équipe de (Sarhan et al. 2020) ont permis d'induire des monocytes avec des fonctionnalités proches des MDSC, grâce à des CSM de patients SMD. Toutefois, les mécanismes de reprogrammation sont très complexes et restent encore majoritairement incompris. Ceux-ci témoignent de la forte plasticité au sein des cellules myéloïdes ainsi qu'au sein des MDSC, et complexifie l'étude de ces cellules.

## B. Mécanismes d'action des MDSC



**Figure 14: Mécanismes immunosuppresseurs et cibles des MDSC (Yuhui Yang et al. 2020).** De nombreux mécanismes d'actions peuvent être utilisés par les MDSC afin de cibler les LT ainsi que d'autres cellules de l'immunité dont notamment la production de NO (oxyde nitrique), de ROS (espèce réactive de l'oxygène), de PNT (peroxynitrite). Les déplétions en arginine ou en tryptophane médiées par Arg1 (Arginase 1) et IDO (indoleamine 2, 3-dioxygénase), ainsi que l'absorption de cystéine altèrent la prolifération et la fonctionnalité des LT. La production d'adénosine par les ectoenzymes CD39 et CD73 permettent l'inhibition des LT. L'expression de marqueurs inhibiteurs à la surface des MDSC dont PD-L1 (programmed cell death-ligand 1) ou CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) permettent l'inhibition des LT après interaction. D'autres mécanismes sont impliqués dans les mécanismes d'immunorégulation comme l'altération de la migration des LT, l'induction de LT régulateurs (LTreg), la sécrétion de cytokines impactant l'ensemble des cellules de l'immunité, ainsi que les capacités des MDSC à se différencier en macrophages associés aux tumeurs (TAM). ADAM17: a disintegrin and metalloproteinase 17, iNOS: inducible nitric oxide synthase, NOX2: NADPH oxidase 2.

1. Stress oxydatif et déplétion des acides aminés essentiels



**Figure 15: Principaux mécanismes de suppression immunitaire des LT médiés par les MDSC.** iNOS et NOX-2 induisent la génération de RNS et de ROS via la nitration et la nitrosylation des protéines, entraînant l'apoptose et l'inhibition de la phosphorylation de protéines et la dégradation de l'ARNm d'IL-2. Arg1 et iNOS consomment la L-arginine extracellulaire déplaçant l'environnement extracellulaire en cet acide aminé, impliquant l'inhibition de l'expression de la chaîne  $\zeta$  CD3 interférant avec la signalisation du TCR et inhibant la prolifération des LT. IDO convertit le L-tryptophane en L-kynurénine et inhibe la prolifération des LT. iNOS (Inducible nitric oxide synthase), NOX-2 (NADPH oxydase 2), RNS (reactive nitrogen species), ROS (Reactive oxygen species), Arg1 (Arginase 1), IDO (Indoleamine 2,3-Dioxygenase)

Les principaux mécanismes de suppression immunitaire des lymphocytes T sont médiés par 4 principales enzymes présentées par la **Fig15** (la synthèse inductible du monoxyde d'azote ou iNOS, un complexe enzymatique membranaire la NADPH oxydase ou NOX-2, l'arginase -1, l'indoléamine 2,3-dioxygénase ou IDO). L'action suppressive de iNOS et de la NADPH oxydase 2 (NOX-2) passe par la génération de d'espèces réactives de l'azote (Youn et al. 2008) (Markowitz et al. 2017) et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Kusmartsev et al. 2004). Il en résulte une nitration ou nitrosylation des cystéines qui conduit à l'inhibition de la phosphorylation des protéines impliquées dans la transduction du signal, favorise l'entrée en apoptose, mais aussi favorise la dégradation de l'ARNm de l'IL-2. La L-arginine (Arg-1) extracellulaire inhibe l'expression de la chaîne  $\zeta$  de CD3 interférant avec la signalisation du TCR. A travers cette dénaturation du TCR, une tolérance des LT est induite suite à l'altération de la reconnaissance des Ag (Nagaraj et al. 2007). Arg1 produit aussi de la L-ornithine qui est le substrat du collagène impliqué dans la réparation des tissus et la fibrose. L'induction d'IDO au sein des MDSC inhibe la prolifération des LT ainsi que leur polarisation en Th1 à travers la métabolisation de l'acide aminé essentiel tryptophane et sa conversion en L-kynurénine et acide kynurénique (Rodríguez et Ochoa 2008) (Yu et al. 2013).

A noter que tous ces mécanismes peuvent être intriqués. En effet, le peroxy-nitrite (PNT) qui résulte d'une réaction entre le NO et un anion superoxyde, induit aussi l'altération du TCR des LT via la

nitration du complexe. De plus, le PNT permet également d'inhiber l'activation des LT à travers la nitration de la Tyrosine394 de la protéine kinase spécifique des lymphocytes, impliquée dans la cascade de signalisation médiée par le TCR (S. Feng et al. 2018) (Nagaraj et al. 2007).

### *2. Expression de molécules inhibitrices à la surface des MDSC*

Les MDSC peuvent également exprimer à leur surface des molécules inhibitrices des LT à travers l'expression de PD-L1 et CTLA-4 (T lymphocyte-associated antigen 4). L'expression de PD-L1 à la surface des MDSC est décrite dans des modèles tumoraux, où elle est corrélée à l'anergie ainsi qu'à l'apoptose des LT. Son inhibition altère directement les propriétés immunosuppressives des MDSC vis-à-vis des LT (Noman et al. 2014) (Antonios et al. 2017). Au cours de ces dernières années, il a été démontré que les molécules pro-inflammatoires du microenvironnement tumoral telles que les alarmines S100A8/A9 induisent l'expression de PD-L1 à la surface membranaire des MDSC (Pinyang Cheng et al. 2019). L'effet de CTLA-4 est moins bien compris. CTLA4 inhiberait la prolifération des G-MDSC, en parallèle de l'inhibition de la production d'Arg1 (Pico de Coaña et al. 2013).

### *3. Altération de la migration des LT vers la tumeur et les ganglions*

La migration des LT naïfs dans les ganglions lymphatiques est un élément clé de la réponse immunitaire puisque c'est à cet endroit que les LT vont interagir avec des Ag afin d'être activés. Plusieurs molécules sont impliquées dans les mécanismes de migration, dont CD62L (L-selectine), qui dirige les LT dans les ganglions lymphatiques périphériques. Les MDSC expriment à leur surface ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease17), qui va cliver le CD62L à la surface des LT naïfs afin d'altérer leur migration jusqu'au ganglion lymphatique et ainsi inhiber la réponse immunitaire (Hanson et al. 2009). HMGB1 (high mobility group box protein 1) qui est une molécule pro inflammatoire, permettrait d'induire les capacités des MDSC à cliver le CD62L à la surface des LT naïfs (Parker et al. 2014). Les PNT entraîneraient aussi la nitration de CCL2, chimiokines indispensables à la migration des LT (Gehad et al. 2012).

### *4. Altération de la fonctionnalité des LT par la production d'adénosine*

Les ectoenzymes CD39 et CD73 exprimés à la surface des MDSC sont respectivement capables d'hydrolyser l'ATP ainsi que l'ADP extracellulaire en AMP, qui sera ensuite clivé en adénosine. La production d'adénosine par les MDSC dans le microenvironnement tumoral inhibe la phosphorylation de Zap70, ERK, Akt, nécessaires à l'activation et la prolifération des LT (Linnemann et al. 2009). Mais cette production d'adénosine permet également une stimulation autocrine des MDSC à travers les récepteurs de l'adénosine  $A_{2B}$ , induisant la prolifération des MDSC (Umansky et al. 2014).

### 5. Induction et recrutement de LT régulateurs et de B régulateurs

L'équipe de (Huang et al. 2006) a montré que les MDSC, en réponse à l'IFN $\gamma$ , sécrètent de l'IL10 ainsi que du TGF $\beta$ , tous deux nécessaires au développement des Tregs. L'induction d'IDO serait aussi propice à l'émergence de Tregs (Jitschin et al. 2014) qui semble être dépendante du contact cellulaire (Siret et al. 2019), notamment de CD40 (Pan et al. 2010). Les MDSC permettent également le recrutement des Tregs en sécrétant les ligands de CCR5 (fortement exprimés à la membrane des Tregs) tels que : CCL3, CCL4 ainsi que CCL5 (Schlecker et al. 2012). La sécrétion de TGF $\beta$  permet aussi l'inhibition des LB, et des NK (H. Li et al. 2009), (Rastad et Green 2016) avec l'expansion de Bregs (LB régulateurs) (M.-J. Park et al. 2016).

### C. Les MDSC en hématologie

L'émergence et l'induction des MDSC ont aussi été décrites dans les cancers liquides (hématologie) et notamment dans les SMD (Kittang et al. 2016). Leur étude sur 42 patients atteints de SMD concluait à une corrélation entre l'augmentation du nombre de MDSC dans la moelle osseuse et l'augmentation du score R-IPSS. A l'image de ce qui était décrit dans les cancers solides (P.-F. Wang et al. 2018), ces cellules pourraient jouer un rôle clé dans la formation d'une niche néoplasique en induisant un microenvironnement immunosuppresseur capable de protéger et de soutenir l'évolution des cellules myélodysplasiques. L'observation de MDSC est associée à un mauvais pronostic dans les hémopathies malignes (Lv, Wang, et Huang 2019). Néanmoins, il est important d'étudier ces cellules dans leur environnement propre à chaque maladie, puisque leurs mécanismes d'actions ainsi que leurs fonctions peuvent varier dépendamment du type de cancer (Lv, Wang, et Huang 2019). Plusieurs études ont montré des disparités dans leur nombre (Solito et al. 2014), et leurs fonctionnalités en fonction des cancers (Bozkus et al. 2015).

#### 1. Les MDSC dans les SMD non greffés

Le microenvironnement médullaire des patients atteints de SMD est caractérisé par une forte augmentation de l'inflammation, notamment médiée par les alarmines S100A8/A9. L'augmentation du nombre de MDSC dans la moelle osseuse des patients est due à l'interaction des alarmines S100A8/A9 avec le CD33, qui induit la prolifération des MDSC (Chen et al. 2013). Les CSM sont essentielles à l'induction de MDSC (Giallongo et al. 2016). Devant les preuves de l'implication des MDSC dans les SMD, plusieurs études ont visé à cibler la prolifération ainsi que le fonctionnel des MDSC comme potentielle cible thérapeutique du SMD (Gabrilovich et Nagaraj 2009).

## 2. MDSC dans le contexte de l'allogreffe de CSH (annexe 1, revue de la littérature)

Dans le contexte de l'allo-HSCT, les MDSC ont tout d'abord été décrites chez l'Homme dans les greffons de CSH collectés chez le donneur volontaire sain après un traitement par G-CSF (Luyckx et al. 2012). Cette première observation de MDSC dans le contexte de l'allo-HSCT s'intéressait à caractériser les cellules sur le plan morphologique, phénotypique et fonctionnel (suppression *in vitro* des LT activés de façon allogénique par la culture mixte lymphocytaire). Plus tard, plusieurs études chez l'Homme ont démontré que la richesse du greffon en MDSC est corrélée à une moindre incidence de la GVH aiguë chez le receveur dans un contexte HLA identique (Vendramin et al. 2014) (K. Wang et al. 2019; D'Aveni et al. 2015) et haplo-identique (Lv et al. 2015). Si les études chez la souris de co-injection de MDSC au moment de l'allo-HSCT révèlent la modulation de l'incidence et la sévérité de la GVH sans impacter l'effet GVL (Highfill et al. 2010) (J. Zhang et al. 2019), le rôle des MDSC induites précocement dans la reconstitution immunitaire du receveur est pour l'heure mal compris. L'observation de MDSC monocytiques circulantes chez le receveur (HLA-DR<sup>low/-</sup> CD14+), dotées de propriétés suppressives *in vitro* par IDO, a été rapportée pour la première fois en 2013 (Mougiakakos et al. 2013). Les premières observations concluent à une corrélation entre l'émergence de M-MDSC circulantes post-greffe et la GVH aiguë (Yin et al. 2020). A l'inverse, un ratio élevé de G-MDSC dès J30 post-greffe serait corrélée à une moindre incidence de GVH aiguë chez le receveur (Guan et al. 2015). Ces études de corrélations décrivent de façon plus ou moins précise le phénotype des MDSC circulantes, avec une exploration fonctionnelle *in vitro* des MDSC qui est de nos jours critiquable (activation des LT par billes anti-CD3, anti-CD28 qui sont rapidement phagocytées par les MDSC et empêchent artificiellement l'activation *in vitro* des LT) (Davis, Silvin, et Allen 2017). Plus tard, plusieurs études (T. W. Kim et al. 2018) (Y. Zhou et al. 2019) suggéreront une incidence augmentée de rechute de l'hémopathie myéloïde chez les patients avec un pourcentage élevé de MDSC dans la moelle osseuse non observé dans d'autres études (Yin et al. 2016) (Lv et al. 2015). Finalement, une étude récente basée sur la cytométrie de masse a permis l'analyse phénotypique longitudinale de nombreuses sous-populations immunitaires dans le contexte post-greffe. Il apparaît que les M-MDSC (HLA-DR- CD11b+ CD33+ CD14+) et les MDSC granulocytiques ou G-MDSC (HLA-DR- CD11b+ CD33+ CD15 + CD66b +) sont observées dans les 6 premiers mois post-transplantation pour progressivement disparaître à un an de la greffe. Néanmoins, aucun marqueur spécifique de leur propriété immunosuppressive, ni aucune corrélation à l'incidence cumulée de la GVH ou de la rechute n'a pu être retenue (Gournay et al. 2022). Au moment de débiter ma thèse, le laboratoire venait de résumer dans une revue de la littérature (D'Aveni et al. 2020, annexe 1) que l'identification précoce dans le sang de MDSC circulantes dans le sang après allo-HSCT semblait plus le reflet d'une hématopoïèse de stress, et que leur rôle dans la rechute/GVH n'était pas déterminé.

## Problématique et objectifs de la thèse

Pour explorer l'échappement du SMD au contrôle par le système immunitaire, le laboratoire d'accueil avait proposé d'étudier le SMD au cours d'une thérapie curative. En effet, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques constitue une immunothérapie puissante où le système immunitaire du donneur joue un rôle majeur dans le contrôle à long terme du SMD. Toutefois, la rechute du SMD survient chez 30 à 40% des patients allogreffés avec un pronostic sombre pour ces patients. La rechute est vraisemblablement liée à une inefficacité du système immunitaire du donneur à éradiquer les cellules tumorales résiduelles (souvent corrélée à l'absence de GVH), comme si le système immunitaire du donneur était devenu rapidement tolérant chez son nouvel hôte. Étudier le système immunitaire précocement après l'allogreffe et comparer les analyses chez les patients qui rechutent précocement *versus* les patients qui ne rechutent pas paraissait être une approche séduisante pour déduire le rôle des MDSC dans l'échappement au contrôle par le système immunitaire. Notre hypothèse principale était que l'émergence rapide de MDSC dans le microenvironnement médullaire était un facteur important dans l'échappement des cellules myélodysplasiques au contrôle par le système immunitaire adaptatif représenté par les lymphocytes T du donneur. En effet, à l'issue du travail de revue de littérature publié en 2020, le rôle des MDSCs dans le contexte de rechute post-greffe était peu précis. Deux principales raisons semblaient expliquer les données contradictoires de la littérature sur le rôle des MDSC dans la rechute post-greffe:

-D'une part les MDSC avaient été essentiellement définies par leur immunophénotype (caractérisation plus ou moins précise nous l'avons vu, basée principalement sur l'absence d'expression de certains marqueurs avec un fenêtrage plus ou moins stringente par la technique de cytométrie en flux). L'exploration concomitante de leurs propriétés régulatrices étaient réalisées avec des tests *in vitro* basés sur l'activation des LT par billes anti-CD3, anti-CD28 dont nous avons exposé préalablement les limites.

-D'autre part, les MDSC avaient été étudiées dans le sang circulant du receveur, souvent à partir d'échantillons préalablement congelés (et nous connaissons la fragilité de ces cellules). Les MDSC n'avaient pas été étudiées au sein du microenvironnement tumoral qui est la moelle osseuse du receveur. Or, ces cellules initialement décrites radiorésistantes dans la rate des souris receveuses capables de moduler la GVH aiguë, pouvaient tout à fait, par analogie chez l'Homme, persister dans la moelle osseuse du receveur les premiers mois de la greffe. Une autre hypothèse était que le microenvironnement stromal médullaire déficient persistant du receveur, pouvait dans les premiers mois de la greffe induire des MDSC à partir des cellules myéloïdes du donneur qui colonisent la moelle osseuse.

Pour répondre à ces hypothèses, nous exposons les travaux selon deux grands axes.

Le premier axe de travail a été réalisé grâce à un protocole de recherche translationnelle monocentrique mené au CHRU de Nancy, REAL-GREFFE (N° ID-RCB : 2018-A03267-68) dirigé par le Professeur Rubio qui visait à différents temps post-greffe (notamment J30, J90, J180 et J365) à évaluer la reconstitution immunitaire lymphoïde et myéloïde. L'objectif de ce travail était d'identifier les MDSC post-greffe et leurs propriétés immunosuppressives *in vitro* et *in vivo* lorsqu'elles étaient issues de patients qui rechutent précocement de leur hémopathie, comparativement à des patients sans rechute précoce (article soumis) et d'explorer une éventuelle corrélation entre ces MDSC et l'émergence de LT de profil épuisé.

Le deuxième axe de travail a été réalisé grâce à un protocole de recherche translationnelle multicentrique mené dans l'inter-région (Nancy, Besançon, Strasbourg), N°ID-RCB : 2019-A00842-55, dirigé par le Professeur D'Aveni. Cette étude a permis de mieux caractériser sur le plan phénotypique les MDSC (grâce à un panel 28 couleurs), et de décortiquer les mécanismes immunorégulateurs *in vitro*, des MDSC issues de patients en rechute précoce. Le travail se poursuit actuellement par l'analyse transcriptomique sur cellule unique afin de mieux comprendre la signature différentielle des MDSC observée dans un contexte de rechute précoce *versus* l'absence de rechute précoce.

## Matériels et méthodes

### I. Etude de la reconstitution immunitaire des receveurs en post-greffe

Etude prospective de la reconstitution immunitaire des cellules myéloïdes (notamment les MDSC) ainsi que des LT à des temps précoces post-greffe : J30, J90 et J180.

#### A. Etude de la reconstitution lymphocytaire et des MDSC post greffe dans le sang périphérique

Les cellules mononuclées sanguines (PBMC) des receveurs sont tout d'abord isolées par la technique de ficoll à partir d'un prélèvement sanguin et/ou médullaire. La sélection des PBMC se réalise dans un tube particulier Leucosep (Greiner Bio-One) où 15mL de milieu de séparation lymphocytaire (Eurobio Scientific) est déposé sous un filtre, et 15mL de sang périphérique dilués dans 15mL de PBS (phosphate-Buffered saline, Gibco®) sont déposés au-dessus du filtre. Pour la moelle osseuse, le ficoll ne peut pas être effectué dans un tube Leucosep de 50mL, 4mL de milieu de séparation lymphocytaire sont placés dans un falcon 15mL, 2 mL de moelle osseuse est mélangé avec 6mL de milieu de type RPMI 1640 Medium supplémenté avec 5% de Glutamine (Gibco ref : 25030081) et 1% de pénicilline-streptomycine (Sigma, ref : H0781), qui est ensuite déposé sur le milieu de séparation lymphocytaire. Après une centrifugation de 10min à 1000g, l'anneau de cellules mononuclées est repéré et pipeté. Les cellules récupérées sont lavées plusieurs fois avec du PBS (50mL PBS 1X et 0.250g de d'albumine de sérum bovin (BSA, 0.5%, Sigma-Aldrich® ref : A2153-1KG). Le marquage par anticorps couplés à des fluorochromes se réalise sur 4 000 000 cellules selon les panels présentés dans les **Tableaux 1 et 2** pour identifier les différentes sous populations de LT et leurs marqueurs d'épuisements. Un 3<sup>ème</sup> panel présenté dans le **Tableau 3** est utilisé pour identifier les sous populations de MDSC. Enfin, un 4<sup>ème</sup> panel a été réalisé pour des prélèvements à partir de Février 2021 concernant les patients inclus dans le protocole Evade. Le sang périphérique des patients était marqué par le panel Evade1 et le panel Evade 2 (**Tableau 4**), la moelle osseuse des patients était marquée uniquement avec le panel Evade 1.

*Tableau 1: Panel d'anticorps LT*

Type	Fluorochrome	Clone	Fournisseur
<b>CD3</b>	APC	UCHT1	BD Biosciences
<b>CD4</b>	PE-Cy7	SK3	BD Biosciences
<b>CD8</b>	PerCpCy5.5	SK1	BD Biosciences
<b>CD122</b>	PE	Mik-β2	Sony

<b>PD-1</b>	BV510	EH12.2H7	Sony
<b>CD197</b>	BV421	G043H7	Sony
<b>CD45RA</b>	APC-H7	SH9	BD Biosciences
<b>CD95</b>	FITC	DX2	BD Biosciences

*Tableau 2: Panel d'anticorps LT épuisés*

Type	Fluorochrome	Clone	Fournisseur
<b>CD3</b>	APC	UCHT1	BD Biosciences
<b>CD4</b>	PE-Cy7	SK3	BD Biosciences
<b>CD8</b>	PerCpCy5.5	SK1	BD Biosciences
<b>Tim-3</b>	PE-DAZZLE	F38-2E2	Sony
<b>PD-1</b>	BV510	EH12.2H7	Sony
<b>CD197</b>	BV421	G043H7	Sony
<b>CD95</b>	FITC	DX2	BD Biosciences
<b>LAG-3</b>	PE	7H2C65	Sony

*Tableau 3: Panel d'anticorps MDSC*

Type	Fluorochrome	Clone	Fournisseur
<b>CD34</b>	APC	651	Sony
<b>CD11b</b>	FITC	LM2/1	Invitrogen
<b>CD33</b>	PerCpCy5.5	WM-53	Invitrogen
<b>CD14</b>	PE-Cy7	M5E2	BD Biosciences
<b>CD15</b>	EF450	HI98	Invitrogen
<b>HLA-DR</b>	BV510	I243	Sony
<b>PD-L1</b>	PE-DAZZLE	29E2A3	Sony
<b>CD3</b>	PE	HIT3a	Sony

CD19	PE	4G7	Sony
------	----	-----	------

*Tableau 4: Panel d'Ac du panel Evade*

	Evade 1	Evade 2
<b>BB515, FITC</b>	CD45-RA	CD45RA
<b>BB630</b>	LAG-3	CD161
<b>BB660</b>	CD244	CD138
<b>BB700, PerCP-Cy5.5</b>	PD-1	CD159a
<b>BB755</b>		TCR VA7.2
<b>BB790</b>	CD14	CD24
<b>APC</b>	CCR7 (CD197)	CCR7
<b>APC-R700</b>	HLA-DR	CXCR5 (CD185)
<b>APC-H7</b>	Viabilité	Viabilité
<b>BV421</b>	TIM-3 (CD366)	CCR4 (CD194)
<b>BV510, BV480</b>	CD15	IgD
<b>BV570</b>	CD49F	TCR invariant
<b>BV605</b>	CD33	CD20
<b>BV650</b>	CD56	CD56
<b>BV711</b>	CD90	CCR6 (CD196)
<b>BV750</b>	CD11b	CD21 (CR2)
<b>BV786</b>	CD127	TCR yd
<b>BUV395</b>	CD8	CD8
<b>BUV496</b>	CD4	CD4
<b>BUV563</b>	CD19	CD19
<b>BUV615</b>	CD16	CD16
<b>BUV661</b>	CD38	CD38

<b>BUV737</b>	PDL1 (CD274)	CD27
<b>BUV805</b>	CD3	CD3
<b>BYG584, PE</b>	CD1d	CD57
<b>PE-CF 594</b>	CD25	IgM
<b>BYG670, PE-CY5</b>	CD34	CXCR3 (CD183)
<b>BYG790, PE-CY7</b>		CD95

## B. Analyses des données de cytométrie en flux

Après l'acquisition des événements cellulaires, les données de cytométrie en flux sont analysées manuellement avec le logiciel FlowJo (Version 10.8.1). Elles sont également analysées en « non supervisé » par une équipe de bio-informatique. 1) Les données ont été compensées en fonction de la matrice de compensation réalisée par le cytomètre à l'issue des monomarquages après contrôle qualité ; 2) Les flux biaisés, perturbés et aberrants ont été écartés. FlowClean (v1.36) a été utilisé pour enlever les événements à ces problèmes d'acquisition. 3) Les événements cellulaires restants ont été normalisés canal par canal et par cohorte entière à l'aide de GaussNorm sous flowStats (v4.10), conduisant à plusieurs alignements de régions à haute densité dans chaque canal. Le paramètre « Min pics » a été ajusté en fonction du nombre de pics de densité pour chaque canal ; 3) Les cellules mortes et les « doublets » ont été éliminés avec un blocage préliminaire approprié ; 4) En fonction de l'ensemble de données (MDSC ou LT), des stratégies de déclenchement semi-automatiques ont été développées à partir de plusieurs outils disponibles dans les packages R openCyto (v2.10.1) et flowWorkspace (v4.10.1, via Bioconductor). L'analyse était principalement basée sur une succession de fenêtrage défini automatiquement par les paramètres les plus adaptés. 5) Les sous-populations de LT préanalysé (CD3<sup>+</sup>) et MDSC (HLA-DR<sup>-</sup> LIN<sup>-</sup>) ont ensuite été analysées à l'aide d'algorithmes non supervisés tels que le t-SNE (v0.16). Le regroupement hiérarchique, intègre des comparaisons de l'expression des marqueurs entre les groupes biologiques. Nous distinguons ainsi 16 sous-populations de LT et 3 sous-populations de MDSC. Voici la nomenclature simplifiée dans les figures :

- 1= CD4<sup>+</sup> naïve T cells (T<sub>N</sub>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>),
- 2= CD4<sup>+</sup> central memory T cells (T<sub>CM</sub>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup>),
- 3= CD4<sup>+</sup> effector memory (T<sub>EM</sub>, CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>),
- 4= CD4<sup>+</sup> terminal effectors (T<sub>EMRA</sub> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup>),
- 5= CD8<sup>+</sup> naïve T cells (T<sub>N</sub>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>),

6= CD8+ central memory T cells ( $T_{CM}$ , CD3+CD8+CD45RA- CCR7+),  
7= CD8+ effector memory ( $T_{EM}$ , CD3+ CD8+ CD45RA-CCR7-),  
8= CD8+ terminal effectors ( $T_{EMRA}$  CD3+ CD8+ CD45RA+ CCR7-),  
9= CD4-CD8- naïve T cells ( $T_N$ , CD3+CD4-CD8-CD45RA+CCR7+),  
10= CD4-CD8- central memory T cells ( $T_{CM}$ , CD3+CD4-CD8-CD45RA- CCR7+),  
11= CD4-CD8- effector memory ( $T_{EM}$  CD3+ CD4-CD8-CD45RA-CCR7-),  
12= CD4-CD8- terminal effectors ( $T_{EMRA}$  CD3+ CD4-CD8-CD45RA+ CCR7-),  
13= CD4+CD8+ naïve T cells ( $T_N$ , CD3+CD4+CD8+CD45RA+CCR7+)  
14= CD4+CD8+ central memory T cells ( $T_{CM}$ , CD3+CD4+CD8+CD45RA- CCR7+),  
15= CD4+CD8+ effector memory ( $T_{EM}$  CD3+ CD4+CD8+CD8-CD45RA-CCR7-),  
16= CD4+CD8+ terminal effectors ( $T_{EMRA}$  CD3+ CD4+CD8+CD45RA+ CCR7-).  
MDSC : Lin-, HLA-DR-, CD11b+, CD33+  
M-MDSC: Lin-, HLA-DR-, CD11b+, CD33+, CD14+, CD15+/-  
G-MDSC: Lin-, HLA-DR-, CD11b+, CD33+, CD14-, CD15+  
e-MDSC: Lin-, HLA-DR-, CD11b+, CD33+, CD14-, CD15-.

Pour faciliter la visualisation des données, une « heat map » permettant de comparer la reconstitution immunitaire des 16 sous-types de LT en fonction du devenir du patient (rechute précoce post-greffe ou non) a été réalisée à partir de ComplexHeatmap (v2.14) et les graphiques principaux sous ggplot2 (v3.4). Tous les packages R (v4.2.2) ont été acquis et utilisés via BioConductor (v3.16). Des « heat maps » de corrélation ont été rendues avec corplot (v0.92) sur des décomptes de données fermées.

## II. Etude des propriétés fonctionnelles des MDSC et caractérisation lors de la reconstitution immunitaire post greffe

### A. Tri immunomagnétique des MDSC de moelle osseuse et de sang périphérique

Pour les prélèvements suffisamment riches en cellules, nous procédions à des tests fonctionnels des MDSC sur les cellules non techniques pour le marquage par cytométrie en flux. Un premier tri immunomagnétique HLA-DR (Miltenyi, 130-046-101) est réalisé, puis un second tri immunomagnétique CD14 (Miltenyi, 130-118-906) permettra l'isolation des MDSC HLA-DR<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup>, selon les recommandations du procédé Miltenyi. Brièvement, les cellules sont mises en suspension dans 80µL de Buffer pour 10<sup>7</sup> cellules, puis 20µL de microbilles anti-HLA-DR sont ajoutés pour 10<sup>7</sup> cellules. Après une bonne homogénéisation et une incubation pendant 15min à 4°C, les cellules sont lavées en ajoutant 1mL de Buffer et une centrifugation à 300g pendant 5min. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et les cellules sont mises en suspension dans 500µL de Buffer. La fraction négative issue de la colonne magnétique de type LS (Miltenyi, 130-042-401) est collectée. Cette

fraction est soumise au même protocole de tri immunomagnétique en utilisant cette fois-ci 20 $\mu$ L de microbilles anti CD14 pour 10<sup>7</sup> cellules. La fraction CD14<sup>+</sup> est collectée. La viabilité et le nombre de cellules sont ensuite évalués automatiquement avec un appareil de type Bio-Rad TC20™ Automated Cell Counter.

#### B. Contrôle qualité du tri immunomagnétique HLA-DR<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup>

Afin de vérifier la qualité du tri, 50 000 cellules triées sont marquées pendant 15 min à 4°C à l'aide du panel d'anticorps du **Tableau 3**. Après lavage, les cellules sont mises en suspension dans 300 $\mu$ L de Buffer, et sont analysées en cytométrie en flux (Gallios, Beckman-Coulter®).

#### C. Etude des propriétés immunosuppressives des MDSC *in vitro*

Les MDSC issues de sang périphérique ou de la moelle osseuse de patients, préalablement triées, sont mises en coculture avec des LT CD3<sup>+</sup> issus de sang périphérique de donneurs sains (les expérimentations ont été réalisées avec les LT du donneur de CSH, HLA compatible avec les MDSCs du receveur triées en post-greffe ou avec des LT de donneur en tierce partie non HLA identique, avec des résultats comparables). Les LT sont marqués par de l'ester succinimidyle de carboxyfluorescéine qui est un colorant de coloration cellulaire fluorescent, nommé CFSE, afin de pouvoir suivre leur prolifération par la dilution du CFSE en cytométrie en flux (l'intensité du marquage CFSE est divisé par deux pour chaque division cellulaire). Puis les lymphocytes T sont activés soit avec des microbilles ou des anticorps préalablement déposés au fond du puits de culture, de type anti-CD3 et anti-CD28. L'étude des propriétés immunosuppressives des MDSC s'est fait en calculant le ratio de prolifération qui correspond au nombre de LT activés entrés en prolifération obtenus en coculture avec des MDSC, divisé par le nombre de LT activés entrés en prolifération uniquement par l'activation anti-CD3, anti-CD28 (sans MDSC). Ainsi, les MDSC sont affirmées immunosuppressives lorsque le ratio de prolifération est inférieur à 1.

##### 1. Tri et marquage CFSE des LT

Les cellules sont mises en suspension à la concentration de 10<sup>7</sup> cellules pour 40 $\mu$ L de Buffer puis marquées par 10 $\mu$ L de Pan T cell Biotin-Antibody Cocktail (Miltenyi, ref 130-096-535) pendant 5min à 4°C. Après l'incubation, 30 $\mu$ L de Buffer sont ajoutés pour 10<sup>7</sup> cellules associé à 20 $\mu$ L de Pan T Cell Microbead Cocktail pour 10<sup>7</sup> cellules, et sont de nouveau incubées à 4°C pendant 10min. Après avoir complété le volume total de la suspension cellulaire à 500 $\mu$ L, les cellules sont passées dans une colonne LS préalablement activée par 3mL de Buffer, et la fraction éluée correspond aux LT CD3<sup>+</sup>. Trois lavages de la colonne par 3mL de Buffer sont réalisés pour récupérer la totalité des LT CD3<sup>+</sup>, et ces derniers sont comptés via le compteur automatique.

Les LT CD3<sup>+</sup> obtenus sont marqués avec du CFSE (BD Biosciences, ref : 565082) à une concentration finale de 0,02mM, et incubés 10min à 37°C. Les cellules marquées sont ensuite lavées successivement à deux reprises avec du milieu RPMI froid. A la fin des deux lavages, les cellules sont mises en suspension à la concentration de 50 000 LT CD3<sup>+</sup> pour 100µL de milieu RPMI complété sans SVF.

## 2. *Activation des LT CD3<sup>+</sup>*

L'activation des LT CD3<sup>+</sup> par les Ac anti-CD3 et anti-CD28 permet de mimer le premier et le deuxième signal d'activation des LT CD3<sup>+</sup>. 40µL d'Ac anti-CD3 (R&D Systems®, ref : MAB100) et anti-CD28 (R&D Systems®, ref : MAB342), chacun à la concentration de 10µg/mL est déposé au fond d'une plaque 96 puits à fond ronds. Les LT ont également été activés via des microbilles CD3 CD28 à la concentration de 1bille pour 2 LT (Dynabeads™ CD3/CD28, Gibco™, ref : 11161D). La plaque est ensuite placée au minimum deux heures dans un incubateur en normoxie (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% de taux d'humidité). Un lavage avec 100µL de PBS est effectué pour chaque puits après avoir préalablement enlevé les anticorps, puis 50 000 LT CD3<sup>+</sup> marqués au CFSE sont déposés au fond des puits et correspond au contrôle positif (= LT activés seuls). Le contrôle négatif correspond à des LT déposés dans des puits non préparés avec les anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Les cocultures correspondent à l'adjonction de 50 000 cellules d'intérêt (MDSC) aux 50 000 LT activés. A J5 de la coculture, les cellules sont récupérées et marquées avec les Ac de cytométrie : CD4 PE-Cy7 (Clone SK3, BD Biosciences), CD8 PerCpCy5.5 (Clone S1, BD Biosciences), pour analyse par cytométrie en flux (Gallios, Beckman-Coulter®).

L'observation des LT en fin de culture a compris aussi les marqueurs d'apoptose/mort cellulaire. Brièvement, à J5 de coculture, les LT (non préalablement marqués par le CFSE) sont marqués par les anticorps de CMF anti-CD4, -CD8, puis marqués par l'anti-annexine V (Sony, ref 3804725) et du 7-AAD (Sony, ref 2702020) afin de détecter l'apoptose précoce, et l'apoptose tardive / la nécrose.

## 3. *Etude des mécanismes d'action des MDSC*

Dans les différentes co-cultures réalisées nous avons testé les inhibiteurs des principaux mécanismes immunorégulateurs des MDSC décrits dans la littérature. Le L-NMMA acetate (NG-Monomethyl-L-arginine acetate) (Bio-technie, ref 0771/10) inhibiteur de iNOS (synthase inductible de monoxyde d'azote), le Nor NOHA monoacetate (Bio-technie, ref 6370/10) inhibiteur de l'arginase-1, VAS 2870 (Bio-technie, ref 6654/5) inhibiteur de la NADPH oxydase et donc de la production des ROS, anticorps monoclonal bloquant l'IL-10 (Bio-technie, ref AF-217-SP), et anticorps monoclonal anti-TGFβ (Bio-technie, ref MAB1835-SP), respectivement à la concentration de 1mM, 300µM, 10µM, 5µg/mL et 10µg/mL. Par ailleurs, certaines co-cultures ont été réalisées avec des MDSC préalablement incubées avec des alarmines S100A8/S100A9 (Bio-technie, ref 8226-S8-050) à la concentration de 1µg/mL pendant 24 heures, des MDSC préalablement incubées sur la nuit avec du LPS (InvivoGen, ref tlr-

peklps) à la concentration de 10ng/mL puis avec 5mM d'ATP (Abcam, ref ab146525) pendant 1 heure, des MDSC préalablement incubées avec du MCC950 (Sigma-Aldrich, ref 256373-96-3) (Inhibiteur de NLRP3) à la concentration de 1 $\mu$ M pendant 24 heures.

#### D. Etude des propriétés immunosuppressives des MDSC *in vivo*

Afin d'étudier les propriétés immunosuppressives des MDSC *in vivo*, nous avons utilisé le modèle murin NSG (NOD.Cg-Prkdcscidll2rgtm1Wjl/SzJ) de xéno-GvH déjà établie à l'Animalerie du Campus Biologie Santé de Nancy. Les souris sont hébergées dans des portoirs ventilés contenant de l'enrichissement préalablement autoclavé, et reçoivent de l'alimentation irradiée ainsi que de l'eau stérile. La procédure de mise à mort des souris est l'asphyxie au CO<sub>2</sub>.

Les souris âgées entre 8 et 10 semaines sont irradiées à 2 Gray par une source de rayons X à J-1. Le jour de la transplantation, une injection de 5 millions de PBMC d'un seul donneur volontaire sain est réalisée en intraveineuse dans une veine caudale. Afin d'évaluer les propriétés de nos cellules d'intérêt, 1 million de MDSC sont co-injectées aux PBMC. Une expérimentation est donc composée d'un groupe contrôle recevant 5.10<sup>6</sup>, et de deux groupes expérimentaux : un groupe recevant 5.10<sup>6</sup> PBMC humains + 1.10<sup>6</sup> MDSC connues pour être immunosuppressives *in vitro* ou 10<sup>6</sup> MDSC connues pour être non immunosuppressives *in vitro*.

Les critères de jugement de l'alloréactivité chez la souris transplantée sont le poids et les signes cliniques de GvH présentés dans le **Tableau 5**, évalués tous les jours. A la fin de l'expérimentation, la peau, le foie, ainsi qu'une partie du tube digestif (estomac et colon) sont prélevés pour une analyse histologique. Les points limites entraînant l'arrêt de l'expérimentation sont un score de sévérité clinique de GvH supérieur ou égal à 3, la survenue d'effets indésirables inattendues, la durée de l'expérimentation supérieure à deux mois post-greffe.

Tableau 5: Critères d'évaluations du score clinique de GvH.

Score	0	1	2	3	4	5
<b>Aspect de la fourrure</b>	0	0,5	1	2		
<b>Voissure dorsale</b>	0	0,5	1	2		
<b>Inflammation oculaire</b>	0	0,25	0,5	1	1,5	2
<b>Perte d'activité</b>	0	0,25	0,5	1		
<b>Diarrhée</b>	0	0,25				
	0	<10%	<25%	<50%	>50%	

Alopécie	0	0,25	0,5	0,75	1	
% de surface cutanée érythémateuse	0	0,25	0,5	0,75	1	

L'analyse de Log-rank (Mantel-cox) a été utilisée pour l'analyse de survie des différents groupes, et le test de Mann-Whitney permet une analyse statistique de la perte de poids au sein des différents groupes.

#### E. Dosage de la production de ROS intra-cellulaire

Pour évaluer la production de ROS intra-cellulaire des MDSC, nous avons utilisé la sonde Carboxy-H2DCF-DA. Après pénétration dans la cellule, la sonde est rapidement réduite par les estérases intracellulaires sous forme H2DCF qui est un indicateur des dérivés réactifs de l'oxygène non fluorescents, puis cette molécule est oxydée par des radicaux en DCF (dichlorofluorescéine) qui fluorescent en vert. Les cellules sont marquées pendant 30 minutes dans du milieu RPMI 1640 sans SVF comprenant 5µM de sonde Carboxy-H2DCF-DA, puis deux lavages successifs avec 1mL de PBS sont réalisés. Une fois les cellules mises en suspension dans 300µL de PBS, elles sont analysées par cytométrie en flux.

#### F. Etude de l'inflammasome NLRP3

L'activation de l'inflammasome NLRP3 peut s'appréhender par l'évaluation de cellules positives à la fois pour NLRP3 (Miltenyi, clone REA668, ref 130-111-209) et IL-1β (Miltenyi, clone REA1172, ref 130-120-952) intra-cellulaire par cytométrie en flux (Gallios, Beckman-Coulter®). Une partie de MDSC triées ont été marquées avec le panel MDSC membranaire, puis ont été marquées avec les Ac NLRP3 et IL-1β en intracellulaire. Cette approximation peut être renforcée par l'observation d'agrégats d'ASC en cytométrie en flux. La formation de l'inflammasome implique une très forte relocalisation des protéines impliquées dans ce complexe, dont fait partie la protéine adaptatrice ASC. Lorsque l'inflammasome est inactif, ASC est disséminé dans la totalité de la cellule, lors de l'activation elle est relocalisée en un seul point. Ce changement de distribution peut être observé par cytométrie en flux avec une diminution de la largeur ou une augmentation de la hauteur de l'impulsion de fluorescence émise. Pour se faire, les cellules sont marquées par le panel MDSC membranaire, ainsi que l'Ac ASC (Bio-technie, ref NBP1-78977), avant d'être analysées par cytométrie en flux (BD Biosciences FACSymphony™ A3 Cell Analyzer).

## G. Etude du microenvironnement cytokinique

Dans le but d'étudier les cytokines sécrétées par les MDSC lors des cocultures avec les LT activés, mais également d'étudier le microenvironnement cytokinique dans lequel évoluent les MDSC chez le receveur, nous avons dosé des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des cytokines anti-inflammatoires via le test « Procartaplex » de Invitrogen. Ces tests immunologiques reposent sur des panels de réactifs à billes magnétiques à base d'anticorps pour la quantification des protéines à l'aide de l'instrument Luminex. Deux panels ont été établis. Le panel 1 du **Tableau 6** permet d'explorer les cytokines des surnageants de coculture MDSC / LT activés, dans le but d'étudier les mécanismes d'action des MDSC décrits dans la littérature. Le panel 2 du **Tableau 6** permet d'étudier les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires décrites dans la littérature des SMD et après allogreffe de CSH. Les cytokines ont été analysées sur un Luminex 200 (Luminex, CHRU Nancy).

**Tableau 6: Panels cytokiniques étudiés dans les surnageants de coculture MDSC / LT activés, ou dans le sang périphérique et la moelle osseuse des patients.** HGF (hepatic growth factor), HMGB1 (high mobility group box 1), LAP (latency-associated peptide)

Panel 1 : Surnageants de coculture	Panel 2 : Sang périphérique / moelle osseuse
<b>S1008A/S100A9</b>	S1008/S100A9
<b>IL1<math>\alpha</math></b>	IL1 $\alpha$
<b>HGF</b>	IFN $\alpha$
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	IFN $\gamma$
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	IL1RA
<b>IL1RA</b>	IFN $\beta$
<b>IL12p70</b>	LAP (TGF $\beta$ )
<b>IL10</b>	IL10
<b>CXLCL8</b>	IL7
<b>IL6</b>	IL4
<b>CXCL10</b>	IL1 $\beta$
<b>IL4</b>	IL2
<b>IL2</b>	
<b>IL1<math>\beta</math></b>	

<b>IDO</b>	
<b>LAP (TGFB)</b>	
<b>HMGB1</b>	

## H. Etude de l'impact des CSM sur les MDSC

### 1. *Isolation et culture des CSM*

Les CSM utilisées sont obtenues via des prélèvements de moelle osseuse de patients atteints de SMD/LAM traités au CHRU de Nancy, ou alors de contrôles « sains » provenant de la COTA (Chirurgie orthopédique, traumatologique et arthroscopique). Tout d'abord nous procédons à une lyse des globules rouges par une solution Leucoplate (Sobioda, ref 3101.002). Entre 4 et 6 millions de cellules totales prélevées sontensemencées en flasque T75 (Corning, ref 430641U), dans du milieu alpha MEM (Lonza, ref BE12- 169F) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma-Aldrich®, ref : A2153-1KG), 1% pénicilline/Streptomycine, amphotéricine B à 2,5 µg/ml et glutamine à 2 mM. Les CSM adhèrent naturellement au plastique de la flasque T75 ce qui permet de les isoler des autres cellules. Les CSM sont trypsinées lorsqu'elles atteignent 70 à 80% de confluence afin de réaliser un passage soit environ 15 jours après leur extraction. Brièvement, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS afin d'éliminer les potentiels inhibiteurs de la trypsine présents dans le lysat plaquettaire. Une fois lavées, une solution de trypsine/EDTA à 0,025% (Gibco, ref 25300-054) est ajoutée puis les cellules sont mises dans l'incubateur 5 minutes, le temps que la trypsine fasse effet. Une fois décollées de la surface plastique, les CSM sont récupérées après l'ajout de milieu complet afin d'inhiber l'effet de la trypsine puis centrifugées à 300g pendant 5min ce qui va permettre ensuite d'éliminer la solution de trypsine/EDTA et de reprendre le culot cellulaire dans du milieu complet. Les CSM sont ensuite comptées puisensemencées à une densité de 1000 cellules par cm<sup>2</sup> dans une boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup> (passage 1) et mises dans l'incubateur. Le milieu de culture est changé tous les 2-3 jours. Les CSM sont utilisées dans les expérimentations jusqu'à P2.

### 2. *Culture des CSM avec des MDSC de patients SMD*

Les MDSC de patients SMD et les CSM de patients SMD mais aussi de donneurs sains sont co-cultivées pendant 24h dans des puits d'une plaque de 96 puits, à la concentration 50 000cellules/100µL pour chaque population cellulaire (200µL total/puits). Au bout de 24h, les MDSC sont mises en suspension et lavées à deux reprises avec 4mL de PBS. Une fois les MDSC lavées, elles sont reprises dans du milieu RPMI 1640 complet à la concentration de 50 000/100µL, et sont mises en coculture avec les LT activés comme décrit dans la partie II.C.2.

## I. Single cell

L'analyse transcriptomique en Single Cell permet d'obtenir la signature transcriptomique à l'échelle cellulaire. Ainsi, l'analyse en Single Cell a pour but de déterminer le transcriptome des MDSC de PBMC totaux de 3 patients en rechute, et de 3 patients sans rechute. Le jour de l'arrivée du prélèvement, 1 million de PBMC est congelé dans du milieu de congélation Cryostor (Stem Cell Technologies, ref 07931) destiné à préserver une bonne viabilité cellulaire des cellules myéloïdes après décongélation. Les cellules sont stockées dans de l'azote liquide à  $-180^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour de l'expérimentation. Afin de pouvoir cibler nos cellules d'intérêts parmi les PBMC, les cellules sont marquées avec des « Ab-Seq » qui correspondent à des Ac extra-cellulaires spécifiques des antigènes de nos cellules d'intérêts, couplés à des séquences d'ARN prédéterminées qui seront séquencées. Une cellule marquée par les Ab-Seq est déposée dans un puit d'une plaque spécifique à l'aide d'un système d'aimant et de fluide, puis une bille magnétique unique capture les queues poly-A des transcrits de la cellule et des Ab-Seq après une étape de lyse cellulaire. Les ARN sont convertis en ADNc et les bibliothèques sont réalisées par des étapes successives de PCR, pour être séquencées.

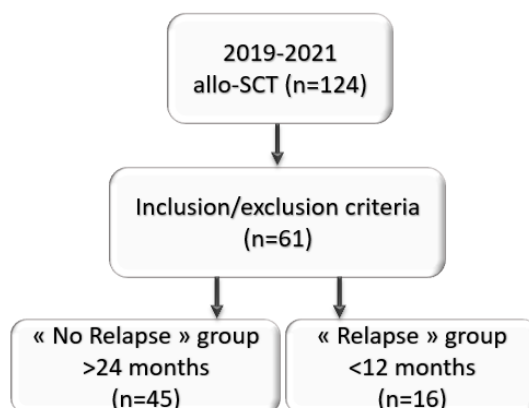
Malheureusement, lors de la décongélation de nos échantillons et malgré l'utilisation du Cryostor afin d'obtenir la meilleure viabilité cellulaire après décongélation, le pourcentage de viabilité obtenu ne nous a pas permis de réaliser les expérimentations de Single Cell Sequencing. Afin de palier à ce problème, un kit Dead Cell Removal (Miltenyi, ref 130-090-101), a été commandé afin d'obtenir une population cellulaire avec un bon pourcentage de viabilité nous permettant de réaliser les expérimentations de Single Cell. Elles seront réalisées dès la réception du kit.

## Résultats

### I. Etude de la reconstitution immunitaire lymphoïde et myéloïde post greffe

#### A. Cohorte d'étude

De décembre 2017 à octobre 2021, la reconstitution immunitaire lymphoïde et myéloïde de 61 patients atteints de SMD/LAM allogreffés au CHRU de Nancy a été étudiée prospectivement dans la moelle osseuse ainsi que dans le sang périphérique par cytométrie en flux. Des prélèvements réalisés au cours des 6 premiers mois post-greffe ont été analysés afin de décrire une signature immunitaire précoce et spécifique de la rechute (J28, J60, J90, J180) via des analyses supervisées et non supervisées. Afin d'éviter l'hétérogénéité des paramètres en lien avec la greffe, nous avons uniquement sélectionné les patients ayant reçu une allogreffe HLA identique 10/10 (phéno-identique et géno-identique) avec le même conditionnement (association de fludarabine et busulfan), ainsi qu'une même prophylaxie de la GVH. Au sein de cette cohorte, 16 patients étaient classés dans le groupe de rechute précoce (c'est-à-dire rechute de l'hémopathie dans l'année qui suit l'allogreffe) dit « R » groupe et comparé au « NR » groupe constitué de patients sans rechute de l'hémopathie dans les deux ans post-greffe.



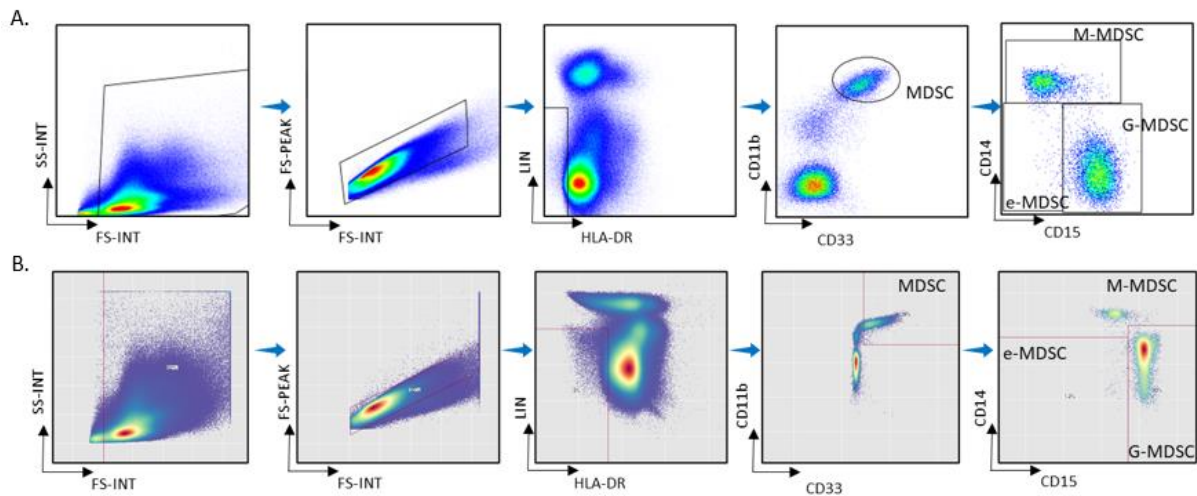
**Figure 16: Cohorte d'étude.** 61 patients comprenant 16 rechutes et 45 non rechute ont été inclus au sein de la cohorte.

**Tableau 7: Caractéristiques des patients.** LAM (Leucémie aigüe myéloïde), SMD (Syndrome myélodysplasique), RC (Rémission complète), RP (Rémission partielle)

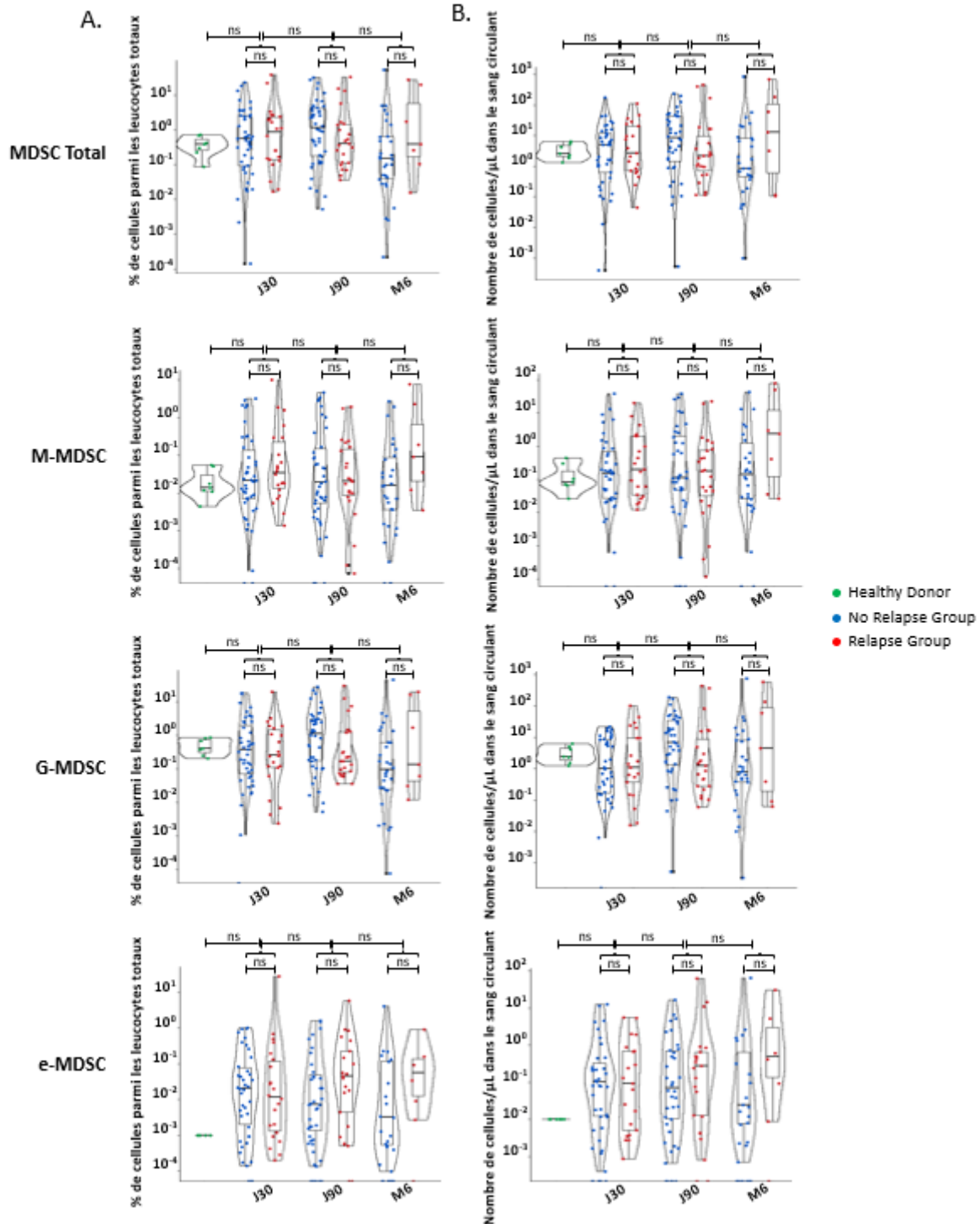
Paramètres	Sans Rechute (n=45)	Rechute (n=16)
<b>Médiane d'âge à la greffe, années (Ecart)</b>	59ans (19-71)	58ans (19-70)
<b>Maladie (n, %)</b>		
LAM	31 (72.73)	15 (82.34)
SMD	12 (27.27)	3 (17.76)

<b>Statut de la maladie à la greffe (LAM)</b>		
RC1	25 (56.81)	8 (47.05)
RC2	7 (16.63)	5 (23.52)
Non en RC	1 (2.27)	2 (11.76)
<b>Pronostic cytogénétique de la LAM au moment du diagnostic</b>		
Bon	5 (11.36)	2 (11.76)
Intermédiaire	17 (38.63)	6 (35.29)
Mauvais	10 (22.72)	5 (25.41)
Inconnu	0 (0)	1 (5.88)
<b>Statut de la maladie à la greffe (SMD)</b>		
RC	5 (11.36)	3 (17.64)
RP	4 (9.09)	0 (0)
Maladie stable	3 (6.81)	0 (0)
Maladie progressive	0 (0)	0 (0)
<b>Pronostic cytogénétique du SMD au moment du diagnostic</b>		
Très bon	0 (0)	0 (0)
Bon	7 (15.90)	0 (0)
Intermédiaire	1 (2.27)	0 (0)
Mauvais	1 (2.27)	0 (0)
Très mauvais	3 (6.81)	3 (17.64)

B. Analyses de la reconstitution en MDSC post greffe



**Figure 17: Stratégies d'analyse en cytométrie en flux des MDSC en méthodes supervisée et non supervisée. A) Analyse supervisée des cellules. B) Analyse non supervisée des cellules.** La première fenêtre correspond à l'analyse de la taille et structure du produit cellulaire. La seconde correspond à l'élimination des doublets. Une fois les doublets éliminés, nous sélectionnons les cellules HLA-DR<sup>-</sup> LIN<sup>-</sup> (CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup>). Ensuite, nous isolons les MDSC à l'aide de la coexpression des marqueurs CD33<sup>+</sup> et CD11b<sup>+</sup>, pour finalement différencier les 3 sous populations qui sont les M-MDSC (CD14<sup>+</sup> CD15<sup>-</sup>), G-MDSC (CD14<sup>-</sup> CD15<sup>+</sup>) et e-MDSC (CD14<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>).



**Figure 18: Reconstitution immunitaire dans le sang des sous populations de MDSC en fonction de la survenue de la rechute dans les 6 mois post-greffe.** A) Pourcentage des MDSC au sein des leucocytes totaux (CD45+), chez des contrôles sains (vert), chez les receveurs d'allo-HSCT sans rechute précoce (bleu) vs les receveurs d'allo-HSCT en rechute précoce (rouge). B) Nombre de MDSC circulantes chez des contrôles sains (vert), receveurs d'allo-HSCT sans rechute précoce (bleu) vs receveurs d'allo-HSCT en rechute précoce (rouge).

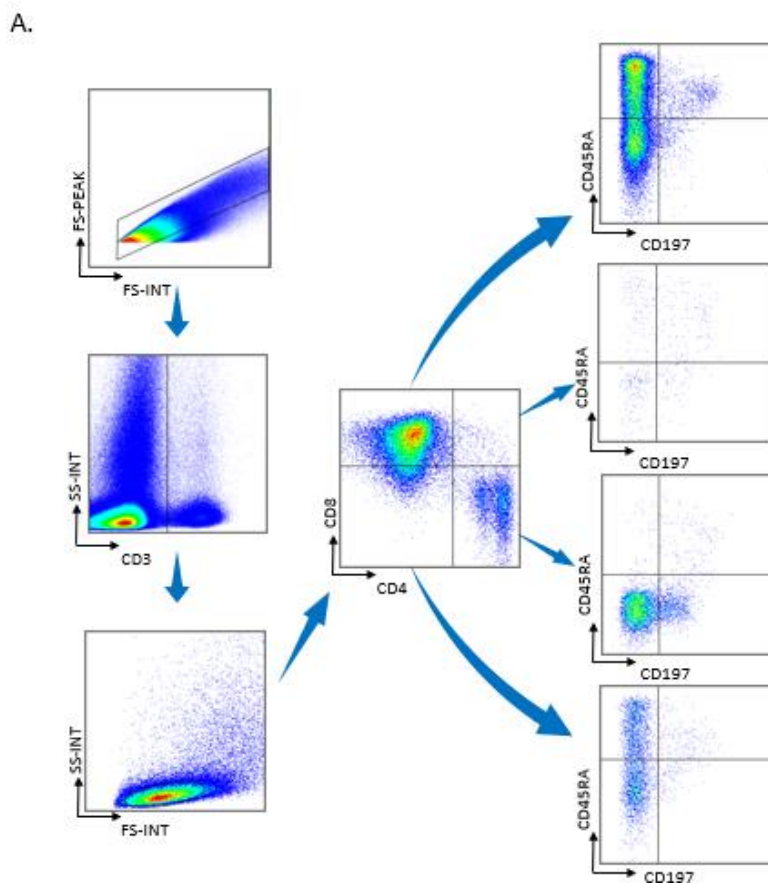
Pour les MDSC totales, nous observons 0.40% +/- 0.08% chez les donneurs sains ; 3.70% +/- 1.92%, 3.36% +/- 1.61% et 7.11% +/- 4.36% chez les patients en rechute ainsi que 2.44% +/- 0.71%, 4.11% +/- 1.12% et 2.52% +/- 1.74% chez les patients non en rechute à J30, J90 et M6 respectivement. Pour les M-MDSC, nous observons 0.02% +/- 0.007% chez les donneurs sains ; 0.69% +/- 0.45%, 0.21% +/- 0.10% et 1.46% +/- 1.07% chez les patients en rechute, ainsi que 0.34% +/- 0.12%, 0.47% +/- 0.16% et 0.23% +/- 0.11% chez les patients non en rechute à J30, J90 et M6 respectivement. Pour les G-MDSC, nous observons 0.51% +/- 0.10% chez les donneurs sains ; 1.64% +/- 0.91%, 2.73% +/- 1.42% et 5.47% +/- 3.30% chez les patients en rechute ainsi que 1.96% +/- 0.61%, 3.49% +/- 0.95% et 2.13% +/- 1.51% chez les patients non en rechute à J30, J90 and M6, respectivement.

Pour les e-MDSC, nous observons 0.001% +/- 0.001% chez les donneurs sains, 1.36% +/- 0.26%, 0.40% +/- 0.25%, 0.17% +/- 0.12% chez les patients en rechute ainsi que 0.13% +/- 0.04%, 0.14% +/- 0.05%, 0.16% +/- 0.13% chez les patients non en rechute à jour 30, 90 and M6, respectivement.

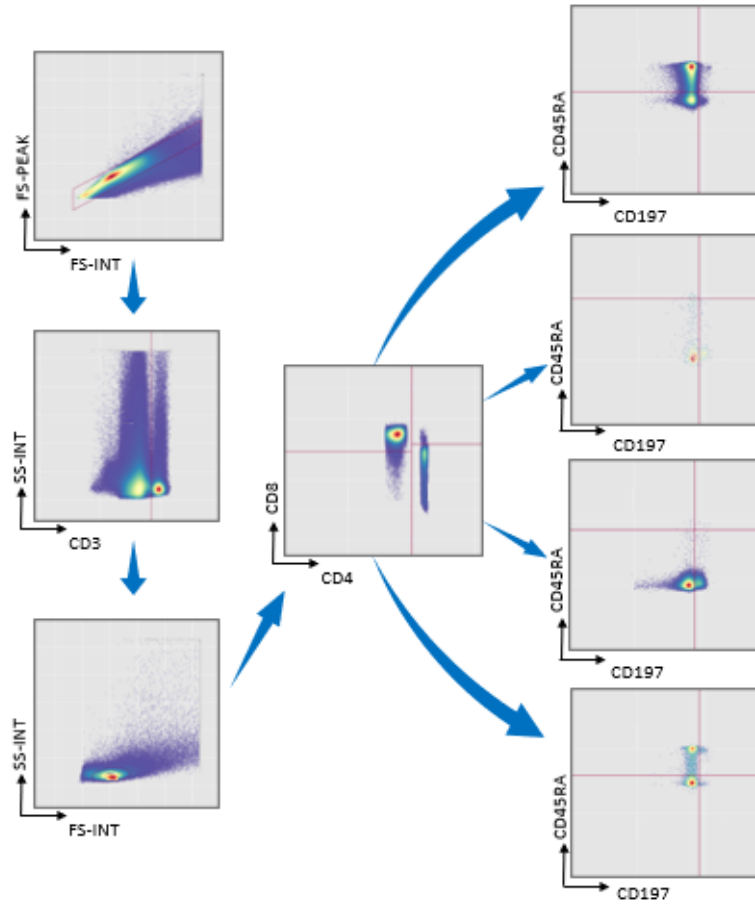
Pour les MDSC totales, nous observons 3.44 +/- 0.73 MDSC/ $\mu$ L dans le sang périphérique chez les donneurs sains ; 14.71 +/- 5.66, 47.33 +/- 25.70 et 134.1 +/- 94.02/ $\mu$ L chez les patients en rechute à J30, J90 and M6, ainsi que 12.42 +/- 4.4, 29.97 +/- 8.05 et 36.02 +/- 28.59 chez les patients non en rechute. Pour les M-MDSC, nous observons 0.15 +/- 0.05 / $\mu$ L dans le sang périphérique chez les donneurs sains ; 2.02 +/- 1.01, 2.18 +/- 1.25 et 19.42 +/- 12.17/ $\mu$ L chez les patients en rechute ainsi que 2.02 +/- 1.00, 3.45 +/- 1.35 et 2.94 +/- 1.59 chez les patients non en rechute à J30, J90 et M6 respectivement. Pour les G-MDSC, nous observons 3.27 +/- 0.72 / $\mu$ L dans le sang périphérique chez les donneurs sains ; 11.83 +/- 5.19, 41.02 +/- 23.82 et 109.4 +/- 78.66 / $\mu$ L chez les patients en rechute ainsi que 4.59 +/- 0.95, 25.45 +/- 6.68 et 30.58 +/- 24.89 chez les patients non en rechute à J30, J90 et M6 respectivement. Pour les e-MDSC, nous observons 0.01 +/- 0.10/ $\mu$ L dans le sang périphérique chez les donneurs sains ; 0.85 +/- 0.35, 4.11 +/- 2.82 et 5.33 +/- 4.34 / $\mu$ L chez les patients en rechute ainsi que 1.00 +/- 0.42, 1.07 +/- 0.46 et 2.50 +/- 2.21 chez les patients non en rechute à J30, J90 et M6, respectivement.

Un des premiers objectifs de cette étude était de comparer la reconstitution des MDSC post greffe dans le sang périphérique des patients en rechute et sans rechute à J30, J90 et M6. En comparant le % des sous populations de MDSC (**Figure 18A**), ainsi que les valeurs absolues (**Figure 18B**), aucune différence significative n'a été mis en évidence concernant la reconstitution des 3 sous populations de MDSC en fonction du statut du receveur (rechute précoce versus pas de rechute précoce). Comme attendu, le pourcentage et le nombre de MDSC circulantes dans le sang de contrôle sain sont quasi nulles, en accord avec le fait que les MDSC émergent dans un contexte clinique particulier.

### C. Analyses de la reconstitution lymphocytaire post greffe



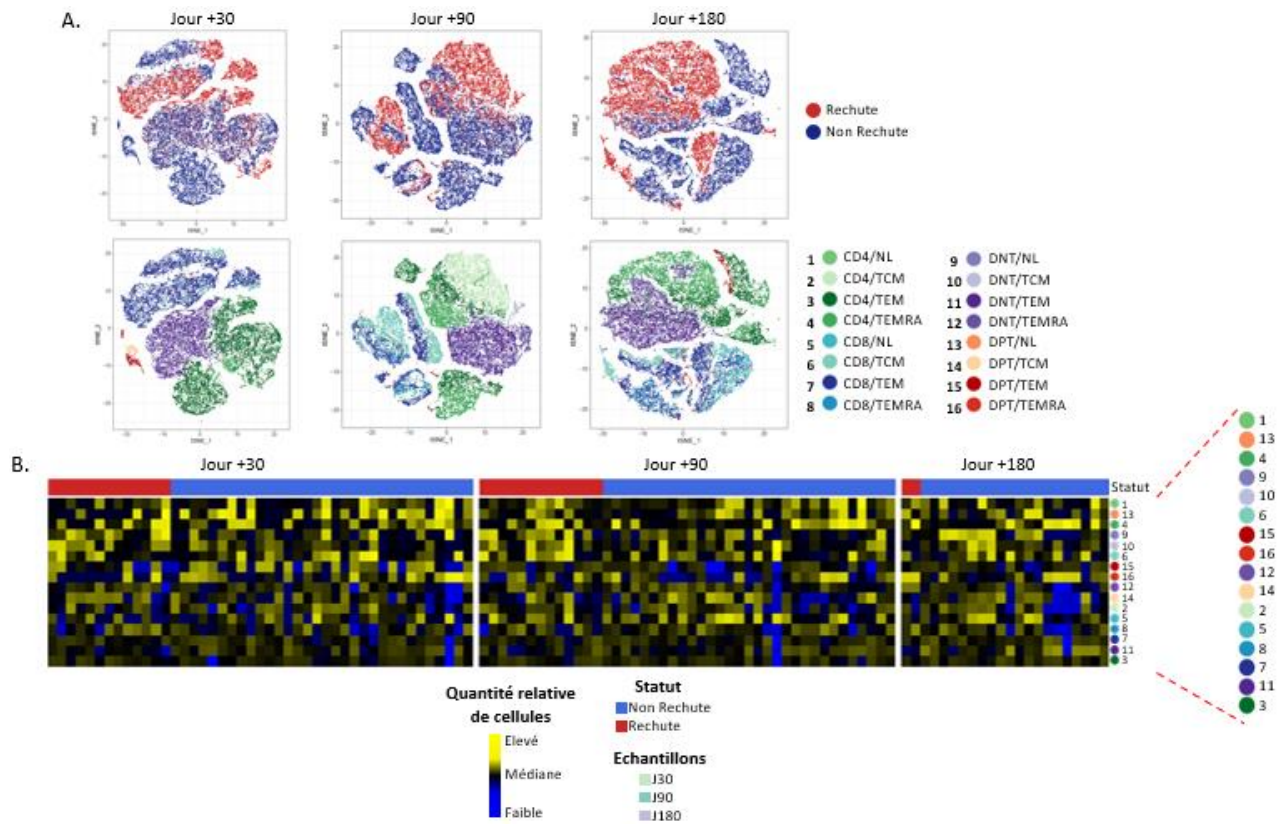
B.



**Figure 19: Stratégies d'analyse en cytométrie en flux des sous populations lymphocytaires en méthodes supervisée et non supervisée.** A) Analyse supervisée des cellules avec un repérage et fenêtrage manuel. B) Analyse non supervisée des cellules avec un repérage et fenêtrage automatique. L'analyse des LT se base sur l'observation de cellules CD3<sup>+</sup>. Nous séparons les LT en 4 sous populations : Les LT CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (Double négatif) ; Les LT CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> (ou LT8) ; Les LT CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> (ou LT4) et les LT CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (Double positif). Dans chacune de ces 4 sous populations nous distinguons les LT naïfs et mémoires. Selon le schéma classique de différenciation d'un LT : les LT naïfs (TN, CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) se différencient en plusieurs sous populations mémoires liées à leur perte progressive de fonction, comprenant les LT centraux mémoire (TCM, CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), les LT effecteurs mémoires (TEM, CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>), et les LT effecteurs mémoires terminaux (TEMRA CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>). Les cellules souches T mémoires (TSCM, CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) sont une sous population qui se différencie directement des T naïfs lors de l'engagement du TCR et conservent la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier hiérarchiquement en toutes les autres cellules T mémoires.

Un des objectifs de cette étude de reconstitution lymphocytaire était de pouvoir identifier une signature immunologique prédictive de la rechute. La **Figure 20A** représente la différenciation lymphocytaire post greffe en 2 dimensions à chaque temps post-greffe. Par la représentation de tSNE, la réduction de complexité nous permet d'identifier sur une seule représentation les 16 sous-populations de lymphocytes T des 61 patients étudiés. Nous observons qu'il n'y a pas de profil lymphocytaire particulier spécifique de la rechute. Néanmoins, l'observation de ces profils lymphocytaires démontrent une très forte orientation de la différenciation lymphocytaire vers les profils LT effecteurs (T<sub>EM</sub> et T<sub>EMRA</sub>). La heat map générée et présentée dans la **Figure 20B**, permet de corrélér l'abondance de chaque sous population lymphocytaire avec le devenir des patients selon deux

groupes « rechute » et « non rechute ». Au sein de notre cohorte, nous observons un profil de reconstitution lymphocytaire à J30, J90 ou J180 assez similaire dans les deux groupes.

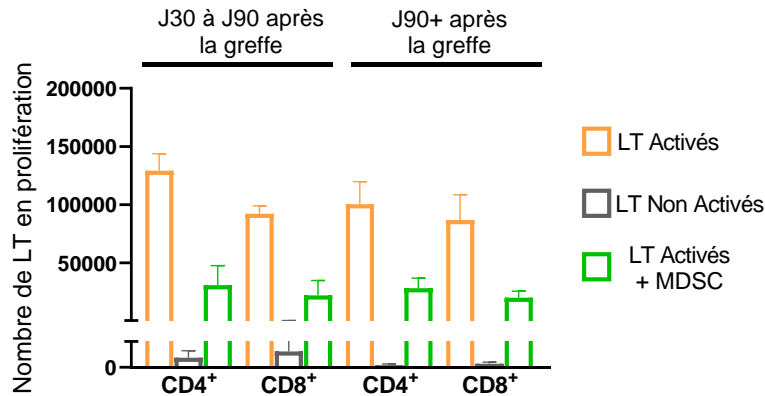


**Figure 20: Reconstitution immunitaire des sous populations de LT dans le sang périphérique dans les 6 premiers mois après une allogreffe de CSH. A)** Analyses tSNE (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding) des sous populations lymphocytaires T naïf like (NL), TCM, TEM et TEMRA, dans le sang périphérique à J30, J90 et J180. Les sous populations lymphocytaires sont similairement étudiées en fonction des groupes rechute (Rouge) ou non rechute (Bleu), ou en fonction de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 (CD4+ ; CD8+ ; Double négatif (DNT) ; Double positif (DPT)) distinguant 16 sous populations numérotées et caractérisées par une couleur. **B)** Heat map des 16 sous populations lymphocytaires circulant dans le sang périphérique à J30, J90 et J180, de 16 patients en rechute, et 45 patients sans rechute, préalablement analysés par cytométrie en flux en fonction de leur profil de différenciation. Statut en rouge correspond au groupe rechute, statut en bleu correspond au groupe non rechute.

## II. Etude des mécanismes immunorégulateurs des MDSC post greffe

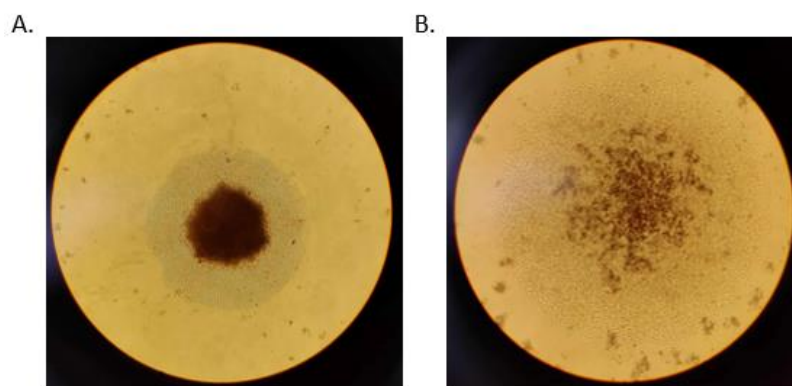
### A. Etude des propriétés immunosuppressives post greffe des MDSC

#### 1. Evaluation des propriétés des MDSC *in vitro*



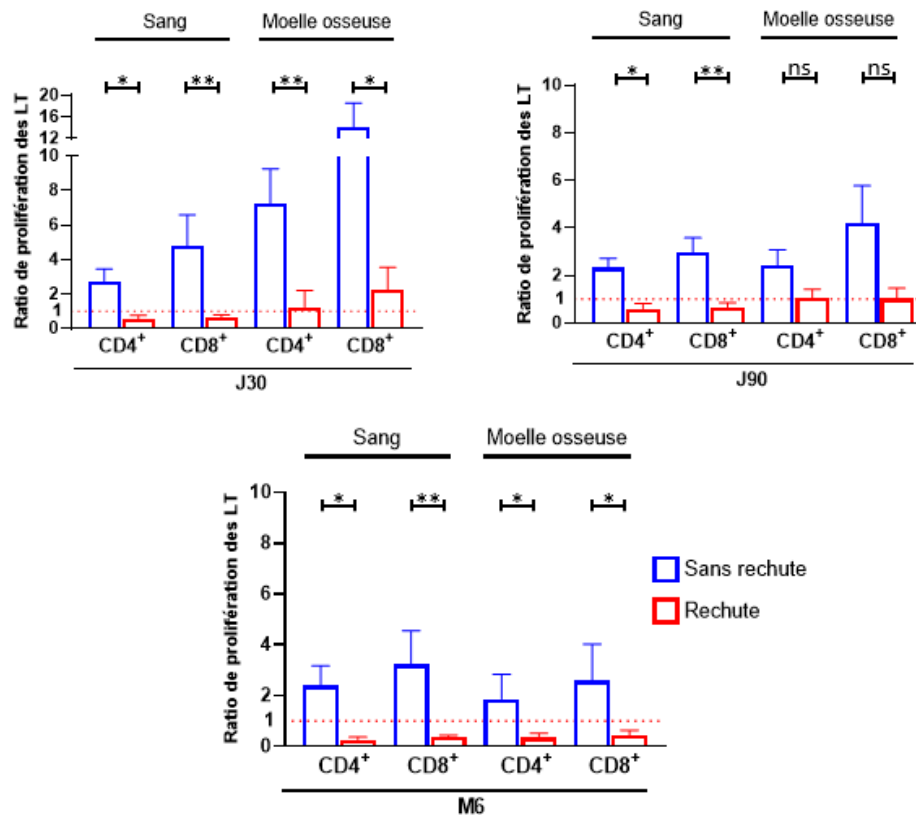
**Figure 21: Activation des lymphocytes par des microbilles CD3/CD28.** Les LT ont été activés puis cultivés seuls, ou en coculture avec des MDSC à un ratio 1 :1 (50 000 LT : 50 000 MDSC). Les MDSC étaient triées à partir de sang périphérique du receveur avant le J90 post greffe (n=4), ou après le J90 post greffe (n=4). Pour les co-cultures réalisées avec les MDSC triées avant le J90 post greffe, les nombres moyens de CD4+ et CD8+ activés seuls (orange) en prolifération sont respectivement de 129 172 +/- 14 559 et 92 065 +/- 6 945, versus 30 812 +/- 16 727 et 22 049 +/- 12 815 en coculture avec des MDSC (vert) (\*p=0.0286). Pour les co-cultures réalisées avec les MDSC triées après le J90 post greffe, les nombres moyens de CD4+ et CD8+ activés seuls en prolifération sont respectivement de 100 255 +/- 19 412 et 86 805 +/- 21 707 versus 28 138 +/- 8 601 et 19 943 +/- 5 585 en coculture avec des MDSC (\*p=0.0286).

L'évaluation des propriétés immunosuppressives des MDSC a été réalisée à l'aide de cocultures de MDSC et de LT activés (issus de PBMC d'un donneur pouvant être HLA identique ou différent). Initialement, les expérimentations ont été réalisées en utilisant des microbilles CD3/CD28 afin d'activer les LT. Nous avons pu observer une importante inhibition de la prolifération des LT CD4+ et des LT CD8+ par les MDSC, sur l'ensemble des prélèvements quel que soit le point post greffe, ainsi que le statut de la maladie.



**Figure 22: Observations au microscope de l'activation des LT en présence de microbilles CD3/CD28.** A) LT activés seuls. Présence des LT activés qui ont proliféré et sédimenté au fond du puit avec les microbilles (en brun). B) LT activés par les microbilles et cultivés avec des MDSC. Absence de la sédimentation des microbilles, répartition beaucoup plus diffuse qui correspond à la séquestration des microbilles par les MDSC.

Néanmoins, comme présenté par la Fig22, l'observation au microscope des LT activés par les microbilles révèle une probable séquestration des microbilles CD3/CD28 par les MDSC, qui empêche la sédimentation des billes au fond des puits et donc l'activation des LT. Ainsi, l'inhibition de prolifération des LT observée était due à un défaut d'activation des LT, plutôt que par l'action des MDSC. Afin de pallier à ce problème, nous avons par la suite réalisé l'activation lymphocytaire par une pré-incubation du fond des puits de la plaque de culture par des Ac anti-CD3 et anti-CD28.

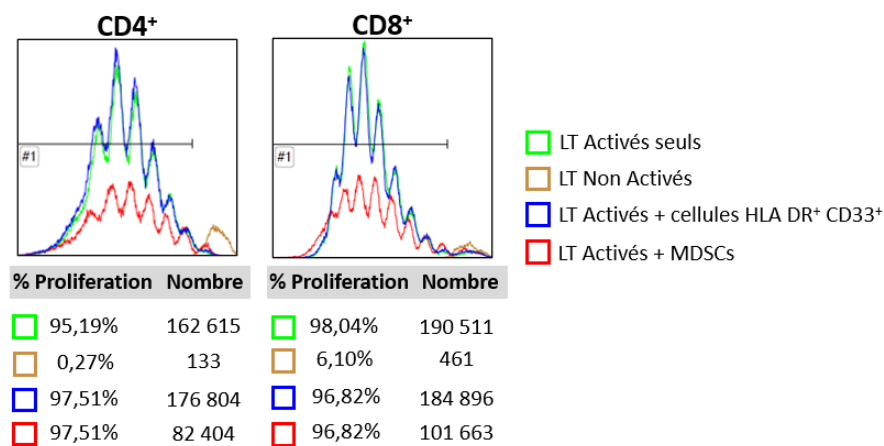


**Figure 23: Etude in vitro des propriétés des MDSC issues de patients sans rechute précoce (bleu) versus en rechute précoce (rouge).** Les LT ont été activés par des Ac anti CD3/CD28. Le Ratio de prolifération correspond au nombre de LT entrés en prolifération lors d'une coculture avec des MDSC, divisé par le nombre de LT entrés en prolifération lorsqu'ils sont activés seuls (sans MDSC). Les MDSC sont triées à partir de prélèvements sanguins réalisés à J30, J90 ou M6 post greffe avec un ratio LT : MDSC de 1 : 1. Les MDSC sont dites immunosuppressives lorsqu'un ratio de prolifération est inférieur à 1. A J30, les ratios de prolifération des LT CD4+ cultivés avec des MDSC de sang périphérique sont de 2.74 +/- 0.70 dans le groupe sans rechute (n=13) versus 0.53 +/- 0.21 dans le groupe rechute (n=3) (\*p=0.0143) et 4.76 +/- 1.81 vs 0.67 +/- 0.12 pour les LT CD8+ (\*\*p=0.0036). A J30, les ratios de prolifération des LT CD4+ cultivés avec des MDSC de moelle osseuse sont de 7.24 +/- 2.00 dans le groupe sans rechute (n=10) versus 1.22 +/- 0.96 dans le groupe rechute (n=5) (\*\*p=0.0080) et 14.09 +/- 4.48 vs 2.21 +/- 1.32 pour les LT CD8+ (\*p=0.0400).

A J90, les ratios de prolifération des LT CD4+ cultivés avec des MDSC de sang périphérique sont de 2.31 +/- 0.39 dans le groupe sans rechute (n=15) versus 0.59 +/- 0.22 dans le groupe rechute (n=3) (\*p=0.0172) et 2.95 +/- 0.62 vs 0.66 +/- 0.19 pour les LT CD8+ (\*\*p=0.0098). A J90, les ratios de prolifération des LT CD4+ cultivés avec des MDSC de moelle osseuse sont de 2.41 +/- 0.66 dans le groupe sans rechute (n=9) versus 1.03 +/- 0.38 dans le groupe rechute (n=5) (p=0.1194) et 4.21 +/- 1.55 vs 1.024 +/- 0.44 pour les LT CD8+ (p=0.1194).

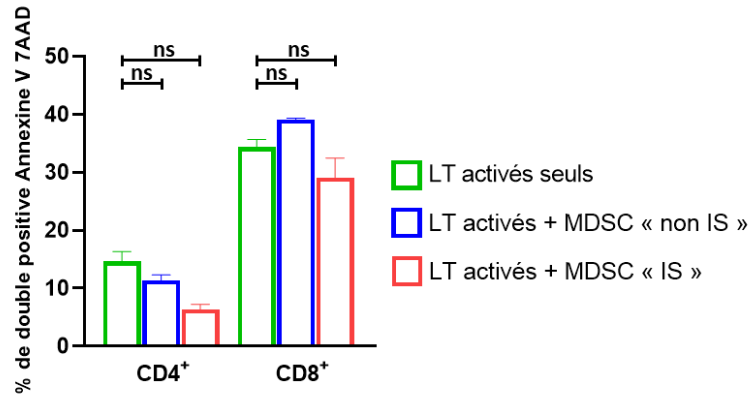
A M6, les ratios de prolifération des LT CD4+ cultivés avec des MDSC de sang périphérique sont de 2.38 +/- 0.79 dans le groupe sans rechute (n=16) versus 0.27 +/- 0.09 pour le groupe rechute (n=3) (\*p=0.0144) et 3.32 +/- 1.32 vs 0.35 +/- 0.08 pour les LT CD8+ (\*\*p=0.0041). A M6, les ratios de prolifération des LT CD4+ cultivés avec des MDSC de moelle osseuse sont de 1.87 +/- 0.97 dans le groupe sans rechute (n=9) versus 0.33 +/- 0.17 dans le groupe rechute (n=5) (\*p=0.0290) et 2.59 +/- 1.43 vs 0.43 +/- 0.20 pour les LT CD8+ (\*p=0.0120).

Globalement, on observe que les MDSC issues de patients sans rechute précoce ne sont pas capables d'inhiber (voire augmentent) la prolifération des LT activés (ratios supérieurs à 2). A l'inverse, les MDSC issues du sang périphérique de patients en rechute précoce, sont dotées de propriétés immunosuppressives avec des ratios de prolifération strictement inférieurs à 1 sur l'ensemble des temps post-greffe. A noter que les propriétés immunosuppressives des MDSC issues de moelle osseuse des patients en rechute précoce sont moins évidentes à J30 et J90, avec respectivement des ratios de 1.22 +/- 0.96 et 2.21 +/- 1.32 pour les CD4<sup>+</sup> et les CD8<sup>+</sup> et de 1.03 +/- 0.38 et 1.02 +/- 0.44 (donc des ratios non strictement inférieurs à 1). Néanmoins, à J180, les MDSC de moelle osseuse de patients en rechute possèdent les mêmes capacités immunosuppressives observées dans le sang périphérique avec des ratios strictement inférieurs à 1.



**Figure 24:** Exemple d'analyse par cytométrie en flux des capacités immunosuppressives des MDSC. Le marquage CFSE permet d'évaluer le nombre de LT en prolifération (calcul de l'aire sous la courbe de chaque pic de division). Dans cet exemple, nous observons 162 615 avec 95.19% LT CD4<sup>+</sup> en prolifération, et 190 511 avec 98.04% LT CD8<sup>+</sup> en prolifération lorsque les LT sont activés seuls. En coculture avec les MDSC, nous observons 82 404 avec 97.51% LT CD4<sup>+</sup> en prolifération et 101 663 avec 96.82% LT CD8<sup>+</sup> en prolifération.

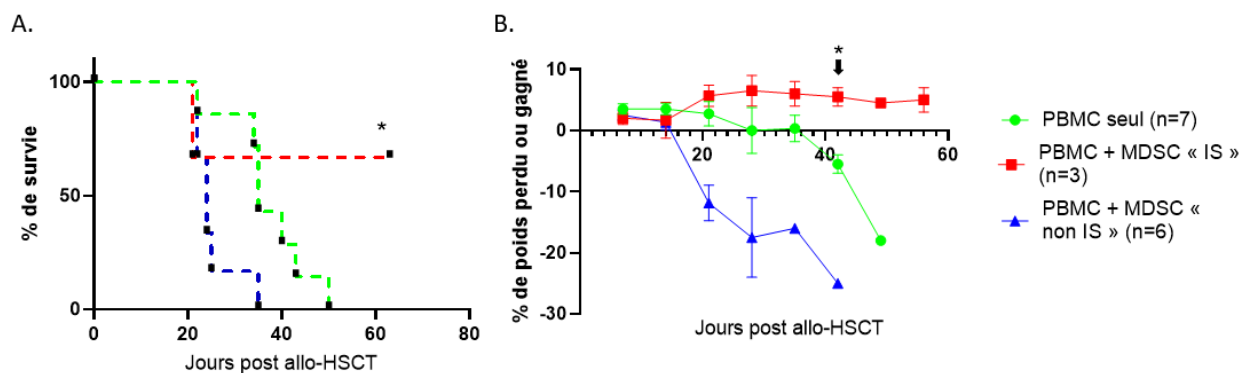
La **Figure 24** est un exemple d'analyse de la prolifération des LT cultivés seuls ou en présence de MDSC. Ici, nous pouvons observer la forte diminution du nombre de LT lorsqu'ils sont cultivés avec les MDSC de patient en rechute en rouge (82 404 pour les CD4<sup>+</sup> et 101 663 pour les CD8<sup>+</sup>) par rapport à l'activation de LT seuls en vert (162 615 pour les CD4<sup>+</sup> et 190 511 pour les CD8<sup>+</sup>). Néanmoins, le marquage CFSE qui nous permet d'estimer le pourcentage de LT en prolifération révèle que les MDSC n'empêchent pas la prolifération des LT malgré leur diminution en nombre.



**Figure 25: Analyses de l'apoptose des LT après coculture.** Observation du pourcentage de LT Annexine V<sup>+</sup> et 7AAD<sup>+</sup> après activation par Ac anti-CD3 et anti-CD28. Les LT sont activés seuls (Vert, n=3), ou en coculture avec des MDSC définies comme non immunosuppressive (par le ratio de prolifération précédemment décrit) « non IS » (Bleu, n=3), ou en coculture avec des MDSC définies comme immunosuppressives « IS » (Rouge, n=3). Nous observons 14,60% +/- 1,74% de LT CD4<sup>+</sup> apoptotiques après activation, vs 11,41% +/- 0,91% pour les LT CD4<sup>+</sup> en coculture avec des MDSC « non IS » (p=0,2000), vs 6,36% +/- 0,87% pour les LT CD4<sup>+</sup> en coculture avec des MDSC « IS » (p=0,1000). Nous observons 34,39% +/- 1,31% de LT CD8<sup>+</sup> apoptotiques après activation, vs 39,12% +/- 0,25% de LT CD8<sup>+</sup> apoptotiques en coculture avec des MDSC « non IS » (p=0,1000), vs 29,12% +/- 3,37% de LT CD8<sup>+</sup> apoptotiques en coculture avec des MDSC « IS » (p=0,4000).

Suite à l'observation de la baisse du nombre de LT en coculture avec des MDSC de patients en rechute, nous avons fait l'hypothèse que les MDSC issues de patients en rechute précoce pouvaient acquérir des propriétés cytotoxiques et ainsi induire plus d'apoptose des LT en co-culture. Afin de tester cette hypothèse, nous avons regardé le pourcentage de LT CD4<sup>+</sup> et de LT CD8<sup>+</sup> apoptotiques en fin de coculture, repérés par l'Annexine V et le 7AAD. Néanmoins le pourcentage de LT apoptotiques en fin de culture est comparable dans toutes les conditions (LT activés seuls, activés avec des MDSC « IS » et activés avec des MDSC « non IS »), (**Figure 25**).

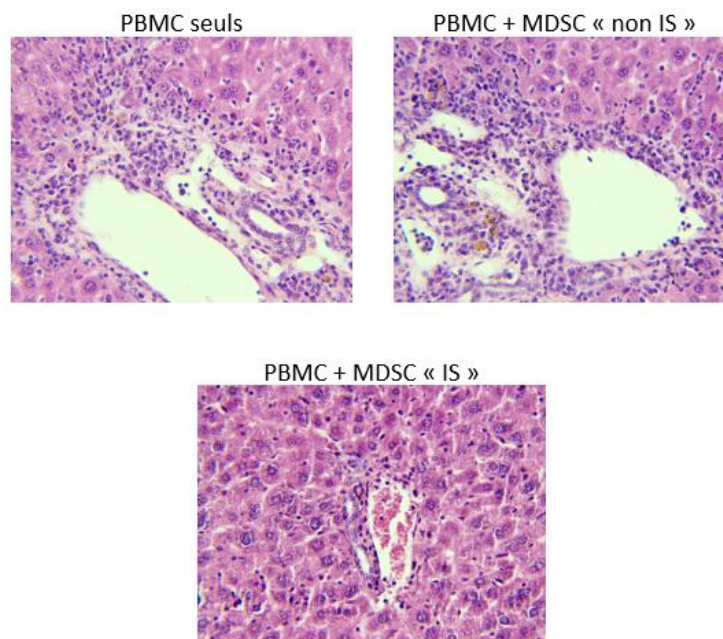
## 2. Evaluation des propriétés des MDSC in vivo



**Figure 26: Propriétés in vivo des MDSC issues des patients allogreffés.** **A)** Courbe de survie des souris NSG après injections de PBMC (Vert, n=7), PBMC + MDSC « non IS (Immunosuppressif) » (Bleu, n=6), PBMC + MDSC « IS » (Rouge, n=3). La médiane de survie des souris recevant des PBMC + des MDSC « IS » n'a pas été atteinte à J60 (date de fin de l'expérimentation), versus 35 jours pour les souris recevant des PBMC versus 24 jours pour les souris recevant des PBMC + des MDSC « non IS » (p=0,0281). Les résultats représentent la synthèse de 2 expérimentations indépendantes. **B)** Variations du poids des souris après injections de PBMC (Vert, n=7), PBMC + MDSC « non IS » (Bleu, n=6), PBMC + MDSC « IS » (Rouge, n=3). A 42 jours post greffe, les souris ayant reçu des PBMC + des MDSC « IS » ont une augmentation du poids de +4.60% +/- 0.64%, versus une perte de -1.91% +/-

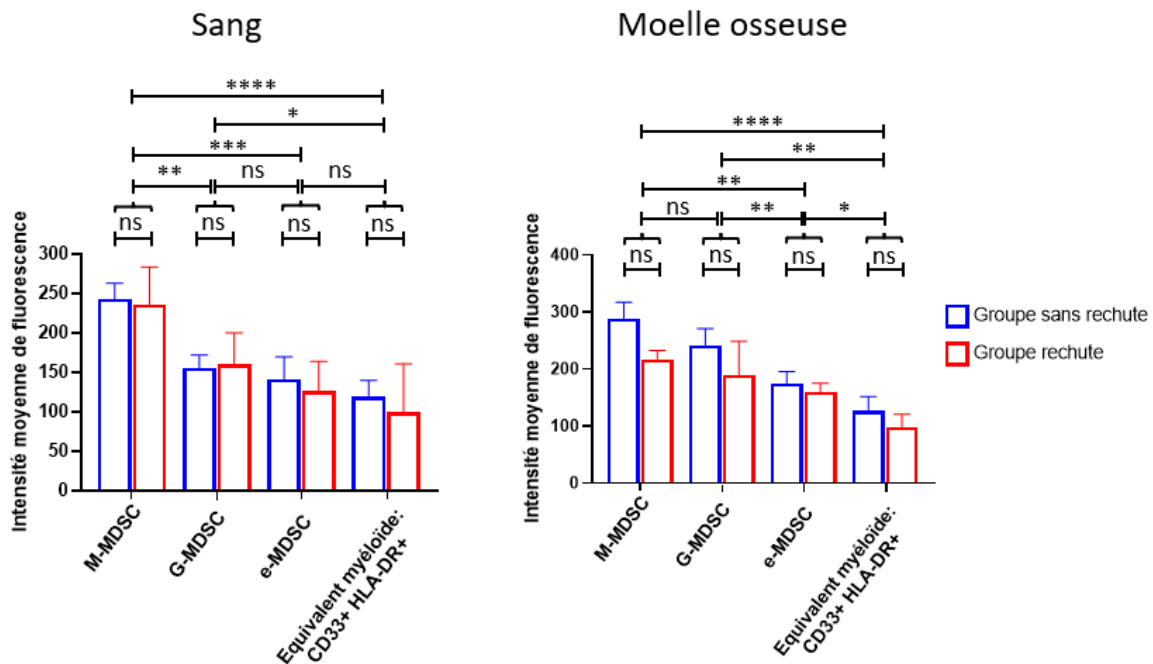
2.93% pour les souris ayant reçu des PBMC, versus une perte de -11.08% +/- 4.46% pour les souris ayant reçu des PBMC + des MDSC « non IS » ( $p=0.0087$ ). Les résultats ont été analysés par le t-test de Student non apparié.

Après une irradiation de 2 Gy, l'injection de  $5 \cdot 10^6$  de PBMC humaines (provenant d'un seul et même donneur sain) dans la veine caudale de la souris NSG entraîne le développement d'une GVH aiguë, létale dans 100% des cas avant J60. Ce modèle mis au point au laboratoire, nous permet ainsi d'étudier l'impact d'une co-transplantation de MDSC au moment de la greffe (J0). Nous avons procédé à l'injection de MDSC confirmées *in vitro* à J30 immunosuppressives (« IS ») ou non immunosuppressives « non IS ». La médiane de survie des souris injectées avec des PBMC est de 35 jours. La médiane de survie n'a pas été atteint à J60 pour les souris co-injectées PBMC +  $1 \cdot 10^6$  MDSC immunosuppressives. La médiane de survie des souris co-injectées PBMC +  $1 \cdot 10^6$  MDSC non immunosuppressives est de 24 jours (**Figure 26**). Le modèle murin utilisé permet de valider *in vivo* les propriétés immunosuppressives des MDSC observées *in vitro*. Parmi les organes cibles de la GVH aiguë développée par la souris receveuse (peau, tube digestif, foie), c'est au niveau du foie que les lésions histologiques de GVH étaient visibles. Les souris co-injectées avec des MDSC « IS » présentaient des lésions d'endothélite et infiltrat portal moindre (**Figure 27**).



**Figure 27: Coupes histologiques d'organes de souris NSG ciblés par la GVH.** Foie, intestin et peau ont été inclus dans de la paraffine, sectionnés et colorés à l'hématoxyline, à l'éosine et au safran. Nous ne présentons que les photographies du foie les plus représentatives. En particulier, les lésions hépatiques ont été évaluées en fonction de la gravité de l'infiltrat portal, des lésions biliaires, de l'endothélite veineuse centrolobulaire et de l'apoptose. Les photos ont été prises avec un grossissement de 200x ou 400x avec un microscope optique Carl-Zeiss AXIO Imager A1m (Carl-Zeiss). Des évaluations histopathologiques en aveugle de la GVHD ont été réalisées.

### 3. Caractérisations de la production de ROS et de l'inflammasome des MDSC



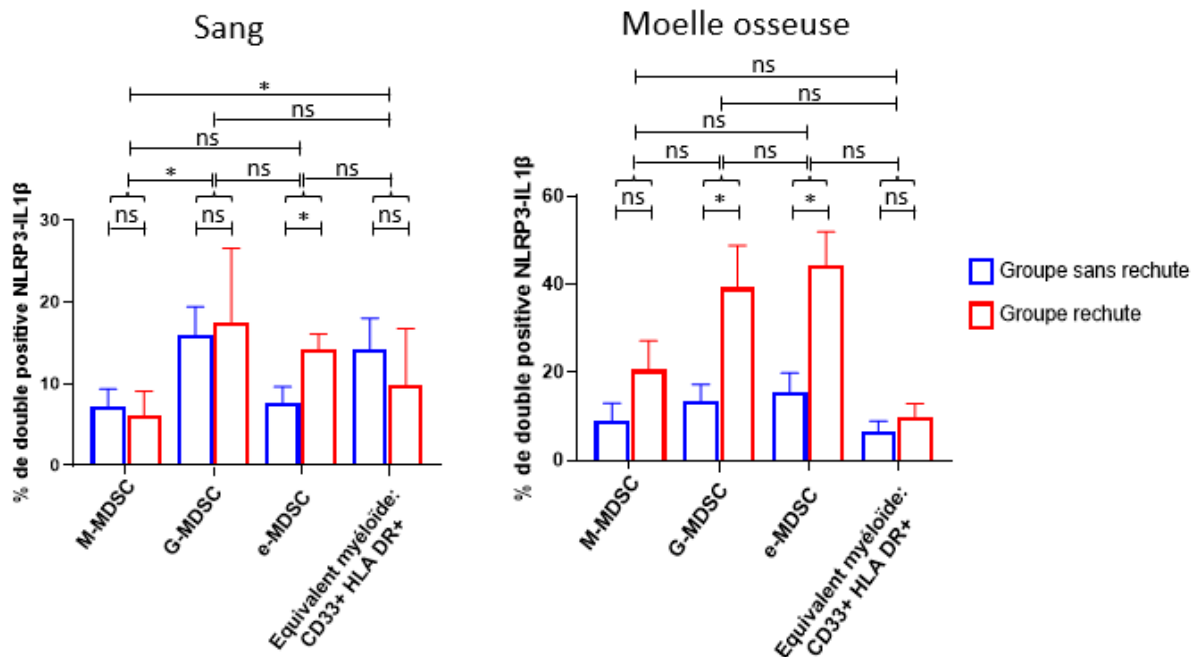
**Figure 28: Evaluation de la production de ROS intracellulaire des MDSC issues du sang périphérique et de la moelle osseuse de patients en rechute vs sans rechute (dans les trois premiers mois post-greffe).** Nous avons mesuré l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de la sonde CM-H2DCFDA dans les sous populations myéloïdes : M-MDSC, G-MDSC, e-MDSC et CD33+ HLA-DR+.

Dans le sang périphérique, la MFI de la sonde observée dans les cellules myéloïdes issues de patients sans rechute précoce (en bleu, n=25) vs la MFI de la sonde observée dans les cellules myéloïdes issues de patients du groupe en rechute précoce (en rouge, n=7) sont similaires dans les 4 sous populations myéloïdes avec respectivement 243.1 +/- 20.13 vs 236.5 +/- 46.98 pour les M-MDSC, 155.7 +/- 16.18 vs 160.1 +/- 40.29 pour les G-MDSC, 141.2 +/- 28.73 vs 126.6 +/- 37.31 pour les e-MDSC et 119.1 +/- 20.82 vs 99.10 +/- 61.94 pour les cellules HLA DR+ CD33+. Néanmoins, les MFI observées dans les sous populations M-MDSC et G-MDSC sont statistiquement supérieures aux MFI observées dans les cellules CD33+ HLA-DR+ avec respectivement 241.6 +/- 18.41 et 156.7 +/- 15.07 MFI vs 114.3 +/- 21.02 MFI (\*\*\*p<0.0001 et \*p=0.0301). En revanche, la MFI dans les e-MDSC est équivalente à celle observée dans les cellules HLA-DR+ CD33+ avec 138.0 +/- 23.65 vs 114.3 +/- 21.02 (p=0.4105), respectivement.

Dans la moelle osseuse, la MFI de la sonde observée dans les cellules myéloïdes issues de patients sans rechute précoce (en bleu, n=13) vs la MFI de la sonde observée dans les cellules myéloïdes issues de patients en rechute précoce (en rouge, n=3) sont similaires dans les 4 sous populations myéloïdes avec respectivement 288.6 +/- 28.67 vs 217.4 +/- 15.30 pour les M-MDSC, 240.7 +/- 30.60 vs 189.8 +/- 59.09 pour les G-MDSC, 175.6 +/- 20.18 vs 160.5 +/- 14.63 pour les e-MDSC, et 127.1 +/- 24.78 vs 98.17 +/- 22.68 pour les cellules CD33+ HLA DR+. Néanmoins, les MFI de la sonde observée dans les M-MDSC, G-MDSC et e-MDSC sont statistiquement supérieures que celle observée dans les cellules CD33+ HLA-DR+ avec respectivement 275.3 +/- 24.32 (\*\*\*p<0.0001), 231.2 +/- 26.88 (\*\*p=0.0017) et 172.7 +/- 16.51 (\*p=0.0192) vs 121.3 +/- 20.25.

Comme les MDSC issues de patients en rechute précoce ont des propriétés *in vitro* de régulation du nombre de LT en prolifération, nous avons souhaité identifier un profil spécifique de ces MDSC, facilement observable par la technique de CMF. Or l'un des mécanismes importants dans la régulation de la prolifération des LT est la production de ROS. L'appréciation de la production de ROS intracellulaire peut se faire par l'observation de l'intensité de la fluorescence de la sonde CM-H2DCFDA. Nous observons un niveau significativement plus élevé de ROS dans les M-MDSC et G-MDSC par rapport à leur contrepartie myéloïde CD33+ HLA-DR+ dans le sang périphérique et la moelle osseuse.

La production de ROS par les e-MDSC était statistiquement plus élevée que les cellules CD33<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> uniquement dans la moelle osseuse. Nous n'avons pas observé de différence significative de l'intensité moyenne de fluorescence de la sonde dans les MDSC issues du groupe de patients avec rechute précoce vs le groupe de patients sans rechute, sur les prélèvements réalisés au cours des trois premiers mois post-greffe.



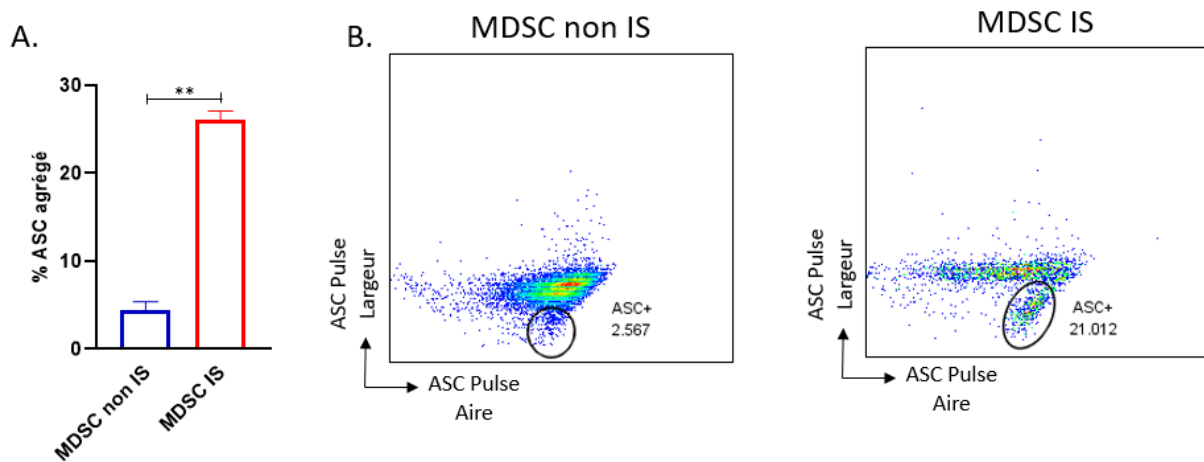
**Figure 29: Evaluation de l'inflammasome dans les MDSC issues du sang périphérique et de la moelle osseuse de patients en rechute vs sans rechute.** Nous avons évalué le % de cellules double positives à NLRP3 et IL1 $\beta$  dans les sous populations myéloïdes : M-MDSC, G-MDSC, e-MDSC et CD33<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>.

Dans le sang périphérique, le % de cellules double positive à NLRP3 et IL1 $\beta$  est plus faible dans les e-MDSC du groupe sans rechute (en bleu, n=26) que dans les e-MDSC du groupe rechute (en rouge, n=4) avec 7.55% +/- 2.07% vs 14.25% +/- 1.85% (\*p=0.0315). Dans les M-MDSC, G-MDSC et CD33<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>, ces valeurs sont similaires avec respectivement 7.22% +/- 2.11% vs 6.05% +/- 3.03%, 15.91% +/- 3.51% vs 17.42% +/- 9.17% et 14.28% +/- 3.75% vs 9.87% +/- 6.86%. La sous population M-MDSC a un % de cellules double positive inférieur aux cellules HLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> avec 7.06% +/- 1.86% vs 13.68% +/- 3.33% (\*p=0.0313). Les G-MDSC et les e-MDSC ont un % similaire aux cellules HLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> avec 16.11% +/- 3.22% (p=0.9634) et 8.45% +/- 1.85% (p=0.1809) vs 13.68% +/- 3.33%.

Dans la moelle osseuse, le % de cellules double positive à NLRP3 et IL1 $\beta$  est plus faible dans les sous populations G-MDSC et e-MDSC dans le groupe sans rechute (en bleu, n=15) que dans le groupe rechute (en rouge, n=4) avec respectivement 13.43% +/- 3.79% vs 39.22% +/- 9.58% (\*p=0.0139) et 15.47% +/- 4.35% vs 44.32% +/- 7.63% (\*p=0.0139). Il n'y a pas de différences significatives dans les sous populations M-MDSC et HLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> avec respectivement 9.09% +/- 3.87% vs 20.56% +/- 6.62% (p=0.0769) et 6.58% +/- 2.36% vs 9.79% +/- 3.05% (p=0.2256). Les % de cellules double positive dans les M-MDSC, G-MDSC, e-MDSC vs HLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> sont similaires avec 11.51% +/- 3.46% (p=0.6009), 18.86% +/- 4.26% (p=0.0894), 21.54% +/- 4.62% (p=0.0894) vs 7.43% +/- 1.89%.

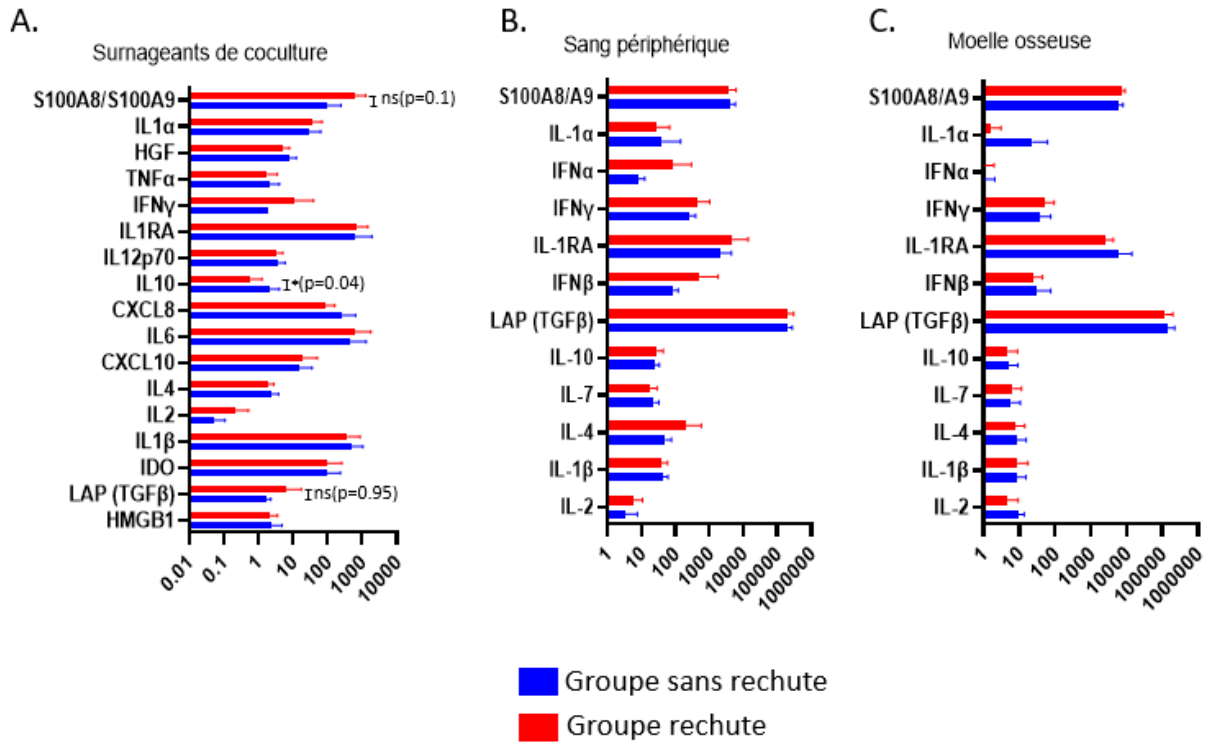
Finalement, l'accumulation de MDSC dans le microenvironnement médullaire des patients SMD ayant été rapportée dans la littérature à un niveau élevé d'alarmines, nous avons étudié l'activation de l'inflammasome NLRP3 des MDSC post-greffe. Pour ce faire, nous avons étudié par CMF intra-cellulaire la libération intracellulaire d'interleukine-1 $\beta$  mature (IL-1 $\beta$ ) liée à l'activation de NLRP3 (NOD-like receptor protein 3). La **Figure 29** montre le pourcentage de cellules double positive NLRP3 et IL-1 $\beta$

dans les 3 sous populations de MDSC. On observe que le pourcentage de cellules IL-1 $\beta$ + et NLRP3+ est globalement supérieur dans les M-MDSC, G-MDSC et e-MDSC issues du groupe de patients en rechute précoce *versus* sans rechute. Cette observation est statistiquement significative pour les MDSC issues de la moelle osseuse. Pour confirmer cette observation, nous avons proposé d'analyser la détection d'agrégats d'ASC (agrégats visibles lorsque NLRP3 est activé) par cytométrie en flux ; la détection des agrégats d'ASC est plus précise et spécifique de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Nous observons que les MDSC avec des propriétés immunosuppressives ont un pourcentage d'agrégats d'ASC statistiquement plus élevé comparativement aux MDSC non immunosuppressives. La très forte relocalisation d'ASC lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3 peut être représentée par une faible aire sous la courbe, pour le marquage d'ASC. En effet, lorsque ASC est disséminé dans toute la cellule (inflammasome inactivé), le signal ASC est large, alors que lorsque ASC est agrégé en un seul point (inflammasome activé), le signal ASC est réduit. La **Figure 30** montre une représentation d'un profil avec seulement 2% de MDSC avec un inflammasome activé (MDSC non IS), et un second profil avec 21% de MDSC avec un inflammasome activé (MDSC IS).



**Figure 30: Evaluation de l'état de l'inflammasome des MDSC via l'utilisation de l'Ac anti ASC.** A) % de ASC agrégé au sein des MDSC non IS (Bleu), et de MDSC IS (Rouge), signifiant une activation de l'inflammasome NLRP3 (n=3). 4.43% +/- 0.95% des MDSC non IS présentent ASC sous forme agrégée, vs 26.13% +/- 0.96% pour les MDSC IS (\*\*p=0.0072). B) Représentation par cytométrie en flux de l'agrégat de ASC avec les paramètres : Aire sous la courbe de ASC en ordonnée / Largeur de la courbe de ASC en abscisse.

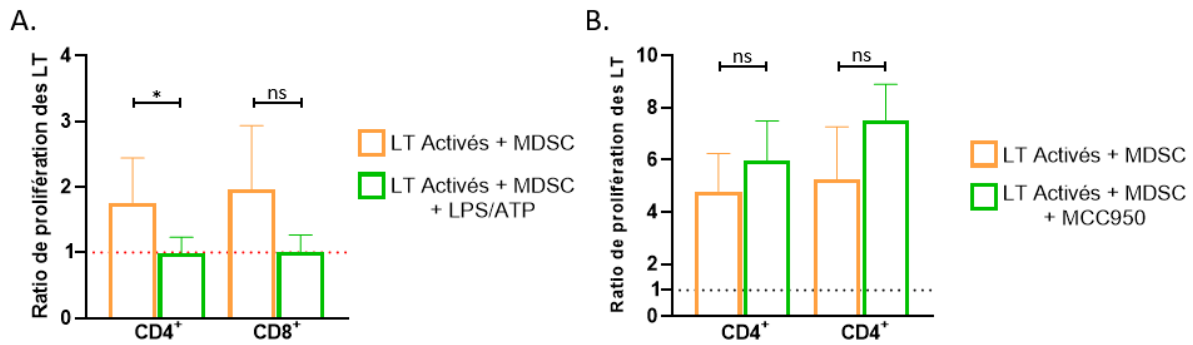
4. Etude de l'impact des MDSC sur le microenvironnement via la sécrétion de cytokines



**Figure 31: Evaluation du taux en cytokines dans les surnageants de coculture et dans les microenvironnements des MDSC.**  
**A)** Mesure du taux en S100A8/S100A9, IL1 $\alpha$ , HGF, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL1RA, IL12p70, IL10, CXCL8, IL6, CXCL10, IL4, IL2, IL1 $\beta$ , IDO, LAP (=TGF $\beta$ ), HMGB1 dans les surnageants de coculture entre LT activés et MDSC provenant de patients en rechute (Rouge), ou de patients sans rechute (Bleu). Les valeurs moyennes ont été normalisées aux valeurs des contrôles LT activés seuls correspondant à chaque condition. Parmi les cytokines étudiées, seul l'IL-10 est statistiquement supérieur dans le groupe sans rechute (2.17 +/- 0.72) par rapport au groupe rechute (0.61 +/- 0.23) (\*p=0.04). Nous pouvons aussi observer une plus grande quantité de S100A8/S100A9 et de TGF $\beta$  dans les groupes rechute vs les groupes sans rechute avec respectivement 637 +/- 206.8 versus 99.98 +/- 82.83 (p=0.1) et 6.3 +/- 3.7 vs 1.66 +/- 0.27 (p=0.95), mais sans différences significatives.  
**B)** Mesure du taux en S100A8/S100A9, IL1 $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL1RA, IFN $\beta$ , LAP (=TGF $\beta$ ), IL10, IL7, IL4, IL1 $\beta$ , IL2 dans les plasmas de sang périphérique, et de moelle osseuse (**C**), de patients en rechute (Rouge), ou sans rechute (Bleu). Aucune différence significative n'a été observé dans les taux de cytokines dans le plasma de sang périphérique ou de moelle osseuse, entre les patients rechute ou sans rechute.

L'analyse des surnageants pour les alarmines et cytokines pro-inflammatoires (S100A8/S100A9, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL1-RA, IL-12p70, CXCL8, IL-6, IL-4, IL-2, IL-1 $\beta$ ) et cytokines anti-inflammatoires (HGF, IL-10, CXCL10, IDO, LAP (=TGF $\beta$ ), HMGB1), ne révèle pas de profil particulier dans les co-cultures avec des MDSC issues de patients en rechute vs sans rechute. En effet, seul le dosage d'IL-10 est significativement diminué dans les surnageants de culture avec les MDSC de patients en rechute précoce vs sans rechute. A noter, le dosage des alarmines S100A8/A9 est augmenté dans les surnageants de coculture avec les MDSC issues de patients en rechute précoce, de façon non statistiquement significative, par rapport aux surnageants de coculture avec les MDSC issues de patients sans rechute. De même, l'analyse des cytokines dans le sérum des patients prélevé dans le sang périphérique (**Figure 31B**) et la moelle osseuse (**Figure 31C**) ne permet pas d'identifier un profil cytokinique associé à un des deux groupes de patients étudiés.

5. Induction des propriétés immunosuppressives des MDSC de patient sans rechute via la simulation du microenvironnement SMD

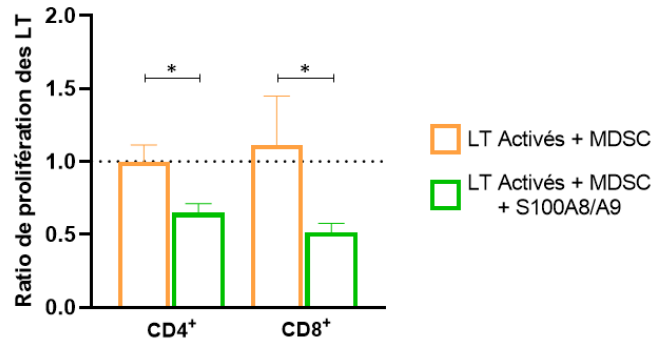


**Figure 32: Evaluation des propriétés immunosuppressives de MDSC de patient sans rechute après modulation de l'inflammasome NLRP3.** Les LT ont été activés par des Ac anti CD3/CD28. Le Ratio de prolifération correspond au nombre de LT activés en coculture avec des MDSC, divisé par le nombre de LT activés seuls. Les MDSC proviennent de patients sans rechute (En orange), et ont pu être traitées par du LPS sur la nuit, puis par de l'ATP pendant 1h (En vert, n=8) afin d'activer l'inflammasome NLRP3 (A), ou ont pu être traitées par du MCC950 pendant 24heures (En vert, n=4) afin d'inhiber l'inflammasome NLRP3 (B), avec un ratio LT : MDSC de 1 : 1. Des MDSC immunosuppressives sont caractérisées par un ratio inférieur à 1.

(A) Les ratios de prolifération des LT CD4<sup>+</sup> sont de 1.76 +/- 0.68 lorsqu'ils sont cocultivés avec des MDSC de patient sans rechute non traitées, versus 0.98 +/- 0.25 lorsqu'ils sont cocultivés avec des MDSC de patient sans rechute traitées au LPS/ATP (\*p=0.0127). Les ratios de prolifération des LT CD8<sup>+</sup> sont de 1.96 +/- 0.97 lorsqu'ils sont cocultivés avec des MDSC de patient sans rechute non traitées, versus 1.00 +/- 0.26 lorsqu'ils sont cocultivés avec des MDSC de patient sans rechute traitées au LPS/ATP (p=0.0593).

(B) Les ratios de prolifération des LT CD4<sup>+</sup> sont de 4.79 +/- 1.45 lorsqu'ils sont cocultivés avec des MDSC de patient sans rechute non traitées, versus 5.97 +/- 1.52 lorsqu'ils sont cocultivés avec des MDSC de patient sans rechute traitées au MCC950 (p=0.2000). Les ratios de prolifération des LT CD8<sup>+</sup> sont de 5.23 +/- 2.02 lorsqu'ils sont cocultivés avec des MDSC de patient sans rechute non traitées, versus 7.52 +/- 1.37 lorsqu'ils sont cocultivés avec des MDSC de patient sans rechute traitées au MCC950 (p=0.3429).

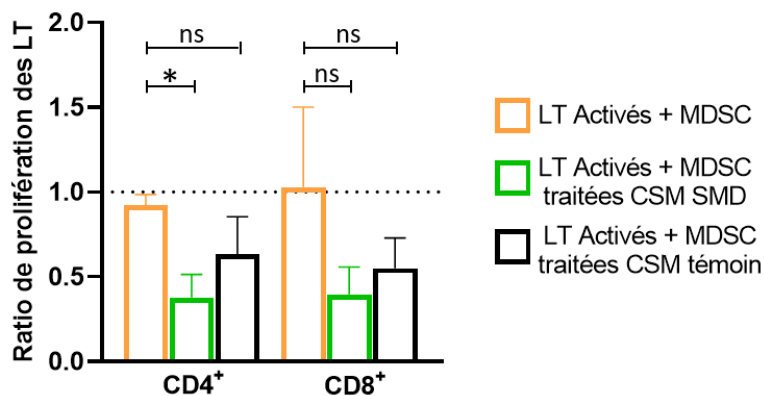
Au total, nos premières observations suggéraient que les MDSC avec un inflammasome NLRP3 activé étaient des MDSC immunosuppressives. Cet inflammasome était probablement activé par le microenvironnement médullaire sans que nous ayons identifié une signature cytokine pro-inflammatoire distincte dans la moelle osseuse des patients en rechute précoce. Nous avons donc proposé de tester *in vitro* la modulation de l'inflammasome NLRP3, afin d'observer les conséquences sur les propriétés immunosuppressives des MDSC. Nous avons ainsi traité les MDSC de patients sans rechute précoce avec du LPS puis de l'ATP afin d'activer l'inflammasome NLRP3 (Figure 32A), ou avec du MCC950 afin d'inhiber l'inflammasome NLRP3 (Figure 32B). Le ratio de prolifération des LT observé dans les co-cultures avec des MDSC issues de patients sans rechute précoce semble diminué lorsque les MDSC ont été pré-traitées par LPS + ATP et semble augmenté lorsque les MDSC ont été pré-traitées par MCC950. Toutefois, nous n'observons pas de différence statistiquement significative, ce qui ne nous permet pas de conclure fermement sur l'impact de la modulation de l'activation de NLRP3 dans les MDSC.



**Figure 33: Evaluation des propriétés immunosuppressives de MDSC de patients sans rechute après traitement par les alarmines SA100A8/S100A9.** Les LT ont été activés par Ac anti CD3/CD28. Les MDSC étudiées sont issues de patients sans rechute précoce (orange, n=9), et ont pu être pré-traitées par des alarmines S100A8/A9 pendant 24h (vert, n=9), avec un ratio (LT : MDSC) de 1 : 1.

Pour les LT CD4<sup>+</sup> cocultivés avec des MDSC non traitées, le ratio de prolifération est de 0.99 +/- 0.11 versus 0.64 +/- 0.06 pour les LT CD4<sup>+</sup> cocultivés avec des MDSC pré-traitées (\*p=0.0142). Pour les LT CD8<sup>+</sup> cocultivés avec des MDSC non traitées, le ratio de prolifération est de 1.11 +/- 0.33 versus 0.51 +/- 0.19 pour les LT CD8<sup>+</sup> cocultivés avec des MDSC pré-traitées (\*p=0.0400).

Compte tenu de l'analyse des surnageants de co-culture et des données de la littérature, nous avons souhaité étudier l'impact d'un traitement préalable (par les alarmines S100A8/A9 durant 24h) des MDSC issues de patients sans rechute précoce. Le traitement par les alarmines S100A8/A9 permet d'induire des capacités immunosuppressives aux MDSC issues de patient sans rechute, notamment par diminution du nombre de LT CD4<sup>+</sup> entrés en prolifération.



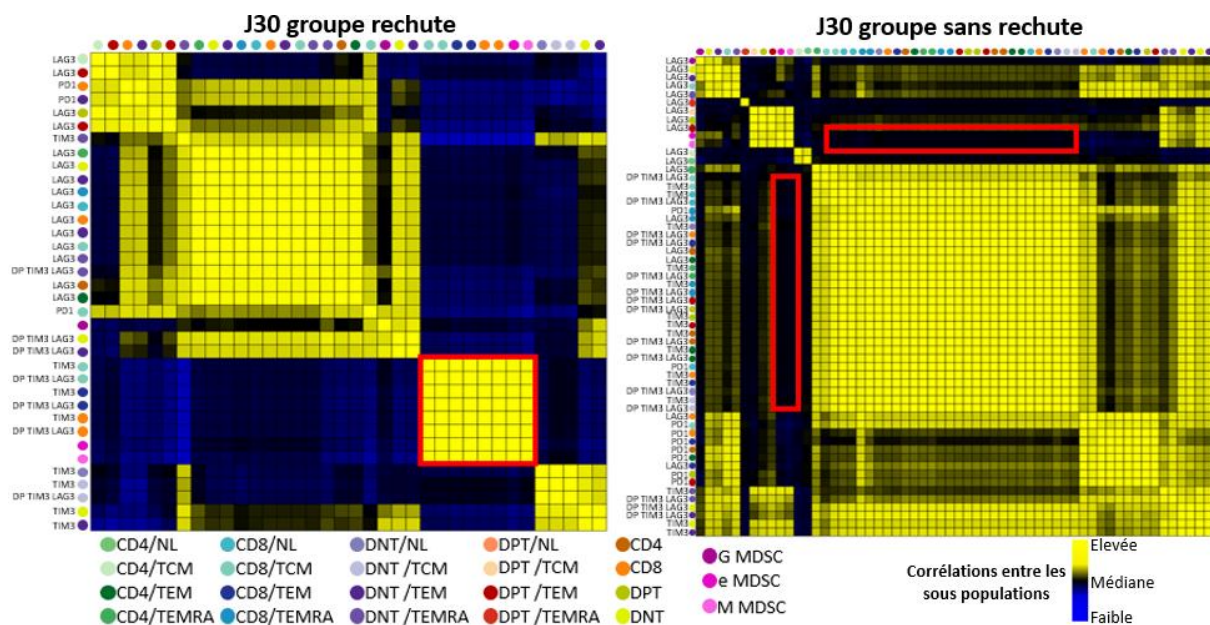
**Figure 34: Evaluation des propriétés immunosuppressives de MDSC de patient sans rechute après incubation avec des CSM de patient SMD, ou des CSM témoin.** Les LT ont été activés par des Ac anti CD3/CD28. Le Ratio de prolifération correspond au nombre de LT activés en coculture avec des MDSC, divisé par le nombre de LT activés seuls. Les MDSC proviennent de patients sans rechute. Les CSM proviennent de patient SMD, ou de patient arthrosique (CSM témoin). Les cocultures ont été réalisées avec un ratio LT : MDSC de 1 : 1. Des MDSC immunosuppressives sont caractérisées par un ratio inférieur à 1.

Les ratios de prolifération des LT CD4<sup>+</sup> sont de 0.92 +/- 0.06 en coculture avec des MDSC de patient sans rechute (En orange, n=7), versus 0.37 +/- 0.13 en coculture avec des MDSC de patient sans rechute préalablement incubées 24h avec des CSM de patient SMD (\*p=0.0101) (En vert, n=5), versus 0.63 +/- 0.22 en coculture avec des MDSC de patient sans rechute préalablement incubées 24h avec des CSM témoin (p=0.2667) (En noir, n=3).

Les ratios de prolifération des LT CD8<sup>+</sup> sont de 1.02 +/- 0.47 en coculture avec des MDSC de patient sans rechute, versus 0.39 +/- 0.16 en coculture avec des MDSC de patient sans rechute préalablement incubées 24h avec des CSM de patient SMD (p=0.2677), versus 0.55 +/- 0.17 en coculture avec des MDSC de patient sans rechute préalablement incubées 24h avec des CSM témoin (p=0.8333).

Afin d'étudier l'impact du microenvironnement et plus particulièrement des CSM sur les MDSC, nous avons réalisé des cocultures entre des LT activés avec des MDSC, et avec des MDSC préalablement incubées avec des CSM de patients ou des CSM témoin. Alors que les MDSC cocultivées avec les LT ne présentent pas de propriétés immunosuppressives avec des ratios respectifs de 0.92 +/- 0.06 et 1.02 +/- 0.47 pour les LT CD4<sup>+</sup> et les LT CD8<sup>+</sup>, lorsque les MDSC sont préalablement incubées avec des CSM de patients les ratios diminuent respectivement à 0.37 +/- 0.13 (p=0.0101\*) et 0.39 +/- 0.16 (p=0.2677), démontrant qu'elles acquièrent des propriétés immunosuppressives. Il est important de noter que lorsque les MDSC sont préalablement incubées avec des CSM témoins, elles n'acquièrent pas les mêmes propriétés immunosuppressives.

B. Corrélation entre MDSC et différenciation lymphocytaire au cours de la reconstitution post greffe



**Figure 35: Corrélation entre l'abondance de MDSC et les sous populations lymphocytaires exprimant des marqueurs d'épuisement à J30 dans le groupe rechute (n=6 à gauche) et le groupe sans rechute (n=14 à droite).** Chaque ligne ou colonne correspond à une sous population lymphocytaire avec des marqueurs d'épuisements précisés, ou à une des 3 sous populations de MDSC. De bas en haut, l'ordre des sous populations dans les lignes est identique à l'ordre de gauche à droite des sous populations dans les colonnes. Les carrés bleus représentent une corrélation négative, les carrés noirs représentent l'absence de corrélation, les carrés jaunes représentent une corrélation positive.

Suite à l'absence de signature immunologique des LT ou MDSC lors de la reconstitution immunitaire post-greffe, nous avons étudié la corrélation entre les sous populations lymphocytaires de phénotype épuisé et les MDSC immunosuppressives définies *in vitro*. L'épuisement des LT est étudié par l'expression des marqueurs PD-1, Tim3 et LAG3. Dans le groupe avec rechute précoce, nous avons observé une corrélation entre 2 sous populations de MDSC (e-MDSC et M-MDSC) et les LT CD8<sup>+</sup> mémoires (T<sub>CM</sub> et T<sub>EM</sub>) Tim3<sup>+</sup> et LAG3<sup>+</sup> (Encadré rouge de la **Figure35**). Ces corrélations ne sont pas observées dans le groupe sans rechute.

### C. Analyse RNAseq

La réalisation de bibliothèques de PBMC totaux décongelés de 3 patients rechute et de 3 patients non rechute est prévue dans les mois à venir. L'analyse transcriptomique des MDSC à l'aide des marquages par les Ab-Seq nous permettront d'obtenir le transcriptome de chaque cellule MDSC de chaque patient analysé.

## Discussion et perspectives

### I. Analyse de la reconstitution immunitaire en lien avec la rechute post-greffe

L'allo-HSCT est le seul traitement pouvant proposer un espoir de guérison complète des SMD. Malheureusement, la rechute post-greffe a une incidence cumulée à 3 ans d'environ 40% (Guièze et al. 2016) et peut atteindre 60 à 70% dans les SMD de haut risque cytogénétique. Cette rechute est associée à une survie globale sombre de l'ordre de 10-15 % à deux ans et une médiane de survie globale de moins de 5 mois (Schmid et al. 2018). Un des acteurs majeurs dans le contrôle à long terme de l'hémopathie est représenté par les lymphocytes (T et NK). Plusieurs études ont exploré le rôle des LT lors de la rechute post-greffe des hémopathies myéloïdes. L'une des caractéristiques importantes est l'épuisement des LT, caractérisé par une augmentation de l'expression membranaire de molécules inhibitrices telles que PD-1, TIM-3 et LAG-3 (Noviello et al. 2019) (Kong et al. 2015). Cet épuisement se traduit par une réduction de la production de cytokines (l'interféron- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-2), essentielles dans l'immunité anti-cancéreuse. En plus de l'altération de la production de cytokines, la déviation de LT effecteurs vers un profil régulateur dans la moelle osseuse, participe à ce microenvironnement permissif à la rechute (Noviello et al. 2019). Or, dans le contexte de la cancérologie solide, un microenvironnement tumoral riche en MDSC joue un rôle pivot dans l'induction de LT épuisés avec des propriétés d'inhibition de la prolifération des LT et la déviation de leur différenciation vers un profil de LT régulateurs (Giallongo et al. 2014). Ces MDSC qui créent un microenvironnement immunitaire permissif dans l'oncologie solide est à ce jour débattu dans le contexte de la rechute après allogreffe de CSH.

Pour investiguer, de façon concomitante les MDSC et les LT afin d'identifier une signature immunologique prédictive de la rechute, le CHRU de Nancy a mené une étude prospective monocentrique de 2019 à 2021. Nous avons proposé d'analyser de façon prospective des prélèvements sanguins et médullaires frais à des temps précoces post-greffe (J30, J90, J180).

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la différenciation lymphocytaire lors de la reconstitution immunitaire post-greffe. Brièvement, le lymphocyte T Naïf Like ( $T_{NL}$ ) se différencie en cellules T mémoires : Lymphocyte T central mémoire ( $T_{CM}$ ) puis Lymphocyte T effecteur mémoire ( $T_{EM}$ ) puis Lymphocyte T effecteur mémoire à différenciation terminale ( $T_{EMRA}$ ). Lors de cette différenciation, les LT perdent leurs capacités prolifératives au profit d'amélioration de leurs capacités effectrices/lytiques. En dehors du contexte de l'allo-HSCT, il a été observé chez les patients atteints de LAM, une diminution de la proportion des  $T_{CM}$   $CD8^+$  au profit de l'augmentation des sous populations  $T_{EM}$  et  $T_{EMRA}$  (L. Xu et al. 2018). Chez les patients atteints de SMD, une diminution de la sous population  $T_{NL}$   $CD4^+$  était observée comparativement aux contrôles sains (Zou et al. 2009). Cette déviation vers

une population mémoire pourrait s'expliquer par la déficience de la transcriptase inverse de la télomérase (L. Yang et al. 2013). Dans le contexte post-greffe, l'expansion homéostatique des LT du greffon aboutit à une grande dominance de LT mémoires dans les premiers mois, quel que soit le type de greffe et quel que soit le devenir du receveur. Récemment, il a été observé chez 32 patients atteints de LAM allogreffés de CSH, une proportion plus élevée de  $T_{SCM}$  et  $T_{CM}$  dans les LT infiltrant la moelle osseuse, exprimant de multiples récepteurs inhibiteurs (PD-1/CTLA-4/TIM-3/LAG-3/2B4/KLRG1/GITR) chez les patients en rechute comparativement aux patients sans rechute. Ces LT épuisés présentent un répertoire TCR restreint et des fonctions effectrices altérées. La détection précoce de  $T_{SCM}$  épuisé (PD-1 + Eomes + T-bet-) prédirait la rechute (Noviello et al. 2019). Ce profil a été récemment confirmé dans une étude monocentrique menée chez les patients allogreffés de CSH à l'hôpital Saint-Louis par la technique de cytométrie de masse (Gournay et al. 2022). Les auteurs concluent que de profondes altérations de l'équilibre immunitaire (avec des LT majoritairement différenciés vers des sous-types mémoires) est stable de 3 à 6 mois post-greffe, et de nombreuses variations se produisent de 6 à 12 mois post-greffe. Aucun profil basé sur l'analyse des marqueurs de différenciation n'a été corrélé au devenir du patient dans ces études. En revanche, des niveaux élevés d'expression de TIGIT et de CD161 sur les lymphocytes T CD4 trois mois après la greffe est associée de manière significative à une rechute de l'hémopathie.

Les premiers résultats de notre étude ont mis en évidence une différenciation lymphocytaire très largement orientée vers les lymphocytes mémoires effecteurs ( $T_{EM}$  et  $T_{EMRA}$ ). En accord avec les deux études récentes citées ci-dessus, aucun profil de différenciation lymphocytaire T n'est spécifique du devenir du receveur notamment de la survenue ou pas d'une rechute précoce dans l'année suivant la greffe.

## II. Rôle et caractérisation des MDSC en post-greffe

L'étude concomitante des MDSC nous apporte les informations suivantes.

L'observation de MDSC circulantes en plus grande proportion et plus grand nombre comparativement aux contrôles sains est caractéristique de l'hématopoïèse post-greffe. Cette observation est en cohérence avec la description de MDSC circulantes principalement dans les 6 premiers mois de la greffe pour diminuer voire disparaître à un an post-greffe (Mougiakakos et al. 2013).

Les trois sous-types (M-MDSC, G-MDSC et e-MDSC) sont facilement repérés sur les caractéristiques immunophénotypiques communément décrites. Le sous-type dominant dans les premiers mois post-greffe est constitué de G-MDSC sans aucun lien avec le devenir du patient (notamment sans corrélation avec la survenue de la rechute précoce ou non).

Enfin, lorsque nous nous intéressons à leurs propriétés immunosuppressives *in vitro*, nous avons observé qu'en fonction des patients, ces cellules pouvaient avoir de façon inconstante des propriétés régulatrices de la prolifération des LT. Ces propriétés immunosuppressives *in vitro* inconstantes ont été confirmées *in vivo* dans un modèle de souris NSG, greffées avec des PBMC humaines, capables de développer une xéno-GVH aiguë expérimentale. Finalement, c'est uniquement lorsque les MDSC étaient triées à partir du sang de patients qui vont présenter une rechute de leur hémopathie dans l'année qui suit l'allogreffe que nous observons ces propriétés immunorégulatrices. Malheureusement, nous n'avons pas identifié le mécanisme impliqué dans la régulation de la prolifération des LT. Le profil de prolifération analysé par CFSE suggérait une bonne activation des LT et leur entrée en prolifération, en revanche, le nombre de LT en prolifération était moindre (confirmé sur une cinétique de révélation de co-culture à des temps plus précoces). Notre première hypothèse était que les MDSC induisaient une apoptose accrue des LT, mais ceci n'a pas été confirmé par les marquages Annexin V/7-AAD. Par ailleurs, l'inhibition de mécanismes couramment impliqués dans la régulation de la prolifération des LT par les MDSC (adjonction de L-NMMA pour bloquer iNOS, Nor-NOHA pour bloquer Arginase 1, L-méthyltryptophane pour bloquer IDO), n'a pas permis de réverser les propriétés immunosuppressives des MDSC issues de patients en rechute précoce (données non montrées). Enfin, si nous avons noté l'absence de signature immunologique des LT ou des MDSC lors de la reconstitution immunitaire post-greffe, nous avons relevé une corrélation entre l'épuisement des LT CD8<sup>+</sup> mémoires (T<sub>CM</sub> et T<sub>EM</sub>) positifs aux marqueurs Tim3 et LAG3, et 2 sous populations de MDSC (e-MDSC et M-MDSC) dans le groupe rechute précoce.

Toutefois, notre étude présente des résultats nuancés sur les propriétés immunosuppressives des MDSC post-greffe en comparaison avec les études publiées jusqu'à présent. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour comprendre pourquoi nos résultats sont en rupture avec ce qui a été démontré jusqu'à présent.

- i) Tout d'abord, nous avons observé que les tests *in vitro* d'activation et prolifération des LT par les microbilles anti-CD3 et anti-CD28 (Mougiakakos et al. 2013) (Guan et al. 2015) doivent être interprétés avec beaucoup de précaution. En effet les microbilles peuvent être phagocytées par les MDSC, ce qui inhibe artificiellement l'activation et la prolifération des LT par séquestration du signal 1 et 2 nécessaire à leur entrée en prolifération (Davis, Silvin, et Allen 2017). Nous suggérons que le test *in vitro* avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (S.-E. Lee et al. 2018) (Yin et al. 2020) doit donc être privilégié.
- ii) De plus, compte tenu de la fragilité des MDSC aux étapes pré-analytiques de congélation et décongélation, nous avons souhaité mener une étude prospective uniquement sur des

échantillons frais, ce qui est inconstamment précisé dans les études publiées jusqu'à présent.

- iii) Enfin, les caractéristiques des patients et de la procédure de greffe sont assez hétérogènes dans les publications précédentes.

Les équipes de Kim, Lee et Yin ont toutes 3 réalisé des études sur respectivement 119, 130 et 99 patients, mais en faisant le choix de mélanger certains paramètres cliniques. En particulier, ces études ont inclus différentes sources de CSH (cordon ombilical, moelle osseuse et sang périphérique). Le choix des conditionnements était également très hétérogène en terme d'intensité et de combinaisons de molécules de chimiothérapie avec ou sans irradiation corporelle totale voire recours à du cyclophosphamide. Enfin, ces études regroupaient différents types de donneurs (géo-identiques, phéno-identiques et haplo-identiques). Par conséquence, les stratégies de prophylaxie de la GVH étaient très variables également incluant ou non du sérum anti-lymphocytaire ou du cyclophosphamide post-greffe.

Notre étude a l'avantage d'être très homogène sur les caractéristiques des patients (hémopathies myéloïdes de type SMD de haut risque et LAM) et les caractéristiques de la greffe (conditionnement uniquement basé sur une association de fludarabine et busulfan, donneur uniquement HLA identique intra-familial ou donneur volontaire sain et de façon subséquente une prophylaxie de la GVH homogène). En effet, il nous paraissait important de limiter les biais possiblement impliqués dans l'émergence de MDSC immunosuppressives en lien avec les traitements médicamenteux administrés au cours de la greffe. Par exemple, nous avons exclu toute greffe nécessitant le recours à l'administration de G-CSF couramment utilisée en post-greffe chez le receveur de greffons alternatifs (sang de cordon placentaire, greffons issus de donneur haplo-identiques ou donneurs volontaires de fichier international avec incompatibilité HLA), qui peut induire des MDSC immunosuppressives comme démontré dans les greffons (D'Aveni et al. 2015, Vendramin et al 2014). Par ailleurs, aucun patient n'a reçu de cyclophosphamide dans le conditionnement ou en post-greffe pour limiter aussi l'induction de MDSC décrite après administration de cette chimiothérapie (Diaz-Montero et al. 2009).

Finalement, notre hypothèse principale pour expliquer la variabilité des propriétés fonctionnelles des MDSC est qu'elles dépendent du microenvironnement tumoral. Plusieurs études ont déjà démontré l'importante plasticité des MDSC, avec des propriétés et des mécanismes d'action qui peuvent varier dépendamment du microenvironnement dans lequel elles se trouvent (Tcyganov et al. 2018). Dans le contexte d'oncologie solide, les monocytes sains peuvent acquérir des propriétés immunosuppressives

et inhiber l'expression d'HLA-DR à leur surface, lorsqu'ils sont cultivés avec des cellules de mélanomes (Mao et al. 2013), ou de gliomes (Rodrigues et al. 2010). De même, dans le contexte de SMD, la culture de monocytes matures avec des CSM de patients SMD aboutit à l'induction de MDSC (Sarhan et al. 2020). Ainsi, la cellule tumorale résiduelle ou le microenvironnement (stroma) déficient est capable d'induire les propriétés immunosuppressives des MDSC. Nos données préliminaires suggèrent le rôle important des CSM issues de patients atteints de SMD/LAM dans l'acquisition des propriétés immunosuppressives par les MDSC initialement non immunosuppressives. Toutefois, nous ne pouvons exclure dans notre cohorte prospective que les patients en rechute précoce présentaient toujours des cellules tumorales résiduelles dans leur microenvironnement médullaire. D'une part, dans la majorité des patients inclus atteints de SMD/ LAM, nous ne disposons pas de technique de suivi de la maladie résiduelle que ce soit par la technique de cytométrie en flux ou que ce soit par biologie moléculaire. D'autre part, l'analyse du chimérisme donneur/receveur dans notre centre est actuellement réalisé sur cellules totales (pas de tri sur les cellules CD33+) avec une sensibilité faible à +/- 2%. Nous avons repris a posteriori les données des patients avec MDSC immunosuppressives en post-greffe, et à chaque temps post-greffe où les MDSC sont immunosuppressives, nous observons un chimérisme sur moelle osseuse persistant faible du receveur (de l'ordre de 2%). Compte tenu de la faible proportion des MDSC au sein des cellules myéloïdes totales, nous souhaitons donc poursuivre le travail par l'analyse sur cellule unique du transcriptome. Cette étude nous permettra d'une part d'identifier si les MDSC immunosuppressives *in vitro* sont issues du receveur ou du donneur, et nous permettra d'investiguer les voies transcriptomiques d'éventuels mécanismes immunosuppresseurs différenciellement exprimés par rapport aux MDSC non immunosuppressives. A ce jour, 6 patients dans notre cohorte ont été identifiés comme intéressants à investiguer par cette technique (3 patients en rechute précoce *versus* 3 patients sans rechute précoce). Ces patients ont été retenus sur les critères suivant : i) prélèvement congelé à J30 ii) évaluation des propriétés immunosuppressives des MDSC disponible, iii) patients avec caractéristique de la maladie identique (SMD avec caryotype complexe), et iv) caractéristique de la greffe identique. Le travail est en cours. Nous nous attacherons tout particulièrement à identifier une signature immunophénotypique qui pourrait permettre d'identifier à l'avenir les MDSC immunosuppressives. En effet, nos premiers résultats ne confirment pas la production de ROS comme un biomarqueur intéressant des MDSC immunosuppressives (Corzo et al. 2009). En revanche, nos premiers résultats suggèrent l'intérêt d'investiguer l'état d'activation de l'inflammasome NLRP3. Comme exposé dans notre introduction, le SMD est associé à un microenvironnement pro-inflammatoire caractérisé par une forte production de DAMP (danger associated molecular pattern) et de PAMP (pathogen associated molecular pattern) (Barreyro, Chlon, et Starczynowski 2018). Ces signaux de danger ainsi que les alarmines S100A8/S100A9 sont présents en très grande quantité au sein du microenvironnement du SMD, et vont venir se lier aux PRR (Pattern

Recognition Receptors) dont font partie les TLR (Toll-like receptors) (Sallman et al. 2016). La stimulation du TLR4 par ces DAMP et alarmines, implique l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la production d'IL-1 $\beta$  via la voie NF- $\kappa$ B. Si nos résultats objectivent une augmentation significative de l'activation de l'inflammasome au sein des MDSC issues de la moelle osseuse des patients en rechute précoce post-greffe, cette affirmation est à nuancer pour les MDSC issues du sang périphérique de ces mêmes patients. Nous faisons l'hypothèse que l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les MDSC de la moelle osseuse de patients en rechute précoce est le reflet d'un microenvironnement hautement inflammatoire lié à la rechute. Toutefois, nous notons que nos résultats avec l'activation de l'inflammasome par LPS/ATP ou l'inhibition par MCC 950 ne modulent pas significativement les propriétés immunosuppressives des MDSC. Seul le traitement par les alarmines aboutit à l'obtention de MDSC significativement immunosuppressives. Si l'activation de l'inflammasome NLRP3 au sein des MDSC a déjà été démontré comme promoteur de la croissance tumorale en oncologie solide suite à l'induction de leurs fortes propriétés immunosuppressives (Bruchard et al. 2013), pour l'heure ce mécanisme est moins connu en hématologie. De plus, l'analyse des plasmas de moelle osseuse et du sang périphérique ne confirme pas une signature cytokinique où les alarmines seraient significativement plus élevées dans le microenvironnement médullaire des patients en rechute précoce.

Toutefois, le microenvironnement semble important dans la modulation des propriétés immunosuppressives des MDSC. Cette affirmation s'appuie sur les résultats obtenus à partir de co-culture de CSM issues de témoins sains et de patients atteints de SMD/LAM avec des MDSC de receveurs initialement non immunosuppressives. Nos résultats ont démontré l'acquisition de propriétés immunosuppressives après 24 heures seulement de co-culture avec des CSM de patients (ce qui n'était pas observé avec les CSM de témoins sains). Les CSM de SMD sont épigénétiquement et fonctionnellement altérées, présentant un profil cytokinique différent de CSM témoins (Geyh et al. 2013), ainsi que des capacités prolifératives et de différenciations réduites (Pavlaki et al. 2014). Toutes ces altérations entraînent un déficit dans le support de l'hématopoïèse normale (Geyh et al. 2016). Si les conclusions concernant l'étude des capacités immunorégulatrices des CSM de SMD divergent au sein de la communauté scientifique (Fattizzo, Giannotta, et Barcellini 2020) (Klaus et al. 2010), il a été démontré que les CSM de SMD étaient capables d'induire un profil immunorégulateur à des monocytes sains (Sarhan et al. 2020). Nos résultats confirment l'importance des interactions entre les CSM et les MDSC, et plus globalement, de l'importance du microenvironnement de la rechute dans l'induction des propriétés immunosuppressives des MDSC. Nous souhaiterions, à l'avenir, à l'issue de ces co-cultures CSM/MDSC mieux caractériser les MDSC devenues immunosuppressives (étude de l'inflammasome, ROS intra-cellulaire...). Enfin, si un pré-traitement par alarmines S100A8/S100A9 ou

par co-culture avec des CSM issues de SMD, joue un rôle essentiel dans l'acquisition des propriétés immunosuppressives des MDSC, nous souhaiterions à l'avenir mieux comprendre les interactions entre les CSM et les MDSC. Sont-elles dépendantes du contact cellulaire (co-culture à réaliser avec un insert bloquant les interactions membrane-membrane) ? Sont-elles dépendantes des alarmines (analyse des surnageants de co-culture...).

## Conclusion

A l'issue de ce travail, nous faisons l'hypothèse principale que, dans le contexte de l'allo-HSCT, la présence de MDSC dans le microenvironnement médullaire est un facteur important dans l'échappement des cellules myélodysplasiques et leucémique au contrôle du système immunitaire adaptatif représenté par les lymphocytes T du donneur. Ces MDSCs pourraient dérivées du receveur (persistance malgré le conditionnement de la greffe) ou être rapidement induites par un microenvironnement pathologique persistant, soit par des cellules tumorales résiduelles soit par les cellules stromales mésenchymateuses déficientes. En effet, nos résultats préliminaires objectivent que les CSM de patients SDM/LAM sont capables d'induire rapidement des propriétés immunosuppressives des cellules « MDSC ». Selon nous, les MDSC immunosuppressives joueraient un rôle pivot dans l'inefficacité du système immunitaire à contrôler la rechute d'un SMD/LAM en post-greffe. En effet, nous avons observé qu'elles sont capables de réguler l'activation et la prolifération des lymphocytes T *in vitro* et *in vivo*. Ce mécanisme expliquerait pourquoi les patients qui rechutent dans les premiers mois de la greffe sont les patients qui ne développent aucune allo-réactivité post-greffe. A contrario, dans certaines situations d'allogreffe (haplo-identique, conditionnement toxique avec relargage de signaux de dangers ...) où le système immunitaire du donneur est capable de déclencher rapidement une allo-réactivité forte, les MDSCs pourraient maturer vers un phénotype de monocytes matures inflammatoires totalement dépourvus de propriétés immunorégulatrices. Ceci expliquerait que les patients atteints de GVH aiguë rechutent rarement dans les premiers mois de la greffe.

## Bibliographie

Adès, Lionel, Raphael Itzykson, et Pierre Fenaux. 2014. « Myelodysplastic Syndromes ». *Lancet (London, England)* 383 (9936): 2239-52. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61901-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61901-7).

Aguirre, Luis E., Najla Al Ali, David A. Sallman, Somedeb Ball, Akriti G. Jain, Onyee Chan, Sara M. Tinsley-Vance, et al. 2023. « Assessment and Validation of the Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes ». *Leukemia* 37 (7): 1530-39. <https://doi.org/10.1038/s41375-023-01910-3>.

Alexandrakis, Michael G., Freda H. Passam, Constantina A. Pappa, Katerina Sfiridaki, George Tsirakis, John Damilakis, Efstathios N. Stathopoulos, et Despina S. Kyriakou. 2005. « Relation between Bone Marrow Angiogenesis and Serum Levels of Angiogenin in Patients with Myelodysplastic Syndromes ». *Leukemia Research* 29 (1): 41-46. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2004.05.002>.

Alhan, C., T. M. Westers, E. M. P. Cremers, C. Cali, B. I. Witte, G. J. Ossenkoppele, et A. A. van de Loosdrecht. 2016. « The Myelodysplastic Syndromes Flow Cytometric Score: A Three-Parameter Prognostic Flow Cytometric Scoring System ». *Leukemia* 30 (3): 658-65. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.295>.

Antonios, Joseph P., Horacio Soto, Richard G. Everson, Diana Moughon, Joey R. Orpilla, Namjo P. Shin, Shaina Sedighim, et al. 2017. « Immunosuppressive Tumor-Infiltrating Myeloid Cells Mediate Adaptive Immune Resistance via a PD-1/PD-L1 Mechanism in Glioblastoma ». *Neuro-Oncology* 19 (6): 796-807. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now287>.

Arber, Daniel A., Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Jürgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau, Clara D. Bloomfield, Mario Cazzola, et James W. Vardiman. 2016. « The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia ». *Blood* 127 (20): 2391-2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.

Arora, M., S. L. Poe, T. B. Oriss, N. Krishnamoorthy, M. Yarlagadda, S. E. Wenzel, T. R. Billiar, A. Ray, et P. Ray. 2010. « TLR4/MyD88-Induced CD11b+Gr-1 Int F4/80+ Non-Migratory Myeloid Cells Suppress Th2 Effector Function in the Lung ». *Mucosal Immunology* 3 (6): 578-93. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.41>.

Aurrand-Lions, Michel, et Stéphane J. C. Mancini. 2018. « Murine Bone Marrow Niches from Hematopoietic Stem Cells to B Cells ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (8): 2353. <https://doi.org/10.3390/ijms19082353>.

Baldrige, Megan T., Katherine Y. King, Nathan C. Boles, David C. Weksberg, et Margaret A. Goodell. 2010. « Quiescent Haematopoietic Stem Cells Are Activated by IFN-Gamma in Response to Chronic Infection ». *Nature* 465 (7299): 793-97. <https://doi.org/10.1038/nature09135>.

Barreyro, Laura, Timothy M. Chlon, et Daniel T. Starczynowski. 2018. « Chronic immune response dysregulation in MDS pathogenesis ». *Blood* 132 (15): 1553-60. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-784116>.

Barreyro, Laura, Britta Will, Boris Bartholdy, Li Zhou, Tihomira I. Todorova, Robert F. Stanley, Susana Ben-Neriah, et al. 2012. « Overexpression of IL-1 Receptor Accessory Protein in Stem and Progenitor Cells and Outcome Correlation in AML and MDS ». *Blood* 120 (6): 1290-98. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-404699>.

Basiorka, Ashley A., Kathy L. McGraw, Erika A. Eksioglu, Xianghong Chen, Joseph Johnson, Ling Zhang, Qing Zhang, et al. 2016. « The NLRP3 Inflammasome Functions as a Driver of the Myelodysplastic Syndrome Phenotype ». *Blood* 128 (25): 2960-75. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-730556>.

Bellamy, W. T., L. Richter, D. Sirjani, C. Roxas, B. Glinsmann-Gibson, Y. Frutiger, T. M. Grogan, et A. F. List. 2001. « Vascular Endothelial Cell Growth Factor Is an Autocrine Promoter of Abnormal Localized Immature Myeloid Precursors and Leukemia Progenitor Formation in Myelodysplastic Syndromes ». *Blood* 97 (5): 1427-34. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.5.1427>.

Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, et C. Sultan. 1982. « Proposals for the Classification of the Myelodysplastic Syndromes ». *British Journal of Haematology* 51 (2): 189-99.

Bernard, Elsa, Heinz Tuechler, Peter L. Greenberg, Robert P. Hasserjian, Juan E. Arango Ossa, Yasuhito Nannya, Sean M. Devlin, et al. 2022. « Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes ». *NEJM Evidence* 1 (7). <https://doi.org/10.1056/EVIDoa2200008>.

Bizymi, Nikoleta, Sunčica Bjelica, Astrid Olsnes Kittang, Slavko Mojsilovic, Maria Velegriki, Charalampos Pontikoglou, Mikael Roussel, et al. 2019. « Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hematologic Diseases: Promising Biomarkers and Treatment Targets ». *HemaSphere* 3 (1). <https://doi.org/10.1097/HS9.000000000000168>.

Bolouri, Hamid, Rhonda E. Ries, Alice E. Wiedeman, Tiffany Hylkema, Sheila Scheiding, Vivian H. Gersuk, Kimberly O'Brien, et al. 2022. « Inflammatory Bone Marrow Signaling in Pediatric Acute Myeloid Leukemia Distinguishes Patients with Poor Outcomes ». *Nature Communications* 13 (1): 7186. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34965-4>.

Bozkus, Cansu Cimen, Bennett D. Elzey, Scott A. Crist, Lesley G. Ellies, et Timothy L. Ratliff. 2015. « Expression of Cationic Amino Acid Transporter 2 (CAT2) Is Required for Myeloid Derived Suppressor Cell-Mediated Control of T Cell Immunity ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195 (11): 5237-50. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500959>.

Bronte, Vincenzo, Sven Brandau, Shu-Hsia Chen, Mario P. Colombo, Alan B. Frey, Tim F. Greten, Susanna Mandruzzato, et al. 2016. « Recommendations for Myeloid-Derived Suppressor Cell Nomenclature and Characterization Standards ». *Nature Communications* 7: 12150. <https://doi.org/10.1038/ncomms12150>.

Bronte, Vincenzo, Paolo Serafini, Carmela De Santo, Ilaria Marigo, Valeria Tosello, Alessandra Mazzone, David M. Segal, et al. 2003. « IL-4-Induced Arginase 1 Suppresses Alloreactive T Cells in Tumor-Bearing Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170 (1): 270-78. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.1.270>.

Bruchard, Mélanie, Grégoire Mignot, Valentin Derangère, Fanny Chalmin, Angélique Chevrier, Frédérique Végran, Wilfrid Boireau, et al. 2013. « Chemotherapy-Triggered Cathepsin B Release in Myeloid-Derived Suppressor Cells Activates the Nlrp3 Inflammasome and Promotes Tumor Growth ». *Nature Medicine* 19 (1): 57-64. <https://doi.org/10.1038/nm.2999>.

Bruns, Ingmar, Daniel Lucas, Sandra Pinho, Jalal Ahmed, Michele P. Lambert, Yuya Kunisaki, Christoph Scheiermann, et al. 2014. « Megakaryocytes Regulate Hematopoietic Stem Cell Quiescence through CXCL4 Secretion ». *Nature Medicine* 20 (11): 1315-20. <https://doi.org/10.1038/nm.3707>.

Cai, Zhigang, Jonathan J. Kotzin, Baskar Ramdas, Sisi Chen, Sai Nelanuthala, Lakshmi Reddy Palam, Ruchi Pandey, et al. 2018. « Inhibition of Inflammatory Signaling in Tet2 Mutant Preleukemic Cells Mitigates Stress-Induced Abnormalities and Clonal Hematopoiesis ». *Cell Stem Cell* 23 (6): 833-849.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.10.013>.

Caiado, Francisco, Eric M. Pietras, et Markus G. Manz. 2021. « Inflammation as a Regulator of Hematopoietic Stem Cell Function in Disease, Aging, and Clonal Selection ». *The Journal of Experimental Medicine* 218 (7): e20201541. <https://doi.org/10.1084/jem.20201541>.

Chan, Charles K. F., Ching-Cheng Chen, Cynthia A. Luppen, Daniel L. Kraft, Jae-Beom Kim, Anthony DeBoer, Kevin Wei, et Irving L. Weissman. 2009. « Endochondral ossification is required for hematopoietic stem cell niche formation ». *Nature* 457 (7228): 490-94. <https://doi.org/10.1038/nature07547>.

Chen, Xianghong, Erika A. Eksioglu, Junmin Zhou, Ling Zhang, Julie Djeu, Nicole Fortenbery, Pearl Epling-Burnette, et al. 2013. « Induction of Myelodysplasia by Myeloid-Derived Suppressor Cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (11): 4595-4611. <https://doi.org/10.1172/JCI67580>.

Cheng, Pingyan, Cesar A. Corzo, Noreen Lueteteke, Bin Yu, Srinivas Nagaraj, Marilyn M. Bui, Myrna Ortiz, et al. 2008. « Inhibition of Dendritic Cell Differentiation and Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer Is Regulated by S100A9 Protein ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (10): 2235-49. <https://doi.org/10.1084/jem.20080132>.

Cheng, Pinyang, Erika A. Eksioglu, Xianghong Chen, Wendy Kandell, Thu Le Trinh, Ling Cen, Jin Qi, et al. 2019. « S100A9-Induced Overexpression of PD-1/PD-L1 Contributes to Ineffective Hematopoiesis in Myelodysplastic Syndromes ». *Leukemia* 33 (8): 2034-46. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0397-9>.

Christopher, Matthew J., Allegra A. Petti, Michael P. Rettig, Christopher A. Miller, Ezhilarasi Chendamarai, Eric J. Duncavage, Jeffery M. Klco, et al. 2018. « Immune Escape of Relapsed AML Cells after Allogeneic Transplantation ». *The New England journal of medicine* 379 (24): 2330-41. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1808777>.

Cogle, Christopher R., Benjamin M. Craig, Dana E. Rollison, et Alan F. List. 2011. « Incidence of the myelodysplastic syndromes using a novel claims-based algorithm: high number of uncaptured cases by cancer registries ». *Blood* 117 (26): 7121-25. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-337964>.

Condamine, Thomas, et Dmitry I. Gabilovich. 2011. « Molecular Mechanisms Regulating Myeloid-Derived Suppressor Cell Differentiation and Function ». *Trends in Immunology* 32 (1): 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.10.002>.

Condamine, Thomas, Jérôme Mastio, et Dmitry I. Gabilovich. 2015. « Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells ». *Journal of Leukocyte Biology* 98 (6): 913-22. <https://doi.org/10.1189/jlb.4RI0515-204R>.

Condamine, Thomas, Indu Ramachandran, Je-In Youn, et Dmitry I. Gabilovich. 2015. « Regulation of Tumor Metastasis by Myeloid-derived Suppressor Cells ». *Annual review of medicine* 66 (janvier): 97-110. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051013-052304>.

Corey, Seth J., Mark D. Minden, Dwayne L. Barber, Hagop Kantarjian, Jean C. Y. Wang, et Aaron D. Schimmer. 2007. « Myelodysplastic Syndromes: The Complexity of Stem-Cell Diseases ». *Nature Reviews Cancer* 7 (2): 118-29. <https://doi.org/10.1038/nrc2047>.

Cortez-Retamozo, Virna, Martin Etzrodt, Andita Newton, Philipp J. Rauch, Aleksey Chudnovskiy, Cedric Berger, Russell J. H. Ryan, et al. 2012. « Origins of Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (7): 2491-96. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113744109>.

Corzo, Cesar A., Thomas Condamine, Lily Lu, Matthew J. Cotter, Je-In Youn, Pingyan Cheng, Hyun-Il Cho, et al. 2010. « HIF-1 $\alpha$  Regulates Function and Differentiation of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (11): 2439-53. <https://doi.org/10.1084/jem.20100587>.

Corzo, Cesar A., Matthew J. Cotter, Pingyan Cheng, Fendong Cheng, Sergei Kusmartsev, Eduardo Sotomayor, Tapan Padhya, Thomas V. McCaffrey, Judith C. McCaffrey, et Dmitry I. Gabrilovich. 2009. « Mechanism Regulating Reactive Oxygen Species in Tumor-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (9): 5693-5701. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900092>.

Damuzzo, Vera, Laura Pinton, Giacomo Desantis, Samantha Solito, Ilaria Marigo, Vincenzo Bronte, et Susanna Mandruzzato. 2015. « Complexity and Challenges in Defining Myeloid-Derived Suppressor Cells ». *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry* 88 (2): 77-91. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21206>.

D'Aveni, Maud, Anne B. Notarantonio, Allan Bertrand, Laura Boulangé, Cécile Pochon, et Marie T. Rubio. 2020. « Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Context of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation ». *Frontiers in Immunology* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00989>.

D'Aveni, Maud, Julien Rossignol, Tereza Coman, Shivajanani Sivakumaran, Stephen Henderson, Teresa Manzo, Pedro Santos e Sousa, et al. 2015. « G-CSF Mobilizes CD34+ Regulatory Monocytes That Inhibit Graft-versus-Host Disease ». *Science Translational Medicine* 7 (281): 281ra42. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010435>.

Davis, Ruth J., Christopher Silvin, et Clint T. Allen. 2017. « Avoiding Phagocytosis-Related Artifact in Myeloid Derived Suppressor Cell T-Lymphocyte Suppression Assays ». *Journal of Immunological Methods* 440 (janvier): 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.11.006>.

Decker, Matthew, Juliana Leslie, Qingxue Liu, et Lei Ding. 2018. « Hepatic thrombopoietin is required for bone marrow hematopoietic stem cell maintenance ». *Science (New York, N.Y.)* 360 (6384): 106-10. <https://doi.org/10.1126/science.aap8861>.

Delano, Matthew J., Philip O. Scumpia, Jason S. Weinstein, Dominique Coco, Srinivas Nagaraj, Kindra M. Kelly-Scumpia, Kerri A. O'Malley, et al. 2007. « MyD88-Dependent Expansion of an Immature GR-

1(+)/CD11b(+) Population Induces T Cell Suppression and Th2 Polarization in Sepsis ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (6): 1463-74. <https://doi.org/10.1084/jem.20062602>.

Della Porta, Matteo G., Cristina Picone, Cristiana Pascutto, Luca Malcovati, Hideto Tamura, Hiroshi Handa, Magdalena Czader, et al. 2012. « Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study ». *Haematologica* 97 (8): 1209-17. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.048421>.

Diao, Jianjun, Xue Yang, Xuedong Song, Shiyu Chen, Yunfeng He, Qingsong Wang, Gang Chen, Chunli Luo, Xiaohou Wu, et Yao Zhang. 2015. « Exosomal Hsp70 Mediates Immunosuppressive Activity of the Myeloid-Derived Suppressor Cells via Phosphorylation of Stat3 ». *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 32 (2): 453. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0453-2>.

Diaz-Montero, C. Marcela, Mohamed Labib Salem, Michael I. Nishimura, Elizabeth Garrett-Mayer, David J. Cole, et Alberto J. Montero. 2009. « Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin–cyclophosphamide chemotherapy ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 58 (1): 49-59. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0523-4>.

Ding, Lei, et Sean J. Morrison. 2013. « Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches ». *Nature* 495 (7440): 231-35. <https://doi.org/10.1038/nature11885>.

Ding, Lei, Thomas L. Saunders, Grigori Enikolopov, et Sean J. Morrison. 2012. « Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells ». *Nature* 481 (7382): 457-62. <https://doi.org/10.1038/nature10783>.

Dulphy, Nicolas, Guylaine Henry, Patrice Hemon, Zena Khaznadar, Hervé Dombret, Nicolas Boissel, Armand Bensussan, et Antoine Toubert. 2014. « Contribution of CD39 to the Immunosuppressive Microenvironment of Acute Myeloid Leukaemia at Diagnosis ». *British Journal of Haematology* 165 (5): 722-25. <https://doi.org/10.1111/bjh.12774>.

Dutta, Partha, Friedrich Felix Hoyer, Lubov S. Grigoryeva, Hendrik B. Sager, Florian Leuschner, Gabriel Courties, Anna Borodovsky, et al. 2015. « Macrophages Retain Hematopoietic Stem Cells in the Spleen via VCAM-1 ». *The Journal of Experimental Medicine* 212 (4): 497-512. <https://doi.org/10.1084/jem.20141642>.

Ebert, Benjamin L., Jennifer Pretz, Jocelyn Bosco, Cindy Y. Chang, Pablo Tamayo, Naomi Galili, Azra Raza, et al. 2008. « Identification of RPS14 as a 5q- Syndrome Gene by RNA Interference Screen ». *Nature* 451 (7176): 335-39. <https://doi.org/10.1038/nature06494>.

Eibl, B., H. Schwaighofer, D. Nachbaur, C. Marth, A. Gächter, R. Knapp, G. Böck, et al. 1996. « Evidence for a Graft-versus-Tumor Effect in a Patient Treated with Marrow Ablative Chemotherapy and Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Breast Cancer ». *Blood* 88 (4): 1501-8.

Essers, Marieke A. G., Sandra Offner, William E. Blanco-Bose, Zoe Waibler, Ulrich Kalinke, Michel A. Duchosal, et Andreas Trumpp. 2009. « IFN $\alpha$  Activates Dormant Haematopoietic Stem Cells in Vivo ». *Nature* 458 (7240): 904-8. <https://doi.org/10.1038/nature07815>.

Estey, Elihu, Robert P. Hasserjian, et Hartmut Döhner. 2022. « Distinguishing AML from MDS: A Fixed Blast Percentage May No Longer Be Optimal ». *Blood* 139 (3): 323-32. <https://doi.org/10.1182/blood.2021011304>.

Fenaux, Pierre, Ghulam J. Mufti, Eva Hellstrom-Lindberg, Valeria Santini, Carlo Finelli, Aristoteles Giagounidis, Robert Schoch, et al. 2009. « Efficacy of Azacitidine Compared with That of Conventional Care Regimens in the Treatment of Higher-Risk Myelodysplastic Syndromes: A Randomised, Open-Label, Phase III Study ». *The Lancet. Oncology* 10 (3): 223-32. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70003-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70003-8).

Feng, Shan, Xi Cheng, Lin Zhang, Xuemin Lu, Seema Chaudhary, Ruifang Teng, Christian Frederickson, et al. 2018. « Myeloid-Derived Suppressor Cells Inhibit T Cell Activation through Nitrating LCK in Mouse Cancers ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (40): 10094-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800695115>.

Feng, Xingmin, Phillip Scheinberg, Colin O. Wu, Leigh Samsel, Olga Nunez, Courtney Prince, Rebecca D. Ganetzky, J. Philip McCoy, Jaroslaw P. Maciejewski, et Neal S. Young. 2011. « Cytokine Signature Profiles in Acquired Aplastic Anemia and Myelodysplastic Syndromes ». *Haematologica* 96 (4): 602-6. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.030536>.

Ferrer, Ruben A., Manja Wobus, Catrin List, Rebekka Wehner, Claudia Schönefeldt, Barbara Brocard, Brigitte Mohr, et al. 2013. « Mesenchymal Stromal Cells from Patients with Myelodysplastic Syndrome Display Distinct Functional Alterations That Are Modulated by Lenalidomide ». *Haematologica* 98 (11): 1677-85. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.083972>.

Fievet, L., N. Serratrice, B. Brulin, L. Giraud, J. Véran, N. Degardin, F. Sabatier, F. Féron, et P. Layrolle. 2022. « A Comparative In Vitro and In Vivo Study of Osteogenicity by Using Two Biomaterials and Two

Human Mesenchymal Stem Cell Subtypes ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10: 913539. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.913539>.

Fozza, Claudio, Francesco Longu, Salvatore Contini, Antonio Galleu, Patrizia Virdis, Silvana Bonfigli, Marco Murineddu, Attilio Gabbas, et Maurizio Longinotti. 2012. « Patients with Early-Stage Myelodysplastic Syndromes Show Increased Frequency of CD4+CD25+CD127(Low) Regulatory T Cells ». *Acta Haematologica* 128 (3): 178-82. <https://doi.org/10.1159/000339498>.

Frenette, Paul S., Sandra Pinho, Daniel Lucas, et Christoph Scheiermann. 2013. « Mesenchymal Stem Cell: Keystone of the Hematopoietic Stem Cell Niche and a Stepping-Stone for Regenerative Medicine ». *Annual Review of Immunology* 31: 285-316. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095919>.

Friedrich, Chloé, et Olivier Kosmider. 2022. « The Mesenchymal Niche in Myelodysplastic Syndromes ». *Diagnostics* 12 (7): 1639. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12071639>.

Gabrilovich, Dmitry I., Vincenzo Bronte, Shu-Hsia Chen, Mario P. Colombo, Augusto Ochoa, Suzanne Ostrand-Rosenberg, et Hans Schreiber. 2007. « The Terminology Issue for Myeloid-Derived Suppressor Cells ». *Cancer Research* 67 (1): 425; author reply 426. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3037>.

Gabrilovich, Dmitry I., et Srinivas Nagaraj. 2009. « Myeloid-Derived Suppressor Cells as Regulators of the Immune System ». *Nature Reviews. Immunology* 9 (3): 162-74. <https://doi.org/10.1038/nri2506>.

Gabrilovich, Dmitry I., Suzanne Ostrand-Rosenberg, et Vincenzo Bronte. 2012. « Coordinated regulation of myeloid cells by tumours ». *Nature reviews. Immunology* 12 (4): 253-68. <https://doi.org/10.1038/nri3175>.

Garcia-Manero, Guillermo, Kelly S. Chien, et Guillermo Montalban-Bravo. 2020. « Myelodysplastic Syndromes: 2021 Update on Diagnosis, Risk Stratification and Management ». *American Journal of Hematology* 95 (11): 1399-1420. <https://doi.org/10.1002/ajh.25950>.

Gehad, Ahmed E., Michael K. Lichtman, Chrysalyn D. Schmults, Jessica E. Teague, Adam W. Calarese, Ying Jiang, Rei Watanabe, et Rachael A. Clark. 2012. « Nitric Oxide-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells Inhibit Vascular E-Selectin Expression in Human Squamous Cell Carcinomas ». *The Journal of Investigative Dermatology* 132 (11): 2642-51. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.190>.

Genovese, Giulio, Siddhartha Jaiswal, Benjamin L. Ebert, et Steven A. McCarroll. 2015. « Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk ». *The New England Journal of Medicine* 372 (11): 1071-72. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1500684>.

Genovese, Giulio, Anna K. Kähler, Robert E. Handsaker, Johan Lindberg, Samuel A. Rose, Samuel F. Bakhom, Kimberly Chambert, et al. 2014. « Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence ». *The New England Journal of Medicine* 371 (26): 2477-87. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409405>.

Geyh, S., S. Oz, R.-P. Cadeddu, J. Fröbel, B. Brückner, A. Kündgen, R. Fenk, et al. 2013. « Insufficient Stromal Support in MDS Results from Molecular and Functional Deficits of Mesenchymal Stromal Cells ». *Leukemia* 27 (9): 1841-51. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.193>.

Gfeller, David, et Michal Bassani-Sternberg. 2018. « Predicting Antigen Presentation-What Could We Learn From a Million Peptides? » *Frontiers in Immunology* 9: 1716. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01716>.

Giallongo, Cesarina, Nunziatina Parrinello, Daniele Tibullo, Piera La Cava, Alessandra Romano, Annalisa Chiarenza, Ignazio Barbagallo, et al. 2014. « Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSCs) Are Increased and Exert Immunosuppressive Activity Together with Polymorphonuclear Leukocytes (PMNs) in Chronic Myeloid Leukemia Patients ». *PloS One* 9 (7): e101848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101848>.

Giallongo, Cesarina, Daniele Tibullo, Nunziatina L. Parrinello, Piera La Cava, Michelino Di Rosa, Vincenzo Bramanti, Cosimo Di Raimondo, et al. 2016. « Granulocyte-like myeloid derived suppressor cells (G-MDSC) are increased in multiple myeloma and are driven by dysfunctional mesenchymal stem cells (MSC) ». *Oncotarget* 7 (52): 85764-75. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7969>.

Giudice, Valentina, Zhijie Wu, Sachiko Kajigaya, Maria del Pilar Fernandez Ibanez, Olga Rios, Foo Cheung, Sawa Ito, et Neal S. Young. 2019. « Circulating S100A8 and S100A9 protein levels in plasma of patients with acquired aplastic anemia and myelodysplastic syndromes ». *Cytokine* 113 (janvier): 462-65. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.06.025>.

Gournay, Viviane, Nicolas Vallet, Vivien Peux, Kristi Vera, Jennifer Bordenave, Marion Lambert, Aurélien Corneau, et al. 2022. « Immune Landscape after Allo-HSCT: TIGIT- and CD161-Expressing CD4 T Cells Are Associated with Subsequent Leukemia Relapse ». *Blood* 140 (11): 1305-21. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015522>.

Granfeldt Østgård, Lene Sofie, Bruno C. Medeiros, Henrik Sengeløv, Mette Nørregaard, Mette Klarskov Andersen, Inge Høgh Dufva, Lone Smidstrup Friis, et al. 2015. « Epidemiology and Clinical Significance of Secondary and Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia: A National Population-Based Cohort Study ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (31): 3641-49. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.0890>.

Greenbaum, Adam, Yen-Michael S. Hsu, Ryan B. Day, Laura G. Schuettpelz, Matthew J. Christopher, Joshua N. Borgerding, Takashi Nagasawa, et Daniel C. Link. 2013. « CXCL12 Production by Early Mesenchymal Progenitors is Required for Hematopoietic Stem Cell Maintenance ». *Nature* 495 (7440): 227-30. <https://doi.org/10.1038/nature11926>.

Greenberg, Peter L., Heinz Tuechler, Julie Schanz, Guillermo Sanz, Guillermo Garcia-Manero, Francesc Solé, John M. Bennett, et al. 2012. « Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes ». *Blood* 120 (12): 2454-65. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-420489>.

Greten, Tim F., Michael P. Manns, et Firouzeh Korangy. 2011. « Myeloid Derived Suppressor Cells in Human Diseases ». *International Immunopharmacology* 11 (7): 802-7. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.01.003>.

Gruber, Stephan, Prakash Arumugam, Yuki Katou, Daria Kuglitsch, Wolfgang Helmhart, Katsuhiko Shirahige, et Kim Nasmyth. 2006. « Evidence That Loading of Cohesin Onto Chromosomes Involves Opening of Its SMC Hinge ». *Cell* 127 (3): 523-37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.048>.

Guan, Qingdong, Anna R. Blankstein, Karla Anjos, Oleksandra Synova, Marie Tulloch, Angeline Giftakis, Bin Yang, et al. 2015. « Functional Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets Recover Rapidly after Allogeneic Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Transplantation ». *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 21 (7): 1205-14. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.04.015>.

Guièze, Romain, Gandhi Damaj, Bruno Pereira, Marie Robin, Patrice Chevallier, Mauricette Michallet, Stéphane Vigouroux, et al. 2016. « Management of Myelodysplastic Syndrome Relapsing after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Study by the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapies ». *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 22 (2): 240-47. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.07.037>.

Haase, Detlef. 2008. « Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes ». *Annals of Hematology* 87 (7): 515-26. <https://doi.org/10.1007/s00277-008-0483-y>.

Haase, Detlef, Ulrich Germing, Julie Schanz, Michael Pfeilstöcker, Thomas Nösslinger, Barbara Hildebrandt, Andrea Kundgen, et al. 2007. « New Insights into the Prognostic Impact of the Karyotype in MDS and Correlation with Subtypes: Evidence from a Core Dataset of 2124 Patients ». *Blood* 110 (13): 4385-95. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-082404>.

Haferlach, T, Y Nagata, V Grossmann, Y Okuno, U Bacher, G Nagae, S Schnittger, et al. 2014. « Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes ». *Leukemia* 28 (2): 241-47. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.336>.

Hanson, Erica M., Virginia K. Clements, Pratima Sinha, Dan Ilkovitch, et Suzanne Ostrand-Rosenberg. 2009. « Myeloid-Derived Suppressor Cells Down-Regulate L-Selectin Expression on CD4+ and CD8+ T Cells ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (2): 937-44. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804253>.

Highfill, Steven L., Paulo C. Rodriguez, Qing Zhou, Christine A. Goetz, Brent H. Koehn, Rachelle Veenstra, Patricia A. Taylor, 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 (25): 5738-47. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-287839>.

Himburg, Heather A., Christina M. Termini, Lauren Schlüssel, Jenny Kan, Michelle Li, Liman Zhao, Tiancheng Fang, Joshua P. Sasine, Vivian Y. Chang, et John P. Chute. 2018. « Distinct Bone Marrow Sources of Pleiotrophin Control Hematopoietic Stem Cell Maintenance and Regeneration ». *Cell Stem Cell* 23 (3): 370. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.07.003>.

Hirata, Yuichi, Kazuhiro Furuhashi, Hiroshi Ishii, Hao Wei Li, Sandra Pinho, Lei Ding, Simon C. Robson, Paul S. Frenette, et Joji Fujisaki. 2018. « CD150<sup>high</sup> Bone Marrow Tregs Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Immune Privilege via Adenosine ». *Cell Stem Cell* 22 (3): 445-453.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.01.017>.

Hölig, Kristina, Michael Kramer, Frank Kroschinsky, Martin Bornhäuser, Thilo Mengling, Alexander H. Schmidt, Claudia Rutt, et Gerhard Ehninger. 2009. « Safety and Efficacy of Hematopoietic Stem Cell Collection from Mobilized Peripheral Blood in Unrelated Volunteers: 12 Years of Single-Center Experience in 3928 Donors ». *Blood* 114 (18): 3757-63. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-218651>.

Hong, Eun-Hye, Sun-Young Chang, Bo-Ra Lee, Yun-Sun Kim, Jeong-Mi Lee, Chang-Yuil Kang, Mi-Na Kweon, et Hyun-Jeong Ko. 2013. « Blockade of Myd88 Signaling Induces Antitumor Effects by Skewing the Immunosuppressive Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells ». *International Journal of Cancer* 132 (12): 2839-48. <https://doi.org/10.1002/ijc.27974>.

Hosono, Naoko. 2019. « Genetic Abnormalities and Pathophysiology of MDS ». *International Journal of Clinical Oncology* 24 (8): 885-92. <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01462-6>.

Hosono, Naoko, Hideki Makishima, Reda Mahfouz, Bartłomiej Przychodzen, Kenichi Yoshida, Andres Jerez, Thomas LaFramboise, et al. 2016. « Recurrent genetic defects on chromosome 5q in myeloid neoplasms ». *Oncotarget* 8 (4): 6483-95. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14130>.

Hu, Xiaolin, Kankana Bardhan, Amy V. Paschall, Dafeng Yang, Jennifer L. Waller, Mary Anne Park, Asha Nayak-Kapoor, Thomas A. Samuel, Scott I. Abrams, et Kebin Liu. 2013. « Deregulation of Apoptotic Factors Bcl-xL and Bax Confers Apoptotic Resistance to Myeloid-Derived Suppressor Cells and Contributes to Their Persistence in Cancer ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (26): 19103-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.434530>.

Hu, Xin, Baihua Li, Xiaoyan Li, Xianxian Zhao, Lin Wan, Guohong Lin, Min Yu, et al. 2014. « Transmembrane TNF- $\alpha$  Promotes Suppressive Activities of Myeloid-Derived Suppressor Cells via TNFR2 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (3): 1320-31. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203195>.

Huang, Bo, Ping-Ying Pan, Qingsheng Li, Alice I. Sato, David E. Levy, Jonathan Bromberg, Celia M. Divino, et Shu-Hsia Chen. 2006. « Gr-1+CD115+ Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host ». *Cancer Research* 66 (2): 1123-31. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1299>.

Hur, Jin, Jae-Il Choi, Hwan Lee, Pniel Nham, Tae-Won Kim, Cheong-Whan Chae, Ji-Yeon Yun, et al. 2016. « CD82/KAI1 Maintains the Dormancy of Long-Term Hematopoietic Stem Cells through Interaction with DARC-Expressing Macrophages ». *Cell Stem Cell* 18 (4): 508-21. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.013>.

Itkin, Tomer, Shiri Gur-Cohen, Joel A. Spencer, Amir Schajnovitz, Saravana K. Ramasamy, Anjali P. Kusumbe, Guy Ledergor, et al. 2016. « Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate hematopoiesis ». *Nature* 532 (7599): 323-28. <https://doi.org/10.1038/nature17624>.

Jädersten, Martin, Luca Malcovati, Ingunn Dybedal, Matteo Giovanni Della Porta, Rosangela Invernizzi, Scott M. Montgomery, Cristiana Pascutto, Anna Porwit, Mario Cazzola, et Eva Hellström-Lindberg. 2008. « Erythropoietin and Granulocyte-Colony Stimulating Factor Treatment Associated with Improved Survival in Myelodysplastic Syndrome ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (21): 3607-13. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.4906>.

Jädersten, Martin, Scott M. Montgomery, Ingunn Dybedal, Anna Porwit-MacDonald, et Eva Hellström-Lindberg. 2005. « Long-Term Outcome of Treatment of Anemia in MDS with Erythropoietin and G-CSF ». *Blood* 106 (3): 803-11. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-3872>.

Jaiswal, Siddhartha, Pierre Fontanillas, Jason Flannick, Alisa Manning, Peter V. Grauman, Brenton G. Mar, R. Coleman Lindsley, et al. 2014. « Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes ». *The New England Journal of Medicine* 371 (26): 2488-98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408617>.

Jitschin, Regina, Martina Braun, Maike Büttner, Katja Dettmer-Wilde, Juliane Bricks, Jana Berger, Michael J. Eckart, et al. 2014. « CLL-Cells Induce IDOhi CD14+HLA-DRlo Myeloid-Derived Suppressor Cells That Inhibit T-Cell Responses and Promote TRegs ». *Blood* 124 (5): 750-60. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-546416>.

Kennedy, James A., et Benjamin L. Ebert. 2017. « Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (9): 968-74. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.0806>.

Kerbaui, Daniella M. Bahia, Vladimir Lesnikov, Beverly Torok-Storb, Eileen Bryant, et H. Joachim Deeg. 2004. « Engraftment of Distinct Clonal MDS-Derived Hematopoietic Precursors in NOD/SCID-Beta2-Microglobulin-Deficient Mice after Intramedullary Transplantation of Hematopoietic and Stromal Cells ». *Blood* 104 (7): 2202-3. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1518>.

Khan, S. N., A. M. Jankowska, R. Mahfouz, A. J. Dunbar, Y. Sugimoto, N. Hosono, Z. Hu, et al. 2013. « Multiple Mechanisms Deregulate EZH2 and Histone H3 Lysine 27 Epigenetic Changes in Myeloid Malignancies ». *Leukemia* 27 (6): 1301-9. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.80>.

Khoury, Joseph D., Eric Solary, Oussama Abla, Yasmine Akkari, Rita Alaggio, Jane F. Apperley, Rafael Bejar, et al. 2022. « The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms ». *Leukemia* 36 (7): 1703-19. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>.

Kim, Chan Kyu, Dong Hoon Han, Young Seok Ji, Min Sung Lee, Chang Wook Min, Seong Kyu Park, Se Hyung Kim, et al. 2016. « Biomarkers of Angiogenesis as Prognostic Factors in Myelodysplastic Syndrome Patients Treated with Hypomethylating Agents ». *Leukemia Research* 50 (novembre): 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2016.08.012>.

Kim, Tae Woo, Sung-Soo Park, Ji-Young Lim, Gi June Min, Silvia Park, Young-Woo Jeon, Seung-Ah Yahng, et al. 2018. « Predictive Role of Circulating Immune Cell Subtypes Early after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Acute Leukemia ». *International Journal of Stem Cells* 12 (1): 73-83. <https://doi.org/10.15283/ijsc18094>.

Kittang, Astrid Olsnes, Shahram Kordasti, Kristoffer Enevold Sand, Benedetta Costantini, Anne Marijn Kramer, Pilar Perezabellan, Thomas Seidl, et al. 2016. « Expansion of Myeloid Derived Suppressor Cells Correlates with Number of T Regulatory Cells and Disease Progression in Myelodysplastic Syndrome ». *Oncoimmunology* 5 (2): e1062208. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1062208>.

Kon, Ayana, Lee-Yung Shih, Masashi Minamino, Masashi Sanada, Yuichi Shiraishi, Yasunobu Nagata, Kenichi Yoshida, et al. 2013. « Recurrent Mutations in Multiple Components of the Cohesin Complex in Myeloid Neoplasms ». *Nature Genetics* 45 (10): 1232-37. <https://doi.org/10.1038/ng.2731>.

Kong, Y, J Zhang, D F Claxton, W C Ehmann, W B Rybka, L Zhu, H Zeng, T D Schell, et H Zheng. 2015. « PD-1hiTIM-3+ T cells associate with and predict leukemia relapse in AML patients post allogeneic stem cell transplantation ». *Blood Cancer Journal* 5 (7): e330. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.58>.

Kordasti, Shahram Y., Wendy Ingram, Janet Hayden, David Darling, Linda Barber, Behdad Afzali, Giovanna Lombardi, et al. 2007. « CD4+CD25high Foxp3+ Regulatory T Cells in Myelodysplastic Syndrome (MDS) ». *Blood* 110 (3): 847-50. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-067546>.

Kotsianidis, I., I. Bouchliou, E. Nakou, E. Spanoudakis, D. Margaritis, A. V. Christophoridou, A. Anastasiades, et al. 2009. « Kinetics, Function and Bone Marrow Trafficking of CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells in Myelodysplastic Syndromes (MDS) ». *Leukemia* 23 (3): 510-18. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.333>.

Kröger, Nicolaus, Simona Iacobelli, Georg-Nikolaus Franke, Uwe Platzbecker, Ruzena Uddin, Kai Hübel, Christof Scheid, et al. 2017. « Dose-Reduced Versus Standard Conditioning Followed by Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Patients With Myelodysplastic Syndrome: A Prospective Randomized Phase III Study of the EBMT (RICMAC Trial) ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (19): 2157-64. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.7349>.

Kusmartsev, Sergei, et Dmitry I. Gibrilovich. 2006. « Role of Immature Myeloid Cells in Mechanisms of Immune Evasion in Cancer ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 55 (3): 237-45. <https://doi.org/10.1007/s00262-005-0048-z>.

Kusmartsev, Sergei, Yulia Nefedova, Daniel Yoder, et Dmitry I. Gibrilovich. 2004. « Antigen-Specific Inhibition of CD8+ T Cell Response by Immature Myeloid Cells in Cancer Is Mediated by Reactive Oxygen Species ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (2): 989-99. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.989>.

Lambert, Claude, Yuenv Wu, et Carmen Aanei. 2016. « Bone Marrow Immunity and Myelodysplasia ». *Frontiers in Oncology* 6 (juillet): 172. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00172>.

Lane, Steven W., Stephen M. Sykes, Fatima Al-Shahrour, Sebastian Shterental, Mahnaz Paktinat, Cristina Lo Celso, Jonathan L. Jesneck, Benjamin L. Ebert, David A. Williams, et D. Gary Gilliland. 2010. « The Apcmin mouse has altered hematopoietic stem cell function and provides a model for MPD/MDS ». *Blood* 115 (17): 3489-97. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-251728>.

Lansford, Jefferson L., Udara Dharmasiri, Shengjie Chai, Sally A. Hunsucker, Dante S. Bortone, James E. Keating, Ian M. Schlup, et al. 2018. « Computational Modeling and Confirmation of Leukemia-Associated Minor Histocompatibility Antigens ». *Blood Advances* 2 (16): 2052-62. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018022475>.

Lee, Stanley Chun-Wei, Heidi Dvinge, Eunhee Kim, Hana Cho, Jean-Baptiste Micol, Young Rock Chung, Benjamin H. Durham, et al. 2016. « Modulation of Splicing Catalysis for Therapeutic Targeting of Leukemia with Mutations in Genes Encoding Spliceosomal Proteins ». *Nature Medicine* 22 (6): 672-78. <https://doi.org/10.1038/nm.4097>.

Lee, Sung-Eun, Ji-Young Lim, Tae Woo Kim, Young-Woo Jeon, Jae-Ho Yoon, Byung-Sik Cho, Ki-Seong Eom, et al. 2018. « Matrix Metalloproteinase-9 in Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Correlate with Early Infections and Clinical Outcomes in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation ». *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 24 (1): 32-42. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.08.017>.

Lee-Six, Henry, Nina Friesgaard Øbro, Mairi S. Shepherd, Sebastian Grossmann, Kevin Dawson, Miriam Belmonte, Robert J. Osborne, et al. 2018. « Population dynamics of normal human blood inferred from somatic mutations ». *Nature* 561 (7724): 473-78. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0497-0>.

Leeuwen-Kerkhoff, Nathalie van, Theresia M. Westers, Pino J. Poddighe, Tanja D. de Gruijl, Shahram Kordasti, et Arjan A. van de Loosdrecht. 2020. « Thrombomodulin-Expressing Monocytes Are Associated with Low-Risk Features in Myelodysplastic Syndromes and Dampen Excessive Immune Activation ». *Haematologica* 105 (4): 961-71. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.219303>.

Li, Hequan, Yanmei Han, Qiuli Guo, Minggang Zhang, et Xuetao Cao. 2009. « Cancer-Expanded Myeloid-Derived Suppressor Cells Induce Anergy of NK Cells through Membrane-Bound TGF-Beta 1 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (1): 240-49. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.1.240>.

Li, Wenchao, et A. Robert Schnatter. 2018. « Benzene Risk Assessment: Does New Evidence on Myelodysplastic Syndrome Justify a New Approach? » *Critical Reviews in Toxicology* 48 (6): 417-32. <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1437389>.

Lin, Ying-Wei, Christopher Slape, Zhenhua Zhang, et Peter D. Aplan. 2005. « NUP98-HOXD13 transgenic mice develop a highly penetrant, severe myelodysplastic syndrome that progresses to acute leukemia ». *Blood* 106 (1): 287-95. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4794>.

Lindsley, R. Coleman, Brenton G. Mar, Emanuele Mazzola, Peter V. Grauman, Sarah Shareef, Steven L. Allen, Arnaud Pigneux, et al. 2015. « Acute Myeloid Leukemia Ontogeny Is Defined by Distinct Somatic Mutations ». *Blood* 125 (9): 1367-76. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-610543>.

Link, Daniel C., Laura G. Schuettpelz, Dong Shen, Jinling Wang, Matthew J. Walter, Shashikant Kulkarni, Jacqueline E. Payton, et al. 2011. « Identification of a Novel TP53 Cancer Susceptibility Mutation through Whole-Genome Sequencing of a Patient with Therapy-Related AML ». *JAMA* 305 (15): 1568-76. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.473>.

Linnemann, Carsten, Frank A. Schildberg, Anna Schurich, Linda Diehl, Silke I. Hegenbarth, Elmar Endl, Svenja Lacher, et al. 2009. « Adenosine Regulates CD8 T-Cell Priming by Inhibition of Membrane-Proximal T-Cell Receptor Signalling ». *Immunology* 128 (1 Suppl): e728-737. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03075.x>.

Liu, Yuelong, Xiaoyu Xiang, Xiaoying Zhuang, Shuangyin Zhang, Cunren Liu, Ziqiang Cheng, Sue Michalek, William Grizzle, et Huang-Ge Zhang. 2010. « Contribution of MyD88 to the Tumor Exosome-Mediated Induction of Myeloid Derived Suppressor Cells ». *The American Journal of Pathology* 176 (5): 2490-99. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090777>.

Lu, Tangying, Rupal Ramakrishnan, Soner Altiok, Je-In Youn, Pingyan Cheng, Esteban Celis, Vladimir Pisarev, Simon Sherman, Michael B. Sporn, et Dmitry Gabrilovich. 2011. « Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (10): 4015-29. <https://doi.org/10.1172/JCI45862>.

Luyckx, Ariane, Elio Schoupe, Omer Rutgeerts, Caroline Lenaerts, Sabine Fevery, Timothy Devos, Daan Dierickx, Mark Waer, Jo A. Van Ginderachter, et An D. Billiau. 2012. « G-CSF Stem Cell Mobilization in Human Donors Induces Polymorphonuclear and Mononuclear Myeloid-Derived Suppressor Cells ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 143 (1): 83-87. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.01.011>.

Lv, Meng, Ke Wang, et Xiao-jun Huang. 2019. « Myeloid-derived suppressor cells in hematological malignancies: friends or foes ». *Journal of Hematology & Oncology* 12 (octobre): 105. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0797-3>.

Lv, Meng, Xiao-Su Zhao, Yue Hu, Ying-Jun Chang, Xiang-Yu Zhao, Yuan Kong, Xiao-Hui Zhang, Lan-Ping Xu, Kai-Yan Liu, et Xiao-Jun Huang. 2015. « Monocytic and Promyelocytic Myeloid-Derived Suppressor

Cells May Contribute to G-CSF-Induced Immune Tolerance in Haplo-Identical Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation ». *American Journal of Hematology* 90 (1): E9-16. <https://doi.org/10.1002/ajh.23865>.

Ma, Xiaomei. 2012. « Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes ». *The American Journal of Medicine* 125 (7 Suppl): S2-5. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2012.04.014>.

Makishima, Hideki, et Jaroslaw P. Maciejewski. 2011. « Pathogenesis and Consequences of Uniparental Disomy in Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17 (12): 3913-23. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2900>.

Malcovati, Luca, et Mario Cazzola. 2013. « Refractory Anemia with Ring Sideroblasts ». *Best Practice & Research. Clinical Haematology* 26 (4): 377-85. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2013.09.005>.

Mandruzzato, Susanna, Sven Brandau, Cedrik M. Britten, Vincenzo Bronte, Vera Damuzzo, Cécile Gouttefangeas, Dominik Maurer, et al. 2016. « Toward Harmonized Phenotyping of Human Myeloid-Derived Suppressor Cells by Flow Cytometry: Results from an Interim Study ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 65 (2): 161-69. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1782-5>.

Mao, Yumeng, Isabel Poschke, Erik Wennerberg, Yago Pico de Coaña, Suzanne Egyhazi Brage, Inkeri Schultz, Johan Hansson, Giuseppe Masucci, Andreas Lundqvist, et Rolf Kiessling. 2013. « Melanoma-Educated CD14+ Cells Acquire a Myeloid-Derived Suppressor Cell Phenotype through COX-2-Dependent Mechanisms ». *Cancer Research* 73 (13): 3877-87. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4115>.

Markowitz, Joseph, Jiang Wang, Zach Vangundy, Jia You, Vedat Yildiz, Lianbo Yu, Isaac P. Foote, et al. 2017. « Nitric Oxide Mediated Inhibition of Antigen Presentation from DCs to CD4+ T Cells in Cancer and Measurement of STAT1 Nitration ». *Scientific Reports* 7 (1): 15424. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14970-0>.

Marvel, Douglas, et Dmitry I. Gabilovich. 2015. « Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment: Expect the Unexpected ». *The Journal of Clinical Investigation* 125 (9): 3356-64. <https://doi.org/10.1172/JCI80005>.

Mathew, Nimitha R., Francis Baumgartner, Lukas Braun, David O'Sullivan, Simone Thomas, Miguel Waterhouse, Tony A. Müller, et al. 2018. « Sorafenib Promotes Graft-versus-Leukemia Activity in Mice and Humans through IL-15 Production in FLT3-ITD-Mutant Leukemia Cells ». *Nature Medicine* 24 (3): 282-91. <https://doi.org/10.1038/nm.4484>.

Medina, Edward A., Caroline R. Delma, et Feng-Chun Yang. 2022. « ASXL1/2 mutations and myeloid malignancies ». *Journal of Hematology & Oncology* 15 (septembre): 127. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01336-x>.

Medyouf, Hind, Maximilian Mossner, Johann-Christoph Jann, Florian Nolte, Simon Raffel, Carl Herrmann, Amelie Lier, et al. 2014. « Myelodysplastic Cells in Patients Reprogram Mesenchymal Stromal Cells to Establish a Transplantable Stem Cell Niche Disease Unit ». *Cell Stem Cell* 14 (6): 824-37. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.014>.

Mellibovsky, L., A. Diez, S. Serrano, J. Aubia, E. Pérez-Vila, M. L. Mariñoso, X. Nogués, et R. R. Recker. 1996. « Bone Remodeling Alterations in Myelodysplastic Syndrome ». *Bone* 19 (4): 401-5. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(96\)00210-4](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(96)00210-4).

Menssen, Andrew J., et Matthew J. Walter. 2020. « Genetics of progression from MDS to secondary leukemia ». *Blood* 136 (1): 50-60. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000942>.

Mian, Syed A., et Dominique Bonnet. 2021. « Nature or Nurture? Role of the Bone Marrow Microenvironment in the Genesis and Maintenance of Myelodysplastic Syndromes ». *Cancers* 13 (16): 4116. <https://doi.org/10.3390/cancers13164116>.

Mirantes, Cristina, Emmanuelle Passegué, et Eric M. Pietras. 2014. « Pro-Inflammatory Cytokines: Emerging Players Regulating HSC Function in Normal and Diseased Hematopoiesis ». *Experimental Cell Research* 329 (2): 248-54. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.017>.

Moore, Lisa D., Thuc Le, et Guoping Fan. 2013. « DNA Methylation and Its Basic Function ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 38 (1): 23-38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>.

Morales-Mantilla, Daniel E., et Katherine Y. King. 2018. « The Role of Interferon-Gamma in Hematopoietic Stem Cell Development, Homeostasis, and Disease ». *Current Stem Cell Reports* 4 (3): 264-71. <https://doi.org/10.1007/s40778-018-0139-3>.

Mougiakakos, D., R. Jitschin, L. von Bahr, I. Poschke, R. Gary, B. Sundberg, A. Gerbitz, P. Ljungman, et K. Le Blanc. 2013. « Immunosuppressive CD14+HLA-DRIow/Neg IDO+ Myeloid Cells in Patients Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation ». *Leukemia* 27 (2): 377-88. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.215>.

Movahedi, Kiavash, Martin Guilliams, Jan Van den Bossche, Rafael Van den Bergh, Conny Gysemans, Alain Beschin, Patrick De Baetselier, et Jo A. Van Ginderachter. 2008. « Identification of Discrete

Tumor-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cell Subpopulations with Distinct T Cell-Suppressive Activity ». *Blood* 111 (8): 4233-44. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-099226>.

Munn, David H., Madhav D. Sharma, Babak Baban, Heather P. Harding, Yuhong Zhang, David Ron, et Andrew L. Mellor. 2005. « GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase ». *Immunity* 22 (5): 633-42. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.03.013>.

Mussai, Francis, Carmela De Santo, Issa Abu-Dayyeh, Sarah Booth, Lynn Quek, Rosanna M. McEwen-Smith, Amrana Qureshi, Francesco Dazzi, Paresh Vyas, et Vincenzo Cerundolo. 2013. « Acute Myeloid Leukemia Creates an Arginase-Dependent Immunosuppressive Microenvironment ». *Blood* 122 (5): 749-58. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-480129>.

Muto, Tomoya, Callum S. Walker, Kwangmin Choi, Kathleen Hueneman, Molly A. Smith, Zartash Gul, Guillermo Garcia-Manero, Averil Ma, Yi Zheng, et Daniel T. Starczynowski. 2020. « Adaptive Response to Inflammation Contributes to Sustained Myelopoiesis and Confers a Competitive Advantage in Myelodysplastic Syndrome HSCs ». *Nature Immunology* 21 (5): 535-45. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0663-z>.

Nagaraj, Srinivas, Kapil Gupta, Vladimir Pisarev, Leo Kinarsky, Simon Sherman, Loveleen Kang, Donna L. Herber, Jonathan Schneck, et Dmitry I. Gabrilovich. 2007. « Altered Recognition of Antigen Is a Mechanism of CD8+ T Cell Tolerance in Cancer ». *Nature Medicine* 13 (7): 828-35. <https://doi.org/10.1038/nm1609>.

Nagler, Arnon, Vanderson Rocha, Myriam Labopin, Ali Unal, Tarek Ben Othman, Antonio Campos, Liisa Volin, et al. 2013. « Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia in Remission: Comparison of Intravenous Busulfan plus Cyclophosphamide (Cy) versus Total-Body Irradiation plus Cy as Conditioning Regimen--a Report from the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (28): 3549-56. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.48.8114>.

Nagler, Arnon, et Avichai Shimoni. 2019. « Conditioning ». In *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*, édité par Enric Carreras, Carlo Dufour, Mohamad Mohty, et Nicolaus Kröger, 7th éd. Cham (CH): Springer. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553926/>.

Naka, Kazuhito, Takayuki Hoshii, Teruyuki Muraguchi, Yuko Tadokoro, Takako Ooshio, Yukio Kondo, Shinji Nakao, Noboru Motoyama, et Atsushi Hirao. 2010. « TGF-Beta-FOXO Signalling Maintains

Leukaemia-Initiating Cells in Chronic Myeloid Leukaemia ». *Nature* 463 (7281): 676-80.  
<https://doi.org/10.1038/nature08734>.

Neukirchen, Judith, Wilma M. Schoonen, Corinna Strupp, Norbert Gattermann, Carlo Aul, Rainer Haas, et Ulrich Germing. 2011. « Incidence and Prevalence of Myelodysplastic Syndromes: Data from the Düsseldorf MDS-Registry ». *Leukemia Research* 35 (12): 1591-96.  
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.06.001>.

Nicolini, F. E., J. D. Cashman, D. E. Hogge, R. K. Humphries, et C. J. Eaves. 2004. « NOD/SCID Mice Engineered to Express Human IL-3, GM-CSF and Steel Factor Constitutively Mobilize Engrafted Human Progenitors and Compromise Human Stem Cell Regeneration ». *Leukemia* 18 (2): 341-47.  
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403222>.

Noman, Muhammad Zaeem, Giacomo Desantis, Bassam Janji, Meriem Hasmim, Saoussen Karray, Philippe Dessen, Vincenzo Bronte, et Salem Chouaib. 2014. « PD-L1 Is a Novel Direct Target of HIF-1 $\alpha$ , and Its Blockade under Hypoxia Enhanced MDSC-Mediated T Cell Activation ». *The Journal of Experimental Medicine* 211 (5): 781-90. <https://doi.org/10.1084/jem.20131916>.

Noman, Muhammad Zaeem, Bassam Janji, Shijun Hu, Joseph C. Wu, Fabio Martelli, Vincenzo Bronte, et Salem Chouaib. 2015. « Tumor-Promoting Effects of Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Potentiated by Hypoxia-Induced Expression of miR-210 ». *Cancer Research* 75 (18): 3771-87.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0405>.

Nombela-Arrieta, César, Gregory Pivarnik, Beatrice Winkel, Kimberly J. Canty, Brendan Harley, John E. Mahoney, Shin-Young Park, Jiayun Lu, Alexei Protopopov, et Leslie E. Silberstein. 2013. « Quantitative Imaging of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell localization and hypoxic status in the Bone Marrow microenvironment ». *Nature cell biology* 15 (5): 533-43. <https://doi.org/10.1038/ncb2730>.

Norde, Wieger J., Frans Maas, Willemijn Hobo, Alan Korman, Michael Quigley, Michel G. D. Kester, Konnie Hebeda, et al. 2011. « PD-1/PD-L1 Interactions Contribute to Functional T-Cell Impairment in Patients Who Relapse with Cancer after Allogeneic Stem Cell Transplantation ». *Cancer Research* 71 (15): 5111-22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0108>.

Noviello, Maddalena, Francesco Manfredi, Eliana Ruggiero, Tommaso Perini, Giacomo Oliveira, Filippo Cortesi, Pantaleo De Simone, et al. 2019. « Bone marrow central memory and memory stem T-cell exhaustion in AML patients relapsing after HSCT ». *Nature Communications* 10 (mars): 1065.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08871-1>.

Ogawa, Seishi. 2019. « Genetics of MDS ». *Blood* 133 (10): 1049-59. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-844621>.

Orazi, Attilio. 2007. « Histopathology in the Diagnosis and Classification of Acute Myeloid Leukemia, Myelodysplastic Syndromes, and Myelodysplastic/Myeloproliferative Diseases ». *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology* 74 (2): 97-114. <https://doi.org/10.1159/000101709>.

Pan, Ping-Ying, Ge Ma, Kaare J. Weber, Junko Ozao-Choy, George Wang, Bingjiao Yin, Celia M. Divino, et Shu-Hsia Chen. 2010. « Immune Stimulatory Receptor CD40 Is Required for T-Cell Suppression and T Regulatory Cell Activation Mediated by Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer ». *Cancer Research* 70 (1): 99-108. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1882>.

Papaemmanuil, Elli, Moritz Gerstung, Luca Malcovati, Sudhir Tauro, Gunes Gundem, Peter Van Loo, Chris J. Yoon, et al. 2013. « Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes ». *Blood* 122 (22): 3616-27. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-518886>.

Park, Hun Hee, Myungshin Kim, Bong-Hee Lee, Jihyang Lim, Yonggoo Kim, Eun Jung Lee, Woo Sung Min, et al. 2006. « Intracellular IL-4, IL-10, and IFN-Gamma Levels of Leukemic Cells and Bone Marrow T Cells in Acute Leukemia ». *Annals of Clinical and Laboratory Science* 36 (1): 7-15.

Park, Min-Jung, Sung-Hee Lee, Eun-Kyung Kim, Eun-Jung Lee, Sung-Hwan Park, Seung-Ki Kwok, et Mi-La Cho. 2016. « Myeloid-Derived Suppressor Cells Induce the Expansion of Regulatory B Cells and Ameliorate Autoimmunity in the Sanroque Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus ». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 68 (11): 2717-27. <https://doi.org/10.1002/art.39767>.

Parker, Katherine H., Pratima Sinha, Lucas A. Horn, Virginia K. Clements, Huan Yang, Jianhua Li, Kevin J. Tracey, et Suzanne Ostrand-Rosenberg. 2014. « HMGB1 Enhances Immune Suppression by Facilitating the Differentiation and Suppressive Activity of Myeloid-Derived Suppressor Cells ». *Cancer Research* 74 (20): 5723-33. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2347>.

Pavlaki, Konstantia, Charalampos G. Pontikoglou, Anthi Demetriadou, Aristeia K. Batsali, Athina Damianaki, Emmanouil Simantirakis, Michail Kontakis, et al. 2014. « Impaired Proliferative Potential of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in Patients with Myelodysplastic Syndromes Is Associated with Abnormal WNT Signaling Pathway ». *Stem Cells and Development* 23 (14): 1568-81. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0283>.

Pico de Coaña, Yago, Isabel Poschke, Giusy Gentilcore, Yumeng Mao, Maria Nyström, Johan Hansson, Giuseppe V. Masucci, et Rolf Kiessling. 2013. « Ipilimumab Treatment Results in an Early Decrease in

the Frequency of Circulating Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells as Well as Their Arginase1 Production ». *Cancer Immunology Research* 1 (3): 158-62. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0016>.

Pietras, Eric M., Cristina Mirantes-Barbeito, Sarah Fong, Dirk Loeffler, Larisa V. Kovtonyuk, SiYi Zhang, Ranjani Lakshminarasimhan, et al. 2016. « Chronic Interleukin-1 Exposure Drives Haematopoietic Stem Cells towards Precocious Myeloid Differentiation at the Expense of Self-Renewal ». *Nature Cell Biology* 18 (6): 607-18. <https://doi.org/10.1038/ncb3346>.

Pinho, Sandra, et Paul S. Frenette. 2019. « Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 20 (5): 303-20. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0103-9>.

Platanias, Leonidas C. 2005. « Mechanisms of Type-I- and Type-II-Interferon-Mediated Signalling ». *Nature Reviews. Immunology* 5 (5): 375-86. <https://doi.org/10.1038/nri1604>.

Poon, Zhiyong, Niraja Dighe, Subhashree S. Venkatesan, Alice M. S. Cheung, Xiubo Fan, Sudipto Bari, Monalisa Hota, Sujoy Ghosh, et William Y. K. Hwang. 2019. « Bone Marrow MSCs in MDS: Contribution towards Dysfunctional Hematopoiesis and Potential Targets for Disease Response to Hypomethylating Therapy ». *Leukemia* 33 (6): 1487-1500. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0310-y>.

Raaijmakers, Marc H. G. P., Siddhartha Mukherjee, Shangqin Guo, Siyi Zhang, Tatsuya Kobayashi, Jesse A. Schoonmaker, Benjamin L. Ebert, et al. 2010. « Bone Progenitor Dysfunction Induces Myelodysplasia and Secondary Leukaemia ». *Nature* 464 (7290): 852-57. <https://doi.org/10.1038/nature08851>.

Rastad, Jessica L., et William R. Green. 2016. « Myeloid-Derived Suppressor Cells in Murine AIDS Inhibit B-Cell Responses in Part via Soluble Mediators Including Reactive Oxygen and Nitrogen Species, and TGF- $\beta$  ». *Virology* 499 (décembre): 9-22. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.08.031>.

Rathnayake, A. J. I. S., H. W. W. Goonasekera, et V. H. W. Dissanayake. 2016. « Phenotypic and Cytogenetic Characterization of Mesenchymal Stromal Cells in De Novo Myelodysplastic Syndromes ». *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam)* 2016: 8012716. <https://doi.org/10.1155/2016/8012716>.

Raza, Azra, et Naomi Galili. 2012. « The Genetic Basis of Phenotypic Heterogeneity in Myelodysplastic Syndromes ». *Nature Reviews Cancer* 12 (12): 849-59. <https://doi.org/10.1038/nrc3321>.

Roder, J. C., A. K. Duwe, D. A. Bell, et S. K. Singhal. 1978. « Immunological Senescence. I. The Role of Suppressor Cells ». *Immunology* 35 (5): 837-47.

Rodrigues, Jennifer C., Guido C. Gonzalez, Lei Zhang, George Ibrahim, John J. Kelly, Michael P. Gustafson, Yi Lin, et al. 2010. « Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-

derived suppressor cell-like properties ». *Neuro-Oncology* 12 (4): 351-65.  
<https://doi.org/10.1093/neuonc/nop023>.

Rodríguez, Paulo C., et Augusto C. Ochoa. 2008. « Arginine Regulation by Myeloid Derived Suppressor Cells and Tolerance in Cancer: Mechanisms and Therapeutic Perspectives ». *Immunological Reviews* 222 (avril): 180-91. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00608.x>.

Rongvaux, Anthony, Tim Willinger, Jan Martinek, Till Strowig, Sofia V. Gearty, Lino L. Teichmann, Yasuyuki Saito, et al. 2014. « Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model ». *Nature biotechnology* 32 (4): 364-72. <https://doi.org/10.1038/nbt.2858>.

Rovatti, Pier Edoardo, Valentina Gambacorta, Francesca Lorentino, Fabio Ciceri, et Luca Vago. 2020. « Mechanisms of Leukemia Immune Evasion and Their Role in Relapse After Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation ». *Frontiers in Immunology* 11 (février): 147. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00147>.

Sacchetti, Benedetto, Alessia Funari, Stefano Michienzi, Silvia Di Cesare, Stefania Piersanti, Isabella Saggio, Enrico Tagliafico, et al. 2007. « Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment ». *Cell* 131 (2): 324-36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.025>.

Sallman, David A., Thomas Cluzeau, Ashley A. Basiorka, et Alan List. 2016. « Unraveling the Pathogenesis of MDS: The NLRP3 Inflammasome and Pyroptosis Drive the MDS Phenotype ». *Frontiers in Oncology* 6 (juin). <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00151>.

Sanchez-Correa, Beatriz, Inmaculada Gayoso, Juan M. Bergua, Javier G. Casado, Sara Morgado, Rafael Solana, et Raquel Tarazona. 2012. « Decreased Expression of DNAM-1 on NK Cells from Acute Myeloid Leukemia Patients ». *Immunology and Cell Biology* 90 (1): 109-15. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.15>.

Sarhan, Dhifaf, Jinhua Wang, Upasana Sunil Arvindam, Caroline Hallstrom, Michael R. Verneris, Bartosz Grzywacz, Erica Warlick, Bruce R. Blazar, et Jeffrey S. Miller. 2020. « Mesenchymal Stromal Cells Shape the MDS Microenvironment by Inducing Suppressive Monocytes That Dampen NK Cell Function ». *JCI Insight* 5 (5). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.130155>.

Sauta, Elisabetta, Marie Robin, Matteo Bersanelli, Erica Travaglino, Manja Meggendorfer, Lin-Pierre Zhao, Juan Carlos Caballero Berrocal, et al. 2023. « Real-World Validation of Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes ». *Journal of Clinical Oncology: Official*

*Journal of the American Society of Clinical Oncology* 41 (15): 2827-42.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.22.01784>.

Scheiermann, Christoph, Yuya Kunisaki, Daniel Lucas, Andrew Chow, Jung-Eun Jang, Dachuan Zhang, Daigo Hashimoto, Miriam Merad, et Paul S. Frenette. 2012. « Adrenergic Nerves Govern Circadian Leukocyte Recruitment to Tissues ». *Immunity* 37 (2): 290-301.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.021>.

Schlecker, Eva, Ana Stojanovic, Christian Eisen, Christian Quack, Christine S. Falk, Viktor Umansky, et Adelheid Cerwenka. 2012. « Tumor-Infiltrating Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate CCR5-Dependent Recruitment of Regulatory T Cells Favoring Tumor Growth ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (12): 5602-11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201018>.

Schmid, Christoph, Liesbeth C. de Wreede, Anja van Biezen, Jürgen Finke, Gerhard Ehninger, Arnold Ganser, Liisa Volin, et al. 2018. « Outcome after Relapse of Myelodysplastic Syndrome and Secondary Acute Myeloid Leukemia Following Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Retrospective Registry Analysis on 698 Patients by the Chronic Malignancies Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation ». *Haematologica* 103 (2): 237-45.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.2017.168716>.

Schoupe, Elio, Camille Mommer, Kiavash Movahedi, Damya Laoui, Yannick Morias, Conny Gysemans, Ariane Luyckx, Patrick De Baetselier, et Jo A. Van Ginderachter. 2013. « Tumor-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets Exert Either Inhibitory or Stimulatory Effects on Distinct CD8+ T-Cell Activation Events ». *European Journal of Immunology* 43 (11): 2930-42.  
<https://doi.org/10.1002/eji.201343349>.

Schuettpelz, Laura G., et Daniel C. Link. 2013. « Regulation of Hematopoietic Stem Cell Activity by Inflammation ». *Frontiers in Immunology* 4: 204. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00204>.

Selimoglu-Buet, Dorothée, Bouchra Badaoui, Emmanuel Benayoun, Andréa Toma, Pierre Fenaux, Bruno Quesnel, Gabriel Etienne, et al. 2017. « Accumulation of Classical Monocytes Defines a Subgroup of MDS That Frequently Evolves into CMML ». *Blood* 130 (6): 832-35. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-779579>.

Serra, Sara, Alberto L. Horenstein, Tiziana Vaisitti, Davide Brusa, Davide Rossi, Luca Laurenti, Giovanni D'Arena, et al. 2011. « CD73-Generated Extracellular Adenosine in Chronic Lymphocytic Leukemia Creates Local Conditions Counteracting Drug-Induced Cell Death ». *Blood* 118 (23): 6141-52.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374728>.

Shultz, Leonard D., Bonnie L. Lyons, Lisa M. Burzenski, Bruce Gott, Xiaohua Chen, Stanley Chaleff, Malak Kotb, et al. 2005. « Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-Scid IL2R Gamma Null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (10): 6477-89. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6477>.

Siret, Carole, Aurélie Collignon, Françoise Silvy, Stéphane Robert, Thierry Cheyrol, Perrine André, Véronique Rigot, et al. 2019. « Deciphering the Crosstalk Between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma ». *Frontiers in Immunology* 10: 3070. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03070>.

Solito, Samantha, Ilaria Marigo, Laura Pinton, Vera Damuzzo, Susanna Mandruzzato, et Vincenzo Bronte. 2014. « Myeloid-Derived Suppressor Cell Heterogeneity in Human Cancers ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1319 (juin): 47-65. <https://doi.org/10.1111/nyas.12469>.

Sperling, Adam S., Christopher J. Gibson, et Benjamin L. Ebert. 2017. « The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal hematopoiesis to secondary leukemia ». *Nature reviews. Cancer* 17 (1): 5-19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.112>.

Srikrishna, Geetha. 2011. « S100A8 and S100A9: New Insights into Their Roles in Malignancy ». *Journal of Innate Immunity* 4 (1): 31-40. <https://doi.org/10.1159/000330095>.

Starczynowski, Daniel T., Florian Kuchenbauer, Bob Argiropoulos, Sandy Sung, Ryan Morin, Andrew Muranyi, Martin Hirst, et al. 2010. « Identification of miR-145 and miR-146a as Mediators of the 5q-Syndrome Phenotype ». *Nature Medicine* 16 (1): 49-58. <https://doi.org/10.1038/nm.2054>.

Steensma, David P., Rafael Bejar, Siddhartha Jaiswal, R. Coleman Lindsley, Mikkael A. Sekeres, Robert P. Hasserjian, et Benjamin L. Ebert. 2015. « Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes ». *Blood* 126 (1): 9-16. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-631747>.

Stern, M., L. C. de Wreede, R. Brand, A. van Biezen, P. Dreger, M. Mohty, T. M. de Witte, N. Kröger, et T. Ruutu. 2014. « Sensitivity of Hematological Malignancies to Graft-versus-Host Effects: An EBMT Megafile Analysis ». *Leukemia* 28 (11): 2235-40. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.145>.

Stewart, Trina J., Kristy M. Greenelch, Julia E. Reid, David J. Liewehr, Seth M. Steinberg, Kebin Liu, et Scott I. Abrams. 2009. « Interferon Regulatory Factor-8 Modulates the Development of Tumour-Induced CD11b+Gr-1+ Myeloid Cells ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (9B): 3939-50. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00685.x>.

Swart, Louise de, Alex Smith, Marius MacKenzie, Argiris Symeonidis, Judith Neukirchen, Dana Mikulenková, Teresa Vallespí, et al. 2017. « Cytomorphology review of 100 newly diagnosed lower-risk MDS patients in the European LeukemiaNet MDS (EUMDS) registry reveals a high inter-observer concordance ». *Annals of Hematology* 96 (7): 1105-12. <https://doi.org/10.1007/s00277-017-3009-7>.

Takizawa, Hitoshi, Kristin Fritsch, Larisa V. Kovtonyuk, Yasuyuki Saito, Chakradhar Yakkala, Kurt Jacobs, Akshay K. Ahuja, et al. 2017. « Pathogen-Induced TLR4-TRIF Innate Immune Signaling in Hematopoietic Stem Cells Promotes Proliferation but Reduces Competitive Fitness ». *Cell Stem Cell* 21 (2): 225-240.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.06.013>.

Tcyganov, Evgenii, Jerome Mastio, Eric Chen, et Dmitry I. Gabrilovich. 2018. « Plasticity of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer ». *Current Opinion in Immunology* 51 (avril): 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.009>.

Teodorescu, Patric, Sergiu Pasca, Delia Dima, Ciprian Tomuleasa, et Gabriel Ghiaur. 2020. « Targeting the Microenvironment in MDS: The Final Frontier ». *Frontiers in Pharmacology* 11 (juillet): 1044. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01044>.

Thota, Swapna, Aaron D. Viny, Hideki Makishima, Barbara Spitzer, Tomas Radivoyevitch, Bartłomiej Przychodzen, Mikkael A. Sekeres, Ross L. Levine, et Jaroslaw P. Maciejewski. 2014. « Genetic Alterations of the Cohesin Complex Genes in Myeloid Malignancies ». *Blood* 124 (11): 1790-98. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-567057>.

Tiu, Ramon V., Valeria Visconte, Fabiola Traina, Anita Schwandt, et Jaroslaw P. Maciejewski. 2011. « Updates in Cytogenetics and Molecular Markers in MDS ». *Current Hematologic Malignancy Reports* 6 (2): 126-35. <https://doi.org/10.1007/s11899-011-0081-2>.

Toffalori, Cristina, Laura Zito, Valentina Gambacorta, Michela Riba, Giacomo Oliveira, Gabriele Bucci, Matteo Barcella, et al. 2019. « Immune Signature Drives Leukemia Escape and Relapse after Hematopoietic Cell Transplantation ». *Nature Medicine* 25 (4): 603-11. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0400-z>.

Umansky, Viktor, Ivan Shevchenko, Alexandr V. Bazhin, et Jochen Utikal. 2014. « Extracellular Adenosine Metabolism in Immune Cells in Melanoma ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 63 (10): 1073-80. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1553-8>.

Vago, Luca, Serena Kimi Perna, Monica Zanussi, Benedetta Mazzi, Cristina Barlassina, Maria Teresa Lupo Stanghellini, Nicola Flavio Perrelli, et al. 2009. « Loss of Mismatched HLA in Leukemia after Stem-

Cell Transplantation ». *The New England Journal of Medicine* 361 (5): 478-88.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0811036>.

Vago, Luca, Cristina Toffalori, Fabio Ciceri, et Katharina Fleischhauer. 2012. « Genomic Loss of Mismatched Human Leukocyte Antigen and Leukemia Immune Escape from Haploidentical Graft-versus-Leukemia ». *Seminars in Oncology* 39 (6): 707-15.  
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2012.09.009>.

Vardiman, James W., Nancy Lee Harris, et Richard D. Brunning. 2002. « The World Health Organization (WHO) Classification of the Myeloid Neoplasms ». *Blood* 100 (7): 2292-2302.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1199>.

Vardiman, James W., Jürgen Thiele, Daniel A. Arber, Richard D. Brunning, Michael J. Borowitz, Anna Porwit, Nancy Lee Harris, et al. 2009. « The 2008 Revision of the World Health Organization (WHO) Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: Rationale and Important Changes ». *Blood* 114 (5): 937-51. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209262>.

Varga, Gergely, Judit Kiss, Judit Várkonyi, Virág Vas, Péter Farkas, Katalin Pálóczi, et Ferenc Uher. 2007. « Inappropriate Notch Activity and Limited Mesenchymal Stem Cell Plasticity in the Bone Marrow of Patients with Myelodysplastic Syndromes ». *Pathology Oncology Research: POR* 13 (4): 311-19.  
<https://doi.org/10.1007/BF02940310>.

Vasta, Lauren M., Nicholas E. Khan, Cecilia P. Higgs, Laura A. Harney, Ann G. Carr, Anne K. Harris, Kris Ann P. Schultz, Mary L. McMaster, et Douglas R. Stewart. 2021. « Hematologic Indices in Individuals with Pathogenic Germline DICER1 Variants ». *Blood Advances* 5 (1): 216-23.  
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002651>.

Vendramin, Antonio, Silvia Gimondi, Anisa Bermema, Paolo Longoni, Sara Rizzitano, Paolo Corradini, et Cristiana Carniti. 2014. « Graft Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell Content Predicts the Risk of Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Transplantation of Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized Peripheral Blood Stem Cells ». *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 20 (12): 2049-55.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.09.011>.

Verovskaya, Evgenia, Mathilde J. C. Broekhuis, Erik Zwart, Martha Ritsema, Ronald van Os, Gerald de Haan, et Leonid V. Bystrykh. 2013. « Heterogeneity of Young and Aged Murine Hematopoietic Stem Cells Revealed by Quantitative Clonal Analysis Using Cellular Barcoding ». *Blood* 122 (4): 523-32.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-481135>.

Wahl, Markus C., Cindy L. Will, et Reinhard Lührmann. 2009. « The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine ». *Cell* 136 (4): 701-18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009>.

Waight, Jeremy D., Colleen Netherby, Mary L. Hensen, Austin Miller, Qiang Hu, Song Liu, Paul N. Bogner, et al. 2013. « Myeloid-Derived Suppressor Cell Development Is Regulated by a STAT/IRF-8 Axis ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (10): 4464-78. <https://doi.org/10.1172/JCI68189>.

Wang, Ke, Meng Lv, Ying-Jun Chang, Xiang-Yu Zhao, Xiao-Su Zhao, Yuan-Yuan Zhang, Yu-Qian Sun, et al. 2019. « Early Myeloid-Derived Suppressor Cells (HLA-DR-/lowCD33+CD16-) Expanded by Granulocyte Colony-Stimulating Factor Prevent Acute Graft-versus-Host Disease (GVHD) in Humanized Mouse and Might Contribute to Lower GVHD in Patients Post Allo-HSCT ». *Journal of Hematology & Oncology* 12 (1): 31. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0710-0>.

Wang, Peng-Fei, Si-Ying Song, Ting-Jian Wang, Wen-Jun Ji, Shou-Wei Li, Ning Liu, et Chang-Xiang Yan. 2018. « Prognostic role of pretreatment circulating MDSCs in patients with solid malignancies: A meta-analysis of 40 studies ». *Oncoimmunology* 7 (10): e1494113. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1494113>.

Wang, Yu-Hung, Chien-Chin Lin, Chi-Yuan Yao, Fabio M. R. Amaral, Shan-Chi Yu, Chein-Jun Kao, Pin-Tsen Shih, Hsin-An Hou, Wen-Chien Chou, et Hwei-Fang Tien. 2023. « High BM Plasma S100A8/A9 Is Associated with a Perturbed Microenvironment and Poor Prognosis in Myelodysplastic Syndromes ». *Blood Advances* 7 (11): 2528-33. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008958>.

Watson, Caroline J., A. L. Papula, Gladys Y. P. Poon, Wing H. Wong, Andrew L. Young, Todd E. Druley, Daniel S. Fisher, et Jamie R. Blundell. 2020. « The Evolutionary Dynamics and Fitness Landscape of Clonal Hematopoiesis ». *Science (New York, N.Y.)* 367 (6485): 1449-54. <https://doi.org/10.1126/science.aay9333>.

Westers, T M, R Ireland, W Kern, C Alhan, J S Balleisen, P Bettelheim, K Burbury, et al. 2012. « Standardization of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes: A Report from an International Consortium and the European LeukemiaNet Working Group ». *Leukemia* 26 (7): 1730-41. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.30>.

Wieduwilt, Matthew J., Leland Metheny, Mei-Jie Zhang, Hai-Lin Wang, Noel Estrada-Merly, David I. Marks, A. Samer Al-Homsi, et al. 2022. « Haploidentical vs Sibling, Unrelated, or Cord Blood Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Lymphoblastic Leukemia ». *Blood Advances* 6 (1): 339-57. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004916>.

Winkler, Ingrid G., Natalie A. Sims, Allison R. Pettit, Valérie Barbier, Bianca Nowlan, Falak Helwani, Ingrid J. Poulton, et al. 2010. « Bone Marrow Macrophages Maintain Hematopoietic Stem Cell (HSC) Niches and Their Depletion Mobilizes HSCs ». *Blood* 116 (23): 4815-28. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-253534>.

Wu, An, Panpan Gao, Ningning Wu, Cong Shi, Zhenya Huang, Chunmeng Rong, Ye Sun, Lixia Sheng, Guifang Ouyang, et Qitian Mu. 2021. « Elevated Mature Monocytes in Bone Marrow Accompanied with a Higher IPSS-R Score Predicts a Poor Prognosis in Myelodysplastic Syndromes ». *BMC Cancer* 21 (1): 546. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08303-8>.

Wu, Hao, Ning Tao, Xiaoman Liu, Xiao Li, Jian Tang, Chungwah Ma, Xiaofei Xu, et al. 2012. « Polysaccharide from *Lentinus Edodes* Inhibits the Immunosuppressive Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells ». *PloS One* 7 (12): e51751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051751>.

Xin, Hong, Chunyan Zhang, Andreas Herrmann, Yan Du, Robert Figlin, et Hua Yu. 2009. « Sunitinib Inhibition of Stat3 Induces Renal Cell Carcinoma Tumor Cell Apoptosis and Reduces Immunosuppressive Cells ». *Cancer Research* 69 (6): 2506-13. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4323>.

Xu, Chunliang, Xin Gao, Qiaozhi Wei, Fumio Nakahara, Samuel E. Zimmerman, Jessica Mar, et Paul S. Frenette. 2018. « Stem Cell Factor Is Selectively Secreted by Arterial Endothelial Cells in Bone Marrow ». *Nature Communications* 9 (1): 2449. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04726-3>.

Xu, Ling, Danlin Yao, Jiexiong Tan, Zifan He, Zhi Yu, Jie Chen, Gengxin Luo, et al. 2018. « Memory T cells skew toward terminal differentiation in the CD8<sup>+</sup> T cell population in patients with acute myeloid leukemia ». *Journal of Hematology & Oncology* 11 (1): 93. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0636-y>.

Yamazaki, Satoshi, Hideo Ema, Göran Karlsson, Tomoyuki Yamaguchi, Hiroyuki Miyoshi, Seiji Shioda, Makoto M. Taketo, Stefan Karlsson, Atsushi Iwama, et Hiromitsu Nakauchi. 2011. « Nonmyelinating Schwann Cells Maintain Hematopoietic Stem Cell Hibernation in the Bone Marrow Niche ». *Cell* 147 (5): 1146-58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.053>.

Yang, H., C. Bueso-Ramos, C. DiNardo, M. R. Estecio, M. Davanlou, Q.-R. Geng, Z. Fang, et al. 2014. « Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in Myelodysplastic Syndromes Is Enhanced by Treatment with Hypomethylating Agents ». *Leukemia* 28 (6): 1280-88. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.355>.

Yang, L., A. Mailloux, D. E. Rollison, J. S. Painter, J. Maciejewski, R. L. Paquette, T. P. Loughran, et al. 2013. « Naive T-Cells in Myelodysplastic Syndrome Display Intrinsic Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Deficiency ». *Leukemia* 27 (4): 897-906. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.300>.

Yang, Yi, Ruihua Zhang, Fei Xia, Ting Zou, Anfei Huang, Sidong Xiong, et Jinping Zhang. 2013. « LPS Converts Gr-1(+)/CD115(+) Myeloid-Derived Suppressor Cells from M2 to M1 via P38 MAPK ». *Experimental Cell Research* 319 (12): 1774-83. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.05.007>.

Yang, Yuhui, Chunyan Li, Tao Liu, Xiaofang Dai, et Alexandr V. Bazhin. 2020. « Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumors: From Mechanisms to Antigen Specificity and Microenvironmental Regulation ». *Frontiers in Immunology* 11 (juillet): 1371. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01371>.

Yin, Jin, Lin Li, Chunyan Wang, et Yicheng Zhang. 2020. « Increased Galectin-9 Expression, a Prognostic Biomarker of aGVHD, Regulates the Immune Response through the Galectin-9 Induced MDSC Pathway after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation ». *International Immunopharmacology* 88 (novembre): 106929. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106929>.

Yin, Jin, Chunyan Wang, Min Huang, Xia Mao, Jianfeng Zhou, et Yicheng Zhang. 2016. « Circulating CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup>/low myeloid-derived suppressor cells in leukemia patients with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: novel clinical potential strategies for the prevention and cellular therapy of graft-versus-host disease ». *Cancer Medicine* 5 (7): 1654-69. <https://doi.org/10.1002/cam4.688>.

Yoshizato, Tetsuichi, Yasuhito Nannya, Yoshiko Atsuta, Yusuke Shiozawa, Yuka Iijima-Yamashita, Kenichi Yoshida, Yuichi Shiraishi, et al. 2017. « Genetic abnormalities in myelodysplasia and secondary acute myeloid leukemia: impact on outcome of stem cell transplantation ». *Blood* 129 (17): 2347-58. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-754796>.

Youn, Je-In, Srinivas Nagaraj, Michelle Collazo, et Dmitry I. Gabilovich. 2008. « Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (8): 5791-5802. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5791>.

Yu, Jinpu, Weijiao Du, Fang Yan, Yue Wang, Hui Li, Shui Cao, Wenwen Yu, Chun Shen, Juntian Liu, et Xiubao Ren. 2013. « Myeloid-Derived Suppressor Cells Suppress Antitumor Immune Responses through IDO Expression and Correlate with Lymph Node Metastasis in Patients with Breast Cancer ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190 (7): 3783-97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201449>.

Zambetti, Noemi A., Zhen Ping, Si Chen, Keane J. G. Kenswil, Maria A. Mylona, Mathijs A. Sanders, Remco M. Hoogenboezem, et al. 2016. « Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-Leukemia ». *Cell Stem Cell* 19 (5): 613-27. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.08.021>.

Zeidan, Amer M., Rory M. Shallis, Rong Wang, Amy Davidoff, et Xiaomei Ma. 2019. « Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes: Why Characterizing the Beast Is a Prerequisite to Taming It ». *Blood Reviews* 34 (mars): 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.09.001>.

Zeiser, Robert, et Luca Vago. 2019. « Mechanisms of Immune Escape after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation ». *Blood* 133 (12): 1290-97. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-846824>.

Zhang, Jilu, Hui-Ming Chen, Ge Ma, Zuping Zhou, David Raulet, Andreana L. Rivera, Shu-Hsia Chen, et Ping-Ying Pan. 2019. « The mechanistic study behind suppression of GVHD while retaining GVL activities by myeloid-derived suppressor cells. » *Leukemia* 33 (8): 2078-89. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0394-z>.

Zhang, Yudi, Junying Wu, Tiejun Qin, Zefeng Xu, Shiqiang Qu, Lijuan Pan, Bing Li, et al. 2022. « Comparison of the revised 4th (2016) and 5th (2022) editions of the World Health Organization classification of myelodysplastic neoplasms ». *Leukemia* 36 (12): 2875-82. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01718-7>.

Zhao, Meng, John M. Perry, Heather Marshall, Aparna Venkatraman, Pengxu Qian, Xi C. He, Jasimuddin Ahamed, et Linheng Li. 2014. « Megakaryocytes Maintain Homeostatic Quiescence and Promote Post-Injury Regeneration of Hematopoietic Stem Cells ». *Nature Medicine* 20 (11): 1321-26. <https://doi.org/10.1038/nm.3706>.

Zhao, Xueqiang, Lijie Rong, Xiaopu Zhao, Xiao Li, Xiaoman Liu, Jingjing Deng, Hao Wu, et al. 2012. « TNF Signaling Drives Myeloid-Derived Suppressor Cell Accumulation ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (11): 4094-4104. <https://doi.org/10.1172/JCI64115>.

Zhao, Zhi-Gang, Wen Xu, Hai-Peng Yu, Bing-Ling Fang, Shu-Hong Wu, Fang Li, Wei-Min Li, Qiu-Bai Li, Zhi-Chao Chen, et Ping Zou. 2012. « Functional Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow of Patients with Myelodysplastic Syndromes ». *Cancer Letters* 317 (2): 136-43. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.08.030>.

Zhou, Bo O., Rui Yue, Malea M. Murphy, James Peyer, et Sean J. Morrison. 2014. « Leptin Receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow ». *Cell stem cell* 15 (2): 154-68. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.008>.

Zhou, Yang, Yingjun Chang, Yu Wang, Lanping Xu, Xiaohui Zhang, Kaiyan Liu, et Xiao-Jun Huang. 2019. « Contribution of Myeloid-Driven Suppressor Cells to Leukemia Relapse in Patients with B-ALL Who Underwent Allo-HSCT ». *Blood* 134 (Supplement\_1): 2010. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-123723>.

Zhu, Jiang, Russell Garrett, Younghun Jung, Yi Zhang, Nacksung Kim, Jingcheng Wang, Gerard J. Joe, et al. 2007. « Osteoblasts Support B-Lymphocyte Commitment and Differentiation from Hematopoietic Stem Cells ». *Blood* 109 (9): 3706-12. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-041384>.

Zohren, Fabian, Diamandis Toutzaris, Viola Klärner, Hans-Peter Hartung, Bernd Kieseier, et Rainer Haas. 2008. « The Monoclonal Anti-VLA-4 Antibody Natalizumab Mobilizes CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells in Humans ». *Blood* 111 (7): 3893-95. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-120329>.

Zou, JX, DE Rollison, D Boulware, D-T Chen, EM Sloand, LV Pfannes, JJ Goronzy, et al. 2009. « Altered naive and memory CD4+ T-cell homeostasis and immunosenescence characterize younger patients with myelodysplastic syndrome ». *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 23 (7): 1288-96. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.14>.

Annexe 1, revue de la littérature : Myeloid-Derived Suppressor Cells in  
the Context of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation



# Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Context of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Maud D'Aveni<sup>1,2\*</sup>, Anne B. Notarantonio<sup>1,2†</sup>, Allan Bertrand<sup>2</sup>, Laura Boulangé<sup>2</sup>, Cécile Pochon<sup>1,2</sup> and Marie T. Rubio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Hematology Department, CHRU Nancy, Université de Lorraine, Nancy, France, <sup>2</sup> Université de Lorraine, UMR 7365 CNRS, IMoPA, Nancy, France

## OPEN ACCESS

Edited by:  
Hermann Einsele,  
Julius Maximilian University of  
Würzburg, Germany

Reviewed by:  
Ying-Jun Chang,  
Peking University People's  
Hospital, China  
Hung Nguyen,  
University of Central Florida,  
United States

\*Correspondence:  
Maud D'Aveni  
m.daveni-piney@chru-nancy.fr

†These authors have contributed  
equally to this work

Specialty section:  
This article was submitted to  
Alloimmunity and Transplantation,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 05 March 2020

Accepted: 27 April 2020

Published: 22 May 2020

Citation:  
D'Aveni M, Notarantonio AB,  
Bertrand A, Boulangé L, Pochon C  
and Rubio MT (2020) Myeloid-Derived  
Suppressor Cells in the Context of  
Allogeneic Hematopoietic Stem Cell  
Transplantation.  
Front. Immunol. 11:989.  
doi: 10.3389/fimmu.2020.00989

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are innate immune cells that acquire the capacity to suppress adaptive immune responses. In the context of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), MDSCs (in the donor graft and in the recipient, after allo-HSCT) might mediate immune suppression through multiple mechanisms. However, it remains unclear how MDSCs can be distinguished from their normal myeloid counterparts in the hematopoietic stem cell donor graft and during immune reconstitution after allo-HSCT in the recipient. Our ability to understand their exact role in allo-HSCT is limited by the absence of a specific gene signature or surface markers for identifying MDSCs among myeloid cells and by their plasticity in different microenvironments. According to various studies, MDSCs might induce transplant tolerance and control graft vs. host disease (GVHD), but their impact on the graft vs. tumor effect (GVT) is not fully understood. In fact, we know that MDSCs commonly expand in patients with cancer, and they are thought to promote hematological malignancy progression. However, little is known about whether depleting them might be an effective strategy for enhancing GVT effects. Here, we review data published over the past 40 years on allo-HSCT to delineate the different MDSC subsets, and their abilities to induce transplant tolerance and preserve the GVT effect. This review will provide a basis for determining whether one MDSC subset might be proposed as the most appropriate candidate for cellular therapies, due to its ability to modulate GVHD.

Keywords: myeloid—derived suppressor cell, GvH disease, GvT, cellular therapy, allogeneic stem cell transplantation

## INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is the only potential curative treatment for some hematopoietic malignant and non-malignant diseases. The success of this therapy is compromised by the development of life-threatening graft-vs.-host disease (GVHD). GVHD is characterized by the activation and proliferation of alloreactive donor T cells that subsequently attack host target organs, such as skin, gut, and liver (1). Immunosuppressive therapies administered to control GVHD are associated with an increased incidence of malignancy recurrence, because they impair the graft-vs.-tumor (GVT) effect. They are also associated with an

increased incidence of infections. Therefore, recent strategies are considering whether regulatory cells might be good candidates for minimizing GVHD and maintaining GVT. The main candidates are: mesenchymal stromal cells (MSCs) (2, 3), regulatory T cells (Tregs) (4, 5), invariant Natural Killer T cells (iNKTs) (6), and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) (7).

MDSCs were first described in the peripheral blood, lymphoid organs, spleen, and tumor sites in the settings of cancer, infection, chronic inflammation, and more recently, transplantation and autoimmunity (8). Although MDSCs are barely detectable in the peripheral blood of healthy individuals, the number of circulating MDSCs increases in cancer settings, where they promote immune evasion (9, 10). Currently, MDSCs are attracting interest in the context of human allo-HSCT. These cells can mediate immune suppression through multiple mechanisms: by producing reactive oxygen species (ROS), depleting key amino acids required for T cell proliferation, and producing immunosuppressive cytokines (11). Moreover, interest has increased in identifying MDSCs in hematopoietic

stem cell grafts and in the graft-recipient's peripheral blood cells.

Unfortunately, in the context of allo-HSCT, MDSC phenotypes are heterogeneous in humans, and inter-study variability is high. Unlike the MDSCs described in the context of cancer (12), in the context of transplantation, we lack a harmonized or standardized definition of MDSCs. Therefore, it has been difficult to identify the best subset of MDSCs for regulating the allogeneic response. Only one study reported that CD1d expression in monocytic MDSCs was a valuable marker for selecting the subset with the highest suppressive activity (13).

This review summarizes the accumulated findings on MDSCs in the context of allo-HSCT. We examine the various MDSC phenotypes across the different studies, their immunosuppressive mechanisms, their advantages and disadvantages in GVHD and GVT, and their potential application to cellular therapy for controlling GVHD.

## FIRST EXPERIMENTAL EVIDENCE OF MDSCS AND CURRENT DEFINITION

In the late 1970s, a suppressive cell population, called "natural suppressor cells" (NSC), was first identified in human, murine, and rat bone marrow, spleen, and lymphatic tissues. These cells displayed an ability to suppress T-cell responses *in vivo* and *in vitro* without regard to the typical restrictions imposed by the major histocompatibility complex (MHC) (14, 15). NSCs had the morphological features of immature cells in rat bone marrow, and they weakly expressed macrophage and granulocyte antigens. They were rapidly classified as cells of early monocyte lineage, and they were considered a good candidate for modulating GVHD (16).

Oseroff et al. firstly characterized NSCs in newborn and adult mice after total lymphoid irradiation (17). Then, endogenous NSCs were reported to expand in mice after bone marrow transplantation: in an irradiated syngenic mouse model (18), in MHC-matched bone marrow chimeras (19, 20), and in parent-F1 bone marrow chimeras (21). These NSCs were lineage

negative, that is: they did not express the typical markers for T-cell (Thy1.2 negative), B-cell (surface immunoglobulin negative), or macrophage (Mac-1 and F4/80 negative). Moreover, these NSCs appeared transiently after allo-HSCT (the number peaked in week 3), and they disappeared by week 12 in minor histocompatibility mismatched recipient mice. NSCs were derived from recipient spleens and were considered radioresistant. They inhibited T-lymphocyte proliferation after mitogenic stimulation (19, 20) and after allogeneic stimulation in mixed lymphocyte reaction (MLR) (17, 18, 21). They also protected recipients against GVHD (21).

In the late 1990's, Johnson et al. demonstrated that, early after bone marrow transplantation, spleen cells collected from allogeneic chimeras contained Sca-1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> cells with immunosuppressive properties, through nitric oxide (NO) production (22). In another context, recipient mice that lacked SH2-containing inositol phosphatase (SHIP<sup>-/-</sup>) displayed a reduced incidence of GVHD after allo-HSCT. This observation was correlated to an elevated number of CD11b<sup>+</sup>

Gr1<sup>+</sup> cells in the spleen. SHIP is a 5 inositol phosphatase

that hydrolyzes phosphoinositol 3,4,5-trisphosphate, which regulates cell survival in myeloid cells. SHIP<sup>-/-</sup> mice had 10- to 20-fold higher levels of CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> cells with immunosuppressive properties compared to wild-type mice (23). Both those studies hypothesized that an immature CD11b<sup>+</sup> cell subset might explain the *in vitro* and *in vivo* immunosuppressive effects on alloreactive T cells. In the early 2000's, it was noted that NSCs shared many of the characteristics that defined MDSCs in individuals with cancer, including their myeloid origin, their accumulation after irradiation or bone marrow transplantation and their suppressive function. The accumulation of MDSCs in bone marrow transplantation recipients (allogeneic and syngenic) was related to the pro-inflammatory cytokine release that appeared during the first 2 weeks after irradiation. Moreover, this accumulation was related to the later appearance of alloreactive T cells (24, 25). Similarly, MDSCs were observed after donor lymphocyte infusions (DLIs). These MDSCs were further characterized as Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> Sca-1<sup>-</sup> CD31<sup>-</sup> cells, which produced NO in response to interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (26) (Table 1).

Currently, these cells are commonly called MDSCs, and they represent a heterogeneous group of cells. Based on the expression of CD49d, two distinct subpopulations have been described in mice: the first was the monocytic CD49d<sup>+</sup> subpopulation, which also displayed CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>low</sup> CD115<sup>+</sup> and the second was the granulocytic CD49d<sup>-</sup> counterpart, which displayed CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>-</sup> Ly6G<sup>high</sup> CD115<sup>-</sup>. In humans, three distinct MDSC subsets have been described, based on monocytic, granulocytic, and early-stage characteristics. They commonly do not express markers of mature myeloid and lymphoid cells (lineage negative). Thus, monocytic human MDSCs (M-MDSCs) are defined as: CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>low/-</sup>, and CD14<sup>+</sup> (27, 28); granulocytic MDSCs (G-MDSCs) are defined as: CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>low/-</sup>, CD15<sup>+</sup> but CD14<sup>-</sup> (29); and early-stage MDSCs (called e- or P-MDSCs) are defined as: CD33<sup>+</sup>, CD11b<sup>low</sup> HLA-DR<sup>low/-</sup>, CD14<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>.

TABLE 1 | MDSC subsets and their immune suppressive mechanisms observed after conditioning regimen (irradiation) and after HSCT (allogeneic or syngenic) in mice.

References	Mouse model (Donor/Recipient)	NSC or MDSC phenotype	Day (D) of first detection	T cell proliferation assay	Mechanisms
Oseroff et al. (17)	BALB/C (after TLI)	Non T cell, non B cell, non macrophage (Thy1.2-, 2C2-, Mac1-, F4/80-)	D+5 (after TLI)	gMLR	?
Sykes et al. (18)	B10B10 B10.D2B10.D2 (syngenic)	Non-T cell, non-B cell, non macrophage	Early weeks (after HSCT)	gCML	?
Holda et al. (19)	B10.D2BALB/C B10.D2B10D2F1 (MIHAgs)	Mac1-, Sca-1-, Thy1-	D+7 (after alloHSCT)	gmitogenic response gMLR	?
Maier et al. (20)	B10.D2BALB/C (MIHAgs)	Thy1.2-, IgS- Non adherent to plastic plate	D+10	gmitogenic response	? (inducible mechanism)
Sykes et al. (21)	B10 +/- B10.D2B10 (syngenic +/- mixed with H2 disparity)	Non-T cell, non-B cell, non adherent, asialo GM1-negative syngenic to the recipient	>D+8 After allo and syngenic HSCT)	gCML and MLR	?
Johnson et al. (22)	B10.BR10.BR (syngenic) B6129F2 or B10.BR.AKR (complete H2 disparity)	Thy1.2-, IgS- Mac1 <sup>low</sup> , Sca-1+	D+10	gMLR	iNOS
Ghansah et al. (23)	C3H AKR (MIHAgs)	CD11b+/Ly6G+/Ly6C+/CD14-/F4/80-/CD11c-	D+21	?MLR	NO
Luyckx et al. (24)	B6 B6D2F1 (partial H2 disparity)	Gr-1 <sup>+</sup> /CD11b <sup>+</sup>	D+21	gMLR	iNOS?
Wang et al. (25)	B6B6 (syngenic) B6BALB/C (complete H2 disparity)	Gr-1 <sup>+</sup> /CD11b <sup>+</sup>	D+14	gMLR	Arg-1 ROS

Arrows pointing down indicate a reduction in the activity. ?, uncertain; Arg-1, arginase; CML, cell mediated lympholysis; H2, Histocompatibility 2; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MDSC, myeloid derived suppressive cells; MIHAgs, Minor Histocompatibility Antigens; MLR, mixed lymphocyte reaction; NO, nitric oxide; ROS, reactive oxygen species.

Mouse models and MHC haplotype:

H2<sup>b</sup>: B6 (C57BL/6), B10: C57BL/10SnJ (a strain of C57BL) and B6129F2.

H2<sup>d</sup>: BALB/C, B10.D2: B10.D2/nSn and DBA/2.

H2<sup>k</sup>: AKR, B10.BR, and C3H.

H2<sup>q</sup>: B6D2F1 (C57BL/6 × DBA/2) and B10D2F1 (B10.D2 × BALB/C).

## ROLES OF MDSCS AND MECHANISMS OF ACTION

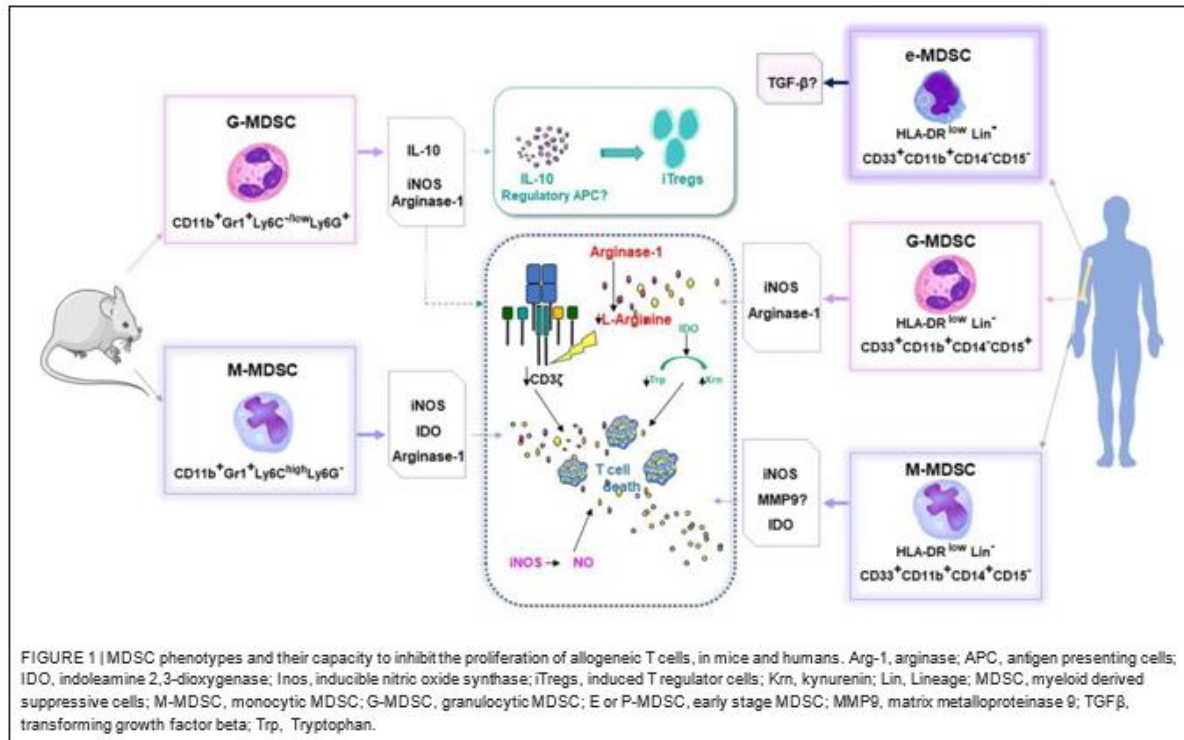
### Murine Models of GVHD

In the context of allo-HSCT, MDSCs are mainly defined by their capacity to inhibit the proliferation of allogeneic T cells. To date, these immunosuppressive properties have been attributed to four main mechanisms demonstrated *in vitro* and *in vivo*, including: NO production; arginase 1-mediated L-arginine depletion; indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-mediated tryptophan (an essential amino acid) conversion; and T regulatory lymphocyte (Treg) induction (Figure 1). Of note, the ROS mechanism of immunosuppression, which was antagonized by adding catalase, was only described once *in vitro* (25).

Experimentally, the immunoregulatory role of NO was established by showing that immunosuppression could be reversed with NO synthase (NOS) inhibitors, such as NG-nitrodimethyl-L-arginine monoacetate, *in vitro*. NO is known to be a negative regulator of intracellular-signaling protein cascades downstream of the interleukin-2 (IL-2) receptor (30, 31). NO blocks the phosphorylation and activation of several signaling proteins, including Janus-activated kinases 1 and 3,

signal-transducer and activator of transcription-5, extracellular-signal-regulated kinase, and protein kinase B (32). NO affects the stability of IL-2 mRNA and the release of IL-2 from activated lymphocytes (33). High NO concentrations also induce T-cell apoptosis through various mechanisms, including accumulation of the tumor-suppressor protein, p53; signaling through Fas or tumor necrosis factor (TNF)-receptor family members; or signaling through caspase-independent pathways (34). The main MDSC subset capable of producing NO is the M-MDSC subset (CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>high</sup> Ly6G<sup>low</sup>). We previously demonstrated that, within the M-MDSC population, there was a highly immunosuppressive subpopulation of cells that expressed CD34; these cells were called CD34<sup>+</sup> monocytes (35). *In vitro*, CD34<sup>+</sup> monocytes required T-cell-mediated IFN-γ stimulation to produce NO and to inhibit T cell activation and proliferation. *In vivo*, adoptive therapy with CD34<sup>+</sup> monocytes protected mice from acute GVHD.

Depletion of L-arginine with arginase 1 inhibits T-cell proliferation by inhibiting T-cell expression of the CD3ζ chain, the cell-cycle regulator, cyclin D3, and cyclin-dependent kinase 4 (36). Recently, Highfill and colleagues demonstrated that MDSCs generated from murine bone marrow cells and



cultured with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) induced arginase-1 activity, which depleted T-cell L-arginine. This depletion resulted in the inhibition of allogeneic T-cell responses, both *in vitro* and *in vivo*. The addition of IL-13 to bone marrow cultures resulted in up-regulating arginase-1 activity, which then increased the suppressive activity of this MDSC subset (37).

IDO is a potent immunoregulatory enzyme that converts the essential amino acid, tryptophan, into catabolic products, collectively known as kynurenines. Joo et al. reported that IFN-γ treatment induced functional IDO activity in MDSCs (Gr1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>), which suppressed allogeneic T-cells, and thus, modulated GVHD (38).

IL-10 is a potent anti-inflammatory cytokine that plays a role in interactions between neutrophils and Tregs (39). Conventional T cells can be converted to Tregs as a consequence of antigen exposure in the periphery, under inflammatory and non-inflammatory (TGF β, IL-10) conditions (40). After allogeneic HSCT, peripheral Tregs emerge *in vivo*, due to IL-10 production by G-MDSCs (41, 42). Induced peripheral Tregs are involved in the control of immunity at sites of inflammation, particularly at mucosal surfaces. More recently, natural Treg proliferation was demonstrated through a mechanism that depended on their cell-cell contact with MDSCs that expressed the Programmed Death-1 ligand (PDL1) (43).

In the context of chronic GVHD, the role of MDSCs has been poorly explored. In a mouse model of chronic GVHD, it was reported that *ex vivo* cultured MDSCs could modulate chronic GVHD presumably by preventing thymic tissue damages and reducing the percentages of CD4<sup>+</sup> T cells that produced IL-17 (Th17 cells) and IL-4 (Th2 cells) (44).

### Human allo-HSCT and GVHD (Table 2 + Figure 1)

MDSCs have been observed in grafts of G-CSF-mobilized peripheral blood hematopoietic stem cell (PBSCs) (45). The presence of some MDSC subsets in hematopoietic stem cell grafts has been correlated with a lower incidence of acute GVHD. For instance, common monocytic MDSCs (defined as Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>low/-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>) (46); CD34<sup>+</sup> monocytic MDSCs (Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>low/-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>) (35); and early-stage MDSCs (HLA-DR<sup>-/low</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>) (47) were correlated with a lower incidence of acute GVHD in HLA-matched and haplo-identical HSCT settings (48). Moreover, G-CSF-primed bone marrow grafts contained higher levels of Lin<sup>low/-</sup> HLA-DR<sup>-</sup> CD33<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> MDSCs, compared to PBSC grafts, and the G-CSF primed bone marrow grafts were associated with improved GVHD-free survival (49).

After an allo-HSCT, MDSC recovery during immune reconstitution and its clinical relevance have not been fully determined. MDSCs were first observed in recipients that developed acute GVHD. Those MDSCs were defined as a myeloid

TABLE 2 | MDSCs in the setting of human allogeneic HSCT.

References	Type of MDSC		Early Stage	Before/after HSCT	Immunosuppressive mechanism	Acute GVHD	Chronic GVHD	OS	NRM	EFS
	Monocytic	Granulocytic								
Luyckx et al. (45)	Lin <sup>-</sup> , HLA-DR <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> CD15 <sup>-</sup>	Lin <sup>-</sup> , HLA-DR <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup> CD14 <sup>low</sup>		Before	?	ND	ND	ND	ND	ND
Vendramin et al. (46)	Lin <sup>-</sup> , HLA-DR <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>			Before	?	g	ND	ND	ND	ND
D'Aveni et al. (35)	Lin <sup>-</sup> , HLA-DR <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>			Before	iNOS	g	ND	ND	ND	ND
Wang et al. (47)			HLA-DR <sup>-</sup> CD33 <sup>+</sup> CD18 <sup>-</sup>	Before	TGFβ?	g	g	=	=	=
Lv et al. (48)	Lin <sup>-</sup> , HLA-DR <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>		Lin <sup>-</sup> , HLA-DR <sup>-</sup> CD11b <sup>low</sup> CD33 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> CD15 <sup>-</sup>	Before	?	g	g	=	=	=
Fan et al. (49)	Total MDSCs:	Lin <sup>-</sup> , HLA-DR <sup>-</sup> , CD11b <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup>		Before	?	g	g	=	=	=
Mougiakakos et al. (50)	HLA-DR <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup>			After	IDO	n	ND	ND	ND	ND
Guan et al. (51)	CD33 <sup>+</sup> CD15 <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup>	CD33 <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup> CD66b <sup>+</sup>		After	Arg-1 iNOS (for G-MDSCs)	=	ND	ND	ND	ND
Kim et al. (52)	CD14 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup>			After	?	g	ND	ND	=	= (nRI)
Lee et al. (53)	CD14 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup>			After	MMP9	=	ND	=	g	g

Arrows indicate increases (pointing up) or decreases (pointing down) in the activity or effect (according to the number of MDSC); =, indicates no change observed; ?, unknown; Arg-1, arginase; EFS, event free survival; GVHD, graft vs. host disease; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MDSC, myeloid derived suppressive cells; MMP9, matrix metalloproteinase 9; ND, not done; NRM, non relapse mortality; OS, overall survival.

circulating cell subset (HLA-DR<sup>low/-</sup> CD14<sup>+</sup>) endowed with *in vitro* suppressive properties through IDO (50, 51). Furthermore, M-MDSCs (HLA-DR<sup>low/-</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>) and G-MDSCs (HLA-DR<sup>-/low</sup> CD33<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> CD66b<sup>+</sup>) have been isolated from recipients early after transplantation (within 3 months). Those cells could suppress third-party CD4 T-cell proliferation and Th1 differentiation, and they promoted Treg development (51). Increased levels of circulating MDSCs have also been described in patients treated with extracorporeal photopheresis for acute and chronic GVHD (54). Extracorporeal photopheresis was associated with an increase in circulating MDSCs, reduction in CD19<sup>high</sup> CD20<sup>high</sup> B cells, and reductions in the expression of CD38 and the BAFF-receptor (55). Unfortunately, the potential mechanisms that gave rise to these observations and the correlations between MDSCs and B cells in the context of chronic GVHD remain unknown.

Prospective studies have attempted to identify which MDSC subsets in recipients could impact post-transplantation outcomes, including overall survival (OS), non-relapse mortality (NRM), event-free survival (EFS), and acute and chronic GVHD. The common findings of those studies were:

- early expansion of G-MDSCs was not correlated with post-transplantation outcomes (52, 53).

- early expansion of M-MDSCs was associated with a higher early infection incidence, a higher NRM, and a lower EFS (and/or higher relapse incidence = RI), but did not affect OS.
- early expansion of M-MDSCs was not associated with acute GVHD in patients that received transplants from siblings or matched unrelated donors (51, 53). Lower expansion of M-MDSCs after allo-HSCT was associated with severe acute GVHD in a cohort of patients that received transplants from siblings, matched unrelated donors, haploidentical-related donors, and double cord donors (52) (Table 2).

To summarize these different studies, M-MDSCs that circulate in the peripheral blood of human recipients early after transplantation can be considered as biomarkers of inflammation, and they can predict some post-transplantation outcomes (infections, GVHD, NRM). However, these findings require validation in larger cohorts.

### Impact of MDSCs on the GVT Effect

In mice, when MDSCs generated *in vitro* were infused to treat severe acute GVHD, the GVT effect was conserved (37). This effect was observed even when the adoptive transfer was performed with MDSCs freshly isolated from tumor-bearing mice. This phenomenon was explained by the observation

that MDSCs spare cytotoxic T lymphocytes (NKG2D<sup>+</sup> CD8 T cells), which play an important role in the retention of GVT activities (56). Moreover, it was demonstrated that CD4 T cells were more susceptible to suppression by MDSCs, and the development of NKG2D<sup>+</sup> T cell populations was associated with the expression of NKG2D ligands on MDSCs. In another mouse model, MDSCs attenuated GVHD in an IL-10 and Treg-dependent manner; (42) indeed, it was previously shown that Tregs could preserve the GVT effect in mice (57). In some studies, post-transplant chemotherapies [bendamustine (58) and cyclophosphamide (59)] induced CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> cells which probably played role in transplant tolerance induction. However, the effect of MDSCs on GVT in the model of post-transplant bendamustine was unclear, because chemotherapy can also improve tumor control (58).

In humans, MDSCs have been related to worse outcomes in hematological malignancies (60, 61); therefore, MDSCs were suspected to be involved in relapses after allo-HSCT. However, in the allo-HSCT setting, only a few prospective studies have reported a significantly higher probability of relapse in patients with higher M-MDSC frequencies than other patients, in the 30 days following allo-HSCT (52, 53). Other studies suggested that MDSCs preserved the GVT effect (26, 56). In a recent study, G-MDSCs derived from G-CSF-mobilized donors inhibited *in vitro* NK cytolytic activity through an IDO and PGE2 mechanism. Those findings suggested that G-MDSCs had a potent inhibitory effect on the antileukemia activity of donor mature NK cells in recipients (62). For instance, DLIs, which are performed to control hematological malignancies, have been tested with or without G-CSF treatment. The DLIs derived from PBSCs collected after G-CSF treatment favored the conversion to full donor chimerism, despite the higher content of M-MDSCs. Moreover, G-CSF-treated DLIs were associated with lower cumulative incidences of relapse and disease progression, and did not significantly increase the cumulative incidence of GVHD (63). Additionally, during the first 100 days after allo-HSCT, the number of MDSCs in peripheral blood was correlated with the occurrence of severe acute GVHD, but not with an increased risk of malignancy recurrence (64). These observations suggested that MDSCs might not inhibit the GVT effect.

## ARE MDSCS OF INTEREST AS A CELLULAR THERAPY?

### Generation of MDSCs in Mouse Models (Table 3)

MDSCs can be successfully generated in mice. This was first established with CpG. CpG was administered either alone or emulsified in incomplete Freund's adjuvant. This treatment caused an accumulation of double-positive CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> cells in the donor's peripheral blood and spleen. Splenic CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> cells isolated from treated mice efficiently suppressed alloreactivity in an MLR *in vitro*, and they prevented GVHD *in vivo* (65). Later, Joo et al. administered G-CSF to B6 mice. They observed that the mobilized donor graft spleen used for hematopoietic stem cell transplantation contained a large

number of immature Gr-1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> myeloid cells. These cells suppressed alloreactive donor T cells, which resulted in the inhibition of acute GVHD through an IDO-independent mechanism (38). MacDonald et al. described cells that were induced by progenipoiitin-1 (a synthetic G-CSF/Flt-3 ligand molecule). These cells can (retrospectively) be considered MDSCs, because they promoted transplant tolerance by inducing MHC class II-restricted, IL-10-secreting, antigen-specific Tregs (41). In another experimental model, MDSCs were induced after culturing bone marrow cells for 4 days with G-CSF and GM-CSF (37). The resulting CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>low</sup>Ly6C<sup>+</sup> MDSCs could inhibit allogeneic T-cell responses *in vitro* and *in vivo* by inducing arginase-1 activity. Addition of exogenous IL-13 in the culture produced a subset of MDSCs (MDSC-IL-13) with greater immunosuppressive potential, due to an up-regulation of arginase-1. MDSC-IL-13 cells migrated to sites of allopriming, where they limited alloreactive donor T-cell proliferation, activation, and pro-inflammatory cytokine production (37). These cells had potent suppressive activity, which resulted in the prevention of acute GVHD lethality. Transplantation of these generated MDSCs inhibited GVHD, but not the anti-tumor cytotoxicity of alloantigen-specific T cells. Moreover, these MDSCs skewed the allogeneic T cell profile toward type-2 T cells, which upregulated T helper 2 (Th2)-specific cytokines (66). Because G-CSF-treated PBSCs are currently used as a source of hematopoietic stem cells in humans, two research teams evaluated the impact of G-CSF-induced MDSCs present in the donor graft. They showed that both G-MDSCs and M-MDSCs induced by G-CSF could reduce acute GVHD in a Treg-dependent manner, through different mechanisms (35, 42) (Table 2).

### Generation of MDSCs in Humans

Successful treatments with *ex vivo* cultured MDSCs have been reported in mouse models, but what do we know about human GVHD? Generating MDSCs for clinical applications might be difficult, because MDSCs represent a rare subpopulation of myeloid cells. A Korean research team proposed to expand MDSCs from one cord blood unit (CBU). They investigated which cytokine combinations (GM-CSF/SCF) could efficiently expand and differentiate human MDSCs from a culture of CD34<sup>+</sup> cells. They showed that human MDSCs could be expanded on a large scale, compatible with clinical applications. They produced up to 10<sup>8</sup> MDSCs (HLA-DR<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>) from 1 CBU. Infusion of these expanded MDSCs (i.e., third-party cells) significantly reduced GVHD scores, which prolonged survival in a NOD-scid IL2rg<sup>null</sup> (NSG) xenogeneic mouse model of GVHD (67). Unfortunately, producing sufficient MDSCs required 6 weeks of continuous culture, which might be too long for their use as a treatment for severe acute GVHD. In fact, the most effective approaches for GVHD are those that dampen T-cell responses early after transplantation (prophylaxis). Once alloreactive T cells have begun to contribute to organ injury, it is probably too late to propose cellular therapy. Because most MDSCs do not survive after freeze-thawing, a biobank of these cells is not relevant, and MDSC generation in humans is a difficult avenue of research. To generate a rapidly available cellular

TABLE 3 | MDSCs (cellular therapy) in HSCT mouse models: induction, mechanisms of action, and impact on GVHD, GVL, and OS.

References	MDSC phenotype	Factors that induced MDSCs	T cell proliferation in MLR	Immunosuppressive mechanisms	Acute GVHD	GVL	OS
Morecki et al. (85)	Gr1 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup> F4/80 <sup>-</sup>	CpG+IFA	g	(IL-6, IL-10, IFN-γ)?	g	ND	∩
Joo et al. (38)	Gr-1 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Ly8C <sup>+</sup>	G-CSF	g	IDO	g	ND	∩
MacDonald et al. (41)	GM cells CD11b <sup>+</sup> Gr1 <sup>low</sup>	G-CSF+FLT3-L		IL-10 gTreg	g	ND	∩
Highfill et al. (37)	CD11b <sup>+</sup> Ly8G <sup>low</sup> Ly8C <sup>+</sup> IL-4Rα <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup>	G-CSF+GM-CSF +/-IL-13	g	Arg-1	g	=	∩
Messman et al. (86)	Gr-1 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD115 <sup>+</sup> IL-4Rα <sup>+</sup>	G-CSF+GM-CSF	g	Th2	g	=	∩
D'Aveni et al. (35)	CD34 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD115 <sup>+</sup> Ly8C <sup>+</sup>	G-CSF	g	iNOS Tregs	g	ND	∩
Perobelli et al. (42)	CD11b <sup>+</sup> Ly8G <sup>high</sup> Ly8C <sup>-</sup>	G-CSF	ND	IL-10 Tregs	g	=	∩

Arrows indicate increases (pointing up) or decreases (pointing down) in the activity or effect; = indicates no change observed; ?, uncertain; Arg-1, arginase; FLT3-L, fms-like tyrosine kinase 3 ligand; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte monocyte CSF; GVHD, Graft vs. host disease; GVL, Graft vs. leukemia (or lymphoma); HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; IFA, incomplete Freund's adjuvant; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MDSC, Myeloid derived suppressive cells; MLR, Mixed lymphocyte reaction; ND, not done; OS, Overall survival; Th2, Helper T cell type 2.

therapy, a donor apheresis sample was sorted, and hematopoietic progenitor cells (CD34<sup>+</sup> cells) were selected and frozen. At the right moment, CD34<sup>+</sup> cells were thawed and cultured for 20 days with stem cell factor, thrombopoietin, fms-like tyrosine kinase 3 ligand, GM-CSF, and IL-6. This treatment generated both M-MDSCs and G-MDSCs (68). However, these cells were only tested *in vitro*. Alternatively, Bonnotte's team proposed to generate *ex vivo* human suppressor cells of monocytic origin (HuMoSCs), rather than from hematopoietic progenitor cells. These HuMoSCs were obtained after 7 days of culture with GM-CSF and IL-6. Because they were obtained from mature cells, they could not be called MDSCs, but they promoted, *in vivo*, the development of a CD8 T lymphocyte subset that expressed FOXP3, which induced peripheral tolerance. Interestingly, these cells could be infused to prevent GVHD on day 7 after transplantation. Alternatively, they could be frozen, then thawed at the precise moment they were needed (69). Unfortunately, little is known about the *in vivo* viability, trafficking, and expansion of these cultured cells.

## DISCUSSION AND FUTURE CONSIDERATIONS

MDSCs represent a diverse population of immature myeloid cells that are currently well-described in the context of allogeneic stem cell transplantation. MDSC properties have been described according to observations at different times during the transplantation procedure: in the donor graft after mobilization, in the recipient after a conditioning regimen, and during the reconstitution of the donor-derived immune system. Flow cytometry studies have analyzed MDSCs in the graft and in recipient blood samples during post-transplantation immune recovery; however, their role is not fully understood. They represent a biomarker of inflammation, but their

immunosuppressive properties are not always maintained; thus, these properties are likely to depend on the context.

MDSCs were first described as highly immunosuppressive cells derived from radioresistant recipient cells. However, recent data have suggested that the intestinal microbiota might provide new avenues of researches on how MDSCs might be induced and modulated after a conditioning regimen. We know that conditioning regimens induce tissue damage, which allows bacterial products to translocate from the skin and mucosa into the blood, where they can activate immune cells. After conditioning, lipopolysaccharide (LPS) mediates activation of the pathway involving Toll Like Receptor 4 (TLR4)-myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)- nuclear factor-kappa B (NF-κB). In a recent study, recipients that received MyD88-deficient bone marrow cell transplantations developed severe intestinal GVHD associated with an insufficient expansion of donor MDSCs. That result suggested that intestinal microbiota might regulate MDSC induction through the TLR/MyD88 pathway (70). In humans, patients that received broad spectrum antibiotics (carbapenem) developed dysbiosis of the intestinal microbiota. This condition was associated with reduced recovery of E- and M-MDSCs and an increase in the cumulative incidence of intestinal GVHD (71). Those findings suggested that, early after conditioning, the TLR/Myd88 pathway might first stimulate (signal 1) Nlrp3 inflammasome, which might induce the generation of MDSCs.

On the other hand, the conditioning regimen also provides a second stimulus (signal 2), through damaged tissues, which cause the release of damage-associated molecular pattern (DAMP) molecules. The release of DAMPs in the conditioning phase can activate the Nlrp3 inflammasome in recipient cells, and this activation correlated to an increased risk of severe GVHD (72). The main endogenous DAMP molecule, Adenosine-5'-triphosphate acts as a ligand for the P2X7 receptor (73). Activation of the P2X7 receptor was shown to be a critical

step in the pathogenesis of GVHD (74). Koehn et al. recently demonstrated that the binding of ATP to the P2X7 receptor could induce the assembly and activation of the Nlrp3 inflammasome. Full activation of the Nlrp3 inflammasome led to MDSCs differentiation and the loss of suppressor function (75). Thus, MDSCs that are induced early after conditioning could rapidly differentiate and lose their immunosuppressive function after allogeneic HSCT. Indeed, pharmacologic agents that targeted Nlrp3 and the P2X7 receptor provided significantly higher survival, due to a lower incidence of GVHD (7, 76).

Strikingly, excessive production of mitochondrial ROS molecules was observed during conditioning; this represents another second stimulus (signal 2) of the Nlrp3 inflammasome (77). In hematology, as in oncology, the metabolism of MDSCs in the tumor microenvironment is commonly described as highly active. These MDSCs produce high levels of cytosolic ROS, due to the action of NADPH oxidase (NOX2). This environment appears to maintain MDSCs in an undifferentiated state with immunosuppressive properties (78). In allogeneic HSCT, NOX2-mediated ROS production in MDSCs has been poorly described (25). However, excessive oxidative stress, due to both mitochondrial and cytosolic ROS production, could compromise redox homeostasis in MDSCs. This condition can activate a nuclear factor called erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2), which regulates an endogenous antioxidant mechanism that is involved in the regulation of various pathways in MDSCs, such as metabolic reprogramming and differentiation (79). Therefore, further studies on MDSCs are warranted in the context of allo-HSCT that aim to decipher the roles and interactions of specific metabolism/redox signaling molecules and inflammasome. Those findings could improve our understanding of the fine-tuning and maintenance of the immunosuppressive functions and differentiation of MDSCs.

To summarize, the generation (67–69) and depletion of MDSCs are gaining interest in the field of research that aims to

shape the balance between GVHD and GVT. Therefore, MDSC metabolism and the inflammasome pathway should be studied carefully. Results from those studies might determine whether we should consider the administration of repeated infusions of *ex vivo* expanded MDSCs to modulate GVHD, as is currently routinely performed in cellular therapy with MSC (80).

## CONCLUSION

The present review showed that MDSCs are gaining interest in the context of allo-HSCT. They represent a key regulatory cell type in the inflammatory environment induced by allo-HSCT, particularly in the context of GVHD. Although murine studies have revealed a plethora of mechanisms and pathways that give rise to the generation of MDSCs and their suppressive functions, evidence of these putative mechanisms in humans remains scarce. In the context of allogeneic HSCT, MDSCs have mainly been described as inhibiting the activation, proliferation, and function of T cells. However, few studies have demonstrated MDSCs interacting with other cells, such as NK cells, iNKT cells, Dendritic Cells, or B cells. Based on this review, we would like to highlight that, to date, M-MDSCs seem to be the most well-described, well-understood MDSC subset in the context of allo-HSCT. The M-MDSC subset is highly conserved between species (mouse and human), has powerful immunosuppressive properties, and could be produced in *ex vivo* cultures. Future studies on MDSC metabolism and the inflammasome pathway might pave the way for new pharmacologic strategies that can either dampen or enhance MDSC suppressor function according to the clinical context.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MD'A and AN drafted the manuscript. CP, AB, LB, and MR reviewed and edited the manuscript.

## REFERENCES

- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. (1974) 18:295–304. doi: 10.1097/00007890-197410000-00001
- Le Blanc K, Frasson F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. (2008) 371:1579–86. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60690-X
- Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. (2006) 81:1390–7. doi: 10.1097/01.tp.0000214462.63943.14
- Hess AD. Modulation of graft-versus-host disease: role of regulatory T lymphocytes. *Biology Blood Marrow Transplant*. (2006) 12(Suppl. 2):13–21. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.11.002
- Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP III, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. (2011) 365:2055–66. doi: 10.1056/NEJMoal108188
- Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ. Strategies for enhancing and preserving anti-leukemia effects without aggravating graft-versus-host disease. *Front Immunol*. (2018) 9:3041. doi: 10.3389/fimmu.2018.03041
- Koehn BH, Apostolova P, Haverkamp JM, Miller JS, McCullar V, Tolar J, et al. GVHD-associated, inflammasome-mediated loss of function in adoptively transferred myeloid-derived suppressor cells. *Blood*. (2015) 126:1621–8. doi: 10.1182/blood-2015-03-634691
- Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. (2009) 9:162–74. doi: 10.1038/nri2506
- Kusmartsev S, Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol*. (2005) 175:4583–92. doi: 10.4049/jimmunol.175.7.4583
- Rodriguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev*. (2008) 222:180–91. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00608.x
- Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Res*. (2017) 5:3–8. doi: 10.1158/2326-6066.CCR-16-0297
- Mandruzzato S, Brandau S, Britten CM, Bronte V, Damuzzo V, Gouttefangeas C, et al. Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. *Cancer Immunol Immunother*. (2016) 65:161–9. doi: 10.1007/s00262-015-1782-5
- An B, Lim JY, Jeong S, Shin DM, Choi EY, Min CK, et al. CD1d is a novel cell-surface marker for human monocytic myeloid-derived suppressor cells with T cell suppression activity in peripheral blood after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biochem Biophys Res Commun*. (2018) 495:519–25. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.010

14. Roder JC, Duwe AK, Bell DA, Singhal SK. Immunological senescence. I. The role of suppressor cells. *Immunology*. (1978) 35:837–47.
15. Subiza JL, Vimuela JE, Rodriguez R, Gil J, Figueredo MA, De La Concha EG. Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice. *Int J Cancer*. (1989) 44:307–14. doi: 10.1002/ijc.2910440220
16. Noga SJ, Wagner JE, Horwitz LR, Donnenberg AD, Santos GW, Hess AD. Characterization of the natural suppressor cell population in adult rat bone marrow. *J Leukoc Biol*. (1988) 43:279–87. doi: 10.1002/jlb.43.3.279
17. Oseroff A, Okada S, Strober S. Natural suppressor (NS) cells found in the spleen of neonatal mice and adult mice given total lymphoid irradiation (TLI) express the null surface phenotype. *J Immunol*. (1984) 132:101–10.
18. Sykes M, Sharabi Y, Sachs DH. Natural suppressor cells in spleens of irradiated, bone marrow-reconstituted mice and normal bone marrow: lack of Sca-1 expression and enrichment by depletion of Mac1-positive cells. *Cell Immunol*. (1990) 127:260–74. doi: 10.1016/0008-8749(90)90131-A
19. Holda JH, Maier T, Claman HN. Graft-vs-host reactions (GVHR) across minor murine histocompatibility barriers. I. Impairment of mitogen responses and suppressor phenomena. *J Immunol*. (1985) 134:1397–402.
20. Maier T, Holda JH, Claman HN. Graft-vs-host reactions (GVHR) across minor murine histocompatibility barriers. II. Development of natural suppressor cell activity. *J Immunol*. (1985) 135:1644–51.
21. Sykes M, Eisenthal A, Sachs DH. Mechanism of protection from graft-vs-host disease in murine mixed allogeneic chimeras. I. Development of a null cell population suppressive of cell-mediated lympholysis responses and derived from the syngeneic bone marrow component. *J Immunol*. (1988) 140:2903–11.
22. Johnson BD, Hanke CA, Becker EE, Truitt RL. Scf(+)Mac1(+) nitric oxide-producing cells in the spleens of recipients early following bone marrow transplant suppress T cell responses *in vitro*. *Cell Immunol*. (1998) 189:149–59. doi: 10.1006/cimm.1998.1373
23. Ghansah T, Paraiso KH, Highfill S, Despoints C, May S, McIntosh JK, et al. Expansion of myeloid suppressor cells in SHIP-deficient mice represses allogeneic T cell responses. *J Immunol*. (2004) 173:7324–30. doi: 10.4049/jimmunol.173.12.7324
24. Luyckx A, Schoupe E, Rutgeerts O, Lenaerts C, Koks C, Fevery S, et al. Subset characterization of myeloid-derived suppressor cells arising during induction of BM chimerism in mice. *Bone Marrow Transplant*. (2012) 47:985–92. doi: 10.1038/bmt.2011.207
25. Wang D, Yu Y, Haarberg K, Fu J, Kaosaard K, Nagaraj S, et al. Dynamic change and impact of myeloid-derived suppressor cells in allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Biology Blood Marrow Transplant*. (2013) 19:692–702. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.01.008
26. Billiau AD, Fevery S, Rutgeerts O, Landuyt W, Waer M. Transient expansion of Mac1+Ly6-G+Ly6-C+ early myeloid cells with suppressor activity in spleens of murine radiation marrow chimeras: possible implications for the graft-versus-host and graft-versus-leukemia reactivity of donor lymphocyte infusions. *Blood*. (2003) 102:740–8. doi: 10.1182/blood-2002-06-1833
27. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Kruger C, Manns MP, et al. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology*. (2008) 135:234–43. doi: 10.1053/j.gastro.2008.03.020
28. Mandruzzato S, Solito S, Falisi E, Francescato S, Chiarion-Sileni V, Mocellin S, et al. IL4Ralpha+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *J Immunol*. (2009) 182:6562–8. doi: 10.4049/jimmunol.0803831
29. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res*. (2005) 65:3044–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4505
30. Bingisser RM, Tilbrook PA, Holt PG, Kees UR. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol*. (1998) 160:5729–34.
31. Fischer TA, Palmetschhofer A, Gambaryan S, Butt E, Jassoy C, Walter U, et al. Activation of cGMP-dependent protein kinase Ibeta inhibits interleukin 2 release and proliferation of T cell receptor-stimulated human peripheral T cells. *J Biol Chem*. (2001) 276:5967–74. doi: 10.1074/jbc.M009781200
32. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, et al. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol*. (2002) 168:689–95. doi: 10.4049/jimmunol.168.2.689
33. Macphail SE, Gibney CA, Brooks BM, Booth CG, Flanagan BF, Coleman JW. Nitric oxide regulation of human peripheral blood mononuclear cells: critical time dependence and selectivity for cytokine versus chemokine expression. *J Immunol*. (2003) 171:4809–15. doi: 10.4049/jimmunol.171.9.4809
34. Serafini P, Meckel K, Kelso M, Noonan K, Califano J, Koch W, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med*. (2006) 203:2691–702. doi: 10.1084/jem.20061104
35. D'Aveni M, Rossignol J, Coman T, Sivakumaran S, Henderson S, Manzo T, et al. G-CSF mobilizes CD34+ regulatory monocytes that inhibit graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. (2015) 7:281ra2. doi: 10.1126/scitranslmed.3010435
36. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*. (2007) 109:1568–73. doi: 10.1182/blood-2006-06-031856
37. Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, Goetz CA, Koehn BH, Veenstra R, et al. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood*. (2010) 116:5738–47. doi: 10.1182/blood-2010-06-287839
38. Joo YD, Lee SM, Lee SW, Lee WS, Lee SM, Park JK, et al. Granulocyte colony-stimulating factor-induced immature myeloid cells inhibit acute graft-versus-host disease lethality through an indoleamine dioxygenase-independent mechanism. *Immunology*. (2009) 128(Suppl. 1):e632–40. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03048.x
39. Lewkowicz N, Klink M, Mycko MP, Lewkowicz P. Neutrophil-CD4+CD25+ T regulatory cell interactions: a possible new mechanism of infectious tolerance. *Immunobiology*. (2013) 218:455–64. doi: 10.1016/j.imbio.2012.05.029
40. Yadav M, Stephan S, Bluestone JA. Peripherally induced tregs - role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front Immunol*. (2013) 4:232. doi: 10.3389/fimmu.2013.00232
41. MacDonald KP, Rowe V, Clouston AD, Welpy JK, Kuns RD, Ferrara JL, et al. Cytokine expanded myeloid precursors function as regulatory antigen-presenting cells and promote tolerance through IL-10-producing regulatory T cells. *J Immunol*. (2005) 174:1841–50. doi: 10.4049/jimmunol.174.4.1841
42. Perobelli SM, Mercadante AC, Galvani RG, Goncalves-Silva T, Alves AP, Pereira-Neves A, et al. G-CSF-induced suppressor IL-10+ neutrophils promote regulatory T cells that inhibit graft-versus-host disease in a long-lasting and specific way. *J Immunol*. (2016) 197:3725–34. doi: 10.4049/jimmunol.1502023
43. van der Merwe M, Abdelsamed HA, Seth A, Ong T, Vogel P, Pillai AB. Recipient myeloid-derived immunomodulatory cells induce PD-1 ligand-dependent donor CD4+Foxp3+ regulatory T cell proliferation and donor-recipient immune tolerance after murine nonmyeloablative bone marrow transplantation. *J Immunol*. (2013) 191:5764–76. doi: 10.4049/jimmunol.1302191
44. Lim JY, Ryu DB, Park MY, Lee SE, Park G, Kim TG, et al. Ex vivo generated human cord blood myeloid-derived suppressor cells attenuate murine chronic graft-versus-host diseases. *Biol Blood Marrow Transplant*. (2018) 24:2381–96. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.07.004
45. Luyckx A, Schoupe E, Rutgeerts O, Lenaerts C, Fevery S, Devos T, et al. G-CSF stem cell mobilization in human donors induces polymorphonuclear and mononuclear myeloid-derived suppressor cells. *Clin Immunol*. (2012) 143:83–7. doi: 10.1016/j.clim.2012.01.011
46. Vendramin A, Gimondi S, Bernerna A, Longoni P, Rizzitano S, Corradini P, et al. Graft monocytic myeloid-derived suppressor cell content predicts the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. (2014) 20:2049–55. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.09.011
47. Wang K, Lv M, Chang YJ, Zhao XY, Zhao XS, Zhang YY, et al. Early myeloid-derived suppressor cells (HLA-DR(-)/low)CD33(+)CD116(-) expanded by granulocyte colony-stimulating factor prevent acute graft-versus-host disease (GVHD) in humanized mouse and might contribute to lower GVHD in patients post allo-HSCT. *J Hematol Oncol*. (2019) 12:31. doi: 10.1186/s13045-019-0710-0
48. Lv M, Zhao XS, Hu Y, Chang YJ, Zhao XY, Kong Y, et al. Monocytic and promyelocytic myeloid-derived suppressor cells may contribute to G-CSF-induced immune tolerance in haplo-identical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol*. (2015) 90:E9–16. doi: 10.1002/ajh.23865

49. Fan Q, Liu H, Liang X, Yang T, Fan Z, Huang F, et al. Superior GVHD-free, relapse-free survival for G-BM to G-PBSC grafts is associated with higher MDSCs content in allografting for patients with acute leukemia. *J Hematol Oncol.* (2017) 10:135. doi: 10.1186/s13045-017-0503-2
50. Mouggiakakos D, Jitschin R, von Bahr L, Poschke I, Gary R, Sundberg B, et al. Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/neg IDO+ myeloid cells in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia.* (2013) 27:377–88. doi: 10.1038/leu.2012.215
51. Guan Q, Blankstein AR, Anjos K, Synova O, Tulloch M, Giftakis A, et al. Functional myeloid-derived suppressor cell subsets recover rapidly after allogeneic hematopoietic stem/progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* (2015) 21:1205–14. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.04.015
52. Kim TW, Park SS, Lim JY, Min GJ, Park S, Jeon YW, et al. Predictive role of circulating immune cell subtypes early after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute leukemia. *In J Stem Cells.* (2018) 12:73–83. doi: 10.15283/ijsc.18094
53. Lee SE, Lim JY, Kim TW, Jeon YW, Yoon JH, Cho BS, et al. Matrix metalloproteinase-9 in monocytic myeloid-derived suppressor cells correlate with early infections and clinical outcomes in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* (2018) 24:32–42. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.08.017
54. Rieber N, Wecker I, Neri D, Fuchs K, Schafer I, Brand A, et al. Extracorporeal photopheresis increases neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in patients with GVHD. *Bone Marrow Transplant.* (2014) 49:545–52. doi: 10.1038/bmt.2013.236
55. Wang L, Ni M, Huckelhoven-Krauss A, Sellner L, Hoffmann JM, Neuber B, et al. Modulation of B cells and homing marker on NK cells through extracorporeal photopheresis in patients with steroid-refractory/resistant graft-versus-host disease without hampering anti-viral/anti-leukemic effects. *Front Immunol.* (2018) 9:2207. doi: 10.3389/fimmu.2018.02207
56. Zhang J, Chen HM, Ma G, Zhou Z, Raulet D, Rivera AL, et al. The mechanistic study behind suppression of GVHD while retaining GVL activities by myeloid-derived suppressor cells. *Leukemia.* (2019) 33:2078–89. doi: 10.1038/s41375-019-0394-z
57. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med.* (2003) 9:1144–50. doi: 10.1038/nm915
58. Stokes J, Hoffman EA, Zeng Y, Lamonier N, Katsanis E. Post-transplant bendamustine reduces GVHD while preserving GvL in experimental haploidentical bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* (2016) 174:102–16. doi: 10.1111/bjh.14034
59. Shyu E, Seth A, Vogel P, Sommers M, Ong T, Pillai AB. Bidirectional immune tolerance in nonmyeloablative MHC-mismatched BMT for murine beta-thalassemia. *Blood.* (2017) 129:3017–30. doi: 10.1182/blood-2016-03-704387
60. Kittang AO, Kordasti S, Sand KE, Costantini B, Kramer AM, Perezabellan P, et al. Expansion of myeloid derived suppressor cells correlates with number of T regulatory cells and disease progression in myelodysplastic syndrome. *Oncotarget.* (2016) 5:e1062208. doi: 10.1080/2162402X.2015.1062208
61. Bizymi N, Bjelica S, Kittang AO, Mojsilovic S, Velegraki M, Pontikoglou C, et al. Myeloid-derived suppressor cells in hematologic diseases: promising biomarkers and treatment targets. *HemaSphere.* (2019) 3:e168. doi: 10.1097/HS9.0000000000000168
62. Tumino N, Besi F, Di Pace AL, Mariotti FR, Merli P, Li Pira G, et al. PMN-MDSC are a new target to rescue graft-versus-leukemia activity of NK cells in haplo-HSC transplantation. *Leukemia.* (2020) 34:932–7. doi: 10.1038/s41375-019-0585-7
63. Schneidawind C, Jahnke S, Schober-Melms I, Schumm M, Handgretinger R, Faul C, et al. G-CSF administration prior to donor lymphocyte apheresis promotes anti-leukaemic effects in allogeneic HCT patients. *Br J Haematol.* (2019) 186:60–71. doi: 10.1111/bjh.15881
64. Yin J, Wang C, Huang M, Mao X, Zhou J, Zhang Y. Circulating CD14(+) HLA-DR(-/low) myeloid-derived suppressor cells in leukemia patients with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: novel clinical potential strategies for the prevention and cellular therapy of graft-versus-host disease. *Cancer Med.* (2016) 5:1654–69. doi: 10.1002/cam4.688
65. Morecki S, Gelfand Y, Yacovlev E, Eizik O, Shabat Y, Slavina S. CpG-induced myeloid CD11b+Gr-1+ cells efficiently suppress T cell-mediated immunoreactivity and graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* (2008) 14:973–84. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.06.018
66. Messmann JJ, Reisser T, Leithäuser F, Lutz MB, Debatin KM, Strauss G. *In vitro*-generated MDSCs prevent murine GVHD by inducing type 2 T cells without disabling antitumor cytotoxicity. *Blood.* (2015) 126:1138–48. doi: 10.1182/blood-2015-01-624163
67. Park MY, Lim BG, Kim SY, Sohn HJ, Kim S, Kim TG. GM-CSF promotes the expansion and differentiation of cord blood myeloid-derived suppressor cells, which attenuate xenogeneic graft-versus-host disease. *Front Immunol.* (2019) 10:183. doi: 10.3389/fimmu.2019.00183
68. Casacuberta-Serra S, Pares M, Golbano A, Coves E, Espejo C, Barquero J. Myeloid-derived suppressor cells can be efficiently generated from human hematopoietic progenitors and peripheral blood monocytes. *Immunology Cell Biol.* (2017) 95:538–48. doi: 10.1038/icb.2017.4
69. Jamkashvili N, Trad M, Gautheron A, Samson M, Lamartine B, Bonnefoy F, et al. Human monocyte-derived suppressor cells control graft-versus-host disease by inducing regulatory forkhead box protein 3-positive CD8+ T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol.* (2015) 135:1614–24 e4. doi: 10.1016/j.jaci.2014.12.1868
70. Lim JY, Lee YK, Lee SE, Ju JM, Eom KS, Kim YJ, et al. MyD88 in donor bone marrow cells is critical for protection from acute intestinal graft-versus-host disease. *Mucosal Immunol.* (2016) 9:730–43. doi: 10.1038/mi.2015.96
71. Lee SE, Lim JY, Ryu DB, Kim TW, Park SS, Jeon YW, et al. Alteration of the intestinal microbiota by broad-spectrum antibiotic use correlates with the occurrence of intestinal graft-versus-host disease. *Biology Blood Marrow Transplant.* (2019) 25:1933–43. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.06.001
72. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol.* (2006) 176:3877–83. doi: 10.4049/jimmunol.176.7.3877
73. Wilhelm K, Ganesan J, Muller T, Durr C, Grimm M, Beilhack A, et al. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med.* (2010) 16:1434–8. doi: 10.1038/nm.2242
74. Jankovic D, Ganesan J, Bscheider M, Stickle N, Weber FC, Guarda G, et al. The Nlrp3 inflammasome regulates acute graft-versus-host disease. *J Exp Med.* (2013) 210:1899–910. doi: 10.1084/jem.20130084
75. Lim JY, Lee YK, Lee SE, Ju JM, Park G, Choi EY, et al. Attenuation of hepatic graft-versus-host disease in allogeneic recipients of MyD88-deficient donor bone marrow. *Immune Netw.* (2015) 15:125–34. doi: 10.4110/in.2015.15.3.125
76. Koehn BH, Saha A, McDonald-Hyman C, Loschi M, Thangavelu G, Ma L, et al. Danger-associated extracellular ATP counters MDSC therapeutic efficacy in acute GVHD. *Blood.* (2019) 134:1670–82. doi: 10.1182/blood.2019001950
77. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* (2011) 469:221–5. doi: 10.1038/nature09663
78. Sarhan D, Wang J, Sunil Arvindam U, Hallstrom C, Verneris MR, Grzywacz B, et al. Mesenchymal stromal cells shape the MDS microenvironment by inducing suppressive monocytes that dampen NK cell function. *JCI Insight.* (2020) 5:e130155. doi: 10.1172/jci.insight.130155
79. Ohl K, Fragoulis A, Klemm P, Baumeister J, Klock W, Verjans E, et al. Nr2f1 is a central regulator of metabolic reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in steady state and sepsis. *Front Immunol.* (2018) 9:1552. doi: 10.3389/fimmu.2018.01552
80. Bader P, Kuci Z, Bakhtiar S, Basu O, Bug G, Dennis M, et al. Effective treatment of steroid and therapy-refractory acute graft-versus-host disease with a novel mesenchymal stromal cell product (MSC-FFN). *Bone Marrow Transplant.* (2018) 53:852–62. doi: 10.1038/s41409-018-0102-z

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 D'Aveni, Notarantonio, Bertrand, Boulangé, Pochon and Rubio. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 2, article soumis : Highly immunosuppressive myeloid cells correlate with early relapse after allogeneic stem cell transplantation

1 **Highly immunosuppressive myeloid cells correlate with early relapse after allogeneic stem cell**  
2 **transplantation**

3 Anne-Béatrice Notarantonio<sup>1,2\*</sup>, Allan Bertrand<sup>1\*</sup>, Romain Piucco<sup>3</sup>, Ghislain Fievet<sup>3</sup>, Hervé Sartelet<sup>4</sup>,  
4 Laura Boulangé<sup>1</sup>, Natalia de Isla<sup>1</sup>, Marcelo De Carvalho-Bittencourt<sup>1,5</sup>, Sébastien Hergalant<sup>3</sup>, Marie-  
5 Thérèse Rubio<sup>1,2</sup> and Maud D'Aveni<sup>1,2</sup>

6

7 (1) Université de Lorraine, UMR 7365 CNRS, IMoPA, F-54000 Nancy, France

8 (2) Université de Lorraine, CHRU Nancy, Hematology Department, F-54000 Nancy, France

9 (3) Université de Lorraine, Inserm UMR\_S 1256 NGERE, F-54500, Vandœuvre-lès-Nancy, France

10 (4) Université de Lorraine, CHRU Nancy, Anatomopathology Department, F-54000 Nancy, France

11 (5) Université de Lorraine, CHRU Nancy, Immunology Laboratory, F-54000 Nancy, France

12 \*These two authors contributed equally to this work.

13 Corresponding author: [m.daveni-piney@chru-nancy.fr](mailto:m.daveni-piney@chru-nancy.fr)

14

15

16

17 **ABSTRACT**

18 Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is the only curative treatment for  
19 myeloid malignancies. The aim of allo-HSCT is to eradicate malignant clones using immunocompetent  
20 donor cells (graft-versus-leukemia effect, GVL).

21 Between 2019 and 2021, we conducted a monocentric prospective study of 61 consecutive patients  
22 who received allo-HSCT for AML or high-risk MDS. We longitudinally investigated immune cells in bone  
23 marrow and peripheral blood at days +30, +90 and +180 posttransplant. We assessed various  
24 immunoregulatory parameters and the dynamics between myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)  
25 and T cells.

26 Among the 61 patients, 45 did not relapse over the first 24 months, while 16 relapsed during the first  
27 year posttransplant. For all patients, the phenotypic myeloid and T-cell landscape was stable from  
28 months 1 to 6. Comparison with healthy donors revealed a heterogeneous increase in MDSC frequency  
29 and an enriched effector memory T-cell compartment with no specific phenotypic relapse signature.  
30 In relapsed patients, functional analyses revealed that MDSCs from peripheral blood were highly  
31 immunosuppressive from day +30 onward, which was not observed in nonrelapsing patients.  
32 Immunosuppressive MDSCs were exclusively detected in early relapse after allo-HSCT. MDSCs might  
33 serve as an early biomarker of relapse and inform the design of new preventive treatments.

34

35

36

## 37 INTRODUCTION

38 Myeloid malignancies such as acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS)  
39 represent a group of chemoresistant cancers [1,2]. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation  
40 (allo-HSCT) holds promise for long-term disease control by providing graft-versus-leukemia (GVL)  
41 immunity. GVL efficacy largely relies on the ability of donor alloreactive T cells to eliminate residual  
42 tumor cells [3]. Unfortunately, alloreactive T cells can damage normal host tissues, causing graft-  
43 versus-host disease (GVHD). GVHD has been associated with protection from relapse, suggesting a  
44 connection between GVL and an alloimmune mechanism [4].

45 Currently, relapse remains the main cause of death after allo-HSCT [5]. In this context, relapse is  
46 attributed to the loss of the GVL effect and hence the escape of tumor cells from the allogeneic  
47 immune response. Accumulating evidence argues that the upregulation of immune regulatory ligands  
48 on AML blasts is associated with the expression of inhibitory receptors on T cells, such as programmed  
49 cell death protein 1 (PD1) [6]. PD-1 is not the sole predominant marker for leukemia-specific T-cell  
50 exhaustion. In-depth analyses using single-cell RNA sequencing have revealed that T-cell  
51 immunoglobulin and mucin containing protein-3 (Tim3) and lymphocyte activation gene-3 (LAG3) are  
52 overexpressed in exhausted leukemia antigen-specific T cells [7]. The high frequency of exhausted PD-  
53 1<sup>high</sup> TIM3<sup>+</sup> T cells in peripheral blood [8,9] and bone marrow [10] is strongly associated with leukemia  
54 relapse. Exhaustion is associated with impaired effector functions [11], metabolic alterations and a  
55 decrease in the production of effector cytokines, such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  [12]. This immune signature  
56 has been shown to be particularly relevant in patients with HLA-matched related donor (MRD) or HLA-  
57 matched unrelated donor (MUD) transplants, while the profile expression of inhibitory receptors is less  
58 correlated with clinical outcome after haploidentical transplantation. In the haplo-setting,  
59 downregulation of major histocompatibility complex (MHC) class II on leukemic cells has been reported  
60 to be the main mechanism of immune escape [13,14]. Preclinical studies have identified PD-1 as the  
61 dominant inhibitory checkpoint molecule involved since blockade of Tim-3, TIGIT and LAG3 fails to  
62 enhance the GVL effect [15]. In clinical trials, anti-PD-1 treatments after allo-HSCT are associated with  
63 the induction of severe alloimmunity [16], suggesting that the PD-1 pathway stimulated by the relapse  
64 microenvironment is a master regulator of immune tolerance. Therefore, developing immune  
65 checkpoint inhibitor therapies that increase GVL activity without enhancing GVHD remains an elusive  
66 goal.

67 Another research field is the modulation of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). Indeed, in solid  
68 cancers, tumor cell escape from immune surveillance has been strongly correlated with the presence  
69 of MDSCs in the tumor microenvironment [17]. Although MDSCs are barely detectable in the  
70 peripheral blood of healthy individuals, they have been described in the peripheral blood and bone  
71 marrow of healthy donors mobilized by granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) [18]. MDSCs  
72 represent a heterogeneous cell population defined by flow cytometry as Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>low</sup> CD33<sup>high</sup>  
73 CD11b<sup>+</sup> cells. Monocytic MDSCs (M-MDSCs) are CD14<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup>, granulocytic MDSCs (G-MDSCs) are  
74 CD15<sup>+</sup> but CD14<sup>-</sup>, and early-stage or promyelocytic MDSCs (called e- or P-MDSCs) are CD14<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>.  
75 Their involvement after allo-HSCT is still debated [19]. MDSCs are principally characterized by their  
76 ability to suppress T-cell proliferation and function through a variety of mechanisms, allowing tumor  
77 cells to escape attack from the immune system. Biochemical features that clearly differentiate MDSCs  
78 from their control counterparts include high arginase and inducible nitric oxide synthase expression  
79 and activity and high and persistent levels of reactive oxygen species (ROS)[20,21]. They are suspected  
80 to be involved in relapse after allo-HSCT, with a few prospective studies having reported a correlation  
81 between higher M-MDSC frequencies in patients in the 30 days following allo-HSCT and a higher

82 probability of relapse [22,23]. Other studies have suggested *in vitro* that MDSCs might suppress donor  
83 T cell proliferation and Th1 differentiation and promoted Treg development [24,25].

84 In the present study, we investigated MDSCs, early T-cell differentiation and inhibitory receptor  
85 expression in a longitudinal setup after allo-HSCT in 61 patients allografted for AML or high-risk MDS.  
86 Our main goal was to test the hypothesis of early immune escape to the GVL effect in myeloid  
87 malignancies. Each patient's immune landscape was explored during the first 6 months  
88 posttransplantation to identify a specific immune signature of relapse. To reduce confounding biases,  
89 we focused on patients with myeloid malignancies transplanted with peripheral blood stem cells  
90 (PBSCs) from an HLA-matched donor (MRD or MUD) with the same conditioning regimen (fludarabine  
91 and busulfan) and similar GVHD prophylaxis treatment (anti-T-lymphocyte globulin, ciclosporin A +/-  
92 mycophenolate mofetil). Interestingly, the myeloid subset that corresponded to the MDSC definition  
93 based mainly on immunophenotype characterization had variable immunosuppressive properties in  
94 the context of allo-HSCT, probably due to the microenvironment.

95

## 96 MATERIAL AND METHODS

97 *Study design and data collection*

98 This study was approved by an ethics committee (CPP OUEST II le 05/02/2019) and was identified as  
99 clinical trial NCT03357172 (“REAL-GREFFE”). All the patients prospectively included in this study signed  
100 an informed consent form. Between 2019 and 2021, we considered 61 leukemic and MDS patients  
101 who underwent a first allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (**Figure S1A**).

102 The inclusion criteria were as follows: age  $\geq 18$  years and allo-HSCT with an HLA-matched related donor  
103 (MRD) or unrelated donor (MUD). Conditioning regimens consisted of fludarabine (total dose 120–150  
104 mg/m<sup>2</sup>) combined with intravenous (iv) Bu (3.2 mg/kg daily) for 2, 3 or 4 days (maximal total dose 12.8  
105 mg/kg). The hematopoietic stem cell source was peripheral blood stem cells (PBSCs) mobilized by G-  
106 CSF. For all patients, *in vivo* T-cell depletion was performed with anti-T-lymphocyte globulin (ATLG, 30  
107 mg/kg for MUD and 15 mg/kg for MRD transplants). Posttransplantation GVHD prophylaxis included  
108 administration of cyclosporin A (or tacrolimus) alone starting on day -1 for MRD transplants or  
109 associated with mycophenolate mofetil starting on day +1 with RIC or a short course of methotrexate  
110 (15 mg/m<sup>2</sup> on day +1 and 10 mg/m<sup>2</sup> on days +3 and +6) for MUD transplants. MDS diagnosis was  
111 defined according to the 2016 World Health Organization (WHO) classification; high-risk MDS was  
112 defined by the classical International Prognostic Scoring System (IPSS) [26] at diagnosis ( $\geq 1.5$ )  
113 regardless of the revised IPSS (R-IPSS)[27]; only AML patients with criteria for allo-HSCT according to  
114 ELN 2017 were included [28].

115 The exclusion criteria were patients who received allo-HSCT from an alternative donor (HLA-  
116 mismatched donor, haploidentical donor, or umbilical cord blood). Patients with secondary AML/MDS  
117 in the 5 years following the treatment of a solid tumor and patients under treatment for a serious  
118 infection before transplantation (including mycobacterial infection, aspergillosis or mucormycosis)  
119 were also excluded.

120 *MDSC isolation*

121 Peripheral blood samples (10 mL in an ethylenediamine tetraacetic acid -EDTA- tube) and bone marrow  
122 samples (3 mL in an EDTA tube) from recipients were collected at days +30, +90, and +180 after  
123 transplantation (**Figure S1A**). MDSCs were purified from the Ficoll-purified peripheral blood  
124 mononuclear cell (PBMC) fraction by negative selection using an HLA-DR depletion kit (Miltenyi Biotec,  
125 Bergisch Gladbach, Germany) and thereafter a CD33-positive selection kit (Miltenyi Biotec) as  
126 previously described [29].

127 *Flow cytometry*

128 Peripheral blood and bone marrow cells from recipients were stained with appropriately labeled  
129 monoclonal antibodies (mAbs) against CD34 (Clone 651, Sony), CD11b (Clone LM2/1, Invitrogen), CD33  
130 (Clone WM-53, Invitrogen), CD14 (Clone M5E2, BD Biosciences), CD15 (Clone H198, Invitrogen), HLA-  
131 DR (Clone I243, Sony), PD-L1 (Clone 29E2A3, Sony) and lineage markers CD3 (Clone HIT3a, Sony), CD19  
132 (Clone 4G7, Sony) for the MDSC panel and against CD3 (Clone UCHT1, BD Biosciences), CD19 (Clone  
133 S/25C1, Sony), CD4 (Clone SK3, BD Biosciences), CD8 (Clone SK1, BD Biosciences), CD197 (Clone  
134 G043H7, Sony), CD95 (Clone DX2 BD Biosciences), CD45RA (Clone 5H9, BD Biosciences), LAG-3 (Clone  
135 7H2C65, Sony), TIM-3 (Clone F38-2E2, Sony), and PD-1 (Clone EH12.2H7, Sony) for the T-cell panel.  
136 Samples were analyzed on a Gallios cytometer (BD Biosciences), and cell events were further processed  
137 using Kaluza 2.1 software. Among the PBMCs, we analyzed MDSCs by focusing on lineage and HLA-DR-  
138 negative cells and then gating on double-positive CD33<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> cells in supervised and unsupervised  
139 strategies (**Figures S1B and S1C**). We further investigated T-cell subset frequencies (TN, naïve T cells

140 CD3+ CD45RA+ CCR7+/TCM, central memory T cells CD3+ CD45RA- CCR7+/TEM, effector memory T  
 141 cells CD3+ CD45RA- CCR7-/TEMRA, terminal effector T cells CD3+ CD45RA+ CCR7-) on CD4+, CD8+,  
 142 double-positive (DP) CD4+ CD8+ and double-negative (DN) CD4- and CD8- T cells and their  
 143 differentiation for a total of 16 T-cell subsets (Figure S2). We named the subpopulations as follows:  
 144 1= CD4+ naïve T cells ( $T_N$ , CD3+CD4+CD45RA+CCR7+),  
 145 2= CD4+ central memory T cells ( $T_{CM}$ , CD3+CD4+CD45RA- CCR7+),  
 146 3= CD4+ effector memory ( $T_{EM}$ , CD3+ CD4+ CD45RA-CCR7-),  
 147 4= CD4+ terminal effectors ( $T_{EMRA}$  CD3+ CD4+ CD45RA+ CCR7-),  
 148 5= CD8+ naïve T cells ( $T_N$ , CD3+CD8+CD45RA+CCR7+),  
 149 6= CD8+ central memory T cells ( $T_{CM}$ , CD3+CD8+CD45RA- CCR7+),  
 150 7= CD8+ effector memory ( $T_{EM}$ , CD3+ CD8+ CD45RA-CCR7-),  
 151 8= CD8+ terminal effectors ( $T_{EMRA}$  CD3+ CD8+ CD45RA+ CCR7-),  
 152 9= CD4-CD8- naïve T cells ( $T_N$ , CD3+CD4-CD8-CD45RA+CCR7+),  
 153 10= CD4-CD8- central memory T cells ( $T_{CM}$ , CD3+CD4-CD8-CD45RA- CCR7+),  
 154 11= CD4-CD8- effector memory ( $T_{EM}$  CD3+ CD4-CD8-CD45RA-CCR7-),  
 155 12= CD4-CD8- terminal effectors ( $T_{EMRA}$  CD3+ CD4-CD8-CD45RA+ CCR7-),  
 156 13= CD4+CD8+ naïve T cells ( $T_N$ , CD3+CD4+CD8+CD45RA+CCR7+)  
 157 14= CD4+CD8+ central memory T cells ( $T_{CM}$ , CD3+CD4+CD8+CD45RA- CCR7+),  
 158 15= CD4+CD8+ effector memory ( $T_{EM}$  CD3+ CD4+CD8+CD8-CD45RA-CCR7-),  
 159 16= CD4+CD8+ terminal effectors ( $T_{EMRA}$  CD3+ CD4+CD8+CD45RA+ CCR7-).  
 160

#### 161 *Reactive oxygen species*

162 MDSCs were incubated with the CM-H2DCFDA probe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).  
 163 CM-H2DCFDA passively diffuses into cells, where its acetate groups are cleaved by intracellular  
 164 esterases. The resulting oxidation in the presence of ROS emits fluorescence that can be analyzed by  
 165 flow cytometry (Gallios Beckman). Cells were incubated in custom RPMI 1640 with 10% fetal calf serum  
 166 and 100 U/mL penicillin–streptomycin (Life Technologies) with 5  $\mu$ M of the CM-H2DCFDA probe.

#### 167 *Proliferation assays*

168 T cells were purified by negative selection using a pan T-cell depletion kit (Miltenyi Biotec). Purity was  
 169 routinely above 98% (not shown). T-cell activation ( $5 \times 10^4$  cells/well) was performed by nonspecific  
 170 TCR activation in a 96-well culture plate coated with 10  $\mu$ g/mL anti-CD3 mAb (Biotechne) and 10  $\mu$ g/mL  
 171 anti-CD28 mAb (Biotechne) for 2 hours before the addition of T cells. MDSCs were plated at  $5 \times 10^4$ /well  
 172 (1:1 ratio). Cells were incubated in custom RPMI 1640 with 10% fetal calf serum and 100 U/mL  
 173 penicillin–streptomycin (Life Technologies). T cells were stained with 5  $\mu$ M carboxyfluorescein  
 174 succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen). T-cell proliferation was analyzed after 5 days of coculture and  
 175 expressed as the ratio of the number of activated T cells obtained in the presence of MDSCs to the  
 176 number of T cells activated without MDSCs. Thus, an immunosuppressive assay was characterized by  
 177 a ratio under the threshold value of 1.

#### 178 *Apoptosis assays*

179 After activation alone or coculture with MDSCs, T cells were stained with 7-AAD (n°2702020, Sony),  
 180 Annexin V (n°3804725, Sony) and CD4 (Clone RPA-T4, Sony) in 100  $\mu$ L of Annexin V binding buffer  
 181 (n°2711005, Sony) for 15 minutes. T-cell apoptosis was analyzed after 5 days of coculture.

#### 182 *Mice*

183 NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) mice were purchased from Charles River (L'Arbresle, France).  
 184 All mice were bred and housed in a specific pathogen-free facility in microisolator cages and used at 8  
 185 to 12 weeks of age according to protocols approved by the local ethics committee (Referral n°26194).

186 NSG mice were irradiated using 2 Gy total body irradiation by X-ray on day -1 followed by intravenous  
187 infusion in the caudal vein of  $5 \times 10^6$  human PBMCs. MDSCs were sorted from patient peripheral blood  
188 between day +45 and +60 posttransplantation when the T-cell proliferation assay on day 30 was  
189 performed and distinguished the “IS” group (immunosuppressive MDSCs, as the T-cell proliferation  
190 ratio was  $<1$ ) versus the “non-IS” group (non-immunosuppressive MDSCs, as the T-cell proliferation  
191 ratio was  $>1$ ). The control group was transplanted with only  $5 \times 10^6$  human PBMCs per mouse on day 0,  
192 the other groups were co-transplanted with  $1 \times 10^6$  MDSCs per mouse on day 0. For all recipient mice,  
193 PBMCs were harvested from the same donor. Mice were monitored for survival and weight twice a  
194 week. Tissues from GVHD target organs (liver, intestine and skin) were embedded in paraffin,  
195 sectioned, and stained with hematoxylin, eosin and safran. Photographs were taken using 200x or 400x  
196 magnification with an optical Carl-Zeiss AXIO Imager A1m microscope (Carl-Zeiss). Blinded  
197 histopathological assessments of GVHD were performed. In particular, liver damage was scored  
198 according to the severity of portal infiltrate, biliary damage, centrilobular vein endotheliitis and  
199 apoptosis. Histopathological analysis was performed as previously described [30]: 0, absent; 1,  
200 minimal; 2, mild and diffuse; 3, moderate; and 4, severe.

201

#### 202 *Cytokine analyses*

203 Proinflammatory (alarmins S100A8/S100A9, interleukin (IL)-1 $\alpha$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ ,  
204 interferon (IFN)- $\gamma$ , IL1-RA, IL-12p70, C-X-C motif ligand 8 (CX-CL8), IL-6, IL-4, IL-2, IL-1 $\beta$ , high-mobility  
205 group box 1, HMGB1) versus anti-inflammatory (hepatocyte growth factor (HGF), IL-10, CXCL10,  
206 indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), latent associated peptide (LAP, reflecting transforming growth  
207 factor beta, TGF $\beta$ )) proteins were explored in proliferation assay supernatants. This panel was defined  
208 according to putative mechanisms involved in MDSC immunosuppressive properties.

209 Another panel was designed for peripheral blood and bone marrow sera, including proinflammatory  
210 proteins such as S100A8/S100A9, interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL1-RA, and IL-1 $\beta$  and cytokines involved in T-cell  
211 development and maintenance or skewing the T-cell repertoire (interferon (IFN)- $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ , LAP (TGF $\beta$ ), IL-  
212 10, IL-4, IL-2, and IL-7). Cytokines were analyzed using the ProcartaPlex Immunoassay (Thermo Fisher  
213 Scientific) on a Luminex 200 analyzer (Luminex, CHRU Nancy) according to the manufacturer’s  
214 instructions.

215

#### 216 *Statistical analyses*

217 Patient and disease characteristics were reported using descriptive statistics. Categorical variables are  
218 described as percentages, while continuous variables are reported as the mean  $\pm$  standard deviation  
219 (SD) or the median interquartile range (IQR), depending on their distribution. The comparative analysis  
220 of patient characteristics before transplantation between conditioning regimens was performed using  
221 the Chi2 test or Fisher’s exact test for categorical variables. Student’s t test or the Wilcoxon test was  
222 used for continuous variables. Relapse was defined by standard hematological criteria. Acute [31] and  
223 chronic GVHD [32] were diagnosed and graded using established criteria (refs ici). Cell events were  
224 acquired on the Gallios Cytometer. Nonparametric tests, such as the Mann–Whitney, Wilcoxon and  
225 log-rank tests, were performed with GraphPad Prism 8 software). Additional flow cytometry statistics  
226 were performed using FlowJo (v10.6) and the Cytobank platform (Beckman Coulter). Other statistical  
227 and main bioinformatics analyses were performed under R (v4.1 and later).

#### 228 *Downstream flow cytometry data analyses*

229 After cell event acquisition, flow cytometry data were first gated manually with FlowJo as described  
230 above. They were also processed in an unsupervised manner according to the following bioinformatics  
231 pipeline: 1) Data were compensated according to the parameters indicated by the cytometer and then  
232 subjected to stringent quality control. 2) First, they were time gated. Biased, disrupted and outlier  
233 flows corresponding to entire segments of time were discarded. This step was visually controlled to

234 ensure that the resulting flows were linear and interpretable. Second, FlowClean (v1.36) [33] was used  
235 to flag and report events with other acquisition issues. 3) The remaining cell events were normalized  
236 channel-by-channel and whole-cohort-wise using GaussNorm under flowStats (v4.10) [34], leading to  
237 multiple alignments of high-density regions in each channel. The min peaks parameter was adjusted  
238 according to the number of density peaks for each channel. 4) Dead cells and singlets were removed  
239 with appropriate preliminary gating. 5) Depending on the dataset (MDSCs or T cells), semiautomatic  
240 gating strategies were developed from multiple tools available in the R packages openCyto  
241 (v2.10.1)[35] and flowWorkspace (v4.10.1, via Bioconductor). Briefly, gating was mainly based on  
242 successions of rectangular gates defined automatically by best-fit parameters. After visual inspection,  
243 each gating was finely tuned and manually corrected if needed. 6) Pregated T-cell (CD3+) and MDSC  
244 (HLA-DR-<sub>LIN</sub>-) subpopulations were then analyzed using unsupervised algorithms such as t-SNE  
245 (v0.16) [36] and hierarchical clustering, embedding comparisons of marker expression between  
246 biological groups. We aimed to classify samples according to their relative percentage for each T-cell  
247 subpopulation.

248 Clustering was performed with median-centered data and Pearson's correlation distance as  
249 dissimilarity metrics. Heatmaps were rendered with ComplexHeatmap (v2.14) and main graphics  
250 under ggplot2 (v3.4). All R (v4.2.2) packages were acquired and used via BioConductor (v3.16).  
251 Correlation heatmaps were rendered with corplot (v0.92) on gated data counts.

252

253 **RESULTS**

254 *Patient cohort*

255 A total of 61 patients with high-risk MDS (n=15) and AML (n=46) were included in this study. Detailed  
 256 characteristics of the patients are summarized in **Table 1**. We distinguished two groups: the no-relapse  
 257 group or “NR group” (n=45), in which no relapse was observed within 24 months after allo-HSCT, and  
 258 the relapse group or “R group” (n=16), in which patients exhibited relapse within 12 months following  
 259 allo-HSCT. The observed median relapse time was 90 days from allo-HSCT (range 21-392). The recipient  
 260 median age at transplantation was 59 years (range 19-71) in the entire cohort, with no significant  
 261 difference between the two groups (Mann–Whitney, p=0.59). For AML patients, there was no  
 262 significant difference between the two groups regarding the disease status (p=0.23) and the  
 263 cytogenetic prognosis (Chi2, p=0.46). For MDS patients, IPSS, cytogenetic risk according to R-IPSS and  
 264 the disease status are described in Table 1. No differences were found between the two groups for  
 265 CMV risk.

266 *Immune landscape during the first 6 months after allo-HSCT*

267 We first aimed to analyze longitudinal changes in peripheral immune cell subsets following allo-HSCT  
 268 in the NR and R groups on day +30, day +90 and day +180 after transplantation. We observed that a  
 269 very small subset of myeloid cells corresponded to the MDSC phenotype definition (Supplementary  
 270 Figure 1 C). The three MDSC subsets (monocytic, granulocytic, and early-stage MDSCs) were studied  
 271 based on CD14 and CD15 cell membrane expression. MDSCs were similarly observed in the NR and R  
 272 groups and were predominantly represented by the granulocytic subset (**Figure 1A**). As previously  
 273 described [25], in comparison with healthy donors, the percentages and numbers of MDSCs among  
 274 circulating CD45+ leukocytes were heterogeneously increased within 6 months after allo-HSCT (**Figure**  
 275 **1B**). We concomitantly investigated whether peripheral blood T-cell differentiation was correlated  
 276 with the occurrence of early relapse. In our cohort, we did not identify a specific pattern in patients  
 277 with early relapse (**Figure 1C**). Hierarchical clustering of the T-cell compartment was performed on  
 278 relative abundances for each gated subpopulation. As previously described [37], T-cell differentiation  
 279 was largely skewed toward effector memory T cells (T<sub>EM</sub> and T<sub>EMRA</sub>). On the resulting heatmap, no  
 280 specific T-cell differentiation pattern was associated with relapse (**Figure 1D**).

281

282 *Detection of highly immunosuppressive MDSCs circulating on day +30 posttransplantation was*  
 283 *correlated with early relapse*

284 We then evaluated MDSC immunosuppressive properties by analyzing activated T-cell (from donor  
 285 PBSCs or from HDs) proliferation in coculture with MDSCs. Initial experiments exploring MDSC  
 286 immunosuppressive properties were performed using a CD3/CD28 microbead-based assay. We  
 287 observed significant CD4 and CD8 inhibition of T-cell proliferation by MDSCs (**Figure 2A**). However,  
 288 during coculture, visual examination suggested probable MDSC sequestration of CD3/CD28  
 289 microbeads, as previously demonstrated with murine MDSCs [38]. To avoid this sequestration, we  
 290 therefore consistently evaluated MDSC immunosuppressive properties in a plate-bound anti-CD3/28  
 291 T-cell stimulation assay. In contrast with the significant T-cell suppression in the CD3/CD28 microbead  
 292 assay, we did not observe suppression of CD4 or CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation (T-cell proliferation ratio > 1)  
 293 in the presence of MDSCs in the NR group at 1, 3 and 6 months after allo-HSCT. Conversely, MDSCs  
 294 sorted from the R group exhibited an immunosuppressive effect with a T-cell proliferation ratio of <1  
 295 when MDSCs were sorted from the recipient peripheral blood after day +30 (**Figure 2B**). Of note, the  
 296 reduction in the number of proliferating T cells was not associated with reduced proportions of

297 proliferating T cells, which were similar in T cells activated alone and T cells cocultured with MDSCs  
298 from either the NR or R group, suggesting that MDSCs of the R group might have acquired cytotoxic  
299 properties (**Figure 2C**). To confirm this hypothesis, we assessed the % of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells double  
300 positive for Annexin V and 7AAD on activated T cells alone or cocultured with “non-IS” and “IS” MDSCs.  
301 There were no more apoptotic T cells in coculture between T cells and “IS” MDSCs, which did not allow  
302 us to consider cytotoxic properties in the R group (**Figure 2D**). To evaluate whether the *in vitro* T-cell  
303 suppressive effects of MDSCs could be reproduced *in vivo*, we further assessed sorted MDSCs from the  
304 R and NR groups in a xenogeneic mouse model of GVHD. Briefly, 100% of irradiated NSG mice injected  
305 with 5 x 10<sup>6</sup> human PBMCs (from a healthy volunteer donor) developed lethal GVHD. In these “donor-  
306 derived xenograft” experiments, the coadministration of 1 x 10<sup>6</sup> MDSCs from the R group significantly  
307 improved overall survival (p=0.0281 with Kaplan–Meier survival curves) and reduced weight loss  
308 compared to mice cotransplanted with 1 x 10<sup>6</sup> MDSCs from the NR group and the control group  
309 (p=0.0087 and p=0.05, respectively, on day+42 posttransplantation) (**Figure 2E**). Recipient mice  
310 cotransplanted with MDSCs from the R group had lower GVHD histopathological scores, particularly in  
311 the liver, than the other groups, according to classical criteria (**Figure 2F**).

312

313 *MDSCs from relapsing patients display an activated inflammasome pattern and correlate with*  
314 *exhausted T-cell populations*

315 Following the observation that MDSCs in relapsing patients have unique immunosuppressive  
316 properties, we sought to determine whether such MDSCs could be easily defined according to a  
317 specific immunophenotype. Because aberrant myeloid cells such as MDSCs often exhibit an increased  
318 production of ROS [39], we evaluated basal as well as induced (upon PMA stimulation) ROS levels in  
319 MDSCs. Our data confirmed higher ROS production in M-MDSCs and G-MDSCs in comparison to their  
320 myeloid counterpart (CD33<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>) in the blood and bone marrow. In our experiments, ROS  
321 production was statistically higher in e-MDSCs than in their myeloid counterparts, only in the bone  
322 marrow. Of note, we did not observe a significant difference in ROS levels in MDSCs observed in the R  
323 versus NR groups (**Figure 3A**). We also investigated the intracellular inflammatory release of mature  
324 interleukin-1 β (IL-1 β) linked to NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) activation, as MDSC accumulation  
325 in the bone marrow microenvironment of MDS has been linked to aberrant innate immune activation  
326 and proinflammatory signals in mice [40]. Strikingly, we observed that the percentage of NLRP3<sup>+</sup> IL1β<sup>+</sup>  
327 MDSCs was lower in the NR group than in the R group in e-MDSC and G-MDSC subsets from both  
328 peripheral blood and bone marrow (**Figure 3B**). However, the evaluation of the proinflammatory  
329 (S100A8/S100A9, IL-1α, TNF-α, IFN-γ, IL1-RA, IL-12p70, CXCL8, IL-6, IL-4, IL-2, IL-1β) versus anti-  
330 inflammatory (HGF, IL-10, CXCL10, IDO, LAP (=TGFβ), HMGB1) proteins secreted in the supernatant of  
331 T cells cocultured with MDSCs did not show any significant difference, especially no significant higher  
332 levels of S100A8/S100A9 or TGFβ in coculture with MDSCs from the R group were observed.  
333 Additionally, no specific bone marrow or peripheral blood cytokine pattern was observed in patient  
334 plasma (**Figure 3C**). Finally, because no specific phenotypic MDSC signature was resolved, we  
335 investigated the correlative structure between subpopulations of MDSCs in the R group and circulating  
336 double-positive Tim3<sup>+</sup> LAG3<sup>+</sup> exhausted T cells. We found strong positive correlations between  
337 immunosuppressive MDSCs (defined by a ratio of <1 in the MDSC/T-cell coculture) and exhausted CD8<sup>+</sup>  
338 T cells circulating in the R group (**Figure 3D**).

339

340

341

## 342 DISCUSSION

343

344 Although MDSCs are associated with worse outcomes in hematological malignancies [41,42], their  
345 involvement after allo-HSCT remains a subject of debate. In mouse models, studies have suggested  
346 that MDSCs preserve the GVL effect [43,44]. Only few prospective studies in humans have reported a  
347 significantly higher probability of relapse in patients with higher M-MDSC frequencies in the 30 days  
348 following allo-HSCT [22,23]. In comparison with these studies, the strength of our study is that we  
349 prospectively studied fresh recipient samples, and we focused on a very homogeneous population in  
350 terms of patient characteristics (age, diagnosis) and transplant characteristics (matched related and  
351 unrelated donors, conditioning regimen, GVHD prophylaxis). Our study highlights for the first time that  
352 MDSCs defined only by phenotypic features should be interpreted with caution in the allo-HSCT  
353 context. The accumulation of immature myeloid cells with an MDSC-like phenotype seemed to be  
354 linked to inflammatory hematopoiesis after allo-HSCT. Of note, it has been previously demonstrated  
355 in mice that under inflammatory conditions, MDSCs accumulate and rapidly differentiate away from  
356 immature lineage cells, losing their immunosuppressive properties [45]. Our *in vitro* T-cell proliferation  
357 assay seems robust, as immunosuppressive properties assessed *in vitro* were confirmed *in vivo*.  
358 Moreover, this assay can be easily performed in immunology laboratories as previously described [46].  
359 Our study also underlined that the functional assay based on anti-CD3/CD28 microbeads for  
360 investigating MDSC immunosuppressive properties [24,25] should be avoided, as it artificially blocks  
361 T-cell proliferation by bead phagocytosis from myeloid cells. Consequently, we conclude that both  
362 immunophenotyping and functional assays are needed to clearly identify MDSCs in the context of allo-  
363 HSCT.

364 Our study suggests that multiparametric flow cytometry analysis focused on plasma membrane  
365 markers on T cells and myeloid cells is not sufficient for determining a specific immune signature that  
366 can predict early disease relapse (<12 months). We confirmed a biased T-cell compartment and a  
367 heterogeneous increase in MDSCs in allografted patients in comparison to healthy donors [37]. The T-  
368 cell compartment was biased toward the effector memory ( $T_{EM}$ ) and terminally differentiated ( $T_{EMRA}$ )  
369 phenotype, mirrored by a persistent lower frequency of naïve ( $T_N$ ) and central memory ( $T_{CM}$ ) T cells.  
370 Additionally, among myeloid cells reaching the immunophenotype definition of MDSCs (e.g., Lin<sup>-</sup>, HLA-  
371 DR<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>), we observed all three subsets (monocytic CD14<sup>+</sup>, granulocytic CD15<sup>+</sup> and early-  
372 stage CD14<sup>-</sup> CD15<sup>-</sup>) of circulating MDSCs, mainly represented by the granulocytic subset and regardless  
373 of recipient outcome. To date, no specific plasma membrane markers have been identified to  
374 characterize immunosuppressive MDSCs. Therefore, we decided to investigate intracellular  
375 biochemical features that might differentiate MDSCs from their immature myeloid counterparts. The  
376 level of intracellular ROS evaluated with the CM-H2DCFDA probe was the easiest to explore routinely,  
377 as low frequencies of MDSCs circulated after allo-HSCT. Unfortunately, the level of ROS in the different  
378 myeloid subsets was not correlated with the immunosuppressive properties or with the patient relapse  
379 status. Notably, intracellular investigations demonstrated that immunosuppressive MDSCs had a  
380 specific signature with double expression of NLRP3 and IL-1 $\beta$ , suggesting an activated NLRP3  
381 inflammasome. This MDSC profile observed in the relapse group might be consistent with the MDSC  
382 definition recently proposed in the MDS microenvironment [47]. In fact, it has been well established  
383 that MDSCs accumulate in the bone marrow of MDS patients as a result of S100A8/S100A9  
384 engagement and its high affinity for the sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin (Siglec)-family  
385 receptor CD33. CD33 activation, via its immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, triggers  
386 elaboration of the immunosuppressive cytokines IL-10 and transforming growth factor- $\beta$ . However,  
387 our findings did not unveil the direct effect and the underlying mechanisms by which MDSCs impact T-  
388 cell proliferation. Thus, we can propose that only immunosuppressive MDSCs might induce exhausted  
389 (Tim3<sup>+</sup>/- LAG3) circulating CD8<sup>+</sup> T cells, as we observed a correlation between immunosuppressive  
390 MDSCs and such exhausted T cells. A recent study reported that MDSCs might be involved in CD8<sup>+</sup> T-  
391 cell exhaustion in myeloid malignancies through a TIM3/Gal-9 pathway [48]. In solid tumors, other  
392 studies have revealed that S100A8/A9 leads to CD8<sup>+</sup> T-cell exhaustion, including inhibiting CD8<sup>+</sup> T-cell  
393 glycolysis, proliferation and TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  production, which is dependent on the TLR4/AKT/mTOR

394 pathway. The fact that immunosuppressive MDSCs displayed an activated NLRP3 inflammasome raised  
395 the question of their origin. We can hypothesize that immunosuppressive MDSCs observed early after  
396 transplantation with an activated NLRP3 inflammasome correspond to recipient persisting MDSCs. In  
397 fact, MDSCs have been described as chemo- and radioresistant cells in mice [49]. If recipient MDSCs  
398 from the tumor microenvironment can persist early after transplant, they might fuel donor immune  
399 escape in the first months posttransplant. Unfortunately, as demonstrated in our study, total MDSCs  
400 after allo-HSCT represented a tiny fraction (< 10%) of the total leukocyte population, and their donor  
401 or recipient origin could not be characterized by short tandem repeat analysis through simple PCR  
402 performed on whole blood at our center.

403

404 Finally, MDSCs are one of the most discussed biological entities in immunology [50]. In the context of  
405 allo-HSCT, we propose to distinguish: i) the accumulation of immature myeloid cells with an MDSC-like  
406 phenotype that solely results from alloreactive inflammation and ii) circulating immunosuppressive  
407 MDSCs in a cancer persisting microenvironment (with consequently an early relapse). This definition  
408 is based on two main observations in our study. First, we observed that immunosuppressive MDSCs  
409 have different NLRP3 activation reflecting different microenvironments. Second, higher  
410 immunosuppressive properties were observed when MDSCs were sorted from the peripheral blood of  
411 relapsing recipients.

412

413

#### 414 CONCLUSION

415 This study confirmed a possible correlation with the course of hematological malignancy and a specific  
416 immune signature with immunosuppressive MDSCs. We demonstrated that this signature can be  
417 investigated in a noninvasive manner in peripheral blood. Immunosuppressive MDSCs are only  
418 observed in an early relapse setting and might help in the future for maintenance treatment  
419 posttransplant. Upon improvement, predicting relapse in allo-HSCT patients is a critical step toward  
420 early prophylaxis/maintenance treatment.

421

422

423

#### 424 Acknowledgments

425 This work was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer (LCC) to M.T.R. and M.D., and A.B.N.  
426 received a fellowship from LCC.

427 The authors thank all the patients and their physicians as well as the nurse and technician staff from  
428 Hôpital Brabois, CHRU Nancy, who helped with this study. We thank Huguette Louis from the  
429 cytometry core facility of UMS2008IBSLor (Université de Lorraine-CNRS-INSERM)

430

#### 431 Authorship Contributions

432 Contribution: M.T.R. and M.D. conceived the study, analyzed the data, and wrote the manuscript;  
433 A.B.N., A.B., and L.B. conducted the experiments and analyzed the data; R.P., G.F. and S.H. participated  
434 in collecting the experimental data, performing the methodology, and editing the manuscript; M.T.R.  
435 and M.D. provided patient samples and data; and S.H., M.T.R. and M.D. discussed the results and  
436 edited the manuscript.

437

#### 438 Conflict of interest statement

439 The authors declare no competing financial interests related to this work.

440

441

442 REFERENCES

443

- 444 1. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia:  
445 Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev* 2019;36:70-87.
- 446 2. Zeidan AM, Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes:  
447 Why characterizing the beast is a prerequisite to taming it. *Blood Rev* 2019;34:1-15.
- 448 3. Martin PJ. Reversing CD8+ T-cell exhaustion with DLI. *Blood* 2014;123:1289-1290.
- 449 4. Valcarcel D, Martino R, Caballero D, et al. . Sustained remissions of high-risk acute myeloid  
450 leukemia and myelodysplastic syndrome after reduced-intensity conditioning allogeneic  
451 hematopoietic transplantation: chronic graft-versus-host disease is the strongest factor  
452 improving survival. *J Clin Oncol* 2008;26:577-584.
- 453 5. Michel C, Robin M, Morisset S, et al. . Outcome after allogeneic stem cell transplantation with  
454 haploidentical versus HLA-matched donors in patients with higher-risk MDS. *Bone Marrow  
455 Transplant* 2023;58:534-543.
- 456 6. Toffalori C, Zito L, Gambacorta V, et al. . Immune signature drives leukemia escape and relapse  
457 after hematopoietic cell transplantation. *Nat Med* 2019;25:603-611.
- 458 7. Jain P, Tian X, Cordes S, et al. . Over-expression of PD-1 Does Not Predict Leukemic Relapse  
459 after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019;25:216-222.
- 460 8. Kong Y, Zhang J, Claxton DF, et al. . PD-1(hi)TIM-3(+) T cells associate with and predict leukemia  
461 relapse in AML patients post allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cancer J* 2015;5:e330.
- 462 9. Hutten TJA, Norde WJ, Woestenenk R, et al. . Increased Coexpression of PD-1, TIGIT, and KLRG-  
463 1 on Tumor-Reactive CD8(+) T Cells During Relapse after Allogeneic Stem Cell Transplantation.  
464 *Biol Blood Marrow Transplant* 2018;24:666-677.
- 465 10. Williams P, Basu S, Garcia-Manero G, et al. . The distribution of T-cell subsets and the  
466 expression of immune checkpoint receptors and ligands in patients with newly diagnosed and  
467 relapsed acute myeloid leukemia. *Cancer* 2019;125:1470-1481.
- 468 11. Noviello M, Manfredi F, Ruggiero E, et al. . Bone marrow central memory and memory stem T-  
469 cell exhaustion in AML patients relapsing after HSCT. *Nat Commun* 2019;10:1065.
- 470 12. Uhl FM, Chen S, O'Sullivan D, et al. . Metabolic reprogramming of donor T cells enhances graft-  
471 versus-leukemia effects in mice and humans. *Sci Transl Med* 2020;12.
- 472 13. Christopher MJ, Petti AA, Rettig MP, et al. . Immune Escape of Relapsed AML Cells after  
473 Allogeneic Transplantation. *N Engl J Med* 2018;379:2330-2341.
- 474 14. Vago L, Perna SK, Zanussi M, et al. . Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell  
475 transplantation. *N Engl J Med* 2009;361:478-488.
- 476 15. Zhou M, Sacirbegovic F, Zhao K, Rosenberger S, Shlomchik WD. T cell exhaustion and a failure  
477 in antigen presentation drive resistance to the graft-versus-leukemia effect. *Nat Commun*  
478 2020;11:4227.
- 479 16. Haverkos BM, Abbott D, Hamadani M, et al. . PD-1 blockade for relapsed lymphoma post-  
480 allogeneic hematopoietic cell transplant: high response rate but frequent GVHD. *Blood*  
481 2017;130:221-228.
- 482 17. Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* 2017;5:3-8.
- 483 18. D'Aveni M, Rossignol J, Coman T, et al. . G-CSF mobilizes CD34+ regulatory monocytes that  
484 inhibit graft-versus-host disease. *Sci Transl Med* 2015;7:281ra242.
- 485 19. D'Aveni M, Notarantonio AB, Bertrand A, Boulange L, Pochon C, Rubio MT. Myeloid-Derived  
486 Suppressor Cells in the Context of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front  
487 Immunol* 2020;11:989.
- 488 20. Veglia F, Sanseviero E, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing  
489 myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol* 2021;21:485-498.
- 490 21. Zhou X, Fang D, Liu H, et al. . PMN-MDSCs accumulation induced by CXCL1 promotes CD8(+) T  
491 cells exhaustion in gastric cancer. *Cancer Lett* 2022;532:215598.

- 492 22. Kim TW, Park SS, Lim JY, et al. . Predictive Role of Circulating Immune Cell Subtypes Early after  
493 Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Acute Leukemia. *Int J*  
494 *Stem Cells* 2018;12:73-83.
- 495 23. Lee SE, Lim JY, Kim TW, et al. . Matrix Metalloproteinase-9 in Monocytic Myeloid-Derived  
496 Suppressor Cells Correlate with Early Infections and Clinical Outcomes in Allogeneic  
497 Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018;24:32-42.
- 498 24. Guan Q, Blankstein AR, Anjos K, et al. . Functional Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets  
499 Recover Rapidly after Allogeneic Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Transplantation. *Biol*  
500 *Blood Marrow Transplant* 2015;21:1205-1214.
- 501 25. Mougiakakos D, Jitschin R, von Bahr L, et al. . Immunosuppressive CD14+HLA-DR<sup>low</sup>/neg IDO+  
502 myeloid cells in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.  
503 *Leukemia* 2013;27:377-388.
- 504 26. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. . International scoring system for evaluating prognosis  
505 in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079-2088.
- 506 27. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. . Revised international prognostic scoring system for  
507 myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;120:2454-2465.
- 508 28. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. . Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN  
509 recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129:424-447.
- 510 29. Vendramin A, Gimondi S, Bermema A, et al. . Graft monocytic myeloid-derived suppressor cell  
511 content predicts the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic transplantation of  
512 granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cells. *Biol Blood*  
513 *Marrow Transplant* 2014;20:2049-2055.
- 514 30. Gao Y, Shan W, Gu T, et al. . Daratumumab Prevents Experimental Xenogeneic Graft-Versus-  
515 Host Disease by Skewing Proportions of T Cell Functional Subsets and Inhibiting T Cell  
516 Activation and Migration. *Front Immunol* 2021;12:785774.
- 517 31. Harris AC, Young R, Devine S, et al. . International, Multicenter Standardization of Acute Graft-  
518 versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD  
519 International Consortium. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22:4-10.
- 520 32. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, et al. . National Institutes of Health Consensus Development  
521 Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis  
522 and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21:389-401 e381.
- 523 33. Fletez-Brant K, Spidlen J, Brinkman RR, Roederer M, Chattopadhyay PK. flowClean: Automated  
524 identification and removal of fluorescence anomalies in flow cytometry data. *Cytometry A*  
525 2016;89:461-471.
- 526 34. Hahne F, Khodabakhshi AH, Bashashati A, et al. . Per-channel basis normalization methods for  
527 flow cytometry data. *Cytometry A* 2010;77:121-131.
- 528 35. Finak G, Frelinger J, Jiang W, et al. . OpenCyto: an open source infrastructure for scalable,  
529 robust, reproducible, and automated, end-to-end flow cytometry data analysis. *PLoS Comput*  
530 *Biol* 2014;10:e1003806.
- 531 36. Pezzotti N, Lelieveldt BPF, Van Der Maaten L, Hollt T, Eisemann E, Vilanova A. Approximated  
532 and User Steerable tSNE for Progressive Visual Analytics. *IEEE Trans Vis Comput Graph*  
533 2017;23:1739-1752.
- 534 37. Gournay V, Vallet N, Peux V, et al. . Immune landscape after allo-HSCT: TIGIT- and CD161-  
535 expressing CD4 T cells are associated with subsequent leukemia relapse. *Blood* 2022;140:1305-  
536 1321.
- 537 38. Davis RJ, Silvin C, Allen CT. Avoiding phagocytosis-related artifact in myeloid derived  
538 suppressor cell T-lymphocyte suppression assays. *J Immunol Methods* 2017;440:12-18.
- 539 39. Poschke I, Mougiakakos D, Hansson J, Masucci GV, Kiessling R. Immature immunosuppressive  
540 CD14+HLA-DR<sup>low</sup> cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and  
541 DC-sign. *Cancer Res* 2010;70:4335-4345.
- 542 40. Chen X, Eksioğlu EA, Zhou J, et al. . Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor  
543 cells. *J Clin Invest* 2013;123:4595-4611.

- 544 41. Kittang AO, Kordasti S, Sand KE, et al. . Expansion of myeloid derived suppressor cells correlates  
545 with number of T regulatory cells and disease progression in myelodysplastic syndrome.  
546 Oncoimmunology 2016;5:e1062208.
- 547 42. Bizymi N, Bjelica S, Kittang AO, et al. . Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hematologic  
548 Diseases: Promising Biomarkers and Treatment Targets. Hemasphere 2019;3:e168.
- 549 43. Zhang J, Chen HM, Ma G, et al. . The mechanistic study behind suppression of GVHD while  
550 retaining GVL activities by myeloid-derived suppressor cells. Leukemia 2019;33:2078-2089.
- 551 44. Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, et al. . Bone marrow myeloid-derived suppressor cells  
552 (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism  
553 that is up-regulated by interleukin-13. Blood 2010;116:5738-5747.
- 554 45. Koehn BH, Saha A, McDonald-Hyman C, et al. . Danger-associated extracellular ATP counters  
555 MDSC therapeutic efficacy in acute GVHD. Blood 2019;134:1670-1682.
- 556 46. Yin J, Li L, Wang C, Zhang Y. Increased Galectin-9 expression, a prognostic biomarker of aGVHD,  
557 regulates the immune response through the Galectin-9 induced MDSC pathway after  
558 allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Int Immunopharmacol 2020;88:106929.
- 559 47. Sallman DA, List A. The role of innate immunity in MDS pathogenesis. Hemasphere 2019;3.
- 560 48. Tao J, Han D, Gao S, et al. . CD8(+) T cells exhaustion induced by myeloid-derived suppressor  
561 cells in myelodysplastic syndromes patients might be through TIM3/Gal-9 pathway. J Cell Mol  
562 Med 2020;24:1046-1058.
- 563 49. Sykes M, Eisenthal A, Sachs DH. Mechanism of protection from graft-vs-host disease in murine  
564 mixed allogeneic chimeras. I. Development of a null cell population suppressive of cell-  
565 mediated lympholysis responses and derived from the syngeneic bone marrow component. J  
566 Immunol 1988;140:2903-2911.
- 567 50. Hegde S, Leader AM, Merad M. MDSC: Markers, development, states, and unaddressed  
568 complexity. Immunity 2021;54:875-884.
- 569
- 570
- 571

572 Figure Legends

573 Supplementary Figure 1. Longitudinal analyses of bone marrow and peripheral blood after allogeneic  
574 stem cell transplantation.

575 A. Sixty-one patients with AML/MDS were included in the longitudinal cohort. Blood and bone marrow  
576 were collected on day +30, day +90 and day +180 after transplantation. PBMCs were analyzed by flow  
577 cytometry, and if enough cells were collected, functional assays were performed.

578 B. Hierarchical gating strategy for MDSCs.

579 C. Comparable gating strategies for MDSCs with supervised and unsupervised methods.

580

581 Supplementary Figure 2: T-cell flow cytometry analysis.

582 A. Supervised analyses of T-cell subsets.

583 B. Unsupervised analyses of T-cell subsets.

584 Comparable gating strategies for T cells with supervised and unsupervised methods.

585 First, we distinguished 4 subsets of T cells: simple-positive CD4+, simple-positive CD8+, double-positive  
586 (DP) CD4+ and CD8+ and double-negative (DN) CD4- and CD8- T cells. Second, in each subset, we  
587 observed naïve and memory T cells. According to the hierarchical model of T-cell differentiation, after  
588 antigen encounter, naïve T cells (TN, CD3+CD45RA+CCR7+) differentiate into several functional subsets  
589 concomitantly with their gradual loss of function, including central memory (TCM, CD3+CD45RA-  
590 CCR7+), effector memory (TEM, CD3+ CD45RA-CCR7-), and terminal effectors (TEMRA CD3+ CD45RA+  
591 CCR7-). Memory stem T cells (TSCM, CD3+ CD95+ CD45RA+ CCR7+) are a subset that differentiate  
592 directly from naïve T cells upon TCR engagement and retain the capacity of self-renewal and to  
593 hierarchically differentiate into all other memory T cells.

594

595 Figure 1. MDSC and T-cell landscape during the first 6 months after allo-HSCT.

596 A. Unsupervised analyses of MDSCs circulating in recipient peripheral blood on day +30, day +90 and  
597 day+180. Circulating MDSCs were similarly observed in the NR and R groups. Granulocytic MDSCs are  
598 the main subset among MDSCs.

599 B. Percentage and absolute numbers of MDSC subpopulation values across patients in the “R” group  
600 and patients in the “NR group” compared to healthy donors. The bar indicates the median value, the  
601 box represents the lower and upper quartiles, and the violin plots represent the density. No significant  
602 difference was observed at D30, D90 and M6 among the three groups. P values correspond to Wilcoxon  
603 signed-rank tests. All tests are NS= not significant.

604 For total MDSCs, we observed 0.40% +/- 0.08% in healthy donors; 3.70% +/- 1.92%, 3.36% +/- 1.61%  
605 and 7.11% +/- 4.36% in the “R” group; and 2.44% +/- 0.71%, 4.11% +/- 1.12% and 2.52% +/- 1.74% in  
606 the NR group at D30, D90 and M6, respectively. For M-MDSCs, we observed 0.02% +/- 0.007% in  
607 healthy donors; 0.69% +/- 0.45%, 0.21% +/- 0.10% and 1.46% +/- 1.07% in the “R” group; and 0.34%  
608 +/- 0.12%, 0.47% +/- 0.16% and 0.23% +/- 0.11% in the “NR” group at D30, D90 and M6, respectively.  
609 For G-MDSCs, we observed 0.51% +/- 0.10% in healthy donors; 1.64% +/- 0.91%, 2.73% +/- 1.42% and  
610 5.47% +/- 3.30% in the “R” group; and 1.96% +/- 0.61%, 3.49% +/- 0.95% and 2.13% +/- 1.51% in the  
611 “NR” group at D30, D90 and M6, respectively. For e-MDSCs, we observed 0.001% +/- 0.001% in healthy

612 donors, 1.36% +/- 0.26%, 0.40% +/- 0.25%, and 0.17% +/- 0.12% in the "R" group and 0.13% +/- 0.04%,  
613 0.14% +/- 0.05%, and 0.16% +/- 0.13% in the "NR" group at days 30 and 90 and M6, respectively.

614 For total MDSCs, we observed 3.44 +/- 0.73 MDSCs/ $\mu$ L in circulating blood in healthy donors; 14.71 +/-  
615 5.66, 47.33 +/- 25.70 and 134.1 +/- 94.02/ $\mu$ L in the "R" group at D30, D90 and M6; and 12.42 +/- 4.4,  
616 29.97 +/- 8.05 and 36.02 +/- 28.59 in the "NR" group. For M-MDSCs, we observed 0.15 +/- 0.05/ $\mu$ L in  
617 circulating blood in healthy donors; 2.02 +/- 1.01, 2.18 +/- 1.25 and 19.42 +/- 12.17/ $\mu$ L in circulating  
618 blood in the "R" group; and 2.02 +/- 1.00, 3.45 +/- 1.35 and 2.94 +/- 1.59 in the "NR" group at D30, D90  
619 and M6, respectively. For G-MDSCs, we observed 3.27 +/- 0.72/ $\mu$ L in circulating blood in healthy  
620 donors; 11.83 +/- 5.19, 41.02 +/- 23.82 and 109.4 +/- 78.66 G-MDSC cells/ $\mu$ L in circulating blood in the  
621 "R" group; and 4.59 +/- 0.95, 25.45 +/- 6.68 and 30.58 +/- 24.89 in the "NR" group at D30, D90 and M6,  
622 respectively. For e-MDSCs, we observed 0.01 +/- 0.10/ $\mu$ L in circulating blood in healthy donors; 0.85  
623 +/- 0.35, 4.11 +/- 2.82 and 5.33 +/- 4.34 e-MDSC cells/ $\mu$ L in the "R" group; and 1.00 +/- 0.42, 1.07 +/-  
624 0.46 and 2.50 +/- 2.21 in the "NR" group at D30, D90 and M6, respectively.

625 C. t-Distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) analyses of T cells circulating in recipient  
626 peripheral blood on Day+30, Day+90 and Day+180.

627 The different T-cell subsets are similarly observed in the NR (blue) and R (red) groups. Memory T cells  
628 are the main subset among T-cell subsets. In each group, 5,000 cells from 5 randomly selected patients  
629 were pooled together and then reduced for tSNE representation.

630 D. Hierarchical clustering heatmap of T cells circulating in recipient peripheral blood. PBMCs from 61  
631 AML/MDS patients with (n=16) and without (n=45) documented subsequent tumor relapse were  
632 collected on Day+30, Day+90 and Day+180 after transplantation and analyzed by flow cytometry  
633 according to their differentiation profile. No specific T-cell subpopulations were associated with  
634 relapse or day after transplantation.

635

636 *Figure 2. Immunosuppressive MDSCs circulating on day +30 are observed in early relapse*

637 A. CD3/CD28 microbead-based assay. For early posttransplantation (samples before day+90), T cells  
638 were activated and then cultured alone or with MDSCs at a 1:1 ratio (50 000 T cells:50 000 MDSCs)  
639 sorted from the circulating blood of recipients before day 60 posttransplantation (n=4) . For late  
640 posttransplantation, T cells were activated and then cultured alone or with MDSCs at a 1:1 ratio  
641 (50 000 T cells:50 000 MDSCs) sorted from the circulating blood of recipients after day 90  
642 posttransplantation (n=4). For early post-transplant, the mean number of proliferating CD4+ and CD8+  
643 T cells activated alone (orange) were 129 172 +/- 14 559 and 92 065 +/- 6 945, respectively, *versus*  
644 30 812 +/- 16 727 and 22 049 +/- 12 815 in coculture with MDSCs (green) (\*p=0.0286). For late  
645 posttransplantation (samples after day +90), the mean numbers of proliferating CD4+ and CD8+ cells  
646 activated alone were 100 255 +/- 19 412 and 86 805 +/- 21 707 *versus* 28 138 +/- 8 601 and 19 943 +/-  
647 5 585 in culture with MDSCs (\*p=0.0286).

648 B. Plate-bound anti-CD3 and anti-CD28 assays. The ratio corresponds to the calculation of the number  
649 of proliferating T cells activated in coculture with MDSCs divided by the number of proliferating T cells  
650 activated alone in culture. The ratio was calculated for cocultures performed with MDSCs sorted from  
651 recipient blood or bone marrow on day 30 (D30), day 90 (D90) and 6 months (M6), with a 1 MDSC:1 T-  
652 cell ratio.

653 On D30, the ratio of proliferating CD4+ T cells cultured with MDSCs from recipient blood was 2.74 +/-  
654 0.70 in the NR group (n=13) *versus* 0.53 +/- 0.21 in the R group (n=3) (\*p=0.0143) and 4.76 +/- 1.81 vs.

655 0.67 +/- 0.12 for CD8+ (\*\*p=0.0036). On D30, the ratio of proliferating CD4+ T cells cultured with  
656 MDSCs from recipient bone marrow was 7.24 +/- 2.00 in the NR group (n=10) *versus* 1.22 +/- 0.96 in  
657 the R group (n=5) (\*\*p=0.0080) and 14.09 +/- 4.48 vs. 2.21 +/- 1.32 for CD8+ (\*p=0.0400).

658 On D90, the ratio of proliferating CD4+ T cells cultured with MDSCs from recipient blood was 2.31 +/-  
659 0.39 in the NR group (n=15) *versus* 0.59 +/- 0.22 in the R group (n=3) (\*p=0.0172) and 2.95 +/- 0.62 vs.  
660 0.66 +/- 0.19 for CD8+ (\*\*p=0.0098). On D90, the ratio of proliferating CD4+ T cells cultured with  
661 MDSCs from recipient bone marrow was 2.41 +/- 0.66 in the NR group (n=9) *versus* 1.036 +/- 0.38 in  
662 the R group (n=5) (p=0.1194) and 4.21 +/- 1.55 vs. 1.024 +/- 0.44 for CD8+ (p=0.1194).

663 At M6, the ratio of proliferating CD4+ T cells cultured with MDSCs from recipient blood was 2.38 +/-  
664 0.79 in the NR group (n=16) *versus* 0.27 +/- 0.09 for the relapse group (n=3) (\*p=0.0144) and 3.32 +/-  
665 1.32 vs. 0.35 +/- 0.08 for CD8+ (\*\*p=0.0041). At M6, the ratio of CD4+ cells cultured with MDSCs from  
666 recipient bone marrow was 1.87 +/- 0.97 in the NR group (n=9) *versus* 0.33 +/- 0.17 in the R group  
667 (n=5) (\*p=0.0290) and 2.59 +/- 1.43 vs. 0.43 +/- 0.20 for CD8+ (\*p=0.0120).

668 C. Analysis of T-cell proliferation by flow cytometry. In this example, we observed 162 615 (95.19%)  
669 proliferating CD4+ T cells and 190 511 (98.04%) proliferating CD8+ T cells when T cells were activated  
670 alone. In coculture with MDSCs, we observed 82 404 cells (97.51%) proliferating CD4+ T cells and  
671 101 663 (96.82%) proliferating CD8+ T cells.

672 D. Analysis of T-cell apoptosis by flow cytometry. We evaluated the % of double-positive (Annexin V+  
673 7AAD+) CD4+ and CD8+ T cells after activation alone (green, n=3), after coculture with “non-IS” MDSCs  
674 (blue, n=3) or with “IS” MDSCs (red, n=3). In CD4+ T cells, we observed 14,60% +/- 1,74% apoptotic  
675 cells after activation, vs. 11,41% +/- 0,91% with “non-IS” MDSCs (p=0,2000), vs. 6,36% +/- 0,87% with  
676 “IS” MDSCs (p=0,1000). In CD8+ T cells, we observed 34,39% +/- 1,31% apoptotic cells after activation,  
677 vs. 39,12% +/- 0,25% with “non-IS” MDSCs (p=0,1000), vs. 29,12% +/- 3,37% with “IS” MDSCs  
678 (p=0,4000).

679 E. Median survival in mice receiving PBMCs with MDSCs from the “R” group was not reached by day  
680 60 vs. 35 days for mice injected with PBMCs alone vs. 24 days for mice injected with PBMCs and MDSCs  
681 from the “NR” group (p=0,0281). The data shown represent pooled results from 2 independent  
682 experiments. The results were compared with Kaplan–Meier survival curves. Percent weight variations  
683 were on day +42 post-HSCT: +4.60 +/- 0.64% in mice injected with PBMCs and MDSCs from the “R  
684 group” (n=3) vs. -1.91 +/- 2.93% in mice injected with PBMCs alone (n=7) (p=0.05), vs. -11.08 +/- 4.46%  
685 in mice injected with PBMCs and MDSCs from the “NR” group (n=6) (p=0.0087). Data were compared  
686 using Student’s unpaired t test.

687 F. Representative histological analyses of GVHD target organs in each group. Portal inflammation with  
688 diffuse or nodular infiltration of mononuclear cells and endothelitis was observed in the group with  
689 PBMCs alone and the group with PBMC+ non-IS MDSCs.

690

691 Figure 3. Immunosuppressive MDSCs correlate with CD8+ exhausted T cells.

692 A. ROS production in MDSCs. We measured the mean fluorescence intensity (MFI) of the CM-H2DCFDA  
693 probe in the three MDSC subsets (M-MDSCs, G-MDSCs, e-MDSCs) and the “myeloid counterpart”  
694 CD33+HLA-DR+ in peripheral blood and bone marrow.

695 In peripheral blood, CM-H2DCFDA MFI in the “NR” group (n=25) vs. the “R” group (n=7) was similar in  
696 the 4 myeloid subsets: 243.1 +/- 20.13 vs. 236.5 +/- 46.98 in the M-MDSC subset, 155.7 +/- 16.18 vs.

697 160.1 +/- 40.29 in the G-MDSC subset, 141.2 +/- 28.73 vs. 126.6 +/- 37.31 in the e-MDSC subset and  
698 119.1 +/- 20.82 vs. 99.10 +/- 61.94 in the CD33+ HLA DR+ cells. Of note, the mean CM-H2DCFDA MFI  
699 in M-MDSCs (241.6 +/- 18.41) and G-MDSCs (156.7 +/- 15.07) was significantly higher than that in their  
700 myeloid counterparts (114.3 +/- 21.02, \*\*\*\*p<0.0001 and \*p=0.0301, respectively).

701 In bone marrow, CM-H2DCFDA MFI in the "NR" group (n=13) vs. the "R" group (n=3) was similar in the  
702 4 myeloid subsets: 288.6 +/- 28.67 vs. 217.4 +/- 15.30 in the M-MDSC subset, 240.7 +/- 30.60 vs. 189.8  
703 +/- 59.09 in the G-MDSC subset, 175.6 +/- 20.18 vs. 160.5 +/- 14.63 in the e-MDSC subset, and 127.1  
704 +/- 24.78 vs. 98.17 +/- 22.68 in the myeloid counterpart. Of note, the mean CM-H2DCFDA MFI in M-  
705 MDSCs (275.3 +/- 24.32), G-MDSCs (231.2 +/- 26.88) and e-MDSCs (172.7 +/- 16.51) was significantly  
706 higher than that in their myeloid counterparts (121.3 +/- 20.25) (\*\*\*\*p<0.0001, \*\*p=0.0017 and  
707 \*p=0.0192, respectively).

708 B. Percentage of myeloid cells with activated inflammasomes. We evaluated the % of double-positive  
709 (NLRP3+ and IL1β+) cells in three MDSC subsets (M-MDSC, G-MDSC, e-MDSC) and the myeloid  
710 counterpart (CD33+ HLA-DR+) in peripheral blood and in bone marrow.

711 In peripheral blood, the percentage of double-positive (NLRP3 and IL1β) cells in each of the four  
712 myeloid subsets was compared in the "NR" group (n=26) versus the "R" group (n=4). This percentage  
713 was significantly different in the e-MDSC subset (7.55% +/- 2.07% vs. 14.25% +/- 1.85%, respectively,  
714 \*p=0.0315). In M-MDSCs, G-MDSCs and their myeloid counterparts, the percentages were  
715 comparable, with 7.22% +/- 2.11% vs. 6.05% +/- 3.03%, 15.91% +/- 3.51% vs. 17.42% +/- 9.17% and  
716 14.28% +/- 3.75% vs. 9.87% +/- 6.86%, respectively.

717 In bone marrow, the percentage of double-positive (NLRP3 and IL1β) cells in each of the four myeloid  
718 subsets was compared in the "NR" group (n=15) versus the "R" group (n=4). This percentage was  
719 significantly different in the G-MDSC and e-MDSC subsets (13.43% +/- 3.79% vs. 39.22% +/- 9.58%,  
720 \*p=0.0139 and 15.47% +/- 4.35% vs. 44.32% +/- 7.63%, \*p=0.0139, respectively). There was also a  
721 trend in M-MDSCs (9.09% +/- 3.87% vs. 20.56% +/- 6.62%, p=0.0769). However, in the CD33+ HLA DR+  
722 subset, there was no significant difference in the NR group vs. the R group, with 6.58% +/- 2.36% vs.  
723 9.79% +/- 3.05% (p=0.2256), respectively.

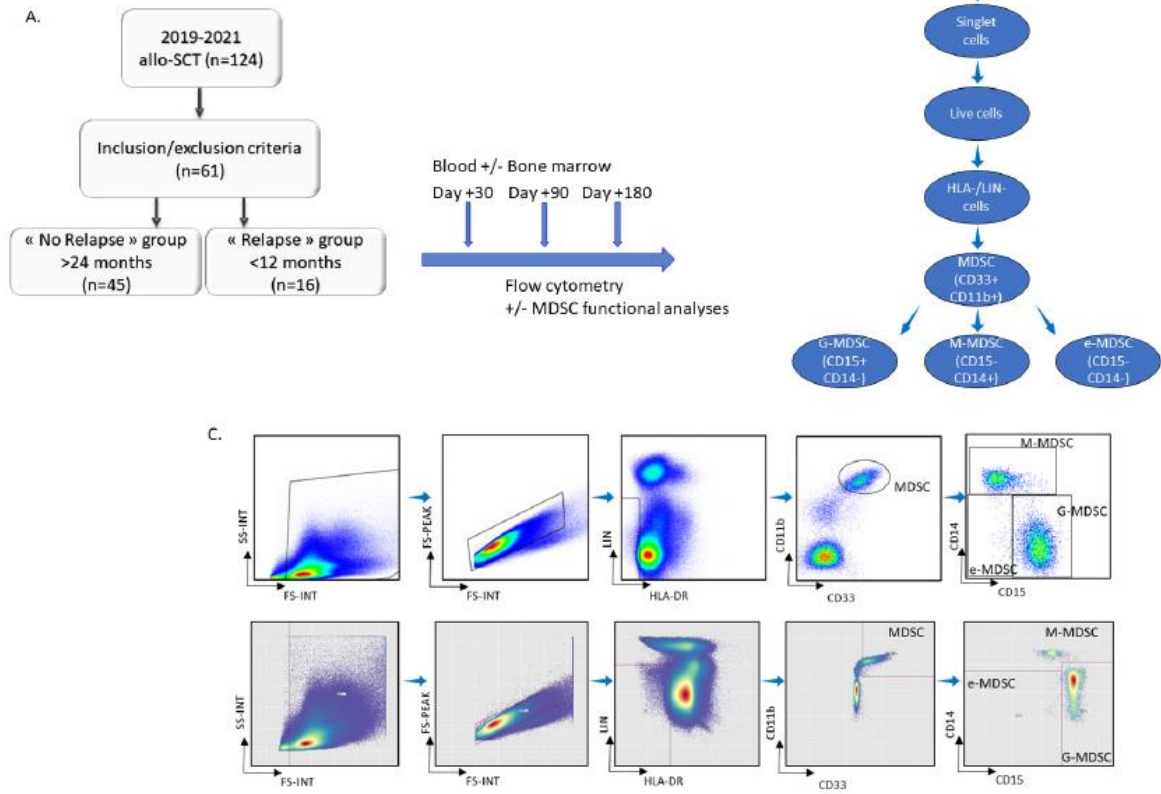
724 C. Cytokine levels in coculture supernatants of T cells with MDSCs sorted from the "NR" group (n=14)  
725 versus the "R" group (n=15). We studied S100A8/S100A9, IL1α, HGF, TNFα, IFNγ, IL1RA, IL12p70, IL10,  
726 CXCL8, IL6, CXCL10, IL4, IL2, IL1β, IDO, LAP (=TGFβ), and HMGB1. Mean values were normalized to the  
727 culture supernatant of activated T cells alone. Among all the cytokines explored, only IL-10 was  
728 statistically higher (2.17 +/- 0.72) in the coculture supernatants with MDSCs sorted from the "NR"  
729 group versus the "R" group (0.61 +/- 0.23) (\*p=0.04). We observed higher S100A8/S100A9 (637 +/-  
730 206.8) versus (99.98 +/- 82.83) (p=0.1) and higher TGFβ 0.95 (6.3 +/- 3.7 vs. 1.66 +/- 0.27; p=0.95) in  
731 coculture supernatant with MDSCs sorted from the "R" group versus the "NR" group, respectively, with  
732 no statistical significance.

733 D. Correlation heatmaps between MDSC and T-cell subsets in groups of patients with (n=6) and without  
734 relapse (n=14) on day +30. Color scale: blue (negative correlation); yellow (positive correlation); black  
735 (no correlation). Spearman's tests on semiautomatic gating cell counts after removal of unpopulated  
736 and insufficiently populated subpopulations. Exhaustion markers for each subset are displayed on the  
737 left.

738

739

Supplementary Fig 1



Supplementary Fig 2

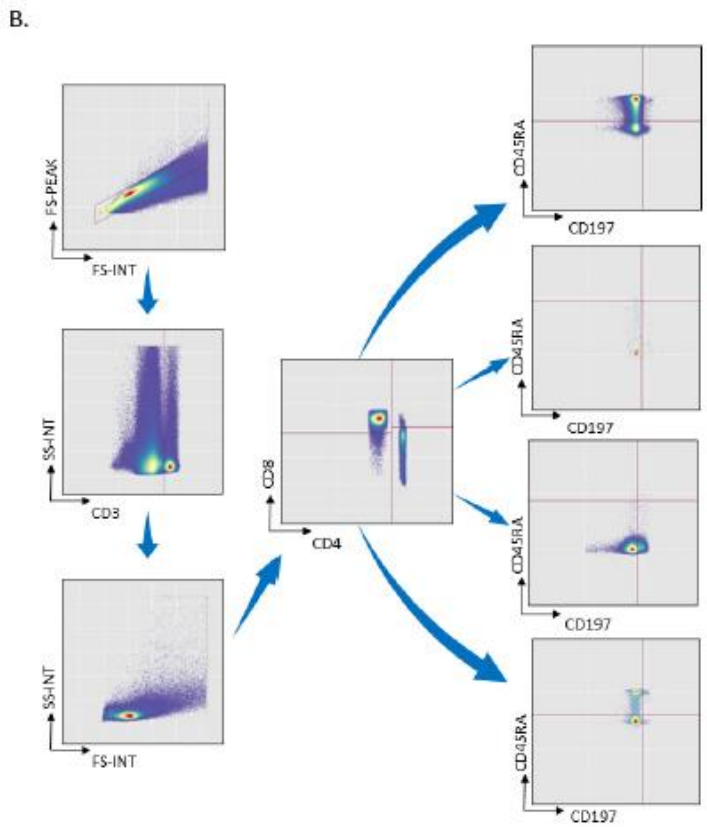
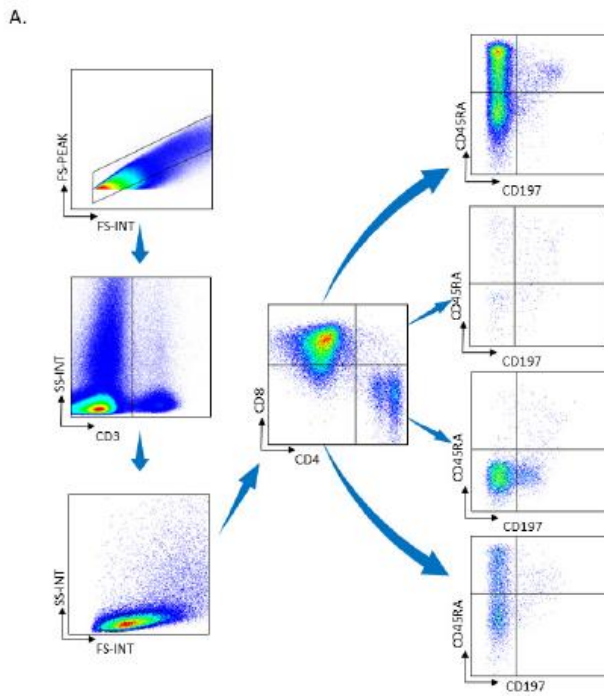
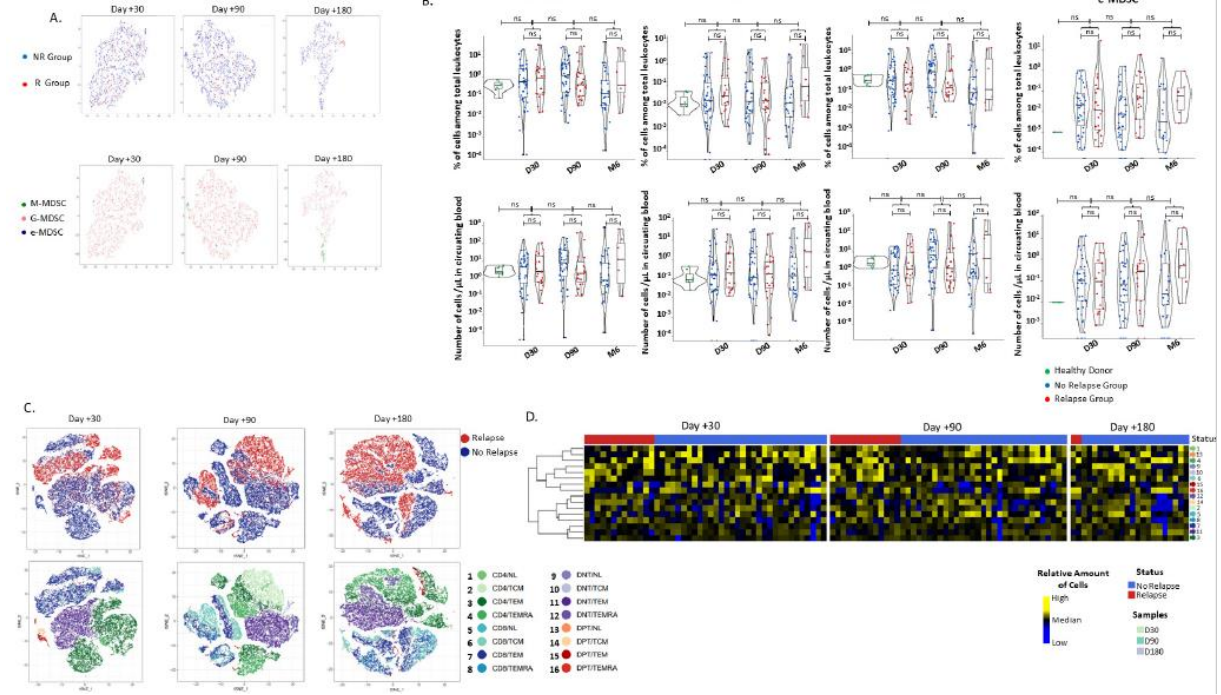


Table 1. Patient characteristics.

Characteristic	NR (n=45)		R (n=16)		P value
Median recipient age at transplantation, years (range)	59	(41-71)	58	(19-70)	<b>P=0.59</b>
<b>Disease (n, %)</b>					<b>P=0.61</b>
AML	31	(72.73)	15	(82.34)	
MDS	12	(27.27)	3	(17.76)	
<b>Disease status at transplantation for AML</b>					<b>P=0.23</b>
CR1	25	(56.81)	8	(47.05°)	
CR2	7	(16.63)	5	(23.52)	
Not in CR	1	(2.27)	2	(11.76)	
<b>Cytogenetic prognosis for AML at diagnosis (according to ELN)</b>					<b>P=0.46</b>
Good	5	(11.36)	2	(11.76)	
Intermediate	17	(38.63)	6	(35.29)	
Poor	10	(22.72)	5	(25.41)	
Unknown	0	(0.00)	1	(5.88)	
<b>Disease status at transplantation for MDS (according to WHO 2006)</b>					
CR	5	(11.36)	3	(17.64)	
PR	4	(9.09)	0	(0.00)	
Stable disease	3	(6.81)	0	(0.00)	
Progressive disease	0	(0.00)	0	(0.00)	
<b>Cytogenetic prognosis for MDS (according to IPSS-R)</b>					
Very good	0	(0.00)	0	(0.00)	
Good	7	(15.90)	0	(0.00)	
Intermediate	1	(2.27)	0	(0.00)	
Poor	1	(2.27)	0	(0.00)	
Very poor	3	(2.27)	3	(17.64)	
<b>Type of donor</b>					<b>P=0.23</b>
MRD	10	(22.73)	4	(23.53)	
MUD	36	(77.27)	12	(76.47)	
<b>CMV risk</b>					<b>P=0.35</b>
High risk (donor negative to recipient positive)	13	(29.54)	7	(41.17)	
Low risk (donor negative to recipient negative)	14	(36.36)	4	(17.66)	
Intermediate risk (donor positive)	15	(34.10)	7	(41.17)	

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; CMV: cytomegalovirus; CR: complete remission; ELN, European Leukemia Network; IPSS-R: revised international prognostic scoring system; MDS: myelodysplastic syndrome; MRD: matched related donor; MUD: matched unrelated donor; PR: partial remission; WHO World Health Organization.

Figure 1.



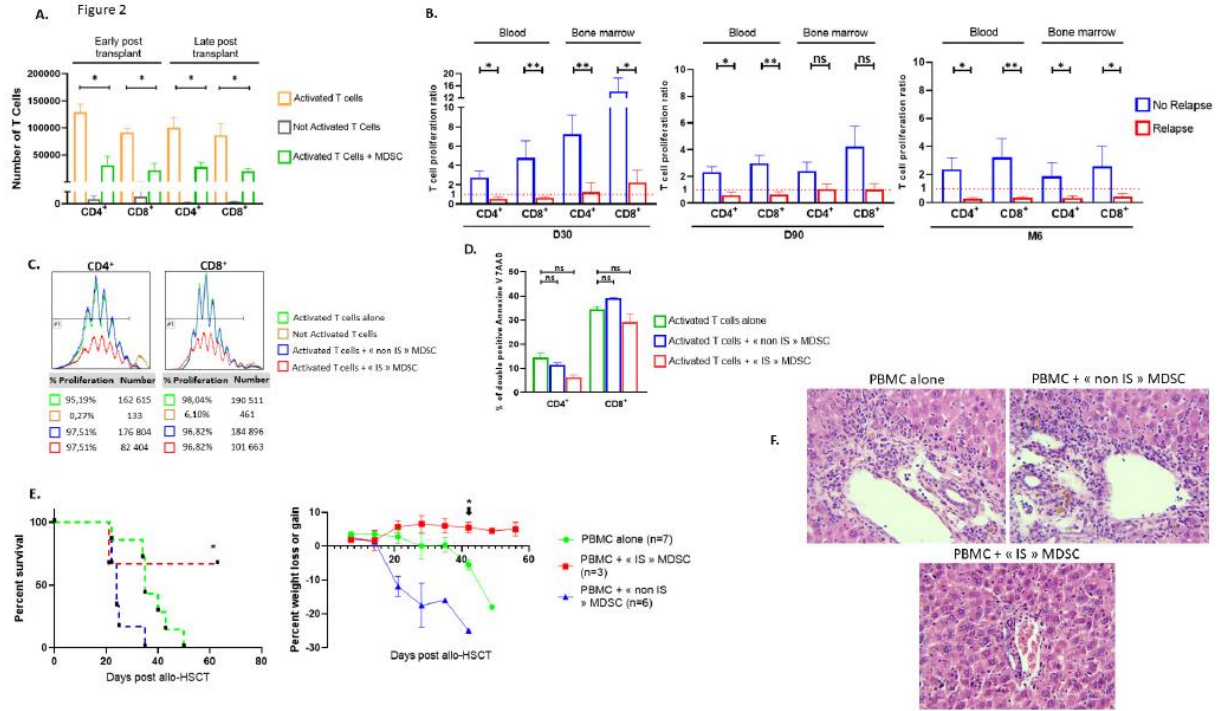
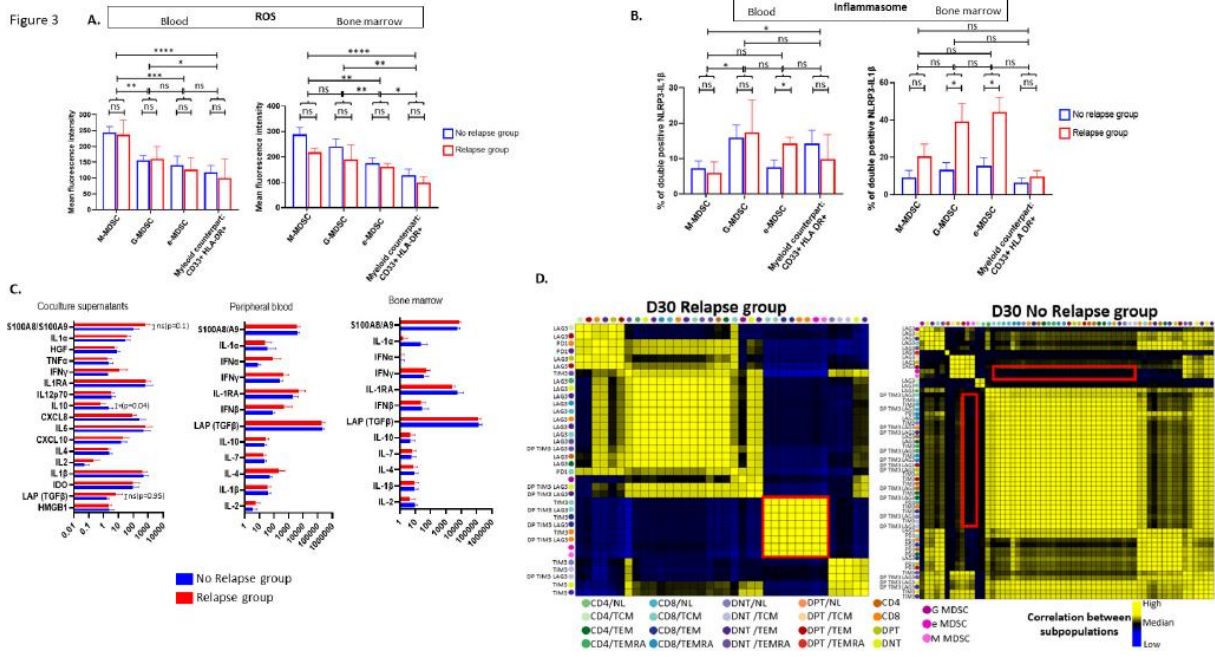


Figure 3



## Résumé

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogéniques demeure le seul traitement curatif de certaines hémopathies myéloïdes. L'effet antitumoral est véhiculé par les lymphocytes T (LT) du donneur qui ciblent les cellules cancéreuses du receveur. Malheureusement, les études prospectives et rétrospectives à long-terme rapportent un taux de rechute d'environ 30% qui peut atteindre 60 à 70% dans les hémopathies myéloïdes (syndromes myélodysplasiques -SMD/ leucémies aiguës myéloïdes-LAM) de haut risque cytogénétique. Notre travail a souhaité approfondir les mécanismes d'échappement des cellules tumorales à la surveillance du système immunitaire du donneur après une allogreffe de CSH. Notre étude prospective monocentrique menée au Centre Hospitalier de Nancy a permis l'analyse de la reconstitution immunitaire post-greffe, avec l'analyse des lymphocytes T et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC). Si l'analyse immunophénotypique par cytométrie en flux de la reconstitution lymphocytaire T des patients n'a pas présenté de signature immunologique prédictive de la rechute précoce post-greffe, l'analyse des propriétés immunosuppressives (par des tests *in vitro* et *in vivo*) des MDSC est statistiquement corrélée à la rechute précoce des patients. Seules les MDSC issues de patients en rechute précoce post-greffe présentaient des propriétés immunosuppressives, avec un profil d'activation de l'inflammasome NLRP3 intra-cellulaire. Afin de comprendre ces données, nous avons évalué l'influence du microenvironnement médullaire notamment l'impact des signaux de dangers tels que les alarmines et l'impact des cellules stromales mésenchymateuses (CSM). Seules les expérimentations *in vitro* d'activation de l'inflammasome NLRP3 par les alarmines S100A8/A9 et de co-culture avec des CSM issues de patients SMD induisent les capacités immunosuppressives des MDSC. Ces résultats témoignent de l'importance de l'influence du microenvironnement médullaire du receveur dans l'échappement tumoral au contrôle par le système immunitaire du donneur dans les premiers mois post-greffe.

**Mots-Clefs** : MDSC, rechute, inflammation, allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

## Abstract

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) remains the only curative treatment for some myeloid malignancies. The graft-versus-tumor effect refers to the ability of donor immune cells to eliminate residual recipient tumor cells. Unfortunately, long-term follow-up of prospective and retrospective studies report relapse rates of 30% and can reach 60 to 70% in myelodysplastic syndromes (MDS)/Acute Myeloid Leukemia (AML) with unfavorable-risk cytogenetic abnormalities. Our work aimed to decipher the mechanisms by which recipient tumor cells can escape to the donor's immune system surveillance after allo-HSCT. Our prospective single-center study at the Nancy Hospital Center investigated the post-transplant immune reconstitution, focused on T lymphocytes and myeloid derived suppressor cells (MDSC). If evaluating the immunophenotypic changes and the absolute numbers of different subsets of circulating immune T cells by multiparametric flow cytometry was not correlated to an early relapse post-transplant, *in vitro* and *in vivo* analyses of MDSC immunosuppressive properties were statistically correlated with recipient early relapse. Briefly, only MDSCs sorted from recipients with an early post-transplant relapse had immunosuppressive properties, and showed an activated NLRP3 inflammasome. In order to understand these data, we evaluated the role of the bone marrow microenvironment, particularly the impact of danger associated molecular patterns such as alarmins and the impact of mesenchymal stromal cells (MSC). Only *in vitro* experiments triggering the activation of the NLRP3 inflammasome by alarmins S100A8/A9 and co-cultures with MSCs harvested from MDS patients induced MDSC immunosuppressive properties. These results suggest the role of the recipient's bone marrow microenvironment in tumor escape from the donor's immune surveillance, during the first months post-transplant.

**Key-Words**: MDSC, relapse, inflammation, hematopoietic stem cell transplantation