



Étude des mécanismes d'action de la PhotoChimiothérapie Extra-corporelle chez l'Homme

Dalil Hannani

► To cite this version:

Dalil Hannani. Étude des mécanismes d'action de la PhotoChimiothérapie Extra-corporelle chez l'Homme. Immunologie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. <NNT : >. <tel-00502158>

HAL Id: tel-00502158

<https://theses.hal.science/tel-00502158v1>

Submitted on 13 Jul 2010

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

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



HAL Authorization

Doctorat de l'Université de Grenoble
Spécialité : Virologie - Microbiologie - Immunologie



**Etude des mécanismes d'action
de la PhotoChimiothérapie Extracorporelle
chez l'Homme**

Thèse

Présentée et soutenue publiquement le 8 Juin 2010
A l'Université de Grenoble
Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Par **Dalil HANNANI**

JURY

Rapporteurs :

Dr. Georges ANDREU (INTS, Paris)
Pr. Philippe SAAS (Inserm U645, EFS, Besançon)

Examineurs :

Dr. Nathalie CHAPUT (Inserm U 1015, IGR, Villejuif)
Pr. Alain FAVIER (UJF, CHU Grenoble) (Président du Jury)

Directeur de thèse :

Dr. Joel PLUMAS (Inserm U823, EFS, Grenoble)

*« L'esprit qui invente est toujours mécontent de ses progrès,
parce qu'il voit au-delà »*

Jean Le Rond d'Alembert,
Philosophe et Mathématicien Français
1717-1783

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement le **Dr Georges Andreu** pour m'avoir fait l'immense honneur d'évaluer mon travail en tant que rapporteur. Vous êtes à l'origine du développement de la PCE en système dissocié, sans lequel une partie de ce travail n'aurait pu être réalisée.

Je remercie très sincèrement le **Pr Philippe Saas** pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Merci pour l'intérêt que vous portez au sujet, et merci pour vos travaux qui m'ont beaucoup inspiré.

Je remercie tout particulièrement le **Pr Laurence Zitvogel** tout d'abord pour l'honneur de vous compter parmi les membres de mon jury de thèse, mais aussi pour vos travaux exceptionnels qui impacteront de façon considérable dans le domaine de la cancérologie et j'en suis sûr, dans le monde de la PCE. C'est pour moi une grande chance et un honneur de rejoindre votre groupe prochainement.

Je remercie également le **Pr. Alain Favier** pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Même si je n'évoque pas notre travail sur la protéomique dans cette thèse, je tiens à vous remercier pour votre investissement dans ce projet...et pour votre sang !

Je remercie tout particulièrement le **Dr Joel Plumas**, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire dès mon Master 2, et pour son encadrement de qualité et sa disponibilité tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir confié ce projet en ayant pris en compte mon intérêt pour la recherche appliquée. Merci de m'avoir enseigné la patience et la rigueur et d'avoir toujours cru en moi en considérant mes théories sur les mécanismes d'action, et mes choix dans les expériences à mener, même lorsque l'on s'éloignait du cadre fixé. Tu m'as également permis de m'épanouir en me laissant libre de prendre des responsabilités universitaires au cours de ma thèse. J'espère sincèrement que l'on retravaillera ensemble.

Je remercie le **Dr David Laurin** à qui je dois tout ! Tu m'as recruté tout petit en Master 1, et tu m'as tout appris notamment à relever les défis, la signification du terme

« grosses manip » et à ne jamais perdre de vue notre réel but, aider les patients. Notre travail sur les mHAg restera une expérience inoubliable. Merci (surtout !) pour les moments moins sérieux essentiels pour maintenir le cap. De « maître de stage » tu es devenu un ami. Profites bien de ces éloges (écrits en plus !) ce sont les derniers ! Pour équilibrer j'ai plusieurs vannes mais elles n'ont pas leur place ici...je te les réserve donc pour la prochaine occaz' ;).

Je remercie chaleureusement le **Dr Françoise Gabert** qui m'a donné le goût pour l'immunologie durant mon cursus universitaire. C'est en grande partie grâce à toi si je suis là aujourd'hui. Merci pour ton implication dans ce projet, pour toutes nos discussions « philosophiques » sur la PCE. Je souhaite devenir MCU, et tu m'as soutenu dans ce projet et permis de gagner en expérience dans l'enseignement, tout d'abord avec quelques TD puis mon premier cours...merci pour cette confiance ! Enfin, nos « Tea Time » me manqueront terriblement.

Un grand merci au **Dr Etienne Merlin**, qui a eu la bonne idée de travailler sur la PCE. Tu ne peux imaginer à quel point ça fait du bien de discuter avec quelqu'un qui se pose les mêmes questions, et aussi de voir que l'on est pas tout seul à se casser la tête à l'élaboration de mécanismes possibles. De plus, on avance plus vite à 2 ! Merci d'être si engagé envers tes tout petits (et moins petits) patients.

Je remercie vivement les **Pr Justyna Kanold** et **François Demeocq** du CHU de Clermont Clermont-Ferrand pour la mise en place d'une collaboration fructueuse, sans laquelle une partie de ce travail n'aurait pu être réalisée.

Je remercie le **Pr. Jean-Claude Béani** pour son intérêt pour le sujet, son expertise ainsi que ses conseils précieux.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe (**Julie, Jérémie, Ariane, Jean-Paul, Laurence, Claire** et **Alexandre**) pour leur soutien technique et moral. Ce fût un réel plaisir de partager ces journées en votre compagnie. Merci tout particulièrement au **Dr Caroline Aspod** pour avoir partagé sa riche expérience à travers de précieux conseils. Malgré ton emploi du temps, tu as toujours été là lorsque j'en ai eu besoin,

et grâce à toi je sais que je n'aurais jamais pu être chirurgien au vue de la qualité de mes greffes de peau ! Saches que tu as toujours été et restera un exemple pour moi. **Yerem**, ou devrais-je dire Dr Jeremy Di Domizio, nous avons évolué ensemble depuis la L3...et à l'heure ou j'écris ces lignes tu es déjà à Houston ! (que de chemin parcouru !). Merci pour ton soutien et pour les supers moments partagés durant toutes ces années...

Je remercie chaleureusement **l'ensemble des personnes de l'EFS Grenoble** pour leur sympathie, leur aide et les bons moments que l'on a passé. Vous faites de l'EFS un endroit où il fait bon vivre. Merci, tout particulièrement à : **Sylvie** et **Agnès**, amies du laboratoire de culture cellulaire, sans oublier mes amis du laboratoire d'immunocytologie et du laboratoire HLA (citer tout le monde serait trop long mais chacun se reconnaîtra) ; Les **Dr. Martine Pernollet** et **Dr Marie-Christine Jacob**, pour leur accueil à mes débuts ; Le **Pr Jean-Claude Bensa** pour son soutien depuis toujours et pour nos discussions scientifiques passionnantes ! Les infirmières et les médecins du don du sang et du centre de soin pour les prélèvements de volontaires sains et de patients. Un grand merci à **Michelle, Ahmed, Elizabeth, Christine, Franck, Marie-Pierre, Lydie, Julien** et **Emmanuelle** pour toutes nos pauses qui redonnent le sourire. Sans citer aucun nom, je compte sur mes pom-pom girls pour le jour J !!!!!

Thank you very much to **Anna Reinicke** ! It was a real pleasure to lunch with you! You help me so much time for my English and thanks to you I have improved it! Our rackets experience was awesome! Good luck for the future dear friend !

Un grand merci aux **Dr Marc Savasta, Dr Serge Perez, Pr Patrick Witomski, Pr Anne Milet** et **Pr Michel Robert-Nicoud** pour m'avoir permis de m'investir au sein de l'Ecole Doctorale Chimie et Science du Vivant et plus largement à l'Université. Vous avez toujours été d'un grand soutien, même au-delà.

Merci à mes amis qui ont toujours été là dans les coups durs, notamment : **Newelle, Alderic, Chris, Isma, Marion** et tous les autres ! Domo Arigato Gozaïmashita **Assia-O'Nee San** !!!

Je dédie cette thèse :

A **ma famille**, sans qui je ne suis rien.

A **Delphine**, à mes côtés depuis le début...

Aux **patients** qui donnent un sens à mon travail, et au-delà, à ma vie.

Sommaire

Chapitre 1 - Introduction 11

1. Historique : 12

A. La Photothérapie moderne est née il y a 100 ans: 13

B. Le 8-méthoxypsoralen (8-MOP) est la substance active de *l'ammî majus* : 14

C. La PUVA (Psoralen + UV-A) thérapie ou Photochimiothérapie :
Potentialisation de la photothérapie 15

D. Naissance de la PhotoChimiothérapie Extracorporelle: (PCE) 15

E. Article 1 : Photochimiothérapie Extracorporelle ou immunothérapie
utilisant des cellules modifiées par photochimie. 17

2. Applications cliniques : 18

A. Introduction : 18

B. Lymphome T cutané épidermotrope ou CTCL : 18

a. Définition : 18

b. Preuve de concept de l'efficacité de la PCE dans le traitement du
CTCL: 19

c. Etudes cliniques majeures : 20

C. Maladie du Greffon contre l'Hôte ou GvHD : 23

a. Définition : 23

b. Traitements conventionnels de la GvHD : 26

c. La PCE dans le traitement de la GvHD : 27

D. Utilisation de la PCE dans d'autres pathologies : 30

E. Conclusion générale sur les applications cliniques de la PCE : 31

3. Immunologie de la PCE : De la clinique à l'immunologie fondamentale. 32

A. La PCE est une immunothérapie 32

B. Comment le système immunitaire peut-il contrôler les LT « pathogènes » ? 36

a. La réponse immunitaire T et sa régulation:..... 36

b. Les Lymphocytes T régulateurs : 37

i. Définition : 37

ii. Les lymphocytes T régulateurs CD4+ : 37

iii. Les Lymphocytes T régulateurs CD8+ : 41

iv. Les LT régulateurs CD8+ CD103+ alloantigènes spécifiques: 43

c. La réponse régulatrice anti-clonotypique : 44

i. Définition : 44

ii. Les LT CD8+ régulateurs cytotoxiques anti-clonotype: 44

iii. Les LT CD8+ régulateurs HLA-E restreints : 45

d. La réponse régulatrice anti-ergotypique : 46

i. Définition : 46

ii. Les ergotopes et la régulation anti-ergotypique: 47

e. Les Lymphocytes NK T régulateurs : 50

C. Comment la PCE peut-elle induire une régulation des LT pathogènes ? 52

a. Effets connus de la PCE 52

i. La PCE induit l'apoptose des cellules traitées..... 52

ii. Données cliniques : la PCE induit un contrôle spécifique des LT pathogènes..... 54

b. Réponses régulatrices potentiellement induites par la PCE : 55

i. L'apoptose peut être un phénomène immunogène	55
ii. La localisation des cellules apoptotiques après réinjection peut être déterminante pour la nature de la réponse induite	59
iii. Mécanismes de régulation T potentiellement induits par la PCE.	61
c. Synthèse des mécanismes potentiels de la PCE :	75

Chapitre 2 – Résultats 78

1. Etude des mécanismes d'action de la PCE chez l'Homme...79

A. Article 2: Extracorporeal Photochemotherapy induces the apoptosis of monocytes without impairing their functions.....	80
B. Article 3: Extracorporeal Photochemotherapy induces a faster apoptosis of pathogenic activated T cells than of resting normal T cells in Graft versus Host Disease.	84
C. Résultats Complémentaires.....	113
a. Immunogénicité des cellules traitées par PUVA.....	113
b. Impact des cellules T traitées par PUVA sur la fonctionnalité des DC :.....	122
D. Perspectives	134

2. Amélioration des pratiques cliniques de la PCE : optimisation du traitement de la GvHD par PCE chez l'enfant..... 137

A. Article 4 : La PhotoChimiothérapie Extracorporelle chez l'enfant.	137
B. Article 5: Cryopreservation of mononuclear cells before extracorporeal photochemotherapy doesn't impair their in vitro antiproliferative capacities	141
C. Article 6: Immunomonitoring of graft-versus-host minor histocompatibility antigen correlates with graft-versus-host disease and absence of relapse after graft	143

D. Perspectives	145
E. Annexe 1 : Résumé du PHRC Photograph 2	147
Chapitre 3 - Discussion	154
Chapitre 4 - Références Bibliographiques	162

Chapitre 1 - Introduction

1. Historique :



'Histoire de la Photochimiothérapie Extracorporelle est tout à fait passionnante.

Cette immunothérapie moderne trouve son origine dans les civilisations les plus anciennes telles que celle des égyptiens du temps des Pharaons. A cette époque, le soleil était vénéré et sa lumière était reconnue pour ces propriétés curatives de certaines pathologies dermatologiques. Les égyptiens potentialisaient les effets de la lumière en ingérant une plante poussant le long du Nil, l'*Ammi majus*.

Dans cette partie, nous verrons comment l'utilisation d'une plante combinée à une exposition au soleil il y a 5000 ans, a pu progressivement donner naissance à une immunothérapie moderne telle que la Photochimiothérapie Extracorporelle.

A. La Photothérapie moderne est née il y a 100 ans:

La photothérapie est une thérapie basée sur les propriétés de la lumière, née il y a environ 100 ans. A la fin du XIXe siècle, les patients atteints de lupus vulgaris (une manifestation cutanée de la tuberculose) étaient encore traités par héliothérapie, c'est-à-dire exposés de façon contrôlée, aux rayons du soleil. La principale limite à cette thérapie était la nécessité d'avoir un bon ensoleillement. C'est ainsi qu'un médecin danois nommé Niels R. Finsen, développa en 1901 la première source de lumière artificielle. Il reçut le prix Nobel de médecine en 1903 pour ses travaux. L'utilisation de lumière artificielle marque le début de la photothérapie moderne.

Les propriétés curatives du soleil sont connues depuis les temps les plus anciens. En effet, les égyptiens ingéraient les feuilles d'une plante qui pousse le long du Nil, l'*Ammi majus* (**Figure 1**), puis s'exposaient au soleil afin de traiter le vitiligo (dépigmentation de la peau).



Figure 1 :

Plante Ammi Majus

Les premières traces de l'utilisation de l'*Ammi majus* en France remontent à la fin du VIIIe siècle. Charlemagne avait ordonné la culture de cette plante et l'avait fait notifier dans « Le capitulaire de Villis Vel Curtis Imperii ». Cet acte législatif définissait, entre autres, la culture des plantes médicinales au sein des jardins royaux de l'époque.

B. Le 8-méthoxypsoralen (8-MOP) est la substance active de l'*ammi majus* :

La substance active de l'*Ammi majus* fut isolée et caractérisée par IR Fahmy et H. Abu-Shady en 1948 (1). Ils la nommèrent Ammoïdine avant de découvrir que cette substance correspondait à la Xanthotoxine, isolée en 1911 de la plante *Fagara xantoxylode* par H. Priess. La nomenclature exacte de l'ammoïdine ou xanthotoxine est le 8-méthoxypsoralen ou 8-MOP. Le 8-MOP fait partie de la famille des furocoumarines ou psoralènes. Sa structure est représentée en **Figure 2**.

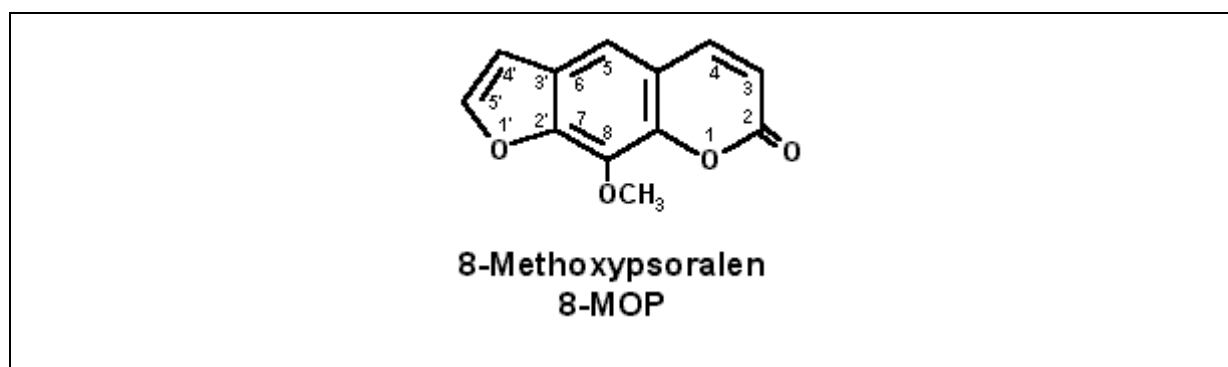


Figure 2 :

Structure du 8 méthoxypsoralène

En 1953, Aaron B. Lerner a décrit pour la première fois que le 8-MOP purifié pouvait être administré en toute sécurité à l'Homme (2). En effet des travaux antérieurs ont montré que chez le rat ou la souris, la LD50 (Lethal Dose 50) est de 400 à 600 mg/kg alors que la dose thérapeutique chez l'Homme est inférieure à 1 mg/kg. Les résultats expérimentaux suggéraient que le 8-MOP seul était inactif, et que l'irradiation induisait la transformation du 8-MOP en un autre composé, actif, probablement responsable de l'effet thérapeutique. Ces travaux ont été pionniers dans la photopharmacologie moderne.

C. La PUVA (Psoralen + UV-A) thérapie ou Photochimiothérapie : Potentialisation de la photothérapie.

La PUVA thérapie consiste à potentialiser les effets de la lumière, en l'occurrence les UV-A à l'aide d'un photosensibilisant ou psoralène. Le terme PUVA résulte de la contraction de Psoralène + UV-A. Le terme Photo-Chimiothérapie est employé comme synonyme car les patients sont traités par prise d'une molécule chimique associée à une exposition lumineuse.

A la fin des années 40, A.M. El Mofty montra que l'administration orale du 8-MOP combinée à la lumière du soleil favorisait la repigmentation de la peau de patients atteints de vitiligo (3). Depuis, son utilisation en dermatologie s'est largement répandue. Au début des années 70, J.F. Walter et J.J Voorhees (4, 5) ont rapporté que l'utilisation topique du 8-MOP suivie d'une exposition aux UV pouvait traiter le Psoriasis. A la fin des années 70, B.A Gilchrest *et al.* (6) ont traité avec succès par PUVA (et prise orale du 8-MOP), 9 patients atteints de mycosis fongoïdes (une des formes du lymphome T cutané ou CTCL pour Cutaneous T cell Lymphoma).

D. Naissance de la PhotoChimiothérapie Extracorporelle: (PCE)

La PCE a été développée par un dermatologue américain, Richard L. Edelson, au début des années 80. Il développa cette technique pour traiter des patients atteints d'une forme avancée du CTCL, le syndrome de Sézary.

Le CTCL est le lymphome T le plus fréquent. Dès son stade précoce, il est caractérisé par des plaques érythémateuses avec un infiltrat important de cellules T tumorales. Gilchrest traita pour la première fois en 1976 des patients atteints de CTCL par PUVA- ou photochimio- thérapie (6). Un peu plus tard, il a été démontré que les lymphocytes T étaient sensibles au traitement PUVA (7, 8).

Le syndrome de Sézary est un stade plus avancé du CTCL où le clone tumoral est retrouvé sous forme circulante dans le sang. Edelson s'est basé sur les travaux du groupe d'IR Cohen qui a montré à la même époque que l'injection d'un clone T altéré pouvait induire une réponse régulatrice capable de réguler ce même clone T (ce point sera développé ultérieurement dans la partie 3.Immunologie de la PCE). Au vu des résultats encourageants obtenus par Gilchrest dans le traitement du CTCL par photochimiothérapie et en se basant sur les travaux de Cohen, Edelson développa l'idée de traiter directement au niveau sanguin les clones T tumoraux par Photochimiothérapie. Pour cela, les patients ingéraient le 8-MOP, et 2 heures après ingestion, celui-ci était retrouvé dans le sang. Les cellules sanguines contenant les cellules de Sézary étaient prélevées et irradiées aux UV-A en extracorporel puis ces cellules altérées par photochimie étaient réinjectées aux patients. Ainsi est née la **PhotoChimiothérapie Extracorporelle**.

Depuis, les progrès techniques ont permis d'optimiser la procédure, notamment l'amélioration des systèmes d'aphérèse, mais son principe reste inchangé (**Figure 3 et Article 1**). En terme d'amélioration de la technique, on peut citer l'exemple de l'administration orale du 8-MOP qui conduisait à des concentration sanguines variables d'une séance à une autre et d'un patient à un autre. Il a fallu attendre le début des années 90 pour que le 8-MOP soit directement ajouté aux cellules prélevées (9) et l'an 2000 pour que l'ajout du 8-MOP en extracorporel soit approuvé par la FDA (10). Ceci a permis la standardisation de la quantité de psoralen présente dans l'échantillon traité au moment de l'irradiation aux UV.

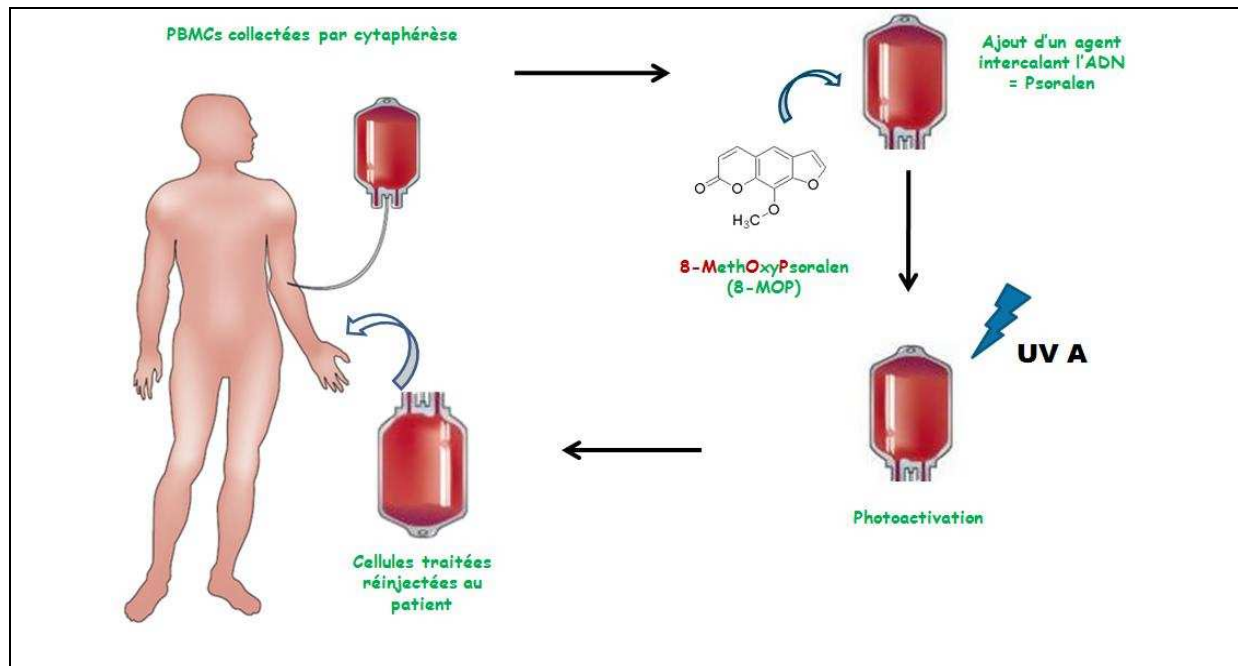


Figure 3 :

Principe de la PhotoChimiothérapie Extracorporelle. Les PBMC sont collectées par aphérèse. Les cellules, préalablement mises en contact avec l'agent photosensibilisant (8-MOP, 200ng/ml), sont photoirradiées (UV-A 365nm, 2J/cm²) puis réinjectées au patient.

Les différentes techniques utilisées en routine dans la pratique de la PCE ainsi que les problématiques liées à celle-ci sont développées dans une revue parue dans la Revue de Médecine Interne (**Article 1** - ci dessous).

E. Article 1 : Photochimiothérapie Extracorporelle ou immunothérapie utilisant des cellules modifiées par photochimie.

Lexique

La photochimiothérapie extracorporelle ou l'immunothérapie par cellules modifiées par photochimie

Extracorporeal photochemotherapy or immunotherapy using cells modified by photochemistry

D. Hannani^{a,b,c}, F. Gabert^{a,b,c}, L. Chaperot^{a,b,c}, M.J. Richard^{a,b,d}, J. Plumas^{a,b,c,*}

^a Université Joseph-Fourier, 38041 Grenoble, France

^b Inserm, U823, immunobiologie et immunothérapie des cancers, 38706 La Tronche, France

^c EFS Rhône-Alpes, 29, avenue du Maquis-du-Grésivaudan, 38701 La Tronche, France

^d Hôpital Michallon, cancérologie et biothérapie, 38043 Grenoble, France

Disponible sur Internet le 11 février 2010

Résumé

La photochimiothérapie extracorporelle (PCE) est une technique de thérapie cellulaire autologue utilisée dans le traitement de pathologies impliquant des lymphocytes pathogènes : lymphomes cutanés à cellules T, rejet d'organe et maladie du greffon contre l'hôte. À chaque séance de PCE, les patients reçoivent un produit cellulaire composé de cellules mononucléées autologues, contenant les cellules pathogènes, traitées par un agent photosensibilisant et un rayonnement UV-A. L'objectif du traitement est d'entraîner une réaction spécifique du système immunitaire modulant l'activité des lymphocytes pathogènes non traités responsables de la pathologie et par conséquent une amélioration des signes cliniques. Les mécanismes d'action précis restent cependant à identifier chez l'homme. Son efficacité associée à l'absence d'effets secondaires peut conduire à diminuer le recours aux immunosuppresseurs. La PCE apparaît donc comme une immunothérapie par cellules modifiées par photochimie qui permet une immunomodulation spécifique de lymphocytes pathogènes.

© 2010 Société nationale française de médecine interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Immunothérapie ; Photochimiothérapie ; Lymphome cutané ; Transplantation ; Maladie du greffon contre l'hôte (GvHD)

Abstract

Extracorporeal photochemotherapy (ECP) is an autologous cell therapy used for the treatment of diseases involving pathogenic cells: cutaneous T-cell lymphoma, organ rejection and graft versus host disease. During an ECP procedure, patients receive a cellular product consisting of autologous mononuclear cells, containing the pathogenic cells, treated with a photosensitising agent and an UV-A radiation. The aim of the treatment is to induce a specific immune reaction modulating the activity of untreated pathogenic lymphocytes responsible for the disease and therefore an improvement of clinical manifestations. The precise mechanisms of action remain to be defined in humans. Its efficacy coupled with the absence of side effects could lead to decrease the use of immunosuppressive drugs. PCE appears as an immunotherapy using cells modified by photochemistry, which allows specific immune modulation of pathogenic lymphocytes.

© 2010 Société nationale française de médecine interne (SNFMI). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Immunotherapy; Photochemotherapy; Cutaneous lymphoma; Transplantation; Graft versus host disease (GvHD)

Depuis la première utilisation de la photochimiothérapie extracorporelle ou PCE dans les années 1980 [1], plusieurs milliers de patients ont été traités dans le monde et plusieurs centaines de milliers de procédures de PCE ont été réalisées. En raison de l'intérêt croissant des cliniciens pour ce type de

thérapie, ces chiffres ne cessent d'augmenter. Les indications majeures de cette thérapeutique sont les traitements :

- des lymphomes cutanés à cellules T (LCT) ;
- du rejet d'organe ;
- de la maladie du greffon contre l'hôte (*graft versus host disease* [GvHD]) [2,3].

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : joel.plumas@wanadoo.fr (J. Plumas).

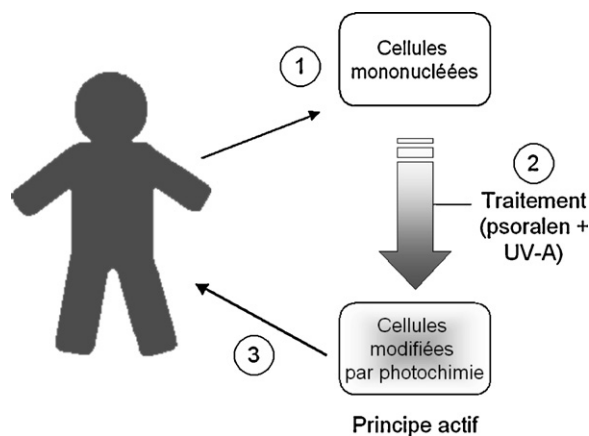


Fig. 1. Principe d'une séance de photochimiothérapie extracorporelle ou d'immunothérapie par cellules modifiées par photochimie : une suspension cellulaire enrichie en cellules mononucléées est obtenue (1), puis traitée par un psoralène et soumise à un rayonnement UV-A (2). Les cellules traitées constituent le principe actif qui est réinjecté au patient (3).

Contrairement à ce que son nom laisse supposer, la photochimiothérapie extracorporelle n'est pas une chimiothérapie mais une technique de thérapie cellulaire autologue au sens de l'article L1241-1 du Code de la santé publique. Le traitement implique bien une modification ex-vivo des cellules par irradiation UV-A en présence d'un psoralène mais ce sont les cellules ainsi modifiées qui constituent le principe actif de la thérapie et non le psoralène (Fig. 1). Quelles que soient les indications, le but de cette thérapie cellulaire est de moduler l'activité du système immunitaire. Il serait en fait plus approprié d'utiliser les termes « d'immunothérapie par cellules modifiées par photochimie » que « photochimiothérapie extracorporelle » car ils reflètent mieux la finalité thérapeutique sans être source d'inquiétude chez les patients quant aux effets secondaires. En effet, dans l'imaginaire des patients le terme de chimiothérapie est associé à un certain nombre de complications (anémie, nausées, vomissements, perte de cheveux, fatigue...) alors que la PCE est très bien tolérée depuis que le psoralène n'est plus administré per os.

Le traitement par PCE reste plus compliqué qu'une simple perfusion médicamenteuse. En effet, une séance de PCE consiste à obtenir une suspension cellulaire enrichie en cellules mononucléées (prélèvement par aphaérèse ou constitution d'un *buffy-coat* en ligne), à lui ajouter du 8-méthoxy-psoralène, qui est un agent photosensibilisant, puis à exposer la suspension à un rayonnement UV-A (ultra violet-A, 365 nm) d'énergie contrôlée. Les cellules ainsi modifiées par photochimie sont réinjectées au patient à la fin de la séance (Fig. 1). Une séance de PCE dure entre deux à trois heures et peut être réalisée en ambulatoire.

Il existe à l'heure actuelle deux techniques permettant de réaliser cet acte thérapeutique : le système en ligne et le système dissocié [4]. Dans le système en ligne, le circuit de prélèvement des cellules est couplé directement au circuit d'ajout du psoralène et d'irradiation par les UV. Un même dispositif médical associe les deux fonctions : séparer les cellules et les traiter par UV-A. Dans le système dissocié, ces deux fonctions sont réalisées par des dispositifs différents. Chaque technique possède

des avantages et des inconvénients en termes de mise en œuvre et de réalisation, du volume sanguin extracorporel, de la composition qualitative et quantitative de la suspension cellulaire, des contrôles qualités réalisables, de la sécurité et du coût. Malgré les différences entre les deux techniques, l'efficacité thérapeutique est similaire. Le choix de la technique par les praticiens est généralement fait sur des critères organisationnels dépendant de l'environnement de la structure de soins. En France en 2007, 15 centres (établissements de soins et établissement de transfusion sanguine) ont réalisé plus de 3200 procédures dont 53 % ont été réalisées avec le système dissocié (enquête de la société française de photochimiothérapie extracorporelle).

La première indication de la PCE a été le lymphome T cutané (LCT) érythrodermique à un stade avancé présentant des cellules malignes circulantes. Les travaux pionniers de Richard Edelson ont montré la faisabilité et l'intérêt du traitement des LCT par PCE et ont apporté les premiers résultats cliniques [1]. Actuellement, la PCE est la seule alternative thérapeutique pour traiter les LCT à un stade avancé [5], reconnu depuis 1988 aux États-Unis.

La PCE est régulièrement utilisée chez les sujets transplantés (cœur, poumons, reins) pour le traitement et la prévention du rejet aigu ou chronique du greffon, pour diminuer les doses d'immunosuppresseurs usuels ou pour traiter le syndrome de bronchiolite oblitérante dans la greffe pulmonaire [3,6].

C'est dans le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) que la PCE est actuellement la plus utilisée (60 % des indications de PCE) et que par conséquent les études sont les plus nombreuses [3,7,8]. La GvHD est une pathologie qui survient après une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Les lymphocytes T allogéniques issus du donneur présents dans le greffon détruisent les organes du receveur, reconnus comme étrangers. Le premier tissu touché est la peau. La GvHD entraîne une forte morbidité et une forte mortalité. Les traitements immunosuppresseurs utilisés pour la traiter ont des effets secondaires importants, ce qui augmente encore le taux de mortalité. Depuis quelques années, de nombreux patients atteints de GvHD chronique et plus récemment de GvHD aiguë ont été traités par PCE. Les études cliniques [9–11] révèlent que plus la PCE est utilisée tôt après l'apparition des signes cliniques de la GvHD, plus elle est efficace. Le grade clinique de la maladie est également un paramètre important car plus le grade est faible, plus le taux de réponse objective augmente. Enfin, ce sont les manifestations cutanées de la maladie qui répondent le mieux au traitement suivi de celles du foie et du tube digestif. L'utilisation de la PCE a pour conséquence de réduire la quantité d'immunosuppresseurs reçue par le patient. La PCE constitue une alternative thérapeutique dans les formes graves de GvHD résistantes aux thérapeutiques classiques.

Le schéma thérapeutique est variable selon les pathologies. Le nombre et la fréquence des séances dépendent de l'évolutivité de la maladie et de la réponse du patient au traitement. Le nombre de séances peut varier de deux à 12 par mois avec une évaluation d'efficacité à un ou trois mois suivie d'une phase d'entretien, où la fréquence des séances est diminuée, selon que la pathologie est évolutive ou non.

Même si l'on peut regretter le manque d'essais cliniques randomisés, la pratique courante et de nombreuses données

de la littérature montrent que la PCE a une réelle efficacité dans le traitement des pathologies évoquées précédemment et qu'elle pourrait représenter une alternative à l'utilisation d'immunosuppresseurs conventionnels [6,11]. Contrairement aux traitements classiques, l'immunosuppression observée après PCE est spécifique et le traitement est bien toléré. Cependant, les mécanismes d'action responsables des effets cliniques bénéfiques sont encore trop peu connus ce qui est un frein au développement de la PCE [2,7]. En effet, les cliniciens manquent de données pour déterminer les patients potentiellement répondeurs ou décider l'arrêt du traitement sur des critères biologiques.

Les observations cliniques, les études réalisées *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles animaux et les connaissances actuelles en immunologie permettent d'avancer que la PCE est bien une immunothérapie dans le sens où elle agit sur le système immunitaire des patients pour diminuer l'activité des lymphocytes pathogènes responsables des manifestations cliniques. En effet, si les trois indications majeures de la PCE peuvent paraître hétérogènes dans leur présentation clinique, elles ont en commun le fait qu'elles impliquent toutes l'existence de lymphocytes pathogènes, qu'ils soient tumoraux ou allogéniques [2]. La présence de ces lymphocytes pathogènes dans la suspension cellulaire traitée est nécessaire pour l'efficacité du traitement.

Le psoralène est une molécule chimique qui s'intercale dans l'ADN et qui après photo-activation forme des liaisons covalentes avec les acides nucléiques entraînant la mort par apoptose des cellules traitées selon une cinétique plus ou moins rapide. Le principe actif de la PCE est donc un produit cellulaire constitué de cellules mononucléées autologues pré-apoptotiques contenant des lymphocytes pathogènes. Le pourcentage de lymphocytes pathogènes peut être très élevé dans le produit final. En effet, les lymphocytes pathogènes peuvent représenter 1 à 2 % des lymphocytes T alors que la fréquence d'un lymphocyte spécifique d'un antigène commun est inférieure à un pour 10 000. À chaque séance de PCE, un nouveau produit est fabriqué et injecté au patient. Il est clair que la déplétion en cellules pathogènes due directement à la procédure n'est pas responsable de l'efficacité de la PCE car le contingent circulant de lymphocytes pathogènes représente moins de 10 % de l'ensemble de cette population qui est majoritairement localisée dans les tissus. L'hypothèse actuelle est que la transfusion de cellules contenant une quantité élevée de lymphocytes T pathogènes modifiés photochimiquement va entraîner une réaction spécifique du système immunitaire. Cette réaction permet de diminuer l'activité des lymphocytes pathogènes non traités responsables de la pathologie, ce qui a pour conséquence l'amélioration des signes cliniques. La réponse immunitaire pourrait dans un premier temps être non spécifique impliquant des facteurs solubles, par exemple et expliquant les effets cliniques rapides observés dans certaines situations. Dans un deuxième temps, se mettrait en place une réponse spécifique vis-à-vis des lymphocytes pathogènes expliquant les effets cliniques à long terme et l'absence d'immunosuppression globale. Le système immunitaire a développé différentes stratégies pour contrôler le développement de lymphocytes potentiellement pathogènes. Parmi elles, le développement de lymphocytes régulateurs ou cytotoxiques est

avancé le plus couramment comme hypothèse, mais d'autres mécanismes sont aussi envisageables. Les efforts dans la compréhension des mécanismes d'actions doivent être poursuivis afin d'augmenter les connaissances des réponses immunitaires induites par la PCE. La littérature sur le sujet doit être examinée avec attention car le besoin de connaissance entraîne parfois des interprétations ou des extrapolations trop rapides [7]. De plus, il faut se garder de vouloir transposer directement les résultats obtenus dans des modèles animaux à l'homme car les cellules traitées, les procédures de traitement, le contexte thérapeutique, les réponses immunitaires ne sont pas les mêmes.

En conclusion, la PCE est bien une immunothérapie par cellules modifiées par photochimie. Cette technique de thérapie cellulaire autologue est prometteuse dans le traitement de pathologies impliquant des lymphocytes pathogènes car elle permet leur immunomodulation. De plus, la PCE permet de diminuer les doses usuelles d'immunosuppresseurs. Son efficacité associée à l'absence d'effets secondaires conduit à une utilisation croissante de la PCE avec un élargissement des domaines d'applications vers les maladies auto-immunes par exemple [12,13]. Cependant, la méconnaissance des mécanismes d'action est une limite à son utilisation et à sa reconnaissance par les autorités de tutelle. Les recherches en cours devraient permettre de préciser ces mécanismes de façon à optimiser la thérapie pour une meilleure efficacité, à standardiser les procédures et peut-être permettre une réduction du nombre de séances nécessaires pour obtenir l'effet immunologique recherché.

Conflit d'intérêt

Les auteurs n'ont pas transmis de conflit d'intérêt.

Remerciements

Les auteurs remercient l'Association recherche et transfusion ainsi que l'établissement français du sang pour leur soutien. Leurs auteurs adressent leurs remerciements au personnel du Centre de soins et de l'unité mixte de thérapie cellulaire de Grenoble. Les auteurs remercient Julie Charles pour ses conseils.

Références

- [1] Edelson R, Berger C, Gasparro F, Jegasothy B, Heald P, Wintroub B, et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results. *N Engl J Med* 1987;316:297–303.
- [2] Plumas J, Drillet P, Jacob MC, Richard MJ, Favrot MC. Extracorporeal photochemotherapy for treatment of clonal T cell proliferations. *Bull Cancer* 2003;90:763–70.
- [3] McKenna KE, Whittaker S, Rhodes LE, Taylor P, Lloyd J, Ibbotson S, et al. Evidence-based practice of photopheresis 1987–2001: A report of a workshop of the British photodermatology group and the U.K. skin lymphoma group. *Br J Dermatol* 2006;154:7–20.
- [4] Schooneman F. Extracorporeal photopheresis technical aspects. *Transfus Apher Sci* 2003;28:51–61.
- [5] Zic JA. The treatment of cutaneous T-cell lymphoma with photopheresis. *Dermatol Ther* 2003;16:337–46.
- [6] Barr ML, Meiser BM, Eisen HJ, Roberts RF, Livi U, Dall'Amico R, et al. Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac trans-

- plantation. Photopheresis transplantation study group. *N Engl J Med* 1998;339:1744–51.
- [7] Plumas J, Manches O, Chaperot L. Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy in the control of GVHD: Involvement of dendritic cells. *Leukemia* 2003;17:2061–2.
- [8] Marshall SR. Technology insight: ECP for the treatment of GvHD—can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3:302–14.
- [9] Dall'Amico R, Messina C. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of graft-versus-host disease. *Ther Apher* 2002;6:296–304.
- [10] Couriel D, Hosing C, Saliba R, Shpall EJ, Andelini P, Popat U, et al. Extracorporeal photopheresis for acute and chronic graft-versus-host disease: Does it work? *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:37–40.
- [11] Flowers ME, Apperley JF, van Besien K, Elmaagacli A, Grigg A, Reddy V, et al. A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2008;112:2667–74.
- [12] Heshmati F. Extracorporeal photochemotherapy and transfusion medicine. Help Medical. Neuilly-sur-Seine 2008.
- [13] Knobler R, Barr ML, Couriel DR, Ferrara JL, French LE, Jaksch P, et al. Extracorporeal photopheresis: Past, present, and future. *J Am Acad Dermatol* 2009.

2. Applications cliniques :

A. Introduction :

La PCE a été initialement utilisée dans le traitement du CTCL puis de la GvHD. Des études cliniques ont également testé son efficacité dans le traitement de pathologies autoimmunes ainsi que dans le rejet d'organes solides. Bien que ces pathologies soient très différentes, elles partagent néanmoins un dénominateur commun : **les lymphocytes T sont les acteurs pathogènes** principaux (LT alloréactifs, tumoraux, autoimmuns). Depuis sa première utilisation dans les années 80 (11), plusieurs milliers de patients ont été traités et plusieurs centaines de milliers de procédures de PCE ont été réalisées dans le monde. Dans cette partie, nous détaillerons les résultats cliniques majeurs obtenus pour l'ensemble de ces pathologies.

B. Lymphome T cutané épidermotrope ou CTCL :

a. Définition :

Les lymphomes T cutanés épidermotropes (CTCL) correspondent à des lymphoproliférations malignes, monoclonales, de lymphocytes T de phénotype CD4+ dans la grande majorité des cas. Les lymphomes T cutanés épidermotropes se répartissent en deux entités : le mycosis fongoïde et le syndrome de Sézary, ce dernier correspondant à la forme leucémique des CTCL (12-13). Le mycosis fongoïde peut se présenter sous une forme progressive, évoluant successivement en une phase initiale de lésions eczématiformes non infiltrées, suivis éventuellement de plaques infiltrées ; enfin le stade des tumeurs, ou encore l'extension des lésions peut aboutir à un

état d'érythrodermie. L'évolution est très variable d'un cas à l'autre, et certaines formes se révèlent d'emblée par des tumeurs. Le syndrome de Sézary se révèle habituellement par une érythrodermie d'emblée, prurigineuse, souvent associée à la présence d'adénomégalies superficielles.

Les CTCL sont des pathologies rares, dont l'incidence annuelle aux États-Unis a été évaluée à 0,4 pour 100 000 habitants, et qui touchent surtout l'adulte avec un pic d'incidence autour de la cinquantaine. Des formes de mycosis fongoïde existent chez l'enfant. L'étiologie des lymphomes T cutanés épidermotropes n'est pas connue. Ce sont des pathologies potentiellement mortelles surtout en stade avancé car il n'existe pas de traitements efficaces.

(D'après H. Bachelez, Thérapeutique Dermatologique 2001)

b. Preuve de concept de l'efficacité de la PCE dans le traitement du CTCL:

En 1987, Edelson a publié la première étude clinique dans laquelle 37 patients, atteints de CTCL résistants aux traitements conventionnels, ont été traités par PCE (11). Quarante-trois pourcents des patients ont vu une amélioration en 22 semaines en moyenne, soit environ 5 cycles de traitement PCE. Vingt-quatre patients (65%) ont eu une amélioration de plus de 75% de leurs lésions cutanées et 15% des patients présentant une érythrodermie extensive ont atteint une rémission complète.

La PCE n'induit pas les effets secondaires observés avec les chimiothérapies standards comme la lymphopénie, les lésions du tube digestif, ou encore la perte capillaire. Dès cette étude, la PCE apparaît comme une thérapie prometteuse pour les CTCL disséminés (syndrome de Sézary).

En 1988, la FDA a approuvé l'utilisation de la PCE dans le traitement du CTCL.

c. Etudes cliniques majeures :

Depuis Edelson en 1987, 18 études cliniques sur l'utilisation de la PCE dans le traitement du CTCL ont été réalisées. Elles sont reportées et résumées en **Table 1**. Cela représente un total de 441 patients entre 1987 et 2006. Au total, 274 patients (62%) ont répondu au traitement. Ils ont tous été traités durant au moins 6 mois. Parmi eux, 92 patients soit 33.6% ont atteint une rémission complète. Les 74.4% restants (182 patients) ont atteint une rémission partielle (amélioration d'au moins 25% des atteintes cutanées par rapport à l'état initial i.e. avant la PCE).

La PCE dans le **traitement du CTCL** semble apporter un **réel bénéfice thérapeutique** pour **62%** des patients dont 1/3 atteignent une **rémission complète (33.6%)**. Cependant, on ne peut pas conclure de façon catégorique car il manque des études randomisées à large échelle. Néanmoins, la PCE n'a pas d'effets secondaires majeurs et constitue donc une très bonne alternative pour des patients ne répondant pas aux traitements conventionnels.

Auteur (ref)	Année	Nombre total de patients	Taux de réponses	Réponse Partielle	Réponse Complète
Edelson (11)	1987	37	27 (73%)	18	9 (24%)
Heald (14)	1989	32	17 (53%)	12	5 (14%)
Dall'Amico(15)	1991	37	27 (73%)	ND	9 (24%)
Prinz (16)	1995	17	12 (71%)	6	0
Owsianowski (17)	1996	16	11 (69%)	7	4 (25%)
Zic (18)	1996	20	10 (50%)	5	5 (25%)
Gottlieb (19)	1996	31	20 (65%)	13	7 (23%)
Duvic(20)	1996	34	17 (50 %)	11	6 (18%)
Russell-Jones (21)	1997	19	10 (53%)	7	3 (16%)
Zouboulis(22)	1998	20	13 (65%)	-	-
Jiang (23)	1999	25	20 (80%)	15	5 (20%)
Wollina (24)	2000	17	13 (76%)	3	10 (59%)
Crovetti (25)	2000	30	22 (73%)	12	10 (33%)
Bisaccia (26)	2000	37	20 (54%)	15	5 (14%)
Wollina (27)	2001	14	7 (50%)	3	4
Knobler (28)	2002	20	10 (50%)	3	7
Quaglino (29)	2004	19	12 (63.2%)	9	3 (15.8%)
Rao (30)	2006	16	6 (37.5%)	-	-
Total	-	441	274 (62%)	182	92 (33.6%)

Table 1 :

Principales études cliniques réalisées de 1987 à nos jours sur l'utilisation de la PCE dans le traitement du CTCL.

Mis à jour à partir de Knobler Ann N Y Ac Sci 2001(31)

Ces études sont hétérogènes car les patients sont atteints de différentes formes de CTCL (Mycosis Fongoïde ou Syndrome de Sézary). De plus, le stade de la pathologie des patients est variable selon les études et parfois au sein même de celles-ci.

Pour qu'un patient atteint de CTCL puisse répondre à la PCE de façon optimale, il doit être immunocompétent (32) i.e. capable d'élaborer une

réponse immunitaire à l'encontre du clone T leucémique. Il semble nécessaire que le ratio de LT CD4 / CD8 soit proche de la norme car les cellules de Sézary (CD4+) ont la propriété de sécréter de grandes quantités d'IL-4, élaborant ainsi un environnement Th2. Dans les stades avancés de la pathologie, on observe un envahissement du sang et de la moelle osseuse par les LT leucémiques pouvant atteindre plus de 90% des LT circulants augmentant considérablement le ratio CD4/CD8 ce qui crée un environnement Th2, défavorable à l'élaboration d'une réponse Th1 dirigée à l'encontre des LT leucémiques. Or la PCE est souvent utilisée au stade tardif chez des patients résistants aux traitements conventionnels. Ces patients ont souvent un ratio CD4/CD8 déjà élevé. Peut être, faudrait-il considérer l'utilisation de la PCE pour des patients en stade précoce.

En 2007, Miller *et al.* (33) ont publié une revue bibliographique réalisée uniquement sur des patients atteints de CTCL en stade précoce (IA, IB, IIA), traités par PCE entre 1987 et 2007. Au total cette étude reprend 16 publications et représente 124 patients traités par PCE en monothérapie ou associée à une thérapie adjuvante. Selon les études, le taux de réponse varie entre 33 et 88%. Sont considérées comme réponses au traitement : (i) Les réponses mineures (>25% d'amélioration), (ii) Les réponses partielles (> 50%) et les réponses complètes (100% d'amélioration). La conclusion de l'étude est que la PCE semble être efficace pour le traitement des stades précoces du CTCL. Là encore, une étude multicentrique randomisée à large échelle serait nécessaire.

C. Maladie du Greffon contre l'Hôte ou GvHD :

a. Définition :

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSTC pour Haematopoietic Stem Cell Transplantation) représente l'un des principaux traitements des hémopathies malignes. Le nombre d'HSCT est en constante augmentation avec 1472 greffes allogéniques réalisées en France en 2008 (d'après l'Agence de la Biomédecine) ce qui représente une augmentation de 50% par rapport à 2004 et 6.7% par rapport à 2007.

Le patient (receveur) est totalement irradié avant la greffe (TBI pour Total Body Irradiation) afin d'éradiquer l'hématopoïèse et ainsi une grande partie des cellules tumorales. Les lésions causées par l'irradiation au niveau des différents tissus, notamment les tissus épithéliaux, induisent la production de cytokines inflammatoires (TNF α , IL-1, IL-6 et GM-CSF) (34). C'est le « cytokine storm » ou orage cytokinique après TBI.

Le greffon contient des cellules souches hématopoïétiques capables de reconstituer chez le receveur une nouvelle hématopoïèse (celle du donneur) mais il contient également des LT matures immunocompétents qui sont capables d'être activés en réponse aux signaux de danger produits au cours du conditionnement pré-greffe et de générer une réponse immunitaire. C'est la réaction du greffon contre l'hôte (GvH pour Graft versus Host reaction). Les LT allogéniques du greffon sont dirigés contre les molécules du complexe d'histocompatibilité (CMH) du receveur, ou HLA chez l'Homme (pour Human Leukocyte Antigen) de classe I et II. Dans le cadre d'une greffe HLA compatible, la GvH est principalement dirigée à l'encontre des antigènes mineurs d'histocompatibilité (35-36) (pour une revue voir Goulmy, Immunol Rev 1997 (37)). L'environnement pro-inflammatoire causé par la TBI exacerbe cette réaction.

L'effet thérapeutique de la greffe est double. Tout d'abord les cellules souches greffées ont pour rôle de remplacer l'hématopoïèse détruite en grande partie lors de la TBI. Ensuite, les cellules tumorales résiduelles sont reconnues et éliminées par les LT CD8+ cytotoxiques et CD4+ allogéniques contenus dans le greffon. C'est l'effet greffon anti-leucémie ou (GvL pour Graft versus Leukemia), recherché, car il est nécessaire à l'éradication complète des cellules tumorales résiduelles (38).

En présence de cytokines inflammatoires, les cellules épithéliales, notamment de la peau et du tube digestif, surexpriment les molécules du CMH et d'adhérence. Elles favorisent ainsi l'activation des LT alloréactifs responsables de la destruction massive des organes du receveur (peau, tube digestif, foie, poumon etc...) (39-41). C'est la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD pour Graft versus Host Disease). La déplétion des cellules T matures du greffon prévient l'apparition de la GvHD mais augmente considérablement les risques de rechute car ces LT sont nécessaires à l'effet GvL (42).

Les LT alloréactifs constituent une population oligoclonale car ils sont spécifiques d'un nombre restreint d'antigènes immunodominants (43). Dès la greffe, ils sont très fortement activés, prolifèrent massivement, constituent une proportion très importante des LT totaux dans les premiers mois post-greffe. Par la suite leur proportion diminue parallèlement à la reconstitution immunitaire et à l'apparition d'un nouveau répertoire T. Néanmoins ils persistent en grand nombre chez les patients n'ayant pas résolu leur GvHD, ils sont détectables dans le sang et leur fréquence corrèle aux manifestations cliniques de la GvHD (44).

La GvHD est la première cause de mortalité et de morbidité, en absence de rechute, après allogreffe HSCT.

La GvHD comporte 2 phases : aiguë et chronique.

GvHD aiguë : Elle survient généralement dans les 100 jours suivant la greffe, la plupart du temps entre 2 et 5 semaines, avec une fréquence de 30 à 70 % selon la greffe considérée malgré le traitement préventif. Les trois organes cibles sont : la peau, le foie et le tube digestif. La GVHD aiguë est classée en 4 grades de gravité croissante, selon le degré d'atteinte des 3 organes-cibles et avec altération plus ou moins marquée de l'état général : grades I et II de pronostic favorable, grade III de pronostic réservé, grade IV presque toujours mortel.

GvHD Chronique : Par définition, la GvHD chronique, généralement mais non constamment précédée par une GvHD aiguë, apparaît plus de 100 jours après la greffe, mais ses manifestations peuvent être plus précoces. Elle survient chez environ 50 % des patients et atteint, à des degrés variables, la peau, les muqueuses et le foie. Elle est classée en formes limitées [peau et (ou) maladies hépatiques] ou extensives. La symptomatologie de la GvHD chronique évoque certaines maladies systémiques, dites "auto-immunes" (sclérodermie, syndrome de Gougerot-Sjögren ou cirrhose biliaire primitive). La GvHD chronique entraîne la persistance d'un déficit immunitaire responsable d'infections tardives potentiellement mortelles (infections à CMV, aspergillose). La peau est généralement le premier tissu atteint. Il s'agit d'une éruption maculopapuleuse, prurigineuse, inflammatoire, d'évolution fluctuante, touchant le visage, la paume des mains et la plante des pieds, douloureuse dans les deux derniers territoires. Elle peut s'étendre au tronc, aux membres puis à l'ensemble du tégument. Toutes les formes sont possibles depuis l'éruption localisée jusqu'au syndrome de Lyell. Les muqueuses peuvent être atteintes (conjonctive, organes génitaux externes).

b. Traitements conventionnels de la GvHD :

Prévention :

Le traitement préventif de la GvHD est systématique. Le protocole le plus utilisé associe la ciclosporine et le méthotrexate (45). D'autres protocoles associent à des degrés divers de la méthylprednisolone et l'association cyclophosphamide / méthotrexate / corticoïdes ou mofétil mycophénolate (46-47).

La déplétion ex vivo des cellules T du greffon reste délicate en raison de la perte de l'effet GvL et du nombre important de rechutes. Néanmoins, un effet GvL peut être obtenu par l'intermédiaire des NK allogéniques (48-49). Dans ces conditions, cette méthode a montré une bonne efficacité, en prévenant la GvHD aiguë tout en conservant un effet GvL. Enfin de nouvelles stratégies de déplétion sélective des LT allo-réactifs ont été proposées, notamment le ciblage d'HSP90 et ouvrent de nouvelles perspectives (50).

Traitements :

Les atteintes modérées sont actuellement traitées par des corticoïdes à forte dose. La ciclosporine et les globulines anti-thymocytes ne sont prescrites qu'en seconde intention. Le mofétil mycophénolate est aujourd'hui largement utilisé. Des essais cliniques ont montrés l'efficacité du rituximab (anti-CD20) en association avec les corticostéroïdes (51). La PUVA-thérapie a montré son efficacité dans les GvHD cutanées eczémateuses et sclérodermiiformes (52-53).

La problématique majeure du contrôle de la GvHD est qu'il faut sans cesse adapter les traitements immunosuppresseurs car s'ils ont l'avantage de

prévenir et/ou traiter l'apparition de cette pathologie ils provoquent aussi des effets secondaires importants. Tout d'abord, ils induisent une immunodépression du patient, le rendant sensible à toute infection opportuniste. Sur le long terme, le risque de développer un cancer est accru. En cas de GvHD aiguë de grade avancée (grade III ou IV), le patient est traité précocement par de fortes doses d'immunosuppresseurs augmentant les risques de rejet de greffe et surtout de rechute (du à l'altération d'un des effets thérapeutiques majeurs de l'allogreffe HSCT : l'effet GvL). Inhiber la GvHD tout en favorisant l'effet GvL est le défi majeur de l'allogreffe HSCT. De nombreux concepts d'immunothérapie allant dans ce sens ont émergé ces dernières années (ciblage d'antigènes mineurs d'histocompatibilité particuliers, mismatches KIR NK...) (38, 54-55).

(Adapté d'après P. A Bécherel, Thérapeutique Dermatologique 2001)

c. La PCE dans le traitement de la GvHD :

Les principales études cliniques sur l'utilisation de la PCE dans le traitement de la GvH aiguë et chronique sont reportées en **Table 2**.

Le premier patient GvHD (chronique) a été traité par Dall'Amico en 1993 (56). Depuis, 157 patients atteints de GvHD aiguë et 400 atteints de GvHD chronique ont été traités par PCE. Les améliorations au niveau cutané, hépatique et digestif ont été résumées en Table 3. Les taux de réponses selon les organes et la phase de GvHD varient entre 46 et 81%. Les atteintes hépatiques et digestives chez les patients atteints de GvHD aiguë ou chronique ont un taux de réponse équivalents (46 vs 54% et 58 vs 64%, respectivement). En revanche, il semblerait qu'au niveau cutané, les patients en GvHD aiguë répondent plus favorablement au traitement (81 vs 64%).

En 2008, Flowers publia la première étude prospective randomisée comportant 95 patients atteints de GvHD chronique (57). Les résultats ne sont pas aussi spectaculaires que ceux des études précédentes. On retrouve les

mêmes tendances, mais celles-ci ne sont pas statistiquement significatives. Il est difficile de maintenir le bras contrôle sans traitement trop longtemps pour des raisons éthiques évidentes. Ainsi, ces études ont été conduites sur 12 semaines. Or les effets de la PCE, tardifs, sont souvent observés ultérieurement. Néanmoins, l'utilisation de celle-ci permet la diminution des immunosuppresseurs et réduit donc *a minima* les effets indésirables liés à leur utilisation.

En revanche, lorsque l'investigateur est informé du traitement du patient alors la probabilité d'une bonne réponse au niveau de la peau après 12 semaines de traitement PCE est significativement supérieure comparée à celle du groupe contrôle (**Figure 4**).

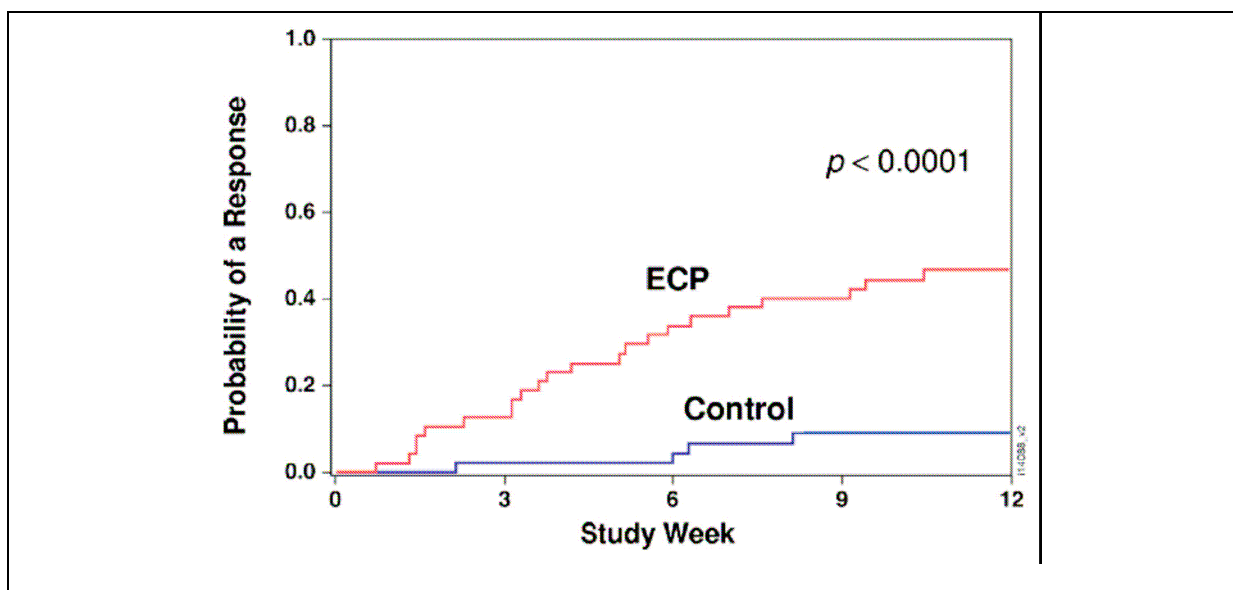


Figure4 :

Courbe de probabilité d'obtenir des améliorations au niveau cutané chez des patients GvHD au cours des 12 premières semaines de traitement PCE.

Source: Flowers, Blood 2008 (57).

Enfin, Justyna Kanold *et al.* ont démontré que la PCE pouvait être utilisée avec succès dans le traitement de la GvHD en pédiatrie (58-59).

GvHD	Auteur (ref)	Année	Nbre total de patients	Taux de réponses (Peau)	Taux de réponses (Foie)	Taux de réponses (Tube digestif)
Aiguë	Sniecinski (60)	1995	11	1/2	1/11	3/5
	Miller (60)	1998	4	3/3	2/4	3/3
	Smith (61)	1998	6	-	0/6	0/6
	Salvaneschi (62)	2001	9	8/9	1/5	3/5
	Messina (63)	2003	33	27/33	9/14	15/18
	Garban (64)	2005	12	12/12	7/9	1/3
	Greinix (65)	2006	59	47/57	14/23	9/15
	Perfetti(66)	2008	23	14/22	1/4	4/10
	Total GvHD Aiguë		157	112/138 (81%)	35/76 (46%)	38/65 (58%)
Chronique	Besnier (67)	1997	5	4/4	1/1	-
	Smith (61)	1998	18	4/10	3/13	2/7
	Miller (60)	1998	8	5/7	0/1	0/2
	Sniecinski (60)	1998	26	12/15	5/12	7/8
	Child (68)	1999	11	10/10	1/6	-
	Zic (69)	1999	11	6/8	2/5	2/10
	Salvaneschi (62)	2001	14	10/12	6/9	8/12
	Padua (60)	2002	19	15/18	7/9	-
	Apisarnthanarax (70)	2003	32	19/32	-	-
	Kanold (58)	2003	63	31/51	24/33	-
	Messina (63)	2003	44	20/36	12/20	-
	Bisaccia (71)	2003	6	4/6	3/3	2/2
	Rubegni (72)	2005	32	22/27	18/23	23/25
	Foss (73)	2005	25	15/25	0/6	6/13
	Garban (64)	2005	15	12/15	-	-
	Marshall (60)	2006	8	4/5	4/4	3/4
	Couriel (74)	2006	63	33/56	3/21	-
	Total GvHD Chronique		400	226/337 (67%)	89/166 (54%)	53/83 (64%)

Table 2 :

Principales études cliniques réalisées de 1995 à nos jours sur l'utilisation de la PCE dans le traitement de la GvHD aiguë et chronique. Mis à jour et complété d'après Marshall RS, Nat Clin Pract Oncol 2006 (60).

La **PCE** est une **thérapie efficace** dans le traitement de la **GvHD aiguë et chronique**. Elle est une **très bonne alternative** à l'usage des **immunosuppresseurs** classiques car elle semble offrir une **immunorégulation spécifique** des Lymphocytes T alloréactifs sans induire d'immunosuppression

généralisée (75), ni d'effets secondaires. Son utilisation dans le traitement de la GvHD a permis un regain d'intérêt pour la recherche de ses mécanismes d'actions afin d'optimiser cette thérapie pour traiter efficacement cette pathologie désastreuse.

D. Utilisation de la PCE dans d'autres pathologies :

Depuis une quinzaine d'années, la PCE a été utilisée avec succès dans de nombreuses pathologies autoimmunes médiées par les lymphocytes T. Les patients étaient tous réfractaires aux traitements conventionnels pour leur pathologie. La PCE semble induire une immunorégulation spécifique des LT alloréactifs, elle a donc été utilisée pour renforcer l'induction de tolérance après transplantation d'organes solides. L'ensemble des pathologies est listé en **Table 3**.

Pathologie	Date de 1 ^{ère} utilisation	Références
Pathologies Autoimmunes	Pemphigus Vulgaris	(76-78)
	Sclérodermie	(76, 79)
	Polyarthrite Rhumatoïde	(80-81)
	Lupus Systémique Erythémateux	(82-83)
	Psoriasis	(84)
	Diabète de type I	(85)
	Maladie de Crohn	(86)
Transplantation	Cœur	(87-88)
	Poumon	(89)
	Rein	(90)
	Foie	(91)
Autres	HIV	(92)

Table 3 :

Tableau récapitulatif de l'utilisation de la PCE dans d'autres pathologies et l'année de première utilisation.

Malgré le nombre très restreint de patients au sein de chaque étude, la **PCE semble être efficace** dans le traitement des **maladies autoimmunes** et des **rejets d'allogreffes**. Elle permet une diminution des immunosuppresseurs chez ces patients. Au vu de son efficacité évidente dans la GvHD, ces résultats ne sont pas surprenants notamment dans le cadre des rejets d'allogreffes où les LT pathogènes, comme dans la GvHD, sont alloréactifs.

E. Conclusion générale sur les applications cliniques de la PCE :

Depuis maintenant 23 ans, la PCE a su trouver sa place dans le panel des nombreux traitements des maladies causées par les lymphocytes T. Ses applications sont larges : pathologies tumorales, pathologies autoimmunes et allogéniques (rejets en transplantation, GvHD). La PCE apparaît comme une thérapie alternative efficace y compris chez des patients résistants aux traitements conventionnels. Elle est bien tolérée et n'induit pas d'effets secondaires majeurs. De plus elle semble offrir une immunorégulation spécifique des LT pathogènes sans immunosuppression généralisée ce qui représente un avantage majeur par rapport aux immunosuppresseurs conventionnels. En outre, elle permet de diminuer les doses d'immunosuppresseurs administrés aux patients, réduisant ainsi les effets secondaires à court et long terme associés à ces derniers. Pour toutes ces raisons, la PCE apparaît comme une thérapie prometteuse et d'avenir.

En revanche, ses mécanismes d'action ne sont toujours pas clairement identifiés. Ceci représente la principale limite à l'optimisation, la généralisation et à la standardisation de la PCE. De plus, la connaissance des mécanismes d'action permettra de définir des indications précises pour son utilisation.

3. Immunologie de la PCE : De la clinique à l'immunologie fondamentale.

A. La PCE est une immunothérapie

La PCE est une thérapie cellulaire utilisée dans des pathologies diverses dont le point commun est l'implication des lymphocytes T « pathogènes » (tumoraux dans le CTCL, alloréactifs dans la GvHD et les transplantations d'organes solides, autoimmuns dans la sclérodermie etc..) dont l'efficacité est démontrée en clinique (11, 60).

Dans le CTCL, le traitement par PCE de patients cortico-résistants a donné des résultats probants. En effet, on observe une diminution (réponse partielle) voir une élimination complète (réponse complète) du clone leucémique circulant (93-95) qui s'accompagne d'une amélioration de l'infiltrat T cutané.

Dans la GvHD, le traitement par PCE de patients cortico-réfractaires permet de contrôler les lymphocytes T alloréactifs responsables de la pathologie (57, 96-97). Ce contrôle est spécifique car les patients traités par PCE ne sont pas immunodéprimés et restent capables de répondre aux infections.

La PCE permet (chez les patients répondeurs) une **nette diminution des doses d'immunosuppresseurs** après greffe de cellules souches hématopoïétiques ou transplantation d'organes solides (87-88). Les mêmes observations ont pu être faites dans le cadre du traitement de maladies autoimmunes.

Les observations cliniques ont été renforcées par des modèles murins de GVHD (98-101) ou de SLE (pour Systemic Lupus Erythematosus) (102-103). Le principe expérimental est le même dans ces différents modèles : la

pathologie est induite chez une première souris (Cf. **Figure 5**), les splénocytes (contenant les LT « pathogènes ») sont récoltés puis traités par PCE avant d'être réinjectés à une seconde souris syngénique saine. La réinjection de splénocytes photoirradiés protège les seconds animaux du développement de la pathologie. **Cette protection est observée uniquement lorsque les cellules traitées contiennent des clones T « pathogènes ».**

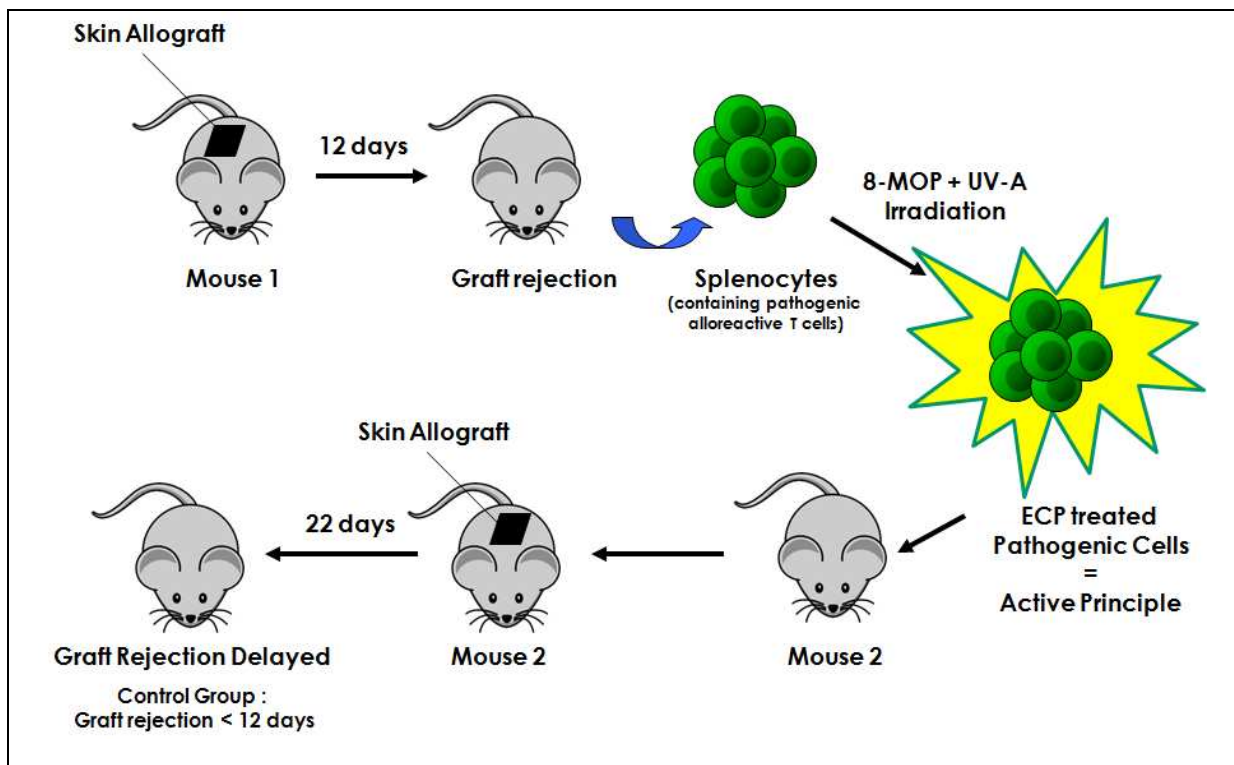


Figure 5 :

Modèle de rejet cutané d'après Perez, Transplantation 1991(104).

Une souris (#1) est greffée avec une peau allogénique. La peau est rejetée en 12 jours post greffe. Les splénocytes de la souris #1 sont récupérés et traités *in vitro* par PUVA. Ils sont réinjectés à une deuxième souris syngénique (#2). Lorsque l'on greffe de la peau allogénique à la souris #2 ayant reçu les cellules traitées, on observe un rejet décalé à 22 jours. Ainsi la réinjection de cellules « pathogènes » traitées par PCE inhibe la réaction de rejet de l'allogreffe.

On retrouve une certaine analogie entre le modèle d'étude de la PCE développé par Perez *et al.* et celui du groupe d'Irhun Cohen (105) portant sur la protection du développement de l'EAE (Experimental Allergic Encephalomyelitis) (**Figure 6**). Dans ce modèle expérimental de maladie autoimmune, la pathologie est initialement induite chez des rats sains en leur

injectant la protéine basique de la myéline (MBP) en présence d'adjuvant complet de Freund. Ceci induit une réponse autoimmune dirigée à l'encontre des cellules nerveuses myélinisées et conduit à leur destruction. Les cellules responsables de la pathologie sont des LT CD4⁺ anti-MBP. Si l'on vaccine un rat sain avec des cellules T « pathogènes » altérées par irradiation γ , l'injection ultérieure de MBP n'induit pas d'EAE. Dans ce modèle, la protection est également antigène spécifique. En effet le second animal est protégé de l'apparition de clones T CD4⁺ anti-MBP et il reste immunocompétent.

Bien que le traitement des cellules T « pathogènes » soit différent (8-MOP+UV-A versus Irradiation γ) le « principe actif » dans ces expériences est similaire : il se compose de **LT « pathogènes » altérés**. Il est important de noter que **les travaux du groupe de Cohen représentent la base des travaux d'Edelson pour le développement de la PCE**.

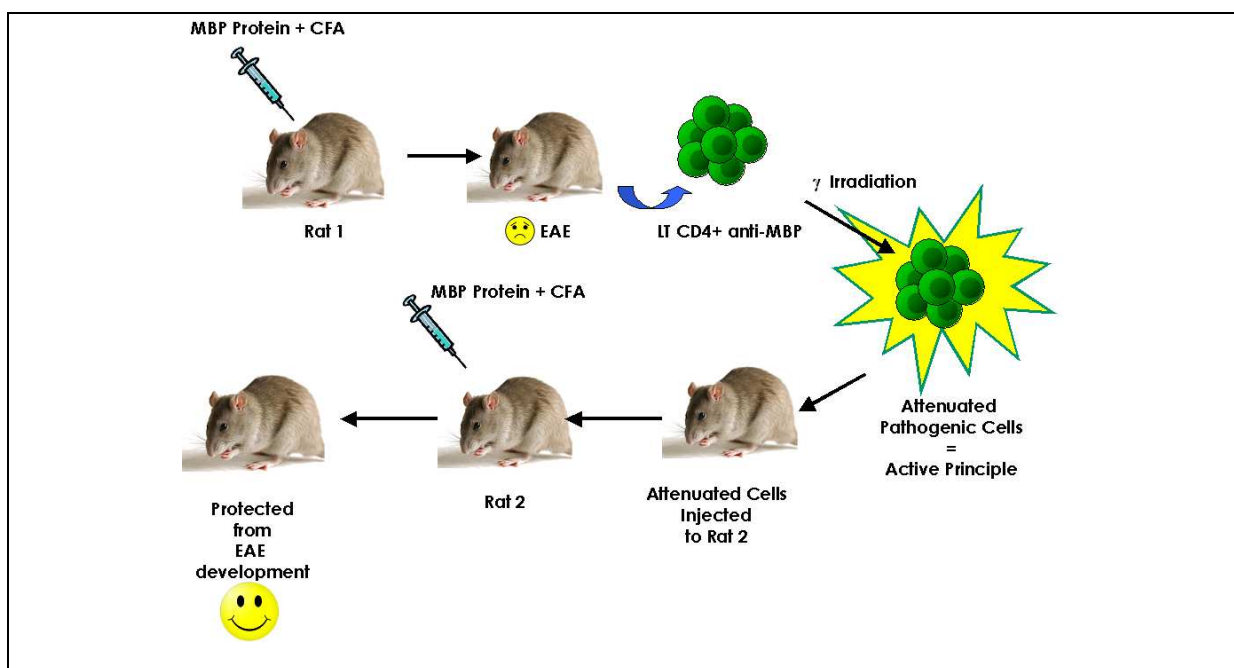


Figure 6 :

Modèle d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) d'après Ben-Nun, Nature 1981(106).

Chez l'Homme, les pathologies traitées par PCE sont différentes mais dans toutes les situations pathologiques rencontrées, le point commun réside dans la nécessité de la présence **des cellules T « pathogènes »** pour obtenir **un effet thérapeutique de la PCE**. Les cellules T « pathogènes » modifiées par photochimie représentent « le principe actif » (107) (**Figure 7**) et la réinjection répétée de ces cellules va entraîner un contrôle par le système immunitaire de l'ensemble des cellules pathogènes (non traitées). Ainsi la PCE induit une **immunomodulation spécifique** des clones T pathogènes.

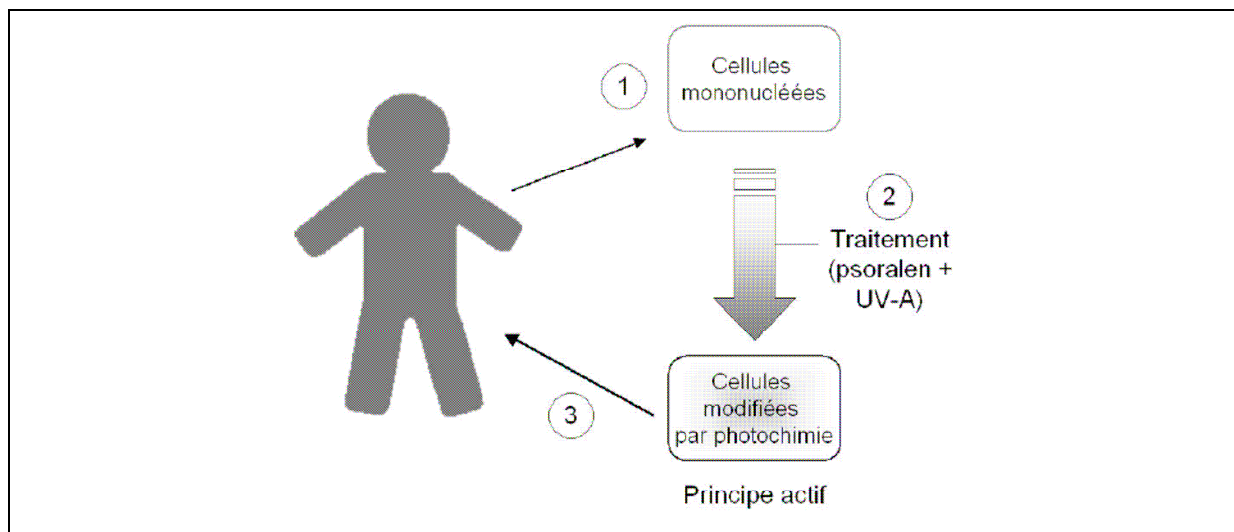


Figure 7 :

Procédure simplifiée de la PCE. (1) Les cellules monoclueées du patient sont collectées par aphérèse. (2) Elles sont ensuite irradiées aux UV-A en présence de 8-MOP (3) Enfin, les cellules pathogènes modifiées par photochimie (principe actif de la PCE) sont réinjectées au patient. Source: Hannani, Rev Med Int 2010 (107)

Ainsi, nous proposons la PCE comme **une immunothérapie par cellules modifiées par photochimie** permettant d'initier une réponse immunitaire spécifiquement dirigée à l'encontre des lymphocytes T « pathogènes ».

B. Comment le système immunitaire peut-il contrôler les LT « pathogènes » ?

a. La réponse immunitaire T et sa régulation:

La réponse immunitaire T spécifique est essentielle à la protection de l'individu à l'encontre des virus, des bactéries et du développement tumoral. On peut résumer cette réponse en 3 phases (**Figure 8**):

Initiation : L'induction d'une réponse T nécessite une quantité d'antigène adaptée qui, combinée aux signaux de l'environnement sont « intégrés » par les DC qui initient une réponse T appropriée (pro- ou anti-inflammatoire, humorale, cellulaire..). Les antigènes sont apprêtés et présentés aux LT naïfs par les DC dans le contexte des molécules du CMH.

Action/effectrice : Les LT qui ont proliféré, mûrent en cellules effectrices (LT CD4⁺ helper : Th1, Th2, Th17, LT régulateurs et des LT CD8⁺ cytotoxiques) capables d'éliminer l'agent pathogène.

Contraction : Une fois l'antigène éradiqué, les cellules effectrices sont éliminées. Durant la phase de contraction, seules quelques cellules survivent et se différencient en cellules T mémoires, capables de répondre beaucoup plus rapidement lors d'un second événement pathogène similaire.

En parallèle d'une réponse effectrice, de nombreux mécanismes de régulation sont impliqués tels que l'Activation-Induced Cell Death ou AICD (apoptose induite par la liaison FAS-FAS-L) (108). Ces mécanismes sont plus ou moins spécifiques de l'antigène.

En revanche, les LT régulateurs sont capables d'inhiber spécifiquement les LT effecteurs(**Figure 8**). Au cours de la réponse immunitaire, leur nombre est inversement proportionnel à celui des LT effecteurs. Il s'accroît jusqu'à l'extinction de la phase effectrice(109).

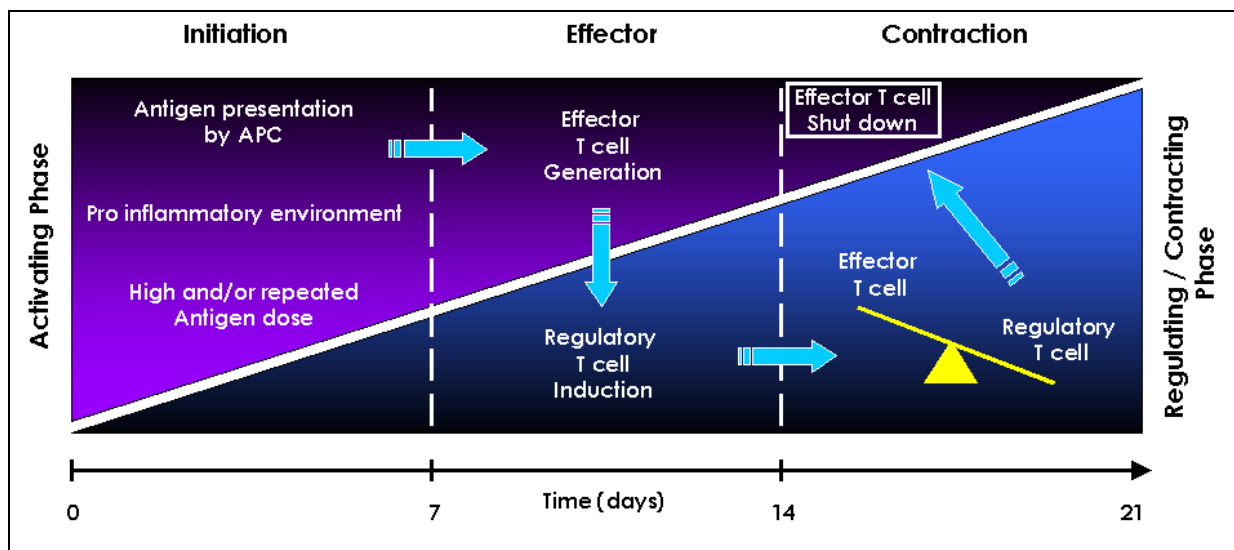


Figure 8 :

Schéma synthétique des 3 phases majeures d'une réponse immunitaire T.

La **régulation spécifique** d'un clone T du soi (ou anti-soi) passe notamment par l'**induction en périphérie de lymphocytes T régulateurs**, capables de le contrôler par contact direct, indirectement par la production de cytokines anti-inflammatoires, ou par cytotoxicité (109). Seuls ces mécanismes de régulation T spécifiques seront développés ici.

b. Les Lymphocytes T régulateurs :

i. Définition :

Les cellules T régulatrices sont fonctionnellement définies par leur capacité à **prévenir** ou **stopper** le développement de réponses immunitaires **indésirables**, excessives : inflammatoires, dirigée contre le soi : autoimmunes.

ii. Les lymphocytes T régulateurs CD4+ :

Les LT régulateurs (Treg) CD4+ les mieux caractérisés sont les Treg naturels ou nTreg. Ils prennent naissance au niveau du thymus, lors de la sélection thymique (Cf. **Table 4**) (110-111). Les lymphocytes T autoréactifs de forte affinité sont éliminés tandis que ceux ayant une affinité intermédiaire peuvent être convertis en LT régulateurs. Le processus de conversion n'est pas encore bien élucidé (112). Les Treg sont caractérisés par l'expression constitutive de CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2, ainsi qu'une forte expression du facteur de transcription forkhead box P3 (FoxP3). Ces Treg CD4+CD25+FoxP3+ ont été décrits comme jouant un rôle majeur dans la prévention de pathologies autoimmunes.

Cellules T régulatrices CD4+		Phénotype	Induction	Mode de suppression	Cibles
nTreg		CD4+CD25+ FoxP3+	Thymique	Contact (GITR, CTLA4), IL-10, TGF β	APC, LT
i Treg (induits en périphérie)	Tr1	CD4+CD25+ FoxP3+	IL-10	IL-10 +++ TGF β +	LT, APC
	Th3	CD4+CD25+ FoxP3+	TGF β , IL-4	TGF β +++ IL-10+	LT, APC

Table 4 :

Récapitulatif des différentes populations de LT régulateurs CD4+ chez l'Homme ainsi que leur phénotype, mode d'induction, mode d'action et leurs principales cibles.

La régulation des clones T auto-réactifs, alloréactifs, ou LT effecteurs trop abondants, est un phénomène qui se développe au niveau des organes lymphoïdes secondaires à travers la génération de Treg dits induits (iTreg) (113). La génération d'iTreg dépend de l'environnement dans lequel les LT CD4+ naïfs ont été activés. Seules les APC professionnelles telles que les DC sont capables d'activer des LT CD4+ naïfs (priming) en LT CD4 effecteurs ou

mémoires. La nature des LT CD4⁺ effecteurs induits dépend de l'état de l'APC qui lui-même est dépendant des cytokines et de l'antigène.

Dans un contexte inflammatoire, en présence d'IFN γ et d'IL-12, les APC induisent des LT CD4⁺ helpers de type 1 (Th1) capables de produire entre autres, de l'IFN γ et de favoriser une réponse T CD8⁺ cytotoxique (Cf. **Figure 9**). En présence d'IL-4, les APC favorisent la différenciation des LT CD4⁺ en Th2 capables de soutenir une réponse humorale forte via la production de cytokines telles que l'IL-4, IL-5 et l'IL-13. En présence d'IL-6 et de TGF β , les APC favorisent la différenciation des LT CD4⁺ en Th17 capables de produire de l'IL-17. Ces cellules récemment décrites, jouent un rôle important dans la physiopathologie de maladies inflammatoires telles que le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn et la GvHD (114-117).

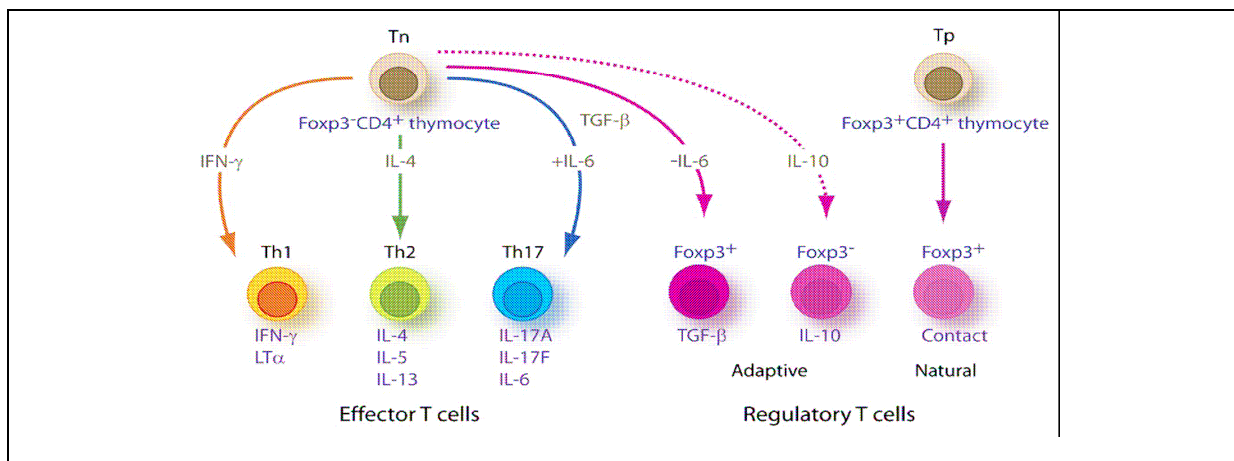


Figure 9 :

Schéma représentant les différentes sous populations CD4⁺ helpers et régulateurs en fonction des cytokines présentées dans l'environnement. Source: Weaver, Immunity 2006

Les iTreg sont générés en présence de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF β ou l'IL-10 (Cf **table 5**). On distingue 2 populations régulatrices: Les Tr1 et les Th3. Les Tr1 sont générés en présence d'IL-10 et sont à leur tour capables d'inhiber les réponses Th1 et Th2 via la production d'IL-10 en grande quantité. Les Th3, sont quant à eux produits en présence de TGF β et le sécrètent à leur tour en grandes quantités. Les LT effecteurs sont rendus anergiques en présence de TGF β (118).

En plus des cytokines polarisantes présentes dans l'environnement, les DC ont également un rôle important à jouer dans l'induction de LT régulateurs. En effet, la présentation d'un peptide à un LT naïf avec un défaut de co-stimulation (CD40, CD80, CD86) entraîne l'anergie de ce dernier. Les APC sont sensibles aux cytokines de leur environnement et la présence de TGF β et/ou IL-10 entraîne un défaut de maturation de ces dernières. Elles sont alors incapables d'initier l'activation des cellules T CD4⁺ en cellules T effectrices de type Th1 ou Th2 ou des cellules T CD8⁺ cytotoxiques (**Figure 10**). Elles diminuent l'expression des molécules de co-stimulation, ne produisent plus ou peu d'IL-12 et enfin produisent de l'IL-10 favorable à la génération de Treg de type Tr1 (119). L'expression de la molécule PD-L1 (programme death ligand 1) par les APC joue un rôle également très important dans l'induction et le maintien des iTreg (chez la souris) lors d'interactions APC – cellule T (120).

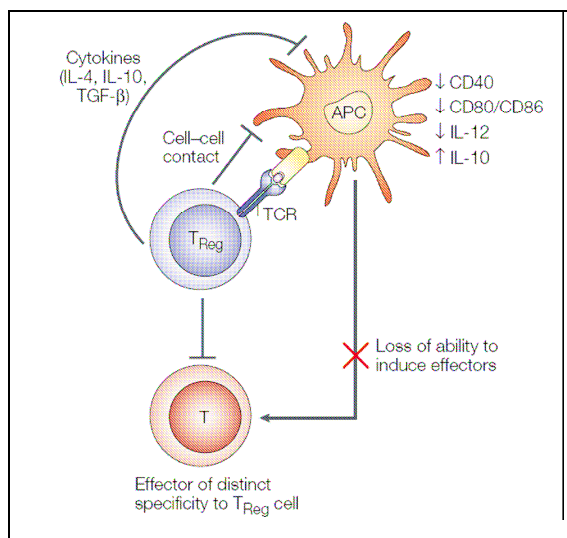


Figure 10 :

Mode d'action des Treg sur les cellules présentatrices de l'antigène (APC). Le Treg induit un défaut de maturation de l'APC via la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et/ou par des signaux inhibiteurs de contact. Source: Von Herrath, Nat Rev Immunol 2003.

Les cellules apoptotiques sont connues pour produire de l'IL-10 et du TGF β (121-124). Ainsi, leur présence dans l'environnement ou leur phagocytose préalable par les APC peut affecter les fonctions de ces dernières et conduire à la génération de LT régulateurs.

iii. Les Lymphocytes T régulateurs CD8+ :

Le concept de LT CD8+ régulateurs (Treg) ou suppresseurs est relativement ancien (125). L'existence de ces Treg CD8+ a été démontrée au cours des 10 dernières années (126-128) grâce aux avancées techniques permettant une meilleure caractérisation phénotypique et fonctionnelle de ces cellules, notamment grâce à la cytométrie en flux. Il existe plusieurs sous populations de Treg CD8+. Elles diffèrent phénotypiquement selon leur origine et leur mode d'action. Les différentes populations sont reportées dans la **table 5** ci-dessous.

Cellules T régulatrices CD8+	Phénotype	Induction	Mode de suppression	Cibles
Thymique nTreg (naturels)	CD8+ HLAG+	Naturelle	HLA-G soluble	-
	CD8+CD122+	Naturelle	IL-10, TGFβ	-
Périphérique iTreg (induits)	CD8+FoxP3+	AutoAg et Pathogènes	IL-10, TGFβ, CCL4	LT, APC
	CD8+NKG2A+	AutoAg et Pathogènes	-	LT
	CD8+CD28-	AutoAg et alloAg	ILT3, ILT4, IDO	APC
	CD8+CD103+	AlloAg	?	LT, APC

Table 5 :

Récapitulatif des différentes populations de LT régulateurs CD8+ chez l'Homme ainsi que leur phénotype, leur mode d'action et leurs principales cibles.

Comme pour les LT CD4+, il existe 2 catégories de Treg CD8+ selon leur origine: les Treg naturels, générés dans le thymus, et les Treg induits, générés en périphérie, dans les organes lymphoïdes secondaires.

On distingue 2 sous populations de **Treg CD8+ naturels**.

- les Treg CD8+HLA-G+ qui sont capables d'inhiber les LT effecteurs via la sécrétion de HLA G soluble (129). HLA-G est connu pour l'induction de

tolérance lors de la grossesse. Plus récemment il a été démontré que HLA-G pouvait être impliqué dans l'inhibition de prolifération des LT CD4⁺ et CD8⁺ allogéniques (130-131).

- Les Treg CD8+CD122+ (CD8+CXCR3⁺ chez l'homme) qui ont la capacité d'inhiber la production d'IFN γ et la prolifération des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ activés en sécrétant de l'IL-10. Cette fonction suppressive est induite par des signaux de co-stimulations de type CD28-B7 et dépendante d'une reconnaissance par le TcR (132-133).

Et 4 autres sous-populations de **Treg CD8⁺ induits** en périphérie après contact avec l'Ag.

- Les Treg CD8+FoxP3+ qui sont générés au contact d'Ag du soi ou du non-soi. Ils sont eux même subdivisés en sous-populations : CTLA4⁻, CTLA4⁺ ou CD45 RC^{low}.
 - o Les Treg CD8+FoxP3+CTLA-4⁻ ont un pouvoir suppressif qui est principalement médié par la production d'IL-10, de TGF β et de CCL4 (134-136).
 - o Les Treg CD8+FoxP3+CTLA-4⁺ dont l'inhibition est contact-dépendante (112).
 - o Les Treg CD8+FoxP3+CD45RC^{low}, induits en stimulant des LT CD8⁺ naifs avec des cellules dendritiques plasmocytoïdes (pDC) en présence d'IL-10, inhibent les réponses primaires T via la production d'IL-10 mais pas de TGF β (137-138). Ils ont également été décrits *in vivo* chez des patients ayant reçu une transplantation de rein, tolérants à long terme (139).
- Les Treg CD8+NKG2A+ dont les modes de suppression ne sont pas encore bien connus (Mingari, Curr Opin Immunol 2005).
- Les Treg CD8+CD28- sont caractérisés par l'absence d'expression de CD28 (140). Leur mode de suppression est exercée par contact avec

des APC, conduisant à la surexpression de molécules inhibitrices, «l'inhibitory immunoglobulin-like transcript» (ou ILT) 3 et 4 par ces dernières. La surexpression d'ILT3 par des APC est associée à l'inhibition de l'activation du facteur de transcription NFκB conduisant à un défaut de maturation de ces dernières. Ces APC acquièrent une capacité tolérogène et ne sont plus capables d'induire des réponses primaires de type Th1.

- Les Treg CD8+CD103+. Nous nous concentrerons dans la suite sur les mécanismes d'induction et d'action de ces Treg plus particulièrement ciblés pour être impliqués dans les mécanismes d'action de la PCE (141).

iv. Les LT régulateurs CD8+ CD103+ alloantigènes spécifiques:

L'intégrine αEβ7 ou CD103 est le récepteur à l'E-cadhérine et a été décrit comme étant une molécule d'adressage (homing) des LT CD8+ au niveau des épithéliums (142). CD103 est également exprimée par les LT CD8+ infiltrant les greffons allogéniques. Hadley *et al.* (143) ont été les premiers à démontrer l'expression de CD103 sur les LT CD8+ alloactivés ayant infiltré des greffons rénaux.

Ces cellules T CD8+CD103+ peuvent être générées *ex vivo* après une stimulation allogénique (141). Elles ont été décrites pour avoir des propriétés suppressives et sont capables d'inhiber la prolifération de cellules autologues lors d'une réaction mixte lymphocytaire (MLR). Bien qu'elles sécrètent de grandes quantités d'IL-10, leur action suppressive est contact dépendante (141). L'expression de CD103 lors d'une MLR est augmentée en présence d'IL-4, d'IL-10 ou de TGFβ et diminuée par la présence d'IL-12. De plus le TGFβ a la propriété de favoriser et maintenir l'expression de CD103 (144). Il est intéressant de noter que l'expression de CD103 par les Treg CD4+FoxP3+ a également été rapportée (145).

c. La réponse régulatrice anti-clonotypique :

i. Définition :

Une réponse T anti-clonotypique est une réponse immunitaire T dirigée à l'encontre d'une population clonale de LT, spécifique de déterminants antigéniques (idiotopes) exprimés par le TcR.

ii. Les LT CD8+ régulateurs cytotoxiques anti-clonotype:

A la fin des années 70, Bellgrau *et al.* (146) ont démontré l'existence d'une réponse immunitaire T à l'encontre de LT dans un modèle de GvHD chez le rat. Dans ce modèle, la GvHD est induite en injectant à des rats F1 (AxB), ayant subi préalablement une irradiation corporelle totale (ou TBI pour Total Body Irradiation), des lymphocytes T d'un des parents (A ou B). La TBI cause une immunodépression, et les LT d'origine parentale vont réagir à l'encontre des antigènes de l'autre parent (B ou A respectivement), causant une GvHD. Les rats F1 n'ayant pas reçu de TBI (rats immunocompétents) sont résistants au développement de la GvHD après injection de LT d'origine parentale. L'injection des splénocytes provenant des rats résistants, à des rats ayant reçu une TBI protège ces derniers du développement de la GVHD, suite à l'injection de LT parentaux. La déplétion des cellules T contenues dans les splénocytes provenant de rats résistants abolit leur effet protecteur après réinjection à des animaux ayant reçu une TBI. Ce travail démontre **l'existence d'une réponse immunitaire T capable de réagir spécifiquement à l'encontre de lymphocytes T** pathogènes semi-allogéniques.

Au début des années 80, il a été démontré que dans le modèle de l'EAE cette réponse T anti-T « pathogènes » passait par une reconnaissance spécifique du TcR des lymphocytes « pathogènes », ici des LT CD4+ anti-MBP

(106, 147). De plus, il a été démontré que la vaccination avec des peptides issus de la région V β d'un TcR exprimé par un clone, empêchait par la suite l'apparition de ce clone (148). C'est une **réponse anti-TcR**. Les fragments peptidiques du TcR ou idiotopes sont présentés dans le contexte des molécules de classe I et II aux LT CD4+ et CD8+ anti-TcR.

Ces lymphocytes T anti-clonotypiques sont cytotoxiques et par conséquent sont des **cellules régulatrices** au sens large du terme.

Plus tard, il a été démontré qu'une partie de la population régulatrice des LT CD8+ anti-TCR était restreinte par les molécules du CMH Ib (non-classiques), notamment HLA-E ou Qa-1 (chez l'Homme ou la souris respectivement). Ce point est développé dans la partie suivante.

iii. Les LT CD8+ régulateurs HLA-E restreints :

Au début des années 1990, Hong Jiang (149) a démontré dans le modèle de l'EAE l'importance de la population LT CD8+ dans le contrôle de la pathologie. Après une première injection de MBP protéine (induction de l'EAE suite à l'activation de LT CD4+ anti-MBP autoréactifs), et après une première rémission spontanée de la pathologie, les animaux sont protégés d'un développement secondaire de l'EAE suite à une seconde injection de la MBP. L'injection préalable d'un anticorps anti-CD8 abolit totalement la protection des animaux suggérant l'absence de régulation par les LT CD4+. Il démontra par la suite que les LT CD4+ pathogènes étaient contrôlés par des LT CD8+ reconnaissant spécifiquement leur TcR (V β 8) et de façon dépendante de la molécule de CMH Qa-1 (HLA-E chez l'Homme) (150-151).

De même, la vaccination d'animaux avec des cellules T CD4+ V β 8+ activées, induit la génération d'une population régulatrice T CD8+ reconnaissant spécifiquement les peptides issus du TcR V β 8 présentés par Qa-1 (**Figure 11**) (152-154). Récemment, il a été démontré dans le même modèle

qu'après injection de clones T CD4+ anti-MBP activés et altérés, ces derniers sont phagocytés et crossprésentés par des DC capables de « primer » des LT CD8+ suppresseurs HLA-E restreints cytotoxiques *in vivo* (155). Ainsi l'injection d'une population **clonale** de LT **CD4+ activés et altérés** (apoptotiques) permet l'induction d'une **réponse régulatrice LT CD8+** dirigée **spécifiquement** à l'encontre de ce clone (réponse anti-clonotypique).

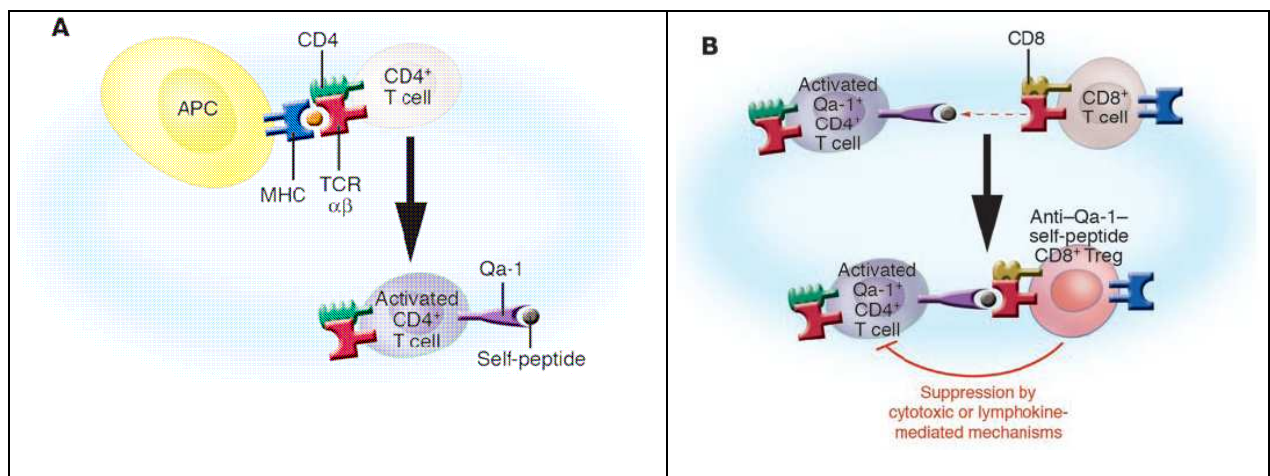


Figure11 :

Schéma représentant l'action des LT CD8+ suppresseurs Qa-1 restreints. (A) l'activation d'un LT CD4+ par une APC conduit à l'expression de la molécule Qa-1 présentant des peptides du soi, notamment des peptides issus du TCR par le LT CD4+ activé. **(B)** Le clone T CD4+ activé va être régulé par un LT CD8+ régulateur spécifique du peptide présenté par le clone LT CD4+ activé et restreint par la molécule Qa-1. Source : Jiang, J Clin Invest 2004 (156)

d. La réponse régulatrice anti-ergotypique :

i. **Définition :**

Ergotope :

« Ergo » est d'origine latine. Cela signifie « en travail / en activité ».

Ainsi un ergotope est un épitope (ou déterminant antigénique) spécifiquement exprimé par des cellules activées. Un ergotope T est donc par

définition dérivé d'un marqueur d'activation T. Ces épitopes sont présentés dans le contexte des molécules de CMH de classe I et II.

Lymphocyte T anti-ergotypique :

Ce sont des lymphocyte T CD4⁺ ou LT CD8⁺ (TcR- $\alpha\beta$ ⁺ ou TcR- $\gamma\delta$ ⁺) ayant pour cible un ergotope dont les cibles antigéniques sont les cellules activées.

ii. Les ergotopes et la régulation anti-ergotypique:

La chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25) apparaît comme un très bon candidat d'ergotope. En 2004, Mimram *et al.* ont mis en évidence (157) l'apparition d'une population T anti-ergotypique reconnaissant spécifiquement CD25 suite à la vaccination de rats à l'aide de l'ADN codant pour CD25. Dans un modèle de maladie autoimmune, cette vaccination protège les animaux de l'apparition de la polyarthrite (développée par le groupe contrôle). Dans ce modèle, les LT « pathogènes » expriment CD25 en s'activant et sont reconnus et éliminés par les LT anti-ergotypiques (anti-CD25) avant l'apparition des signes de la pathologie. L'expression de **CD25** étant restreinte aux LT activés, ce marqueur d'activation constitue un **ergotope T spécifique**.

L'HSP60 (Heat Shock Protein) est une protéine de stress exprimée par l'ensemble des cellules de l'organisme. Elle a été décrite comme jouant un rôle en tant que médiateur inflammatoire (158-159). HSP60 est présentée dans le contexte du CMH par les LT activés. De façon intéressante, la vaccination de rats à l'aide d'un ADN codant pour le gène de l'HSP60 les protège du développement de la polyarthrite, de façon similaire à la vaccination par l'ADN codant pour CD25 (160). Ainsi, bien que HSP60 soit présente dans différents types cellulaires, le fait qu'elle soit présentée par des LT CD4⁺ activés et qu'elle soit antigénique fait tout de même de cette protéine un

ergotope car la reconnaissance de HSP60 permet une élimination des LT CD4⁺ activés. On parle « d'ergotopes partagés ».

Les Lymphocytes T régulateurs anti-ergotypiques sont des Lymphocyte T CD4⁺ ou CD8⁺ $\alpha\beta$ ⁺ ou des LT $\gamma\delta$ ⁺. Les LT $\alpha\beta$ ⁺ reconnaissent les peptides ergotopes présentés dans le contexte du CMH et les LT CD8⁺ $\alpha\beta$ ⁺ exercent une activité cytotoxique à l'encontre des LT activés. Contrairement aux LT $\alpha\beta$ ⁺, le mécanisme de reconnaissance des LT CD4⁺ activés par les LT $\gamma\delta$ ⁺ anti-ergotypiques n'est pas restreint par le CMH (Classe I et II) (157). L'induction des T régulateurs anti-ergotypique est schématisée de façon simplifiée dans la **figure 12**.

La réponse anti-ergotypique est très certainement un des mécanismes de régulation constitutif chez l'individu sain. C'est un phénomène bénéficiant d'un grand champ d'action car il régule l'ensemble des lymphocytes T CD4⁺ activés. C'est un moyen par lequel le système immunitaire peut limiter l'expansion trop importante d'un clone T CD4⁺ et apparaît comme un phénomène garant de l'homéostasie lymphocytaire T.

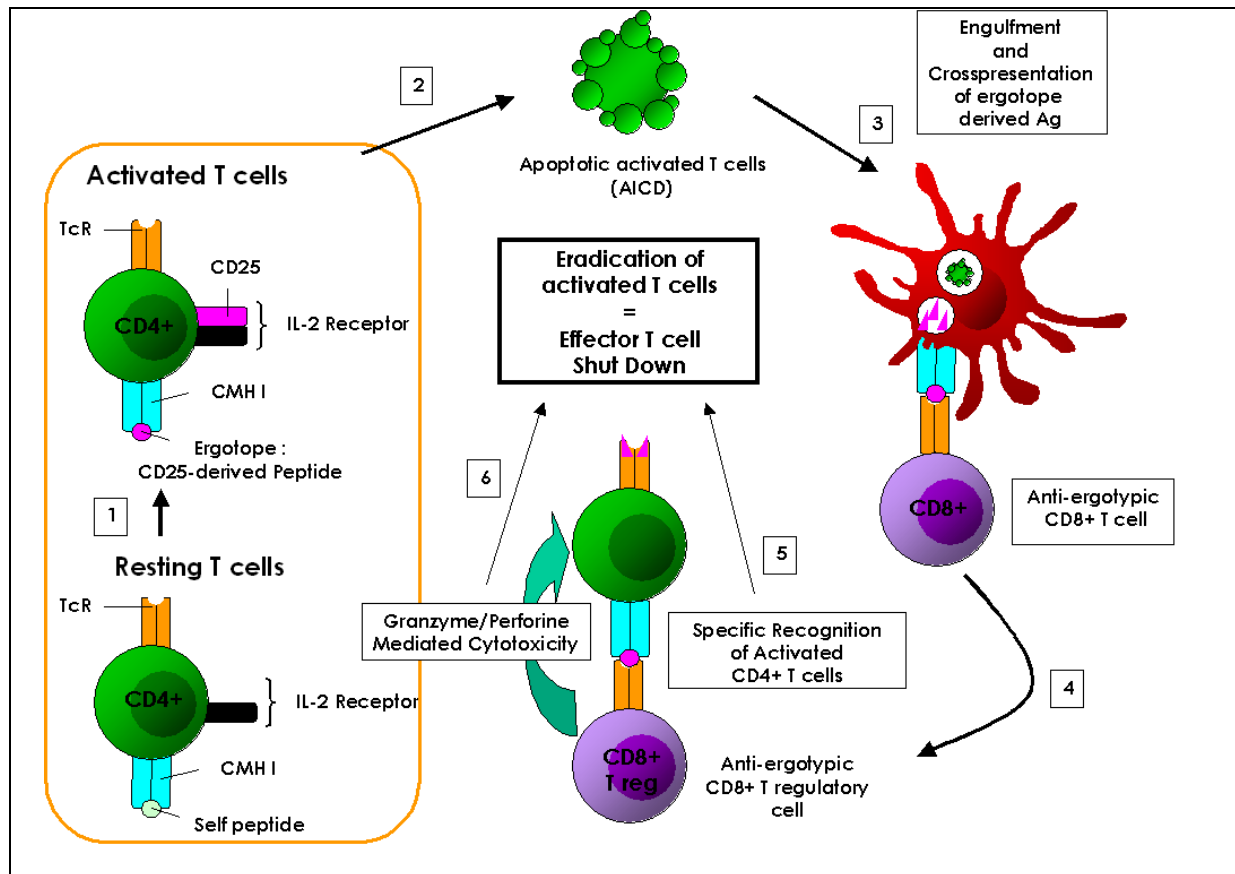


Figure 12 :

Induction d'une réponse régulatrice CD8+ anti-ergotypique. Les LT CD4+ expriment (1) des ergotopes en s'activant, ici CD25. Plus tard une partie de ces LT vont entrer (2) en apoptose notamment par l'AICD. Les antigènes issus de ces LT apoptotiques pourront (4) être apprêtés et cross-présentés par les DC aux LT CD8+. Parmi ces antigènes, on retrouve des ergotopes. La présentation de ces peptides issus d'ergotopes dans le contexte du CMH de classe I induit (4) une réponse T CD8+ anti-ergotypique (spécifiques de peptides issus du CD25 dans cet exemple) conduisant à (5) la reconnaissance et (6) à l'élimination de l'ensemble des LT CD4+ activés. Ceci permet *in fine* l'extinction des réponses immunitaires après élimination de l'antigène et permet notamment de contrôler l'expansion des LT CD4+ au cours de ces réponses.

e. Les Lymphocytes NK T régulateurs :

Les lymphocytes Natural Killer T (NKT) sont une sous population de lymphocytes partageant des caractéristiques des cellules NK comme l'expression du CD161 et du CD94 et des caractéristiques des LT en exprimant un TcR $\alpha\beta$. L'expression d'un TcR les différencie fondamentalement des Lymphocytes NK. Parmi les NKT, les plus étudiés expriment un TcR semi-invariant : le V α 24-J α 18 et V β 11 chez l'Homme. De plus ce TcR invariant ne reconnaît pas des peptides associés au CMH I et II classiques mais des glycolipides présentés par CD1d, une molécule du CMH non classique et non polymorphique. Les NKT se différencient au niveau du thymus, on les retrouve de façon prédominante dans le foie et leur fréquence dans le sang périphérique représente 0.2% des lymphocytes T.

Peu de ligands naturels des NKT sont connus à nos jours. On en dénombre 6 : 3 ligands endogènes et 3 autres bactériens (pour une review : (161)). Le ligand le plus efficace pour activer les NKT est le glycolipide synthétique α -galactosylceramide (α GalCer), initialement dérivé d'une éponge marine. Il est largement utilisé comme antigène hautement spécifique aussi bien chez l'Homme que chez la souris.

La capacité des NKT à répondre très rapidement après activation par la sécrétion de cytokines est typique d'une réponse de l'immunité innée. Ils peuvent produire à la fois des cytokines Th1 notamment de l'INF γ et des cytokines Th2 telles que de l'IL-4, IL-13 et de l'IL-10 et, selon l'environnement et l'Ag, les NKT sont capables de sécréter uniquement des cytokines de type Th1 ou de type Th2 (161). En présence d'IL-12 les NKT produisent de l'IFN γ (162) tandis que l'IL-2 induit la production d'IL-5 et IL-13 (163). Anna Beaudoin *et al.* ont démontré dans un modèle de souris NOD que les NKT étaient capables d'inhiber la différenciation de LT CD4⁺ pathogènes spécifiques des îlots pancréatiques responsables du diabète de type I en effecteurs Th1 (164). Dans ce modèle, les NKT ont donc un rôle protecteur dans le développement

de l'auto-immunité. Il a ensuite été démontré que cette inhibition était contact-dépendante (165). Plus récemment, il a été montré dans un modèle d'infection au LCMV chez la souris que les NKT pouvaient coopérer avec les Cellules Dendritiques plasmocytoïdes (pDC) via une interaction OX40-OX40L induisant une production d'IFN de type I par les pDC. Cette production est tissu-spécifique car elle a lieu au niveau du pancréas et pas au niveau de la rate. Ainsi, la forte production d'IFN de type I par les pDC permet de réduire la charge virale, protégeant les cellules pancréatiques d'une destruction causée par la mise en place d'une immunité antivirale.

Dans un autre modèle dans lequel le diabète de type I est causé par l'injection de LT CD8⁺ spécifiques du virus de l'influenza (Flu) à des souris exprimant spécifiquement au niveau des cellules β des îlots pancréatiques des antigènes de Flu (166), la présence de NKT invariants exacerbe la réponse CD8⁺ en favorisant à la fois l'activation, la prolifération et la différenciation des LT CD8⁺ en cellules effectrices produisant de l'IFN γ .

Ainsi, les NKT semblent jouer un rôle ambivalent aussi bien régulateur qu'activateur de la réponse immunitaire T directement ou indirectement en coopérant avec d'autres cellules de l'immunité. De nombreuses questions subsistent encore sur leur mécanisme d'action.

C. Comment la PCE peut-elle induire une régulation des LT pathogènes ?

La PCE est utilisée depuis plus de 20 ans mais ses mécanismes d'action *in vivo* restent inconnus. L'effet le mieux caractérisé de la PCE est l'induction d'apoptose des cellules traitées. On observe au final en clinique une amélioration de la pathologie traitée sans immunosuppression généralisée suggérant une réponse immunitaire spécifiquement dirigée à l'encontre des LT « pathogènes ». Il existe très peu de données concernant les mécanismes impliqués entre l'induction d'apoptose des cellules traitées et l'effet clinique observé. Dans ce chapitre, nous décrirons dans un premier temps les effets connus et bien caractérisés de la PCE puis nous discuterons de la capacité de la PCE à induire les systèmes de régulation T décrits précédemment.

a. Effets connus de la PCE

i. La PCE induit l'apoptose des cellules traitées

Lors d'un traitement par PCE les cellules mononuclées du sang périphériques sont irradiées par UV-A en présence d'un photosensibilisant : le 8-MOP.

Le 8-MOP est capable de se lier de façon covalente aux bases thymidines de l'ADN (**Figure 13**). En absorbant un photon, il peut former un monoadduit (le 4'5'-monoadduit ou le 3,4 monoadduit) (167-168). En recevant un second photon, il peut se lier à 2 bases thymidines, réalisant ainsi un pontage physique (ou crosslink) entre les 2 brins d'ADN.

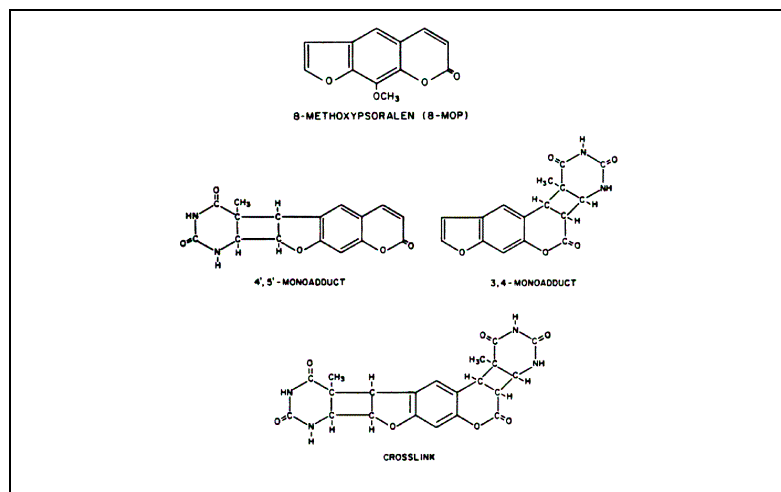


Figure 13 :

Représentation des différentes liaisons possible entre le 8-MOP et l'ADN. Grâce à l'énergie d'un photon, il peut se former des monoadduits (4'5'-monoadduit ou le 3,4 monoadduit). L'énergie apportée par un second photon crée ainsi une double liaison. Cette liaison crée des pontages physiques et covalents entre les 2 brins d'ADN. Source: Gasparro Yale J Biol Med 1985(168)

La conséquence directe des liaisons covalentes dans l'ADN est l'entrée en apoptose des cellules traitées, principalement des lymphocytes et des monocytes (64).

L'apoptose des lymphocytes T a été bien documentée (7-8, 169-173). Le processus apoptotique des LT traités est relativement lent car les premières cellules apoptotiques n'apparaissent qu'au bout de 6 heures après le traitement. En moyenne, 40 à 50% des LT traités sont apoptotiques 24h après PCE et ce phénomène peut atteindre 80% à 24h selon les études (170, 174). Il est important de noter qu'une séance de PCE dure 3 heures et que donc les LT ne sont pas encore entrés en apoptose au moment de la réinjection au patient. Enfin, le traitement PCE induit une inhibition de la prolifération T (175).

L'entrée en apoptose des monocytes après PCE est quant à elle très controversée (169, 176-179). Selon certaines études, ils ont été décrits comme résistants à la PCE. Ce point sera discuté ultérieurement, dans l'**article 2**.

Globalement, il est admis que la PCE induit une apoptose de l'ensemble des cellules traitées, les LT étant les plus rapides à entrer en

apoptose. Ainsi, la **PCE revient à injecter massivement des cellules encore vivantes** mais ayant **entamé l'entrée en apoptose**.

Enfin, le 8-MOP est également capable de se lier aux protéines et aux lipides. Très peu d'études se sont intéressées à ces interactions (180-182) et les conséquences immunologiques n'ont pas été approfondies.

ii. Données cliniques : la PCE induit un contrôle spécifique des LT pathogènes

Les données cliniques concernant la PCE, largement rapportées dans la partie « II -Applications cliniques », nous indiquent que :

1. La PCE est une technique de thérapie cellulaire efficace qui est utilisée dans le traitement de pathologies causées par des Lymphocytes T i.e des LT « pathogènes ».
2. Le clone T « pathogène » **doit être présent** dans l'échantillon traité pour que l'effet thérapeutique soit observé.
3. Après plusieurs séances, la PCE induit une amélioration des manifestations cliniques liées aux clones T « pathogènes » (des plaques érythémateuses du CTCL, des destructions des tissus dans la GvHD et de l'autoimmunité, des rejets d'organes transplantés).
4. En traitant une partie des clones T « pathogènes » (présents dans l'échantillon traité), on obtient un effet sur **l'ensemble** de ces derniers i.e amélioration des manifestations cliniques de la pathologie traitée.
5. Contrairement aux immunosuppresseurs chimiques, la PCE semble offrir une immunorégulation sélective des clones T « pathogènes » sans induire d'immunosuppression généralisée.
6. Elle permet la diminution des doses d'immunosuppresseurs et réduit ainsi les effets indésirables à long terme associée à ces derniers.

Toutes ces observations cliniques suggèrent très fortement que la PCE, à travers la réinjection de clones T « pathogènes » altérés, **active un ou plusieurs systèmes de régulation** immunitaire, capable(s) de **contrôler (ou d'éliminer) spécifiquement l'ensemble des clones T pathogènes**.

Nous verrons dans la partie suivante comment la PCE pourrait induire ces systèmes de régulations.

b. Réponses régulatrices potentiellement induites par la PCE :

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la PCE induit l'apoptose des cellules traitées. Compte-tenu de leur cinétique d'apoptose, ces cellules sont encore « vivantes » au moment de la réinjection et pourraient conserver certaines fonctions, notamment leur capacité migratoire. Ainsi, avant de développer les hypothèses d'action de la PCE sur le système immunitaire il est nécessaire de traiter 2 points : l'immunogénicité des cellules apoptotiques et leur ciblage après réinjection. Ces 2 aspects sont essentiels à la compréhension des mécanismes de la réponse induite par la PCE.

i. L'apoptose peut être un phénomène immunogène

Il a longtemps été considéré que seules les cellules nécrotiques étaient immunogènes. A l'inverse, les cellules apoptotiques ont été largement décrites comme étant tolérogènes.

Les cellules apoptotiques, notamment les lymphocytes, sont tout d'abord capables de sécréter des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et/ou du TGF β (121-123).

La prise en charge de ces cellules par les phagocytes, peut induire la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF β) par ces derniers, notamment par les macrophages et les DC (183-184). Ceci provoque un

environnement anti-inflammatoire, favorable à la tolérogénisation des APC ainsi qu'à la génération de Treg. C'est un phénomène plutôt actif d'induction de tolérance par les cellules phagocytaires ayant ingéré des cellules apoptotiques.

Le concept d'immunogénicité des cellules apoptotiques a émergé récemment (185-186) et a notamment été mis en évidence dans le contexte de la réponse anti-tumorale (124, 187-188). Le traitement de cellules tumorales par certains agents de chimiothérapie peut induire l'exposition à leur surface des protéines chaperonnes HSP. Ces chaperonnes peuvent capturer des antigènes provenant de la cellule apoptotique et faciliter ainsi leur présentation par les APC (186). Elles favorisent également la reconnaissance des cellules apoptotiques par les APC et participent à l'immunogénicité de celles-ci (189).

De même, selon l'agent de chimiothérapie, les cellules apoptotiques peuvent exposer à leur surface la calréticuline (CRT). Obeid *et al.* ont démontré dans un système expérimental *in vivo* que la vaccination de souris à l'aide de cellules tumorales apoptotiques dépourvues de CRT ne permettait pas d'induire une réponse immunitaire protectrice du développement secondaire de la tumeur (187). L'exposition en surface de la CRT corrèle parfaitement avec l'immunogénicité des cellules apoptotiques. Néanmoins, l'ajout de CRT sur des cellules tumorales vivantes ne suffit pas à les rendre immunogènes. La CRT semble donc essentielle comme premier signal immunogène lors de l'apoptose mais les données suggèrent l'implication d'autres molécules dans l'immunogénicité.

HMGB1 (High Mobility Group Box 1), est une protéine nucléaire non-histone, ayant des fonctions à la fois intra- et extra-cellulaires (190). Elle participe au maintien de la structure chromatinienne. Elle peut s'associer ou recruter des facteurs de transcription et joue donc un rôle dans la transcription des gènes. Dans le milieu extra-cellulaire, HMGB1 agit comme une cytokine pro-inflammatoire (191-192). Les cellules nécrotiques, en

perdant leur intégrité membranaire la relarguent passivement dans le milieu extracellulaire générant ainsi une inflammation (193). A l'inverse cette protéine peut être sécrétée activement notamment par les macrophages activés et les DC myéloïdes matures (192). Lorsque ces cellules sont activées, HMGB1 est acétylé, provoquant sa translocation du noyau vers le cytoplasme puis vers des vésicules sécrétoires et enfin sa sécrétion (194). Il était admis que seules les cellules nécrotiques pouvaient relarguer passivement HMGB1 (193) mais récemment, des études ont montré que les cellules apoptotiques en étaient également capables (188, 195-196). Une fois dans le milieu extracellulaire, HMGB1 va pouvoir activer les cellules de l'immunité, notamment les DC via sa liaison avec le récepteur RAGE (receptor for advanced glycation end-products) ou les Toll-Like Récepteurs (TLR) 2 et 4 (197). Ceci conduit à la maturation des DC, à la production de cytokines pro-inflammatoires et au recrutement de leucocytes. Enfin, une étude récente a mis en évidence le rôle crucial d'HMGB1 dans l'immunogénicité de cellules tumorales apoptotiques (188). Dans cette étude, l'engagement du TLR4 est essentiel à l'élaboration d'une réponse anti-tumorale efficace.

Par ailleurs, l'ATP extracellulaire constitue un signal pro-inflammatoire. Les cellules apoptotiques immunogènes relarguent de l'ATP. Celui-ci est reconnu par les DC à travers le récepteur purinergique P2XR7 (198).

Ainsi, l'apoptose considérée durant longtemps comme un processus silencieux et tolérogène peut, selon le mode d'induction de l'apoptose et la nature de la cellule, induire un certain nombre d'évènements (**Figure 14**) qui conduisent à une immunogénicité des cellules apoptotiques : (i) l'exposition en surface de la calréticuline (ii) le relargage dans le milieu des HSP et de l'ATP (iii) puis de HMGB1. Ces messagers inflammatoires sont nommés DAMP (pour Damage Associated Molecular Pattern ou motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires).

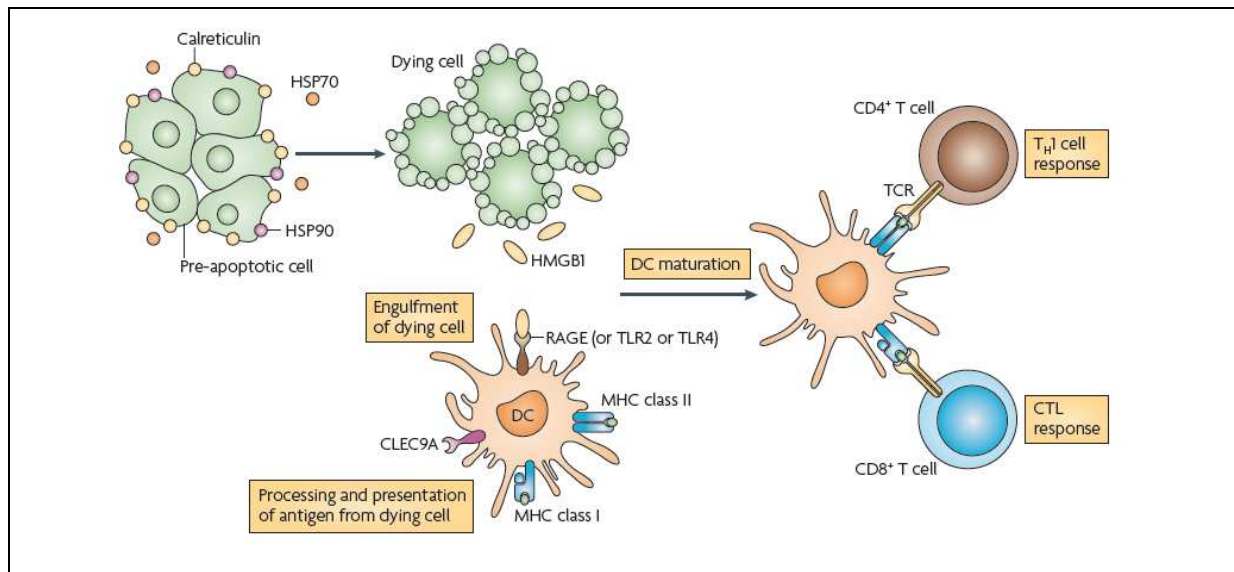


Figure 14 :

Caractéristiques principales nécessaires pour que l'apoptose soit immunogène.

Les cellules apoptotiques exposent à leur surface la calréticuline ainsi que les HSP. Elles peuvent également sécréter ces dernières. Plus tardivement dans l'apoptose, elles peuvent relarguer HMGB1. L'ensemble de ces signaux induira la phagocytose des cellules apoptotiques ainsi que la présentation et la crossprésentation des antigènes issus de ces cellules. Au contact des HSP et d'HMGB1, les DC mûrissent permettant la génération de LT CD4+ Th1 et des LT CD8+ cytotoxiques ou CTL. Source : Green, Nat Rev Immunol 2007 (124).

Immunogénicité ou Tolérogénicité des cellules apoptotiques traitées par PCE ?

A ce jour, aucune étude ne décrit l'immunogénicité ou la tolérogénicité des cellules entrant en apoptose suite au traitement PCE. Cet aspect doit être clarifié car il permettra d'aider à la compréhension des mécanismes d'action de la PCE, en aiguillant sur la nature des réponses immunitaires induites.

ii. La localisation des cellules apoptotiques après réinjection peut être déterminante pour la nature de la réponse induite

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la nature de la réponse immunitaire qui sera induite par les cellules apoptotiques traitées par PCE dépend d'un certain nombre de signaux propres à ces dernières. Au delà de ces signaux, et comme bien souvent en immunologie, l'environnement (le lieu et le moment) où se met en place la réponse doit jouer un rôle essentiel. Cette dimension spatio-temporelle n'est jamais réellement prise en compte lors de la formulation d'hypothèses d'action de la PCE. Nous tenterons donc dans cette partie d'en discuter l'importance.

Chez la souris, l'injection de cellules apoptotiques par voie intraveineuse (i.v) conduit à leur accumulation dans la rate et le foie (199-200). Dans la PCE, les cellules traitées sont réinjectées en i.v et il a été montré dans un modèle murin qu'elles s'accumulaient également dans **la rate et le foie** (201). La rate est un organe lymphoïde secondaire propice à l'élaboration de réponses immunitaires et le foie est un organe dont l'environnement est plutôt décrit comme tolérogène. Même s'il est difficile d'anticiper la nature de la réponse induite dans le contexte de la PCE, quelques travaux relativement similaires à la PCE nous fournissent quelques éléments de réponse.

Philippe Saas et ses collègues ont travaillé sur les propriétés immunomodulatrices de leucocytes allogéniques apoptotiques injectées par voie i.v dans le cadre du traitement de la GvHD. La PCE revenant à injecter massivement des cellules entrant en apoptose en i.v, il est tout à fait pertinent et aisé de faire l'analogie entre les 2 méthodes.

Dans ces études, l'injection de cellules apoptotiques conduisait à l'expansion de Treg TGF β -dépendante au niveau de la rate, les macrophages de l'hôte semblent jouer un rôle fondamental dans ce processus (199, 202-203). Ainsi, après avoir phagocyté des cellules apoptotiques injectées par voie iv, les

macrophages de la rate sécrèteraient du TGF β conduisant à l'expansion de Treg CD4+CD25+FoxP3+. Ces Treg favoriseraient la prise de greffe mais aussi diminuer les risques de développer une GvHD (199, 204). L'injection i.v. de cellules apoptotiques semble donc sans danger et promotrice de tolérance.

Par ailleurs, il a été montré que l'injection de cellules apoptotiques à des souris immunocompétentes peut entraîner la production d'auto-anticorps (205). Ce résultat est expliqué par les auteurs par le fait que lors d'une injection massive de cellules apoptotiques, les macrophages peuvent être « débordés ». Ainsi, les antigènes issus de ces cellules pourraient être captés par des lymphocytes B ou des DC induisant une réponse immunitaire. En absence d'élimination rapide, ces cellules apoptotiques peuvent entamer une nécrose secondaire, un processus hautement inflammatoire. L'ensemble de ces données indiquent que l'injection massive de cellules apoptotiques peut, selon les cas, conduire à l'élaboration d'une réponse immunitaire à l'encontre de ces cellules.

Dans le contexte PCE chez l'Homme, on pourrait s'attendre à ce que les cellules traitées par PCE préapoptotiques aillent également se loger dans la rate et le foie. Ainsi, comme nous l'avons vu plus haut, leur prise en charge par les macrophages devrait conduire à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et donc promouvoir l'induction de tolérance. Néanmoins, un certain nombre d'éléments doit être pris en compte :

1. La quantité de cellules réinjectées : Elle représente une quantité considérable de cellules : 1/8^{ème} de l'ensemble des PBMC du patient. On peut donc aisément imaginer que les macrophages et autres cellules phagocytaires se retrouvent « débordés ». Ainsi ces cellules apoptotiques pourraient créer finalement de l'inflammation.
2. Le foie est considéré comme un organe dont l'environnement est tolérogène bien qu'il ait été démontré qu'il pouvait être le siège d'initiation de réponses T de type Th1 (206-207).

3. Les cellules traitées par PCE ne sont pas encore apoptotiques au moment de la réinjection.

Pour conclure, il n'est pas possible de répondre complètement à la question du ciblage des cellules traitées chez l'Homme. En revanche, elle mérite non seulement d'être posée mais aussi d'être prise en compte lors de l'élaboration d'hypothèses d'action de la PCE. Ces mécanismes d'action potentiels sont complexes et doivent être appréhendés en considérant l'importance de l'espace et du temps dans la dynamique et la nature des réponses immunitaires induites.

A la lumière des systèmes de régulation T décrits plus hauts (Cf B : Comment le système immunitaire peut-il contrôler un LT pathogène ?) et de ces éléments (immunogénicité et localisation des cellules apoptotiques), les mécanismes potentiellement induits par la PCE seront développés dans la suite.

iii. Mécanismes de régulation T potentiellement induits par la PCE

Induction de LT régulateurs CD4+ dans le contexte PCE :

Dès lors que l'efficacité de la PCE a été démontrée dans le traitement de la GvHD, l'hypothèse que celle-ci favorisait l'induction de T reg CD4+ a été avancée. Ainsi, c'est le champ d'investigation qui a le plus été étudié dans la PCE. Les recherches se sont orientées vers l'analyse de l'environnement anti-inflammatoire créé par les cellules traitées par PCE ainsi que l'induction de DC tolérogènes. De nombreuses équipes ont cherché à mettre en évidence une augmentation de Treg chez les patients traités par PCE. Enfin, quelques modèles animaux ont été développés afin de déterminer l'implication des Treg dans les mécanismes d'action de la PCE. Dans ce chapitre, nous développerons l'ensemble de ces points.

Environnement anti-inflammatoire

Dans le contexte de la GvHD, la réinjection massive et répétée de cellules apoptotiques pourrait conduire à la sécrétion d'IL-10 soit par les cellules traitées elles-mêmes soit par les APC (non traitées) les ayant phagocyté (121-123, 184, 208).

In vitro, au contact des cellules apoptotiques traitées par PCE, il a été démontré que des monocytes non traités issus de patients atteints de GvHD étaient capables de sécréter de l'IL-10 (174, 176).

Induction de DC tolérogènes

L'IL-10 crée un environnement anti-inflammatoire propice à la génération de Treg et contribue notamment à l'induction d'APC tolérogènes.

Récemment, il a été décrit qu'en présence de cellules traitées par PCE des DC dérivées de monocytes autologues présentaient un phénotype tolérogènes (défaut de co-stimulation, production d'IL-10, diminution de la production d'IL-12 et TNF α) (209).

La PCE peut aussi modifier la fonctionnalité des DC directement traitées. Gerner *et al.* ont démontré que la PCE induisait un défaut de maturation des 6-sulfo LacNAc DC (SlaDC) traitées(210) , population de DC majoritaire dans la circulation. Ces cellules traitées produisent moins de cytokines inflammatoires. De plus, leur capacité à induire une prolifération de cellules T et une polarisation Th1 est diminuée. Spisek *et al.* ont démontré par ailleurs que les DC entraient en apoptose après traitement par PCE (211). Ainsi, ces DC traitées « tolérogénisées » doivent certainement participer à l'effet immunomodulateur après réinjection, au moins de façon transitoire, mais ne suffisent pas à expliquer les mécanismes de régulation spécifique induits la PCE, et elles ne persistent pas chez le patient.

L'environnement anti-inflammatoire créé par les cellules traitées par PCE induirait donc des APC tolérogènes. Ces dernières favorisent la tolérance

selon différents modes d'actions : défaut de co-stimulation, production de cytokines anti-inflammatoires, défaut de production de cytokines pro-inflammatoires, expression de l'enzyme Indolamine 2,3 dioxygénase (IDO) (212) ou d'arginase (213).

Il est important de noter que l'induction de Treg de « toutes spécificités » ne permet pas d'expliquer le contrôle spécifique des LT pathogènes dans la GvHD. Seules 2 populations de Treg seraient capables d'inhiber spécifiquement ces LT pathogènes :

- Des **Treg spécifiques d'alloantigènes** qui pourraient s'activer dans les tissus du patient, à proximité des LT alloréactifs.
- Des **Treg spécifiques des clones T « pathogènes »** qui pourraient, par reconnaissance spécifique et directe des LT « pathogènes », inhiber leur action.

L'ensemble de ces processus conduisent à l'élimination ou anergie spécifique des LT pathogènes (dans le cadre d'une présentation d'alloantigènes) et sont résumés dans la **figure 15**.

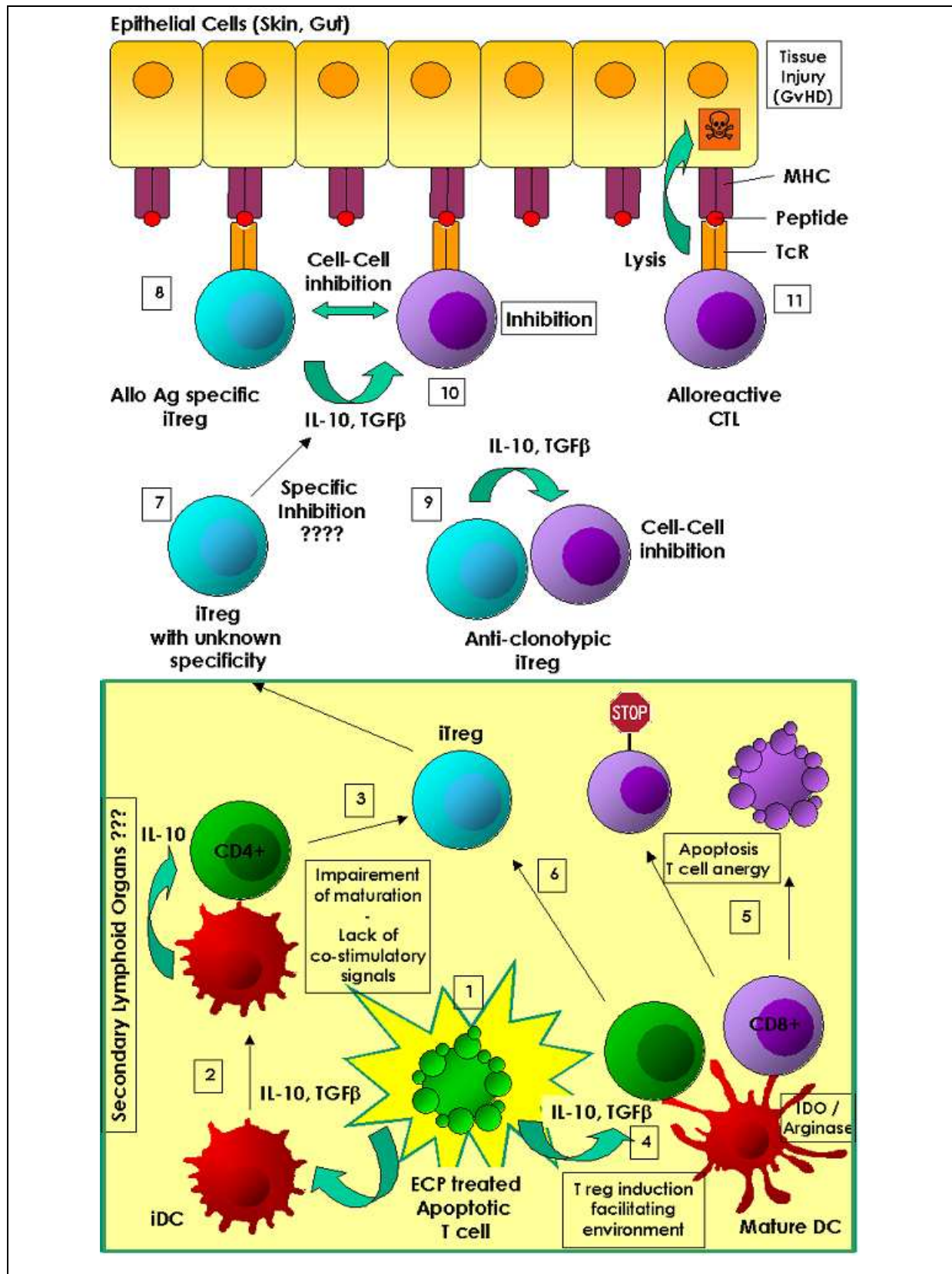


Figure 15 :

Schéma récapitulatif des différentes voies d'induction potentielles de Treg CD4+ chez des patients atteints de GvHD et traités par PCE.

Les cellules traitées par PCE **(1)** sécrètent des cytokines anti-inflammatoires conduisant à deux phénomènes : Tout d'abord **(2)** l'inhibition de la maturation des DC (défaut de stimulation des LT CD4+ alloréactifs) et production de cytokines anti-inflammatoires et donc **(3)** l'induction des LT CD4+ naïfs en Treg.

De plus, un environnement anti-inflammatoire peut aussi induire **(4)** l'expression de l'IDO ou de l'arginase par des DC matures. La déprivation en tryptophane ou arginine causée respectivement par ces enzymes induit **(5)** l'anergie ou l'apoptose des LT CD8+ alloantigènes spécifiques. Ce processus participerait à l'élimination de ces derniers. Enfin, lorsque les APC présentent un antigène aux LT CD4+ dans un environnement anti-inflammatoire, cela peut conduire **(6)** à la génération de Treg CD4+ induits de différentes spécificités.

In fine, des Treg induits **(7)** d'une spécificité inconnue, **(8)** spécifiques d'alloantigènes ou **(9)** anti-clonotypiques vont être **(7, 8 et 9)** activés par leur antigène : respectivement un antigène inconnu, les tissus du receveur ou le clone T pathogène et pouvoir **(10)** inhiber **(11)** l'action cytotoxique des LT CD8+ alloréactifs.

Suivi des Treg chez l'Homme :

Au niveau clinique, le suivi des Treg dans le sang périphérique de patients atteints de GvHD a suscité beaucoup d'intérêt de la part de différents groupes y compris le nôtre. Plusieurs études ont observé une augmentation des Treg CD4+CD25+FoxP3+ circulants au cours du temps chez des patients atteints de GvHD traités par PCE (214-218). Dans chacune de ces études, l'augmentation des Treg au cours du temps et au fil des séances de PCE est montrée mais aucune corrélation avec les signes cliniques n'est réalisée ou observée. De plus, les patients traités par PCE (en très faible nombre dans chaque étude) ne sont jamais comparés à un groupe contrôle non traité, rendant les conclusions difficiles. De la même manière, au sein même du groupe de patients traités par PCE, on retrouve des patients qui sont en réponse partielle ou complète (PR et CR respectivement) et la comparaison des proportions de Treg entre les patients CR et PR n'a pas été faite. Di Biaso *et al.* ont publié la seule étude s'intéressant aux Treg chez les patients répondeurs ou non (219). Ils montrent en effet que la quantité de Treg augmente uniquement chez les patients répondeurs, atteignant un pic à 6 séances, puis le niveau diminue, devenant comparable à celui des patients non répondeurs. Ainsi, il est difficile de conclure sur l'action de la PCE sur les Treg car l'augmentation observée n'a lieu qu'autour de la 6^{ème} séance. Il

n'est pas non plus précisé si l'amélioration de la GvHD apparaît à ce moment précis ou non.

Schmitt *et al.* ont rapporté récemment une augmentation des Treg au fil des séances PCE chez des patients atteints de GvHD (220). Ces Treg CD4+FoxP3+ expriment CD39 qui, combiné à CD73, forme une ectonucléase capable de déphosphoryler l'ATP, formant de l'adénosine, décrite comme ayant des propriétés immunosuppressives (221-222). Au fil des séances de PCE, l'activité ectonucléasique des Treg augmente chez ces patients. Ce mécanisme fait partie de l'arsenal que les Treg ont pour supprimer les réponses inflammatoires et pourrait jouer en partie un rôle dans l'immunomodulation induite par la PCE.

Enfin, dans une étude réalisée au laboratoire sur des échantillons de patients atteints de GvHD au cours des 12 premiers mois post-greffe, nous n'avons pas pu mesurer une augmentation significative des Treg CD4+CD25+FoxP3+ circulants (Pernollet M, Jacob MC, Héquet O et Plumas J, données non publiées) et ce malgré une réponse positive au traitement PCE.

Ainsi, malgré toutes ces études, il n'est pas possible de conclure de façon formelle sur l'induction de Treg par la PCE chez l'Homme et sur leur rôle dans l'immunomodulation spécifique induite chez les patients traités.

Modèles animaux : études *in vivo*

En 2005, Akira Maeda a étudié la PCE dans un modèle murin d'hypersensibilité de contact (CHS pour Contact HyperSensitivity) au 2,4-dinitrofluorobenzène ou DNFB (201). Dans ce modèle, une première souris est sensibilisée au DNFB. Ses splénocytes sont récupérés 24h plus tard puis traités par PCE avant d'être injectés à une souris naïve. Puis cette seconde souris est sensibilisée à son tour. L'œdème de l'oreille est mesuré 5 jours plus tard après application locale de DNFB. Ainsi, on observe que l'injection de splénocytes traités par PCE inhibe l'inflammation de l'œdème donc la sensibilisation des

souris à l'haptène. Cette inhibition est transférable à des souris naïves et est due à la population de DC CD11c+. De plus, Maeda *et al.* ont démontré que ce mécanisme était dépendant de l'IL-10 (223).

Ce modèle comporte néanmoins un biais majeur : Dans la PCE chez l'Homme, les LT représentent une large proportion des cellules traitées or dans le modèle CHS présenté par Maeda, les splénocytes traités sont récupérés 24h après sensibilisation au moment où la rate contient les DC chargées avec l'haptène ayant migré pour induire une réponse immunitaire T mais pas encore de LT spécifiques de l'haptène (Olivier Héquet et Jean-François Nicolas, INSERM U851/EFS, communication personnelle). Dans ce modèle, les cellules traitées sont donc des APC chargées de l'haptène. Le traitement PCE doit leur conférer une certaine tolérogénicité probablement due à un défaut de maturation et de co-stimulation. Ainsi, ce modèle ne reflète pas la situation réelle d'utilisation de la PCE chez l'Homme dans laquelle les cellules traitées doivent contenir les LT pathogènes pour obtenir une efficacité clinique. Donc même si l'analyse de ce modèle est bien argumentée, les conclusions tirées ne peuvent être transposées à la PCE chez l'Homme.

Dans 2 modèles murins de GvHD, Gatza *et al.* (224) ont démontré que la PCE induisait des Treg CD4+CD25+FoxP3+. Le premier modèle comportait une incompatibilité au niveau des antigènes mineurs (réponse T CD8+) et le second une incompatibilité au niveau des molécules de CMH II (réponse T CD4+). Dans ces modèles, une première souris est greffée pour induire une GvHD. Ses splénocytes sont récupérés puis traités par PCE avant d'être injectés à J7, 14, 21 et 28 à une seconde souris greffée. Les souris ayant reçu les cellules pathogènes traitées par PCE ont une survie améliorée, un score clinique plus bas et une prise de greffe plus rapide que le groupe contrôle. Dans ces 2 modèles, une augmentation du nombre et de la proportion de Treg CD4+CD25+FoxP3+ est observée dans la rate, les ganglions et le thymus et la déplétion en Treg abroge complètement l'effet protecteur observé après traitement, démontrant que l'immunomodulation induite par la PCE est

Treg dépendante. Cette étude est la seule étude complète modélisant de façon fidèle la situation clinique des patients atteints de GvHD et les conditions de traitement PCE, nous donnant un argument très fort en faveur de l'induction de Treg CD4+CD25+FoxP3+ chez l'Homme. Il est important de noter que dans ces expériences, la GvHD est diminuée et non totalement inhibée, suggérant que d'autres mécanismes entrent très probablement en jeu. Ce modèle reste néanmoins différent du contexte humain où les cellules traitées par PCE sont des PBMC et non des splénocytes.

Pour conclure, l'induction de Treg de « toutes spécificités » ne permet pas d'expliquer le contrôle spécifique des LT alloréactifs après PCE observé en clinique, seule l'induction de Treg spécifiques d'alloantigènes ou des LT pathogènes pourraient l'expliquer. Ces 2 dernières populations sont de bons candidats pour expliquer l'effet immunomodulateur de la PCE chez l'Homme dans la GvHD, dans les pathologies autoimmunes ainsi que dans l'induction de tolérance dans le cadre des transplantations d'organes solides, mais leur intervention n'a pas été clairement mise en évidence. Néanmoins, l'intervention des Treg ne permet pas d'expliquer l'efficacité de la PCE dans le traitement du CTCL où les cellules leucémiques ne sont *a priori* pas sensibles aux Treg. De plus les cellules de Sézary ont été décrites comme pouvant être elles mêmes de type régulatrices, exprimant FoxP3 et inhibant la prolifération T (225). Ainsi, d'autres mécanismes de régulation doivent également être envisagés.

Induction de LT régulateurs CD8+ CD103+ alloantigènes spécifiques dans le contexte PCE :

Les LT CD8+CD103+ sont des LT régulateurs produits lors de réactions allogéniques. Ils sont induits notamment par la présence de TGFβ ou d'IL-10 (141). Lors du traitement PCE, les cellules apoptotiques réinjectées massivement pourraient elles-mêmes produire de l'IL-10 et/ou du TGFβ ou induire cette production par les APC au niveau des organes lymphoïdes secondaires. De plus les cellules épithéliales d'un organe peuvent produire du TGFβ lorsque celui-ci est lésé par les LTCD8+ (réaction allogénique après HSCT ou transplantation d'organe solide). Cet environnement anti-inflammatoire serait propice à la génération de LT régulateurs CD8+CD103+ spécifiques d'allo-antigènes à partir d'un LT CD8+ naïf (**Figure 16**). Ils seraient capables d'inhiber spécifiquement les LT alloréactifs autologues (origine receveur) suite à une transplantation d'organe solide ou allogéniques (origine du donneur) après greffe de cellules souches hématopoïétiques.

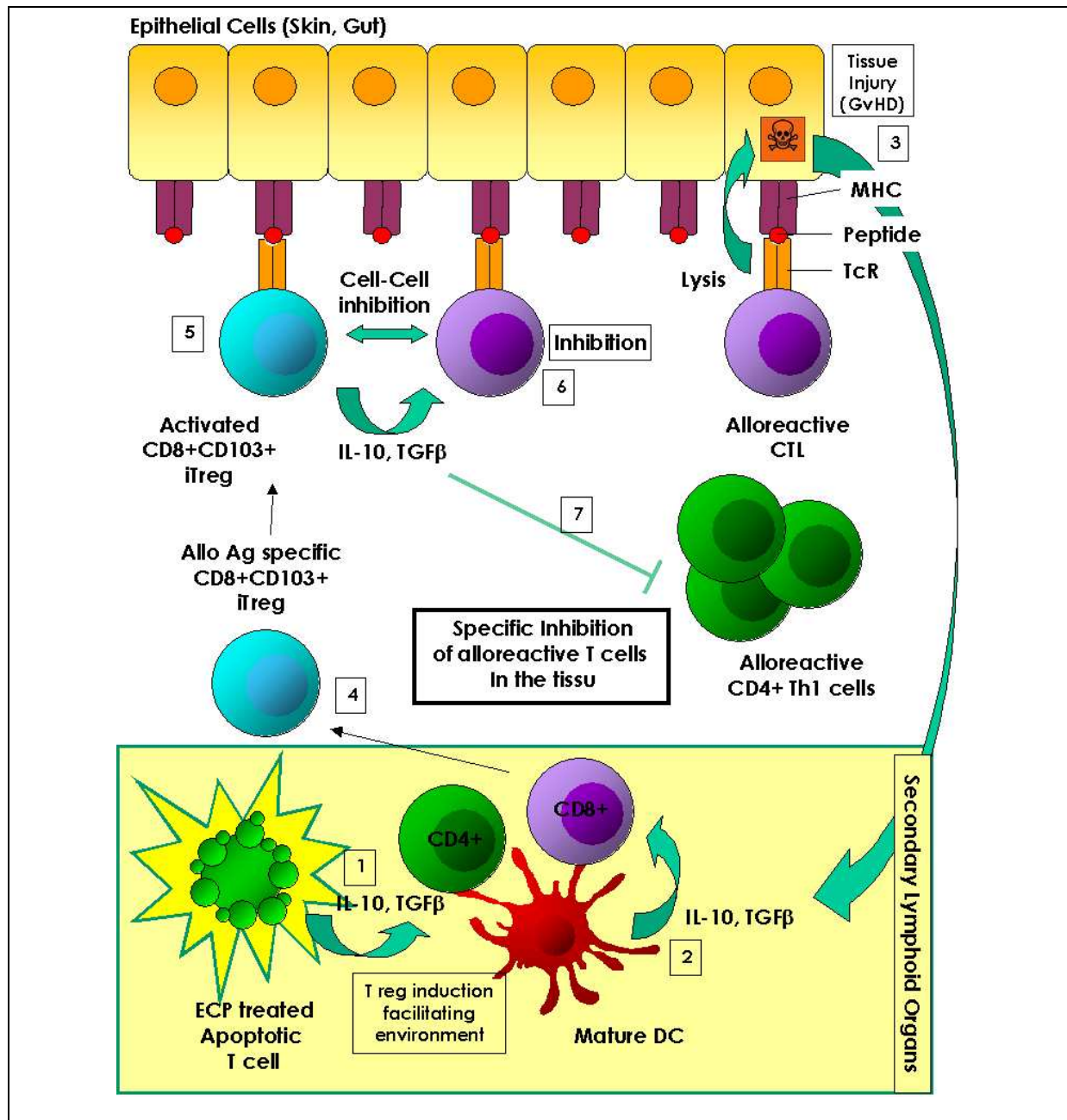


Figure 16 :

Induction de Treg CD8+CD103+ après traitement PCE.

La production de cytokines anti-inflammatoires par **(1)** les cellules apoptotiques **(2)** les APC rendues tolérogènes à leur contact et **(3)** par les tissus endommagés par les cellules T cytotoxiques, favoriserait la génération de Treg CD8+CD103+ **(4)** lors d'une présentation de peptides allogéniques. Ces cellules régulatrices ont la même spécificité que les cellules effectrices. Au niveau du tissu cible, les Treg vont **(5)** être activés par les alloantigènes et pouvoir inhiber **(6)** les CD8+ cytotoxiques ainsi que **(7)** les T helpers CD4+ Th1. Cela conduirait à l'extinction spécifique et localisée des réponses immunitaires dirigées contre les alloantigènes et donc à l'amélioration de la GvHD.

Induction d'une réponse T anti-clonotypique dans le contexte PCE :

Une population clonale T exprime un même TcR. Elle peut être spécifiquement reconnue et éliminée par des LT reconnaissant des peptides issus du TcR. Ces peptides peuvent être présentés à des LT de type CD8+ cytotoxiques et des LT CD4+ Th1 dans le contexte des CMH de classe I et II respectivement et à des LT CD8+ suppresseurs dans le contexte du CMH non classique Ib, notamment par la molécule HLA-E (148, 226).

L'induction d'une réponse T anti-clonotypique par la PCE a été la première hypothèse émise pour expliquer les mécanismes d'action de celle-ci dans la pathologie du CTCL. En effet, les patients ayant une forme circulante du lymphome, le syndrome de Sézary, peuvent voir la proportion de cellules T tumorales (clonales) atteindre plus de 90% de la population circulantes. Lors du traitement par PCE, les cellules T tumorales pré-apoptotiques sont réinjectées. Cette réinjection répétée de cellules T clonales et apoptotiques, constitue une source d'antigène et leur prise en charge par les DC pourrait permettre une présentation des peptides du TcR (donc spécifiques des clones tumoraux) aux LT CD4+ et CD8+ cytotoxiques.

Les peptides issus du TcR de la population oligoclonale T pathogène traitée pourraient également être présentés par des DC via HLA-E aux LT CD8+ régulateurs HLA-E restreints.

Ainsi, les LT pathogènes activés exprimant HLA-E pourraient donc dans un second temps être la cible des LT CD8+ régulateurs HLA-E restreints. (**Figure 17**). On retrouve ici le schéma expérimental développé par les différents groupes ayant travaillé sur le contrôle de l'EAE (106, 153) (**Figure 8**).

Dans le contexte de la GvHD, les LT pathogènes sont fortement activés par leur environnement (les tissus du receveur, orage cytokinique suite au conditionnement pré-greffe (227)) et il a été montré que les LT activés exprimaient le HLA-E.

Les données rapportées par French (96), montrent que la PCE est efficace uniquement chez des patients atteints de GvHD ayant une population clonale circulante, indiquant qu'il est nécessaire de réinjecter la population clonale pathogène apoptotique pour observer un effet clinique. Ceci suggère la mise en place d'un processus de « vaccination » à l'encontre de cette population clonale voir oligoclonale « pathogène » et constitue un argument soutenant l'hypothèse d'une induction de réponse anti-clonotypique par la PCE.

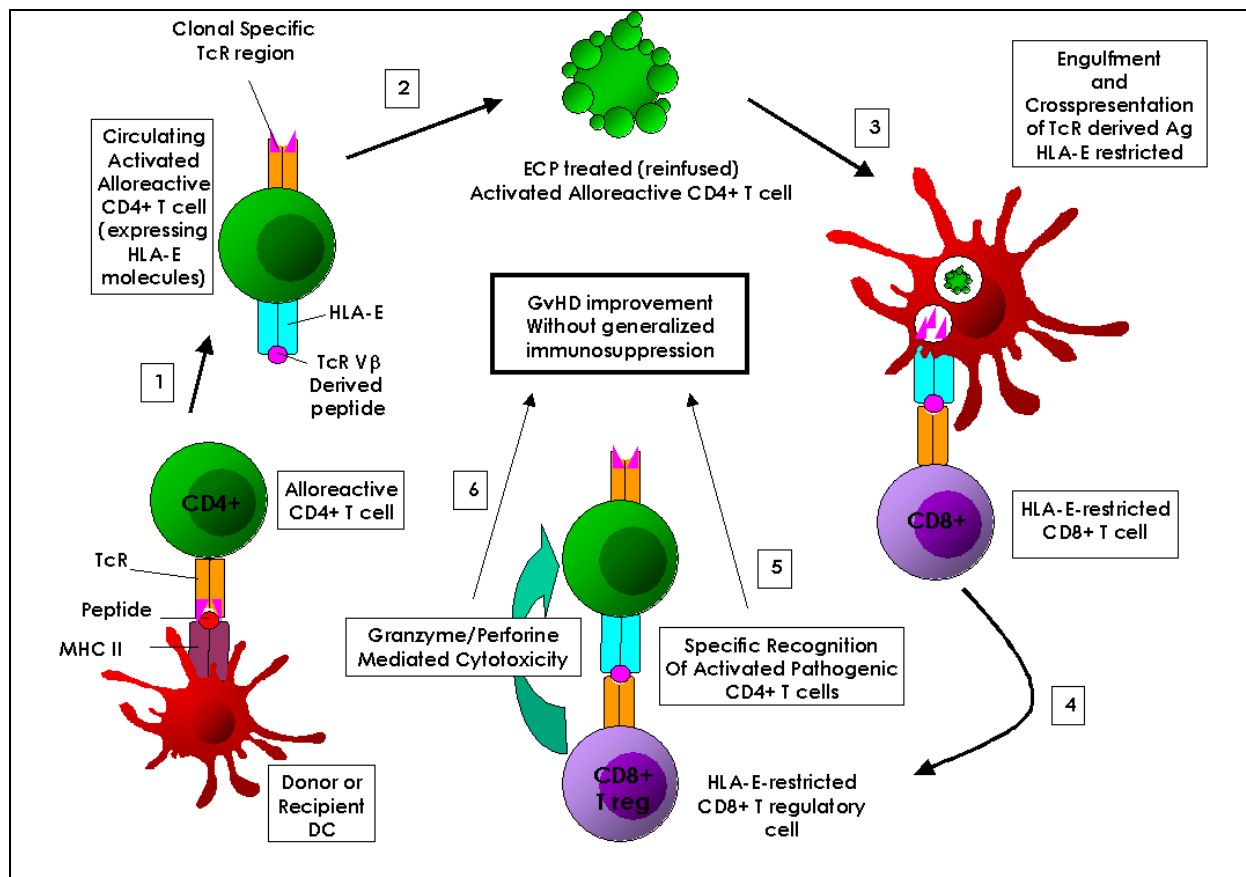


Figure 17 :

Contrôle des LT CD4+ par des Treg CD8+ restreints par HLA-E induits par le traitement PCE.

(1) Les LT CD4+ pathogènes (alloréactifs) sont activés par des APC. Les cellules T pathogènes activées, expriment HLA-E et présentent des peptides issus du TcR. **(2)** Les cellules circulantes sont traitées par PCE et réinjectées au patient. **(3)** Elles vont entrer en apoptose et pouvoir être prises en charge par des APC qui pourront crossprésenter les peptides dérivés du TcR restreints par HLA-E aux LT CD8+ régulateurs. **(4)** Ces derniers vont alors être capables **(5)** de reconnaître **(6)** et d'éliminer spécifiquement les clones T CD4+ activés partageant le même TcR. Ceci conduit à la régulation spécifique des LT CD4+ pathogènes et à l'amélioration des signes cliniques de la GvHD.

Ce mécanisme est le seul permettant d'expliquer l'efficacité de la PCE dans l'ensemble des différentes situations pathologiques pour lesquelles elle est utilisée. Ceci est résumé dans la **Table 6** ci dessous.

Pathologies	Cellules T « pathogènes »	Réponse Anti-clonotypique	
		MHC I et II restreint	MHC Ib (HLA-E) restreint
GvHD	Alloréactif, Activé, Oligoclonal	X	X
Maladies autoimmunes	Autoréactif, Activé, Oligoclonal	X	X
Transplantation	Alloréactif, Activé, Oligoclonal	X	X
CTCL	Tumoral, Au repos, Clonal	X	?

Table 6:

Liste des pathologies dans lesquelles la PCE pourrait induire une réponse anti-clonotypique restreinte par le CMH I et II et /ou CMH Ib. Les caractéristiques des LT pathogènes sont également reportées.

X : possible **?** : dépend de l'expression de HLA-E par les cellules de Sézary.

Induction d'une réponse anti-ergotypique dans le contexte PCE:

Une réponse anti-ergotypique est par définition une réponse immunitaire médiée par des lymphocytes T dirigés à l'encontre d'ergotopes. Les LT auto- ou alloréactifs (donc pathogènes) étant activés, ils constitueront potentiellement après PCE une source d'ergotopes qui pourraient être présentés au système immunitaire par les APC non traitées du patient. De plus, les cellules apoptotiques préalablement activées ont la capacité de faire maturer les DC (228) et pourront induire une réponse anti-ergotypique qui conduira à l'élimination de LT activés présentant des ergotopes.

La limite majeure à cette hypothèse est le manque de spécificité de la réponse régulatrice. En effet, l'ensemble des LT activés pourraient être pris pour cible. Ainsi, lors d'une réponse antivirale, les LT s'activant à l'encontre de peptides viraux pourrait eux-mêmes être pris pour cible par un LT anti-ergotope. Cela entraînerait une susceptibilité accrue aux infections. Or, il est

important de souligner que les patients traités par PCE n'apparaissent pas plus sensibles aux infections. De plus dans la GvHD, si l'un des ergotopes cible était le CD25, nous pourrions nous attendre à une élimination des Treg CD4+CD25+FoxP3+. Dans ce cas, la PCE conduirait plutôt à une accentuation des manifestations cliniques de GvHD. Là encore la réalité en clinique ne correspond pas.

Pour conclure, les éléments évoqués ci-dessus, notamment le manque de spécificité de la réponse anti-ergotypique, semblent invalider cette hypothèse dans la PCE. Ces limites ne s'appliquent cependant qu'aux ergotopes partagés par l'ensemble des LT activés (pathogènes ou non). Ainsi, il n'est pas exclu que la PCE induise une réponse anti-ergotypique mais celle-ci doit être restreinte à des ergotopes spécifiques des LT pathogènes. Ces ergotopes spécifiques peuvent être des peptides issus du TcR présentés par des molécules de CMH exprimées uniquement lorsque les LT sont activés : le CMH de classe II (notamment HLA-DR) et/ou de classe Ib i.e HLA-E.

Induction de NKT Régulateurs dans le contexte PCE

Le rôle et les modes d'induction des NKT régulateurs (NKT reg) ne sont pas encore complètement connus. Néanmoins ces cellules immunorégulatrices sont capables, en fonction de l'environnement dans lequel elles sont activées, de faire basculer l'immunité d'une prédominance Th1 vers Th2. Elles exercent ainsi un rôle anti-inflammatoire. Les NKT reg sont principalement présents dans le foie et reconnaissent des glycolipides présentés par CD1d. Sous irradiation UV, le 8-MOP a la capacité de se fixer aux lipides (181), des modifications glycolipidiques pourraient donc apparaître sur les cellules traitées. De plus, celles-ci entrant en apoptose, elles pourraient s'accumuler dans le foie et activer les NKT. Dans l'environnement tolérogène du foie, les NKT pourraient sécréter des cytokines de type Th2 et contribuer à un basculement Th1 vers Th2. Bien que l'action des NKT reg ne

permette pas d'expliquer l'effet immunomodulateur spécifique observé en clinique induit par la PCE, celle-ci reste envisageable et peut potentiellement contribuer à l'action de la PCE.

c. Synthèse des mécanismes potentiels de la PCE :

Il est extrêmement difficile de dégager une vision simple des mécanismes potentiels d'action de la PCE. Peut être parce que ceux-ci sont aussi nombreux que complexes. Il est tout à fait possible que la PCE induise un ou plusieurs types de régulation, selon la pathologie (induction de Treg dans la GvHD, réponse anti-clonotypique dans le CTCL) , ou plusieurs mécanismes de régulation concomitants dont un serait prédominant en fonction du contexte pathologique et environnemental. Ceci pourrait expliquer l'étendue des applications que la PCE connaît aujourd'hui ainsi que son efficacité malgré la grande hétérogénéité des protocoles.

Ici, nous avons choisi de ne discuter que des systèmes de régulation mettant en jeu des lymphocytes T, acteurs principaux des réponses régulatrices en périphérie et de plus, ils permettent une régulation hautement spécifique. L'ensemble des hypothèses mettant en jeu un système de régulation T ont été résumées en **Figure 18**. Ici, nous avons choisi pour exemple le traitement de la GvHD, dans lequel le clone pathogène est un LT CD4⁺ alloréactif activé, qui permet de détailler l'ensemble des hypothèses citées ci-dessus.

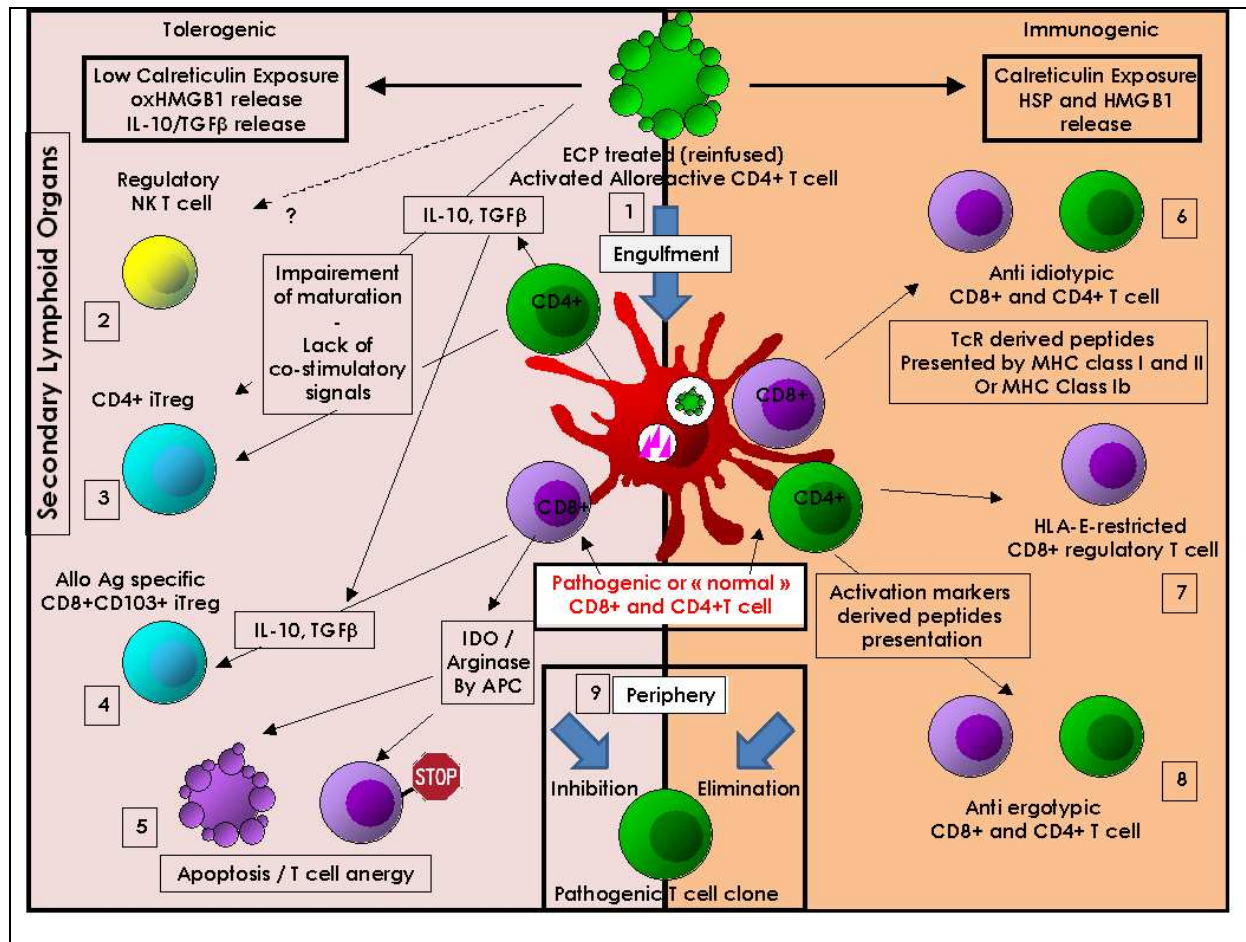


Figure 18 :

Synthèse de l'ensemble des systèmes de régulation pouvant être induits par la PCE dans la GvHD. Les cellules traitées par PCE, notamment les LT pathogènes, vont entrer en apoptose après réinjection au patient. **(1)** Ces cellules vont pouvoir être phagocytées par des APC. En fonction de l'immunogénicité des cellules apoptotiques (dépendant des signaux exprimés ou émis par ces dernières), la nature de la réponse immunitaire sera différente.

Toléro-génicité des cellules apoptotiques (partie de gauche) : **(2)** Le traitement PUVA peut provoquer des modifications au niveau des glycolipides pouvant potentiellement conduire à l'activation des NKT régulateurs qui pourront induire un basculement d'une réponse Th1 vers une réponse Th2.

La phagocytose des cellules apoptotiques par les APC peut conduire à la sécrétion d'IL-10 et de TGFβ. De plus, les cellules apoptotiques elles-mêmes peuvent les sécréter. Ceci crée un environnement anti-inflammatoire propice à la génération de LT régulateurs : **(3)** des LT régulateurs induits CD4+CD25+FoxP3+ **(4)** LT régulateurs CD8+CD103+ alloantigène spécifiques. **(5)** Cet environnement anti-inflammatoire peut induire l'expression de l'IDO ou de l'arginase par les APC. Ainsi, la déprivation en tryptophane ou arginine respectivement peut conduire à l'anergie ou à l'apoptose de LT CD8+ alloréactifs lors de leur interaction avec les APC. Ceci conduit à la destruction spécifique des LT alloréactifs.

Immunogénicité des cellules apoptotiques (partie de droite) : Les cellules apoptotiques peuvent exprimer en surface la Calréticuline. Cette molécule favorisant leur phagocytose est essentielle à leur immunogénicité. Celle-ci est favorisée par la sécrétion de HMGB1 et des HSP, signaux fortement immunogènes.

Dans ces conditions pro-inflammatoires, la PCE pourrait induire une réponse immunitaire de type Th1 à l'encontre des LT pathogènes notamment : Une réponse anti-clonotypique ou idiotypique lorsque les antigènes sont issus du TcR du clone pathogène et qu'ils sont présentés **(6)** par les molécules de CMH de classe I et II classiques aux LT CD4+ et CD8+ « conventionnels », **(7)** par la molécule de CMH Ib HLA-E aux LT CD8+ régulateurs restreints par HLA-E et enfin **(8)** Une réponse anti-ergotypique dirigée contre des marqueurs d'activation T. **(9)** L'ensemble de ces réponses permettrait le contrôle (inhibition ou élimination) des LT pathogènes en périphérie.

Chapitre 2 – Résultats

1. Etude des mécanismes d'action de la PCE chez l'Homme.

A. Article 2: Extracorporeal Photochemotherapy induces the apoptosis of monocytes without impairing their functions.

Introduction :

Les mécanismes potentiels de la PCE ont tout d'abord été étudiés dans le contexte du CTCL, où l'hypothèse d'une induction d'une réponse immunitaire anti-clonotypique est avancée. L'hypothèse d'action de la PCE proposée dans cette pathologie est que la réinjection au patient de cellules tumorales induites en apoptose permet l'élaboration d'une réponse immunitaire anti-tumorale et conduit à l'élimination de l'ensemble des cellules leucémiques. Pour cela, il est nécessaire que des APC phagocytent les cellules tumorales apoptotiques et présentent leurs antigènes (Ag) aux lymphocytes T.

Les monocytes représentent une grande proportion des cellules traitées pouvant atteindre jusqu'à 30%. Ce sont des cellules impliquées à la fois dans l'immunité innée et adaptative, et sont des précurseurs de cellules dendritiques *in vitro* et *in vivo*. Tambur *et al.* (169) ont décrit que les monocytes, contrairement aux lymphocytes, étaient résistants à l'apoptose. Berger et Edelson ont décrit que sous l'action du traitement PCE, les monocytes s'activaient et se différenciaient en 24h en DC CD83+, sans ajout de cytokines. Ainsi, ils proposent de conserver l'échantillon traité à 37°C une nuit pour obtenir des cellules tumorales apoptotiques et générer une grande quantité de DC autologues. Dans cette hypothèse la PCE peut être considérée comme un vaccin cellulaire basé sur l'injection de DC autologues préalablement mises en contact avec des cellules tumorales apoptotiques, source d'antigènes tumoraux. C'est l'hypothèse de la « Transimmunisation ». En 2008, Rao *et al.* (177) ont publié des données décrivant que les monocytes traités entraient en apoptose et atteignaient près de 100% d'apoptose en 72h. Ces données sont donc en contradiction avec l'hypothèse d'Edelson.

L'hétérogénéité des données de la littérature sur le devenir des monocytes traités est en partie due à des biais techniques :

1. Dans toutes ces études, l'Annexine V est utilisée pour détecter l'apoptose. Or les monocytes vivants étant également capables de la fixer (Appelt, Cell Death Diff 2004), la mesure d'apoptose est incorrecte.

2. Les monocytes sont des cellules phagocytaires capables d'internaliser des cellules apoptotiques, ainsi, les cellules apoptotiques « disparaissent » et le pourcentage de cellules AnnV+ n'augmente pas.

Il est donc difficile de conclure sur la survie des monocytes traités par PCE. De plus, il n'existe aucune étude analysant l'impact du traitement PCE sur les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des monocytes traités.

Objectifs :

L'objectif de notre analyse est de préciser l'effet de la PCE sur l'apoptose, le phénotype et la fonctionnalité des monocytes. La capacité des monocytes à se différencier en DC a ainsi été étudiée ainsi que la fonctionnalité de ces dernières.

Méthode :

Des monocytes provenant de volontaires sains ont été purifiés par sélection négative puis traités *in vitro* par PUVA. Nous avons mesuré l'apoptose induite par le traitement en utilisant une technique différente de l'annexine V, et en évaluant le nombre absolu de cellules vivantes. Nous avons utilisé le 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DioC6), un marqueur mitochondrial des cellules vivantes. Ainsi, les cellules DioC6 négatives ont perdu leur potentiel de membrane et sont donc apoptotiques. Nous avons voulu évaluer les modifications phénotypiques et fonctionnelles induites par la PCE. Nous sommes intéressés au phénotype des cellules traitées et avons mesuré par cytométrie en flux l'expression des molécules de co-stimulation, du HLA et des récepteurs aux chimiokines. La fonctionnalité des monocytes traités a été étudiée de façon large en déterminant le profil cytokinique de

ces cellules après stimulation au LPS, leur capacité à induire une alloprolifération T, la polarisation induite ainsi que leur capacité à amplifier des LT autologues spécifiques de l'antigène. Enfin, nous avons évalué la capacité des monocytes traités à se différencier en DC et caractérisé la nature de ces DC par leur production de cytokines ainsi que leur capacité d'allostimulation et de polarisation T.

Résultats / Discussion :

Cette étude démontre que la PCE n'induit pas de modification phénotypique des monocytes (expression des molécules MHC de classe I et II, de co-stimulation, d'adhérence et des récepteurs à chimiokine). En revanche, la PCE affecte partiellement les capacités migratoires des monocytes notamment vers CCL2 et CCL4, 2 chimiokines majeures de l'inflammation. Ceci suggère qu'après réinjection, les monocytes ne sont plus capables de migrer vers les sites d'inflammation, ou du moins que leur migration est altérée, et ont donc un champ d'action limité.

La PCE induit l'apoptose des monocytes. Le processus d'apoptose est plus lent que celui des lymphocytes T. En effet, il faut 6 jours pour que 80% des monocytes soient apoptotiques contre 3 jours pour les LT. Le GM-CSF, utilisé comme une cytokine de survie, ne ralentit pas la cinétique d'apoptose. La PCE semble donc induire de façon irréversible la mort cellulaire.

D'un point de vu fonctionnel, les monocytes restent, immédiatement après le traitement, capables d'endocyter des molécules telles que l'ovalbumine ou la lucifer yellow aussi efficacement que les monocytes contrôles. La PCE ne modifie pas leur profil cytokinique après activation par du LPS et donc leur capacité d'activation. Il est intéressant de noter que les monocytes traités ne produisent pas de cytokines anti-inflammatoires notamment l'IL-10. Leur capacité d'allostimulation T reste également intacte. La polarisation des LT CD4+ stimulés par des monocytes traités est identique à celle obtenue avec des monocytes contrôles. De plus, les monocytes traités

chargés avec un peptide restent tout à fait capables d'amplifier des LT spécifiques de l'antigène.

Il est possible d'obtenir des DC dérivées de monocytes (moDC) en cultivant ces derniers durant 6 jours en présence de GM-CSF et IL-4. Afin de vérifier les données d'Edelson et Berger, les monocytes traités ont été cultivés sans cytokines durant 6 jours. Le pourcentage de cellules CD14⁺ n'a pas diminué indiquant que le traitement n'induit pas de différenciation spontanée des monocytes en DC. En revanche, en présence des cytokines appropriées, le GM-CSF et l'IL-4, les monocytes survivant au traitement (environ 20% à 6 jours post PCE) se différencient en moDC CD209⁺CD14⁻. Ces PUVA-moDC mûrent en présence de LPS et IFN γ et sécrètent un profil cytokinique équivalent au moDC contrôles. Le traitement induit une diminution de la quantité de cytokines inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-12 mais cette tendance n'est pas statistiquement significative. Enfin, la polarisation T induite par les PUVA-moDC et les moDC contrôles est tout à fait similaire.

Conclusion :

En conclusion, la PCE induit une apoptose lente des monocytes. Durant les premiers jours suivant le traitement, leurs fonctions principales ne sont pas modifiées hormis leur capacité migratoire. Les monocytes survivant au traitement restent capables de se différencier en DC fonctionnelles sans phénotype tolérogène particulier. Cette étude remet donc en cause le rôle des monocytes traités dans l'efficacité thérapeutique de la PCE dans le traitement du CTCL, à savoir le principe de transimmunisation. Les lymphocytes T pathogènes apoptotiques sont probablement phagocytés après réinjection par des APC non traitées.

La PCE semble donc induire l'apoptose de l'ensemble des cellules traitées. Il est donc important de se concentrer par la suite sur l'effet de la présence des cellules apoptotiques sur les réponses immunitaires.

Photochemotherapy Induces the Apoptosis of Monocytes Without Impairing Their Function

Dalil Hannani,^{1,2,3} Françoise Gabert,^{1,2,3} David Laurin,^{1,2,3} Mariam Sall,³ Jean-Paul Molens,^{1,2,3} Olivier Hequet,³ Laurence Chaperot,^{1,2,3} and Joel Plumas^{1,2,3,4}

Background. Extracorporeal photopheresis (ECP) is a powerful therapy currently used to treat various hematological disorders as in graft versus host disease. Clinical data clearly demonstrate its efficacy and immunomodulation toward the pathogenic T cells. However, ECP mechanism of action is still poorly understood. Monocytes represent up to 30% of the total amount of treated cells and are known to play an important role in adaptive immunity. However, data from previous reports analyzing the effect of psoralen and UV-A irradiation (PUVA) on their functions are heterogeneous. In this study, we focused on the effect of PUVA on human monocytes functions in adaptive immunity.

Design and Methods. Purified human monocytes were treated in vitro by PUVA. We measured their kinetic of apoptosis after the treatment. We also determine whether their phenotype and functionalities were modified. Finally, we assessed the functionalities of PUVA-treated monocytes-derived dendritic cells (DC).

Results. PUVA treatment sentenced purified monocytes to die in 6 days and immediately altered their migratory capacities without impairing their ability of endocytosis. It also up-regulated co-stimulatory molecules and production of inflammatory cytokines on activation and consequently stimulated allogeneic or autologous T cells as efficiently as untreated monocytes. Moreover, PUVA-treated monocytes retained their ability to differentiate into fully functional DC that matured and stimulated T cells as well as normal DC.

Conclusions. Our data demonstrate that monocytes undergo apoptosis and lose a part of their migratory capacity after ECP and the surviving cell functionalities are not impaired, suggesting that monocytes have a minor effect on ECP-mediated immunomodulation.

Keywords: Extracorporeal photochemotherapy, Monocytes, Apoptosis, Immunobiology.

(*Transplantation* 2010;89: 492–499)

Extracorporeal photopheresis (ECP), a therapy initially developed for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) (1), is now currently used for various hematological disorders involving pathogenic T-lymphocyte clones such as in graft versus host disease (GVHD) (2). In latter, ECP proved effective with impressive clinical results (3). Moreover, ECP is a safe and well-tolerated therapy. Briefly, ECP process consists of the withdrawal of a large amount of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by apheresis (between 10 and 15 billions), followed by incubation

with the photoactivable drug 8-methoxypsoralene (8-MOP) and psoralen and UV-A irradiation (PUVA). Depending on the method used (online or off-line system), PUVA-treated cells are reinfused back to the patient within 1 to 3 hr.

Patients usually receive 5 to 50 or even more procedures depending on their clinical response to the treatment. Although ECP procedure is rather simple, but its mechanisms of action seem more complex and still remain enigmatic (2, 4). The direct effect of ECP on the treated cells is the formation of covalent linkage between DNA and 8-MOP induced by the UV-A light (5). The treated cells, including pathogenic T cells, become unable to proliferate in vitro and undergo apoptosis after several hours (6–8). This apoptosis is well characterized, however, it cannot explain the efficacy of ECP because only a small proportion of pathogenic T cells is treated during the process. Indeed, in GVHD, such as in CTCL, the pathogenic T cells are mainly located in periphery, so they are not directly affected by the 8-MOP/UV-A exposure. It has been proposed that in humans the immune system could downmodulate the pathogenic T-lymphocyte reactivity (4). In animal models, the injection of PUVA-treated cells to healthy animal has been shown to induce an immune response that impedes, after induction, the development of the pathology condition studied (8–11). However, in these studies, the PUVA-treated cells were taken from the spleen, lymph

This work was supported by the Etablissement Français du Sang and Association Recherche et Transfusion.

¹ Inserm, U823, Immunobiologie et Immunothérapie des cancers, La Tronche, France.

² University of Grenoble - Joseph Fourier University, Grenoble, France.

³ EFS Rhône-Alpes, La Tronche, France.

⁴ Address correspondence to: Joel Plumas, Ph.D., EFS RA, Laboratoire R&D, 29 avenue du maquis du Grésivaudan, 38701 La Tronche, France.

E-mail address: joel.plumas@efs.sante.fr

D.H. performed most of the experiments with the help of J.-P.M. and M.S. for some of them. D.H., J.P., D.L. and O.H. analyzed data. D.H., J.P., L.C., and F.G. designed the work and wrote the manuscript.

Received 30 September 2009. Revision requested 30 September 2009.

Accepted 16 October 2009.

Copyright © 2010 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/10/8905-492

DOI: 10.1097/TP.0b013e3181c6ffdb

nodes, or in vitro cultured T cells, whereas in human, they are usually PBMC. Therefore, the immunomodulation and effectors identified in these studies could be different than those involved in human ECP. Among the treated cells, monocytes are a major group because they represent up to 30% of PBMC (12). It is well known that monocytes play an important role in adaptive immunity as they modulate immune responses and differentiate into dendritic cells (DC) (13). However, data from previous reports analyzing the direct effect of PUVA treatment on the functions of monocytes are heterogeneous (7, 14–17). In this study, we analyzed the kinetic of monocytes apoptosis after PUVA treatment and the changes in their functional characteristic involved in adaptive immunity. We also evaluated the effects of PUVA treatment on antigen-presenting function of monocytes and on their ability to differentiate into functional DC.

MATERIALS AND METHODS

Medium and Reagents

The cell culture medium used throughout these experiments was Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Glutamax (Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 1 mmol/L sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, l'Isle d'Abeau, France), nonessential amino acids (Invitrogen), 20 ng/mL gentamicin (Invitrogen), and 10% heat inactivated human AB serum (referred as complete medium).

Immunophenotyping was performed by using fluorescein isothiocyanate (FITC)-, phycoerythrin (PE)-, PE-Cyanin5 or 7 (PC5 or PC7)- and allophycocyanin (APC)- conjugated and purified mouse monoclonal antibodies from Beckman Coulter (Marseille, France). IgG_{2a} isotypic control, Interferon (IFN) γ , and interleukin (IL)-4 antibodies were purchased from BD Biosciences (Pont de Claix, France).

Cells were stained with IgG1, IgG2a, CD11a, CD14, CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86, CD209, human leukocyte antigen (HLA)-I, HLA-II, and HLA-DR markers. DioC6 (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide) and ovalbumin (OVA)-FITC were purchased from Invitrogen. Lucifer yellow (LY) was purchased from Sigma-Aldrich. The 7-Aminoactinomycin D (7AAD) viability dye was purchased from Beckman Coulter. The 8-MOP was provided by our cell therapy unit. Flow cytometric analyses were performed using a four-color FACScalibur flow cytometer and the CellQuest-Pro software (BD Biosciences).

Cell Purification

Blood samples were collected from three healthy volunteers who gave their written informed consent. The PBMC were separated by density gradient on lymphocyte separation medium (Eurobio, Les Ulis, France). Monocytes and T cells were purified according to the manufacturer's instructions by using the human monocyte-enrichment cocktail RosetteSep and from PBMC using the human T-cells-enrichment cocktail EasySep kit (Stem Cell Technologies Inc, Vancouver, Canada). Cells were cryopreserved in liquid nitrogen until use.

Monocyte-Derived Dendritic Cells Generation

Purified monocytes were seeded at 0.5×10^6 cells/mL in a complete medium in the presence of 50 U/mL of granulo-

cyte macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) (Leucomax, Shering Plough, France) and 10 ng/mL of IL-4 (Tebu, Le Perray-en-Yvelines, France) as previously described (18). Both cytokines were added at day 0 and additional IL-4 at day 3. After 6 days, immature moDCs were harvested and verified as CD14⁺CD209⁺ by flow cytometry.

Experimental Psoralen/UV-A Treatment

Purified monocytes were seeded at 1×10^6 cells/mL in a complete medium. Cells were incubated for 15 min at 37°C with 200 ng/mL of 8-MOP in the dark and were exposed to 2 J/cm² 365 nm wavelength UV-A radiation (Bio Sun, Vilbert-Lourmat). After PUVA treatment, cells were washed in a complete medium and then cultured in the same medium at 37°C in 5% atmosphere CO₂.

Cell Viability

Apoptotic cells were quantified by DioC6/7AAD staining as described previously (19). DioC6 was used to monitor mitochondrial transmembrane potential disruption. Monocytes (1×10^6 cells in 1 mL) were incubated with DioC6 at a final concentration of 1 nM for 15 min at 37°C. Cells were washed in phosphate-buffered saline and then analyzed by flow cytometry.

Percentage of specific apoptosis was calculated by taking into account of the number and the viability of cells as follows:

$$\frac{[(\text{nb cells}) \times (\% \text{ DioC6}^+ \text{ cells})]_{\text{control}} - [(\text{nb cells}) \times (\% \text{ DioC6}^+ \text{ cells})]_{\text{PUVA}}}{[(\text{nb of cells}) \times (\% \text{ DioC6}^+ \text{ cells})]_{\text{control}}} \times 100$$

Endocytosis

Endocytosis of monocytes was assayed by LY and OVA-FITC after PUVA treatment. A total of 2×10^5 monocytes in 200 μ L of RPMI with 10% fetal calf serum (FCS) medium were incubated with 1 mg/mL of LY or 0.1 mg/mL of FITC-conjugated OVA in polypropylene tubes (BD Bioscience) for 3 hr at 37°C in 5% CO₂ to allow endocytosis. Negative control was performed at 4°C. For OVA-macropinocytosis-negative control, cells were incubated at 37°C in the presence of 10 μ g/mL of Cytochalasin D (Sigma-Aldrich). After 3 hr, cells were centrifuged twice in Hanks' balanced salt solution with 2% FCS and then the pellet was incubated with CD11b antibody. Phagocytic cells were determined as CD11b-FITC/LY (FL-2) or Ova-FITC/CD11b-PE double-positive cells by flow cytometry.

Cells Activation and Cytokine Production

Monocytes (1×10^6) were cultured in 1 mL of complete medium and activated with 1 μ g/mL lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich) for 24 hr. Immature moDCs were produced as described earlier. At day 6, they were activated with 1 μ g/mL LPS and 100 ng/mL IFN γ (Peprotech Neuilly sur Seine, France) for 48 hr.

Culture supernatants from activated monocytes and moDCs were collected after 24 and 48 hr, respectively. The contents were analyzed for IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, p70, and TNF α by cytokine bead array (CBA) inflammation kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's recommendations with FACScan (BD Bioscience). Data were analyzed with CBA software (BD Biosciences).

Transwells Chemotaxis Assay

Migration assays were carried out by using transwells (6.5 mm diameter, COSTAR, Cambridge, MA) with 5×10^5 cells/well. Control or treated PBMCs were washed, preincubated for 1 hr at 37°C in RPMI with FCS 2%, and then placed for 2 hr in 5- μ m pore size inserts at 37°C. The migrating monocytes were harvested and immunostained with CD14-FITC. The results were shown as the percentage of monocytes that have migrated relative to the input number of monocytes. The chemokines used were MCP-1/CCL2 (CCR2), MIP-1 β /CCL4 (CCR5), RANTES/CCL5 (CCR1), and SDF-1 α /CXCL12 (CXCR4), at 100, 50, 50, and 100 ng/mL, respectively (R&D systems, MN).

Antigen-Specific T-Cell Amplification

Autologous monocytes (1×10^6 /mL) were pulsed with 10 μ M of the influenza M1 peptide (GILGFVFTL; HLA-A2 restricted) for 3 hr at 37°C in RPMI. Then 5×10^4 of control or treated Flu-monocytes were co-cultured with 1×10^5 T cells for 7 days. PE-Flu-M1/HLA-A2 tetramers (Beckman Coulter, France) were used for the staining of the M1-specific CD3+CD8+ T cells according to the manufacturer's recommendations.

Mixed Lymphocyte Reaction

Responding T lymphocytes and stimulating monocytes were purified from PBMC of two healthy volunteers. Unidirectional mixed leukocyte reactions were conducted in quadruplicate of 96-well flat-bottom plates (BD Biosciences) by mixing 5×10^4 responding purified CD3+ T cells and 5×10^3 to 5×10^4 monocytes or moDC $\pm$ PUVA (ratio responding/stimulator cells from 1/1 to 1/0.1) in a final volume of 200 μ L (20). After 5 days, [^{3} H]thymidine was added to each well and cells were harvested after 18 hr later (Cell harvester: Inotech IH 280 Berthold). [^{3} H]thymidine incorporation was measured by a liquid scintillation counter, TopCount NXT (Perkin Elmer).

T-Cell Polarization

A mixed lymphocyte reaction was performed as described earlier. After 6-day culture, cells were harvested and T cells were restimulated with 0.5 ng/mL of phorbol myristate acetate and 5 ng/mL of Ionomycin (Sigma-Aldrich) for 6 hr. The secretion pathway was inhibited by using monensine after 1 hr. At the end of the culture, cells were permeabilized by cytofix/cytoperm kit (BD Bioscience) allowing the intracellular staining of IFN γ and IL-4 (BD Bioscience). Analysis was performed by using a FACS-Canto II cytometer (BD Bioscience).

Statistical Analysis

The unpaired Student's *t* test or two-way analysis of variance were used to determine if the differences observed between control and treated conditions were significant or nonsignificant. A value of *P* less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Monocytes Undergo Apoptosis After Exposure to PUVA

First, we analyzed the kinetic of PUVA-induced apoptosis, a direct effect of the treatment due to the formation of photo adducts (5). In this study, we used DioC6 instead of the annexin-V staining method (19) because the numerous platelets stuck on monocytes were highly bound to annexin-V leading to a nonspecific labeling (21, 22). We cultured PUVA-treated monocytes for 6 days in the presence or absence of GM-CSF used here as a monocyte-survival factor. At day 0, more than 90% of monocytes were alive. Six days after PUVA treatment in the presence of GM-CSF about 80% of them were dead (Fig. 1A). The observation of PUVA-monocytes after May-Grünwald-Giemsa staining clearly showed an apoptotic features (cell shrinkage, apoptotic bodies, and nuclear

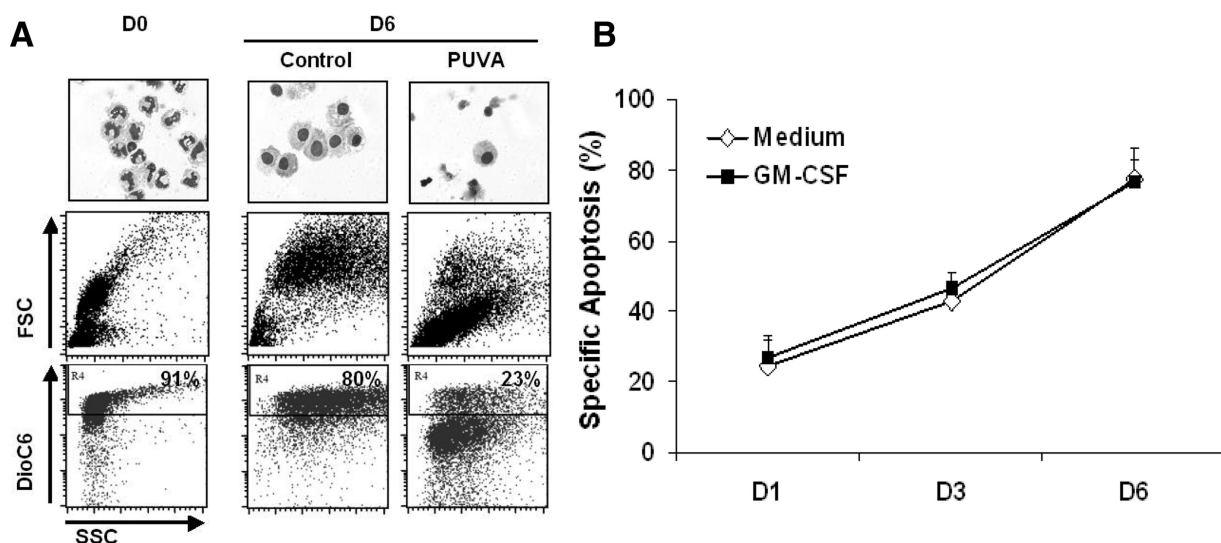
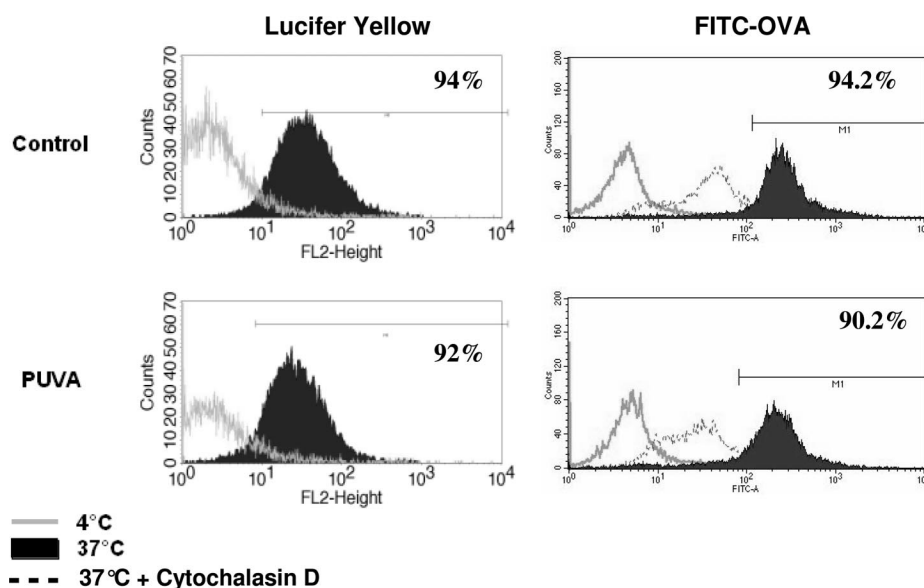


FIGURE 1. Psoralen and UV-A irradiation (PUVA) treatment induces apoptosis in monocytes. Treated (PUVA) or untreated (control) monocytes cultured in the medium with or without granulocyte macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) for 6 days were labeled by DioC6. Dead cells are defined as DioC6-negative cells. (A) May-Grünwald-Giemsa staining and dot plots from GM-CSF condition are shown which are representative of three independent experiments. (B) The graphs represent the kinetic of monocytes apoptosis after PUVA treatment. FSC, forward scatter; SSC, side scatter.

FIGURE 2. Endocytic capacity of monocytes is not impaired after psoralen and UV-A irradiation (PUVA) treatment. Endocytosis assays were performed 24 hr after PUVA treatment in the presence of Lucifer yellow (LY) (left) or fluorescein isothiocyanate-ovalbumin (FITC-OVA) (right) at 37°C for 3 hr (black histogram). Negative controls were performed at 4°C (empty histogram) or at 37°C in the presence of 10 µg/mL of cytochalasin D. One experiment histogram is a representative of two performed with two donors.



condensation) when compared with untreated monocytes. Moreover, because monocytes have the ability to engulf cell debris or apoptotic bodies, we have also taken into account the absolute number of viable cells during the culture to calculate the percentage of specific apoptosis. The results presented in Figure 1B showed that specific apoptosis was continuously increasing in the days after the treatment. One day after the treatment, the specific apoptosis was low (around 20%), whereas at day 6, it reached up to 80%. The presence of GM-CSF did not change this kinetic, suggesting that the sensitivity of monocytes to cell death was not modified by survival factors. Apoptosis induced by PUVA in monocytes has a slow kinetic and thus surviving treated cells may still be functional until day 6.

The Main Functions of Monocytes Are Not Altered by the PUVA Treatment Except Their Migratory Capacities

We then analyzed the effect of PUVA treatment on the capacity of monocytes to perform endocytosis. Capture of LY was used as a model of pinocytosis and FITC-OVA as a model of macropinocytosis. After 3-hours incubation at 37°C, more than 90% of the monocytes efficiently engulfed LY and FITC-OVA (Fig. 2). The PUVA treatment neither affected the percentage of positive cells nor the intensity of labeling, meaning that the endocytic ability of monocytes was not altered.

As monocytes died slowly after PUVA treatment, it can be assumed that once they are injected back to the patient, these cells could still be able to migrate in periphery, in the lymphoid organs, or to stimulate T cells. So, we evaluated the expression of molecules involved in these processes on control or PUVA-monocytes. Moreover, for an optimal T-lymphocytes stimulation, monocytes are required to present peptide associated to HLA molecules and to provide co-stimulation signal through molecules such as CD40 and CD86 in the immune synapse reinforced by adhesion molecules such as CD11a, CD54, and CD58. These molecules were constitutively expressed on monocytes at various levels (data not shown). Twenty-four hours after PUVA treatment, we did

not observe any significant change of their expression in comparison with untreated cells (Fig. 3A, B). Also, the main chemokine receptors expressed by monocytes were not modified by the treatment (Fig. 3C). Interestingly, despite an absence of a differential chemokine receptors expression, PUVA treatment significantly ($P < 0.01$) impaired the monocytes migration toward CCL2 and CCL4 but not to CCL5 and CXCL12 (Fig. 3D). These data suggest that reinfused-treated monocytes have lost a part of their capacities to patrol in the body.

We next analyzed the production of inflammatory or inhibitory cytokines by monocytes known to modify the immune response like IL-1b, TNF- α , and IL-10. Monocytes were treated or not by PUVA and then activated or not by LPS for 24 hr (Fig. 4A). Without activation, there was no cytokine production. The production of these cytokines after activation with LPS was affected neither positively nor negatively by the PUVA treatment. This suggests that PUVA does not modify the ability of monocytes to secrete cytokines in response to an infection or others stimulatory signals.

The APC function of the cells can be tested by performing a mixed lymphocyte reaction (18). Indeed, this assay reflects the global stimulatory capacities of APC, taking into account the expression of molecules involved in the immunological synapse (HLA, co-stimulatory, and adhesion molecules) and the cytokines released. As presented in Figure 4B, after 6-day culture, the T-cell proliferation increased according to the number of allogeneic monocytes added in the culture. A similar T-cells proliferation was observed when PUVA-treated monocytes were used as APC. Moreover, the T-cell polarization induced by control or PUVA - monocytes was similar in both conditions (Fig. 4C). So, it appears that PUVA does not affect the allogeneic stimulatory potential of monocytes.

We next analyzed in autologous setting the impact of PUVA on the capacity of monocytes to induce antigen-specific T cells. Influenza M1 peptide-pulsed monocytes were used to stimulate autologous T cells (Fig. 4D). After 7-day culture, the frequency of Flu-specific T cells reached up to 15% in control condition and was not affected in the treated one.

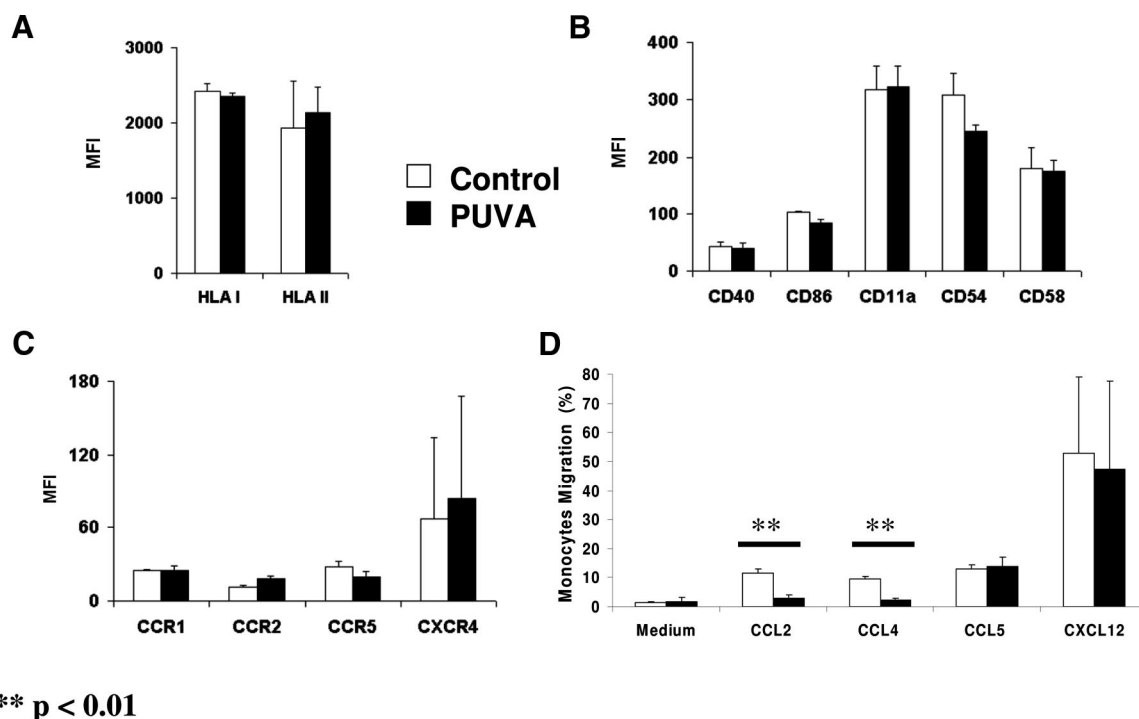


FIGURE 3. Chemokine receptors, major histocompatibility complex (MHC) molecules and activation and adhesion markers expression are not modified on monocytes by psoralen and UV-A irradiation (PUVA) treatment but their migratory capacities are impaired. PUVA effects were determined on the expression of class I and II MHC molecules (A), on the activation and adhesion markers (B) and on the chemokine receptors (C) on purified monocytes. PUVA-treated or -untreated cells were cultured and then analyzed by flow cytometry. The migration capacities of treated monocytes were evaluated by transwell assay. (D) Data represent the mean $\pm$ SD of two independent experiments performed with monocytes from two donors. HLA, human leukocyte antigen. MFI, mean fluorescence intensity.

All together, these data indicate that immediately after PUVA, the allogeneic and antigen-specific stimulation capacities of monocytes are not modified. In contrast, PUVA-treated monocytes seem to partially lose their migratory capacity.

The PUVA Treatment Does Not Impair the Differentiation of Monocytes Into Functional DC

Because DC are potent inducers of immune response and monocytes are one of their precursors, we asked whether the PUVA treatment could alter or induce their differentiation into functional DC.

The differentiation of monocytes into DC was induced by 6-day culture with GM-CSF and IL-4. This differentiation can be easily evidenced by the concomitant decrease of CD14 and an increase of CD209 (DC-SIGN) expression. At day 0, monocytes were CD14⁺CD209[−] and after culture they become CD14[−]CD209⁺ DC (Fig. 5A). We then evaluated the impact of the PUVA treatment on this differentiation. Because the PUVA treatment induces apoptosis in monocytes, we performed analysis only on the surviving cells for 6-day culture. On culture with IL-4 and GM-CSF, PUVA-treated monocytes lost CD14 while they acquired CD209 with the same kinetic as control monocytes (Fig. 5B, upper). In addition, in the absence of cytokines, monocytes did not turn into DC as evidenced by the persistent expression of CD14 and the low level of CD209 (Fig. 5B, lower), whatever were the conditions.

We then wondered whether DC generated from treated monocytes were functional by stimulating them with LPS in

the presence of IFN γ for 48 hr. We analyzed their activation by measuring the up-regulation of CD83, CD86, and CD40 and by production of cytokines. As presented in Figure 5C, DC derived from treated monocytes upregulated the expression of these activation markers to the same extent as non-treated monocytes. Regarding cytokine production, IL1b and IL-10 were not detected whatever was the condition. However, it seems that the levels of IL-6, IL-12, and TNF α were slightly, but not significantly, lower in PUVA-monocytes-derived DC condition (Fig. 5D). Moreover, when control and PUVA-moDC were used as stimulating cells for allogeneic T cells, they both induce the same IL-4⁺/IFN γ ⁺ positive cells ratio (Fig. 5E). These results suggest that the functions of PUVA-monocytes-derived DC remain preserved.

DISCUSSION

ECP is a cell therapy commonly used for the treatment of diseases caused by pathogenic T cells such as CTCL (1) or GVHD (2). However, its overall mechanism of action remains unclear. Several studies demonstrate the clinical beneficial effects of ECP, however, the immune pathway leading to this ECP-mediated immunomodulation remains to be elucidated.

The ECP treatment has been shown to induce T-cell apoptosis (7, 23). Regarding monocytes, previous reports have presented heterogeneous data about the sensitivity of these cells to apoptosis (7, 14–17). We first analyzed the kinetic of monocytes apoptosis after the treatment. We

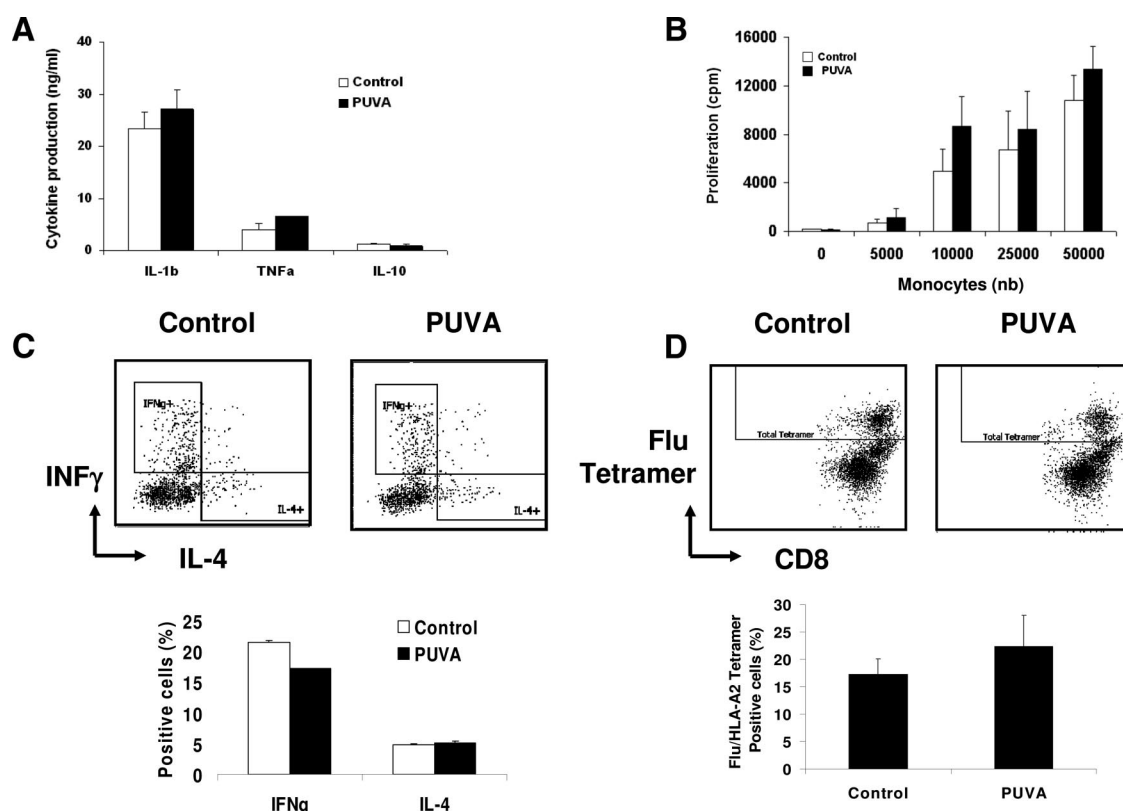


FIGURE 4. Psoralen and UV-A irradiation (PUVA) treatment does not modify cytokine production under activation or allostimulation or antigen-specific stimulatory capacities of monocytes. (A) Cytokine production of PUVA-treated monocytes activated by lipopolysaccharide for 24 hr was measured by CBA inflammation kit. Data represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments performed with three donors. (B) Allogeneic mixed lymphocyte reaction was performed by mixing increasing amount of irradiated monocytes and purified allogeneic T lymphocytes. T-lymphocytes proliferation was measured by the incorporation of [^{3} H]thymidine after 6 days of culture. Data represent the cpm (mean $\pm$ SD) of two independent experiments performed with two donors. (C) T-cell polarization after 6-day culture with control or PUVA allogeneic monocytes. Data represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments performed with three donors. (D) Amplification of Flu-specific T cells after 7-day culture with influenza M1 peptide-pulsed control or PUVA-treated monocytes. IL, interleukin; HLA, human leukocyte antigen.

also calculated the specific apoptosis by taking into account the absolute number of cells and their viability assessed with DioC6. This method appears to be more appropriate than the others because the phagocytic activity of monocytes by removing dead cells could alter the results leading to underestimate apoptosis. Moreover, the detection of apoptosis by the commonly used annexin-V marker is unsuitable in this case because it binds to the numerous platelets (22) stuck onto monocytes membranes. We show that it takes 6 days for monocytes to undergo apoptosis, whereas it takes only 3 days for T cells ((7, 23), unpublished results). So, after PUVA treatment, monocytes apoptosis was slow compared with T-cell apoptosis. This enhanced resistance of monocytes could be explained by the fact that, contrary to T cells, monocytes do not proliferate and hence could be less sensitive to apoptosis induced by PUVA (5). Interestingly, GM-CSF did not protect the cells from apoptosis, suggesting that the apoptotic process is definitely engaged after the treatment.

We next analyzed whether the PUVA treatment could alter the main functions of monocytes in adaptive immunity. We evaluated monocytes properties just after the treatment as

soon as possible because of the ongoing apoptosis and the treated cells are rapidly infused back to the patient during the therapeutic process. We observed that the treatment did not change the expression of specific homing receptors on monocytes but inhibit their migratory capacities toward CCL2 and CCL4, suggesting that they could not patrol in the body after reinfusion avoiding monocytes to play their role. Concerning the influence of the PUVA treatment on cytokine secretion, in contrast to other study (24), we did not detect any increase in the spontaneous production of TNF- α . This discrepancy could be explained by the differences in purification process, indeed, purification by adhesion or positive selection is known to activate monocytes. To avoid this risk, we purified them by a negative magnetic selection. In addition, unlike to some report (16), the PUVA treatment did not lead to the secretion of inhibitory molecules by monocytes such as IL-10. The absence of global inhibitory effect mediated by the PUVA-treated monocytes was evidenced by their ability to induce a consistent allogeneic proliferation of T cells even when the monocytes/T-cell ratio was high. Conversely, when this ratio was low, no increase of T-cell proliferation was observed with treated compared with untreated monocytes,

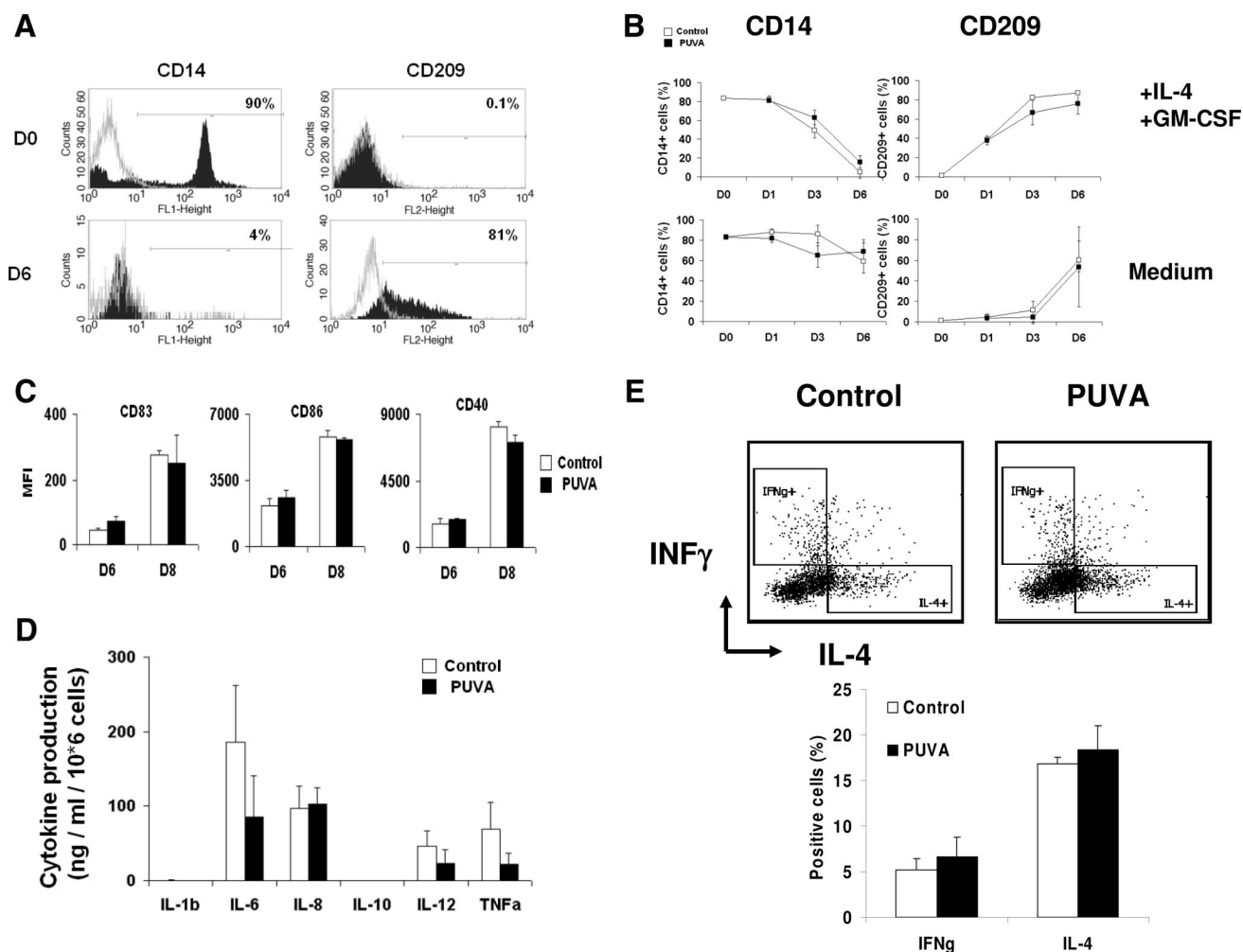


FIGURE 5. Psoralen and UV-A irradiation (PUVA) treatment neither impairs the differentiation of monocytes into potent dendritic cells (DC) in the presence of cytokines nor induces their spontaneous differentiation. PUVa-treated and -untreated monocytes were cultured with or without granulocyte macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin (IL)-4 for 6 days. CD14 and CD209 are specific markers for monocytes and DC, respectively. (A) Representative histograms of three independent experiments performed with three donors represent CD14 and CD209 histogram at day 0 and 6, (B) CD14 and CD209 membrane expression on monocytes at days 0, 1, 3, and 6. Data represent the percentage of positive cells (mean $\pm$ SD) of two independent experiments performed with two donors. (C) Immature DCs were obtained from PUVa treated and untreated monocytes cultured with GM-CSF and IL-4 for 6 days. DCs were matured by activation with lipopolysaccharide and IFN γ for 48 hr and the expression of activation markers were then analyzed by flow cytometry. The percentages of positive cells are represented. (D) Supernatants from mature DC were collected and the measurements cytokines were performed by CBA inflammation kit. Data represent the percentages of positive cells (mean $\pm$ SD) of three independent experiments performed with three donors. (E) T-cell polarization after 6-day culture with PUVa-treated and control allogeneic monocytes-derived DC. Data represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments performed with three donors.

suggesting that the treatment did not up-regulate the stimulatory activity of monocytes. Also, their antigen-specific T-cell amplification capacities were not modified. These observations are consistent with the fact that the expression of co-stimulatory and adhesion molecules and the secretion of cytokines were not modified by the treatment. Moreover, the observation that the endocytic capacity of treated monocytes remained unchanged suggests that monocyte main function is not impaired by PUVa treatment at least early after the treatment.

Monocytes are precursors of DC in vivo, but the previous data showed that the effect of PUVa treatment on

this differentiation was heterogeneous (17, 25, 26). In vitro, monocytes can easily be turned into DC by 6-day culture in the presence of GM-CSF and IL-4. In these conditions, we have shown here that PUVa-treated monocytes differentiated into DC with the same kinetic as non-treated cells. Contrary to a previous report (25) but confirmed by a recent work (26), we found that in the absence of added cytokines, there was no spontaneous DC differentiation. This could be explained by the absence of plastic interaction in our condition. Moreover, whether monocytes were treated or not, the generated DCs were able to mature in the presence of LPS as evidenced by the

up-regulation of co-stimulatory molecules and cytokines production. Moreover, both control and PUVA-moDC were able to induce the T-cell polarization with the same extent, suggesting that they were fully functional and ECP do not modify their immunomodulatory properties. So, our results suggest that the low fraction of monocytes that did not undergo apoptosis after 6 days after PUVA treatment were still able to differentiate into fully functional DC only in the presence of differentiating cytokines.

The demonstration that the main functions of monocytes were not impaired suggests that they have no direct effect on the ECP-mediated immunomodulation. Moreover, after reinfusion, our data suggest that they become enable to migrate toward inflammatory sites. We show that the monocytes that are in great number among the cells treated by PUVA are sentenced to die such as T cells, DC, and probably all other cells (27). This injection back to the patient of huge amount PUVA-treated cells may induce indirect effects on immune response. For instance, Craciun et al. (28) showed that the treated cells trigger the synthesis of immunosuppressive cytokines by nontreated mononuclear cells. This could be responsible for the early clinical efficacy of ECP. It is now necessary to further analyze the impact of the treated cells on the long-term immunomodulatory effects induced by ECP.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M.J. Richard, H. Egelhofer, and the staff of Cell and Tissue therapy Unit of Saint-Ismier for providing us the psoralen molecule; P. Drillat, F. Bernard, C. Morand, I. Michaud, C. Guitton, and the staff of EFS Rhône-Alpes for blood sample collections; and R. Muhammad for critical review of the article.

REFERENCES

1. Miller JD, Kirkland EB, Domingo DS, et al. Review of extracorporeal photopheresis in early-stage (IA, IB, and IIA) cutaneous T-cell lymphoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2007; 23: 163.
2. Marshall SR. Technology insight: ECP for the treatment of GvHD—Can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 3: 302.
3. Dall'Amico R, Murer L. Extracorporeal photochemotherapy: A new therapeutic approach for allograft rejection. *Transfus Apher Sci* 2002; 26: 197.
4. Plumas J, Manches O, Chaperot L. Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy in the control of GVHD: Involvement of dendritic cells. *Leukemia* 2003; 17: 2061.
5. Kanne D, Straub K, Rapoport H, et al. Psoralen-deoxyribonucleic acid photo-reaction. Characterization of the monoaddition products from 8-methoxypsoralen and 4,5'-8-trimethylpsoralen. *Biochemistry* 1982; 21: 861.
6. Jacob MC, Manches O, Drillat P, et al. Quality control for the validation of extracorporeal photopheresis process using the Vilbert-Lourmat UV-A irradiation's system. *Transfus Apher Sci* 2003; 28: 63.
7. Yoo EK, Rook AH, Elenitsas R, et al. Apoptosis induction of ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell Lymphoma: Relevance to mechanism of therapeutic action. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 235.
8. Truitt RL, Johnson BD, Hanke C, et al. Photochemical treatment with S-59 psoralen and ultraviolet A light to control the fate of naive or primed T lymphocytes in vivo after allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol* 1999; 163: 5145.
9. Ullrich SE. Photoinactivation of T-cell function with psoralen and UVA radiation suppresses the induction of experimental murine graft-versus-host disease across major histocompatibility barriers. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 303.
10. Perez MI, Berger CL, Yamane Y, et al. Inhibition of anti-skin allograft immunity induced by infusions with photoinactivated effector T lymphocytes—The congenic model. *Transplantation* 1991; 51: 1283.
11. Maeda A, Schwarz A, Kernebeck K, et al. Intravenous infusion of syngeneic apoptotic cells by photopheresis induces antigen-specific regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 174: 5968.
12. Garban F, Drillat P, Makowski C, et al. Extracorporeal chemophototherapy for the treatment of graft-versus-host disease: Hematologic consequences of short-term, intensive courses. *Haematologica* 2005; 90: 1096.
13. Randolph GJ, Jakubick C, Qu C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 52.
14. Legitimo A, Consolini R, Di Stefano R, et al. Psoralen and UVA light: An in vitro investigation of multiple immunological mechanisms underlying the immunosuppression induction in allograft rejection. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29: 24.
15. Tambur AR, Ortel JW, Morales A, et al. Extracorporeal photopheresis induces lymphocyte but not monocyte apoptosis. *Transplant Proc* 2000; 32: 747.
16. Di Renzo M, Rubegni P, Pasqui AL, et al. Extracorporeal photopheresis affects interleukin (IL)-10 and IL-12 production by monocytes in patients with chronic graft-versus-host disease. *Br J Dermatol* 2005; 153: 59.
17. Rao V, Saunes M, Jorstad S, et al. In vitro experiments demonstrate that monocytes and dendritic cells are rendered apoptotic by extracorporeal photochemotherapy, but exhibit unaffected surviving and maturing capacity after 30 Gy gamma irradiation. *Scand J Immunol* 2008; 68: 645.
18. Chaperot L, Chokri M, Jacob MC, et al. Differentiation of antigen-presenting cells (dendritic cells and macrophages) for therapeutic application in patients with lymphoma. *Leukemia* 2000; 14: 1667.
19. Manches O, Lui G, Chaperot L, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2003; 101: 949.
20. Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, et al. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia* 2005; 19: 1597.
21. Silverstein RL, Nachman RL. Thrombospondin binds to monocytes-macrophages and mediates platelet-monocyte adhesion. *J Clin Invest* 1987; 79: 867.
22. Thiagarajan P, Tait JF. Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. *J Biol Chem* 1990; 265: 17420.
23. Enomoto DN, Schellekens PT, Yong SL, et al. Extracorporeal photochemotherapy (photopheresis) induces apoptosis in lymphocytes: A possible mechanism of action of PUVA therapy. *Photochem Photobiol* 1997; 65: 177.
24. Vowels BR, Cassin M, Boufal MH, et al. Extracorporeal photochemotherapy induces the production of tumor necrosis factor- α by monocytes: Implications for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 1992; 98: 686.
25. Berger CL, Xu AL, Hanlon D, et al. Induction of human tumor-loaded dendritic cells. *Int J Cancer* 2001; 91: 438.
26. Legitimo A, Consolini R, Failli A, et al. In vitro treatment of monocytes with 8-methoxypsoralen and ultraviolet A light induces dendritic cells with a tolerogenic phenotype. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 564.
27. Holtick U, Marshall SR, Wang XN, et al. Impact of psoralen/UVA-treatment on survival, activation, and immunostimulatory capacity of monocyte-derived dendritic cells. *Transplantation* 2008; 85: 757.
28. Craciun LI, Stordeur P, Schandene L, et al. Increased production of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist after extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* 2002; 74: 995.

B. Article 3: Extracorporeal Photochemotherapy induces a faster apoptosis of pathogenic activated T cells than of resting normal T cells in Graft versus Host Disease.

en révision pour publication dans le journal « Transplantation »

Introduction :

La maladie du greffon contre l'hôte est l'une des premières causes de morbidité après greffe de cellules souches hématopoïétiques. Ce sont les lymphocytes T allogéniques provenant du greffon (origine du donneur) qui sont responsables de la destruction des tissus de l'hôte (le receveur). Ces LT allogéniques sont détectables dans le sang périphérique et représentent une quantité importante des cellules circulantes pouvant atteindre une fréquence de 1% des LT CD8⁺ (44). Dans le cadre d'une greffe HLA compatible ces derniers représentent une population oligoclonale dirigée à l'encontre des Ag mineurs d'histocompatibilité (229).

La PCE permet le contrôle des LT « pathogènes » sans induire d'immunosuppression généralisée. L'oligoclonalité de ces derniers permet d'envisager le développement d'une réponse anti-idiotypique dirigée à l'encontre du TcR. L'ensemble des LT traités (« pathogènes » ou non) entrent en apoptose, les LT « pathogènes » étant majoritaires dans le prélèvement traité. Dans l'hypothèse d'une réponse anti-idiotypique, le système immunitaire du patient doit distinguer les LT normaux des pathogènes traités afin d'initier une réponse spécifiquement dirigée à l'encontre de ces derniers.

Les LT allogéniques sont constamment stimulés par leur environnement (l'hôte) (230), leur état d'activation peut être considéré comme une caractéristique des LT « pathogènes ».

Nous avons émis l'hypothèse que la PCE pouvait induire une cinétique d'apoptose différente des LT selon leur état d'activation.

Objectif de l'étude :

Le but de cette étude est de déterminer si la PCE a un effet différentiel sur la cinétique d'apoptose des LT selon leur état d'activation.

Méthode / Résultats :

Les LT ont été purifiés par sélection négative à partir de prélèvements de volontaires sains. La cinétique d'apoptose après PUVA des LT au repos a été comparée à celle des LT activés par un agent mitogénique (anti-CD3 ou PHA). La cinétique d'apoptose a été mesurée durant les 3 jours suivant le traitement par marquage à l'Annexin V. Dans les premières 24h, la cinétique d'apoptose induite par la PCE est 2 fois plus rapide pour les LT activés par anti-CD3 ou PHA que les LT au repos. Dès 48h après le traitement, les niveaux d'apoptose spécifique entre les LT au repos et activés deviennent comparables. Le fait de cultiver les cellules en présence de cytokines de survie (IL-2, IL-7 ou IL-15) ne modifie pas significativement cette cinétique.

Afin d'étudier l'effet de la PCE sur l'apoptose de cellules T activées spécifiquement par leur Ag, des LT ont été stimulés par des moDC autologues chargées avec le peptide M1 de l'Influenza (peptide Flu) présenté par la molécule HLA-A2. Après 7 jours de culture, on obtient une culture contenant 30% de LT CD8+ spécifiques de Flu (LT anti-Flu). Seuls ces LT anti-Flu ont un phénotype activé (CD69+). Vingt-quatre heures après traitement, l'apoptose spécifique des LT anti-Flu activés atteint 75% alors que celle des LT non spécifiques au repos n'atteint que 15%.

Enfin la cinétique d'apoptose des LT activés au sein d'échantillons provenant de 3 patients atteints de GVHD a été comparée à celle des LT au repos. Pour cela, nous avons mesuré la quantité de cellules apoptotiques (AnnV+) parmi les cellules activés (HLA-DR+) versus au repos (HLA-DR-) au sein d'un même échantillon. Et là encore les LT activés ont un niveau d'apoptose spécifique supérieur ($p < 0.01$) comparé aux LT au repos.

Discussion :

Dans cette étude, nous avons montré que les lymphocytes T activés entraient plus rapidement en apoptose suite au traitement PUVA. Cette différence d'apoptose est optimale dans les premières 24h suivant le traitement. Dès le 2^{ème} jour, les taux d'apoptose des LT au repos ou activés deviennent comparables. Ces résultats ont été démontrés dans 2 modèles d'activation de LT provenant de volontaires sains (activation mitogénique ou antigène spécifique) et confirmés chez 3 patients atteints de GvHD chronique.

Ainsi, durant les premières heures suivant le traitement, les LT activés entrent plus massivement en apoptose que les LT au repos. Ils vont pouvoir être phagocytés par les APC (non-traitées) du patient. Durant cette fenêtre de temps, les LT pathogènes constituent la source principale d'antigènes. De plus, il a été démontré que les cellules apoptotiques activées induisaient la maturation des DC (228). L'ensemble de ces données suggèrent que les antigènes des LT pathogènes sont apprêtés préférentiellement dans les premières heures suivant la réinjection des cellules traitées. De plus, à leur contact, les DC s'activent. Ceci crée des conditions favorables à la génération d'une réponse anti-clonotypique. Les LT anti-clonotypiques ainsi générés, pourront dans un second temps éliminer spécifiquement la population oligoclonale pathogène. Ces données constituent une piste supportant la thèse d'une réponse anti-clonotypique dirigée à l'encontre des LT « pathogènes ». Cette hypothèse représente un mécanisme de la PCE qui pourrait expliquer son efficacité à la fois dans le traitement de la GvHD (et par extrapolation des maladies autoimmunes ou des rejets d'organes solides) et dans le traitement du CTCL. Ce travail n'exclut pas la possibilité d'induction de Treg suite à l'injection massive de cellules apoptotiques. Ces 2 phénomènes pourraient intervenir en synergie dans le contrôle des LT « pathogènes » alloréactifs responsables de la GvHD. L'immunogénicité des cellules apoptotiques traitées par PUVA et leur capacité à activer les DC ont été étudiées et sont présentées par la suite.

Photochemotherapy induces a faster apoptosis of alloreactive activated T cells than of non-alloreactive resting T cells in GvHD.¹

Hannani Dalil ^{2,3,4}, Merlin Etienne ⁵, Gabert Françoise ^{2,3,4}, Laurin David ^{2,3,4}, François Deméocq ^{5,6}, Chaperot Laurence ^{2,3,4}, Justyna Kanold ^{5,6}, Plumas Joel ^{2,3,4}

Inserm, U823, Immunobiologie et Immunothérapie des cancers, Grenoble, France ;

University of Grenoble - Joseph Fourier University, Grenoble, France ;

Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes, Grenoble, France.

CHU Clermont-Ferrand, Pédiatrie B, INSERM, CIC 501, F-63001 Clermont-Fd, France

Clermont Université, Université d'Auvergne, 63000 Clermont-Fd, France.

Running title: Fast apoptosis of activated T cells following ECP

Word Count:

Abstract: 249 Text: 2460

Figures: 4 References: 30

Keywords: Extracorporeal Photochemotherapy, T lymphocyte, Apoptosis, GvHD

Corresponding Author:

Joel Plumas, PhD

Address: EFS RA, Laboratoire R&D

29 avenue du maquis du Grésivaudan 38701 La Tronche France

E mail address: joel.plumas@efs.sante.fr

Tel : +33(0)4.76.42.43.44 / Fax: +33(0)4.76.54.69.18

Footnotes

¹ This work was supported by the Etablissement Français du Sang and the Association Recherche Transfusion

² Inserm, U823, Immunobiologie et Immunothérapie des cancers, Grenoble, France ;

³ University of Grenoble - Joseph Fourier University, Grenoble, France ;

⁴ Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes, Grenoble, France.

⁵ CHU Clermont-Ferrand, Pédiatrie B, INSERM, CIC 501, F-63001 Clermont-Fd, France

⁶ Clermont Université, Université d'Auvergne, 63000 Clermont-Fd, France

Authorship

D.H performed all the experiments with the help of E.M and D.L for some of them. D.H, J.P, E.M and D.L analyzed data. D.H, J.P designed the work and wrote the manuscript with the help of F.G, L.C, F.D and J.K.

Abbreviations

APC : Antigen presenting cell

DC: Dendritic Cells

ECP: Extracorporeal Photochemotherapy

GvHD: Graft versus Host Disease

PUVA: Psoralen + UVA

Abstract:

Background:

Graft versus Host Disease (GvHD) is the main complication following hematopoietic stem cell transplantation. Extracorporeal Photochemotherapy (ECP) is a cell therapy currently used for the treatment of T cell-mediated diseases and appears as a valuable second-line therapy for patients suffering from steroid-refractory acute or chronic GvHD. ECP induces the apoptosis of treated cells and is thought to elicit a specific immune regulation of alloreactive T cells through repeated apoptotic T cell infusions. However, its mechanisms of action have not yet been elucidated. In GvHD, alloreactive but not non-alloreactive T cells are continuously activated by their environment. We hypothesized that ECP has a differential apoptotic effect on activated compared to resting T cells.

Method:

The ECP induced apoptosis of resting and activated T cells from patients with chronic GvHD was assessed. The kinetic of apoptosis was also evaluated using several triggers of T cell activation such as mitogenic or antigen-specific activation. The influence of survival cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15) was also evaluated.

Results:

Activated T cells from patients with chronic GvHD underwent apoptosis faster than resting T cells. This phenomenon was confirmed using mitogenic and antigen-specific activated T cells from healthy donors and cannot be delayed by protective cytokines.

Conclusions:

ECP induces a faster apoptosis of alloreactive activated T cells than of non-alloreactive resting T cells in GvHD, and more generally of activated T cells than of resting T cells. These novel findings provide new insights about the ECP-induced specific control of pathogenic T cells in GvHD.

Introduction:

Graft versus Host Disease (GvHD) is the major complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). GvHD occurs in acute and chronic forms. The complex pathophysiology of acute GVHD is a consequence of interactions between the donor and host innate and adaptive immune responses. Multiple inflammatory molecules and cell types are implicated in the development of GvHD. Particularly, the cytokine storm occurring after conditioning regimen and mature donor T cells contained into the graft are recognized to be the main causes of acute GvHD (1,2). Conversely, the biology of chronic GvHD is much less well understood. Chronic GvHD seems rather to be an autoimmune-like disease which occur, at least in part, due to thymic damage and defective negative selection of T cells generated from marrow progenitors after HSCT (3-5). Despite the disparities between acute and chronic form of GvHD, T cells play a crucial role in the initiation and/or maintaining of both pathologies. The detection of circulating alloreactive T cells correlates with the occurrence of acute and chronic GvHD (6). Moreover, both acute and chronic GvHD are usually treated by steroid therapy and other immunosuppressive drugs that target T cells reactivity. However, the benefit of those medications is frequently hampered by their important short-term and long-term side effects.

Extracorporeal Photochemotherapy (ECP) is a safe and well-tolerated cell therapy currently used for the treatment of T cell-mediated diseases and appears as a valuable second-line therapy for patients suffering from steroid-refractory acute or chronic GvHD (7-10). ECP provides the notable advantage of inducing immune tolerance without severe side effects, and thus allows the reduction of immunosuppressive drug dose (11). Patients responding to ECP seems to control alloreactive T cells, regarding GvHD improvement, without generalized immunosuppression since they are still able to respond to vaccination and do not display an increased sensitivity to infections (12). However, the mechanism of action of ECP is not yet well understood(13).

The best characterized effect of ECP is the induction of apoptosis of exposed cells(14,15). During the procedure for the treatment of GvHD, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are collected by apheresis and then are exposed to UVA irradiation in the presence of 8-MOP (8-Methoxy-psoralen) as a photo-sensitizer.

Following this treatment, the cells are infused back to the patient. Virtually all treated cells undergo apoptosis (14,15). In case of the treatment of GVHD, the treated bag is supposed to contain various amounts of alloreactive T cells since the cells are collected from the blood. It has been shown that the presence of alloreactive T cells in the treated sample is necessary for ECP efficacy (16-18).

In the context of both acute and chronic GvHD, alloreactive T cells are continuously stimulated by their environment, i.e. the recipient (19,20). This activated state represents the main difference between alloreactive and non-alloreactive T cells and could be considered as a feature of alloreactive T cells. We hypothesized that ECP has a differential apoptotic effect on activated compared to resting T cells.

To address this issue, we first assessed the effects of ECP on the kinetics of apoptosis of resting versus activated T cells from patients suffering from chronic GvHD, then, we analyzed ECP-induced T cell death in various contexts of T cell activation.

Results:

Activated T cells from patients' blood with chronic GvHD undergo apoptosis faster than resting T cells following PUVA treatment:

The aim of this study was to evaluate whether the apoptotic effect of ECP depends on the activation state of T cells. We first evaluated if activated T cells contained in patients' blood suffering from chronic GvHD could be more sensitive to PUVA (Psoralen+UVA) than resting T cells (Figure 1). PBMC from 3 patients with chronic GvHD were treated by PUVA and specific apoptosis was analyzed 24h later on activated and resting CD3⁺ T cells defined according to their expression of HLA-DR which is a representative T cell activation marker (Figure 1). As illustrated in the figure 1a, HLA-DR⁺ T cells display a higher rate of apoptotic cells compared to HLA-DR⁻ (78.5% versus 50% respectively) 24h following PUVA treatment. The specific apoptosis was significantly higher in activated T cells compared to resting T cells (means : 59.7% versus 44.5 respectively; $p < 0.05$; Figure 1b). These data indicate that following the treatment of samples from patients with chronic GvHD, alloreactive activated T cells undergo faster apoptosis than resting T cells.

PUVA- treated activated T cells undergo apoptosis faster than resting T cells:

We then extended the study using blood samples from healthy donors to better define this phenomenon. Normal donors' T cells were activated for 72h hours with 2 potent mitogens, OKT3 or PHA. The activation of T cells was monitored by analyzing their expression of CD25, CD69 and HLA-DR (Fig 2a). Freshly isolated resting T cells did not express any of these markers that were up regulated on OKT3 and PHA-activated T cells. CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressed equivalent levels of the activation markers.

Resting and activated T cells were then treated by PUVA and apoptosis was measured during 3 days following the treatment. This analysis is illustrated for total CD3⁺ T cells, 24h following PUVA treatment in figure 2b. One day after PUVA, OKT3 and PHA-activated T cells reached 84.6% +/- 2.9 and 95.8% +/- 1.2 of specific apoptosis respectively compared to 21.8% +/- 3.9 for resting T cells (Fig 2c; $p < 0.01$).

From day 2, the specific apoptosis of resting T cells reached 74% +/- 2.9 and was comparable but still lower than apoptosis of activated T cells (Fig 2d and data not shown).

Taken together the data show that following a mitogen-induced stimulation, activated T cells undergo apoptosis faster than resting T cells after PUVA treatment.

Survival cytokines do not protect PUVA- treated activated or resting T cells from apoptosis:

The kinetic of apoptosis of PUVA-treated cells should be modified by a cytokine-rich environment encountered following reinfusion. To address this issue, we analyzed the kinetics of apoptosis of resting and OKT3-activated T cells cultured in medium alone or in presence of IL-2, IL-7 or IL-15 which are survival cytokines for T cells(21) (Figure 3).

One day following PUVA treatment, resting T cells cultured in the presence of IL-2, IL-7 or IL-15 displayed a specific apoptosis rate comparable to the medium condition (Figure 3a, b and c respectively). At day 2 and 3 following PUVA treatment, no protective effect was observed (Data not shown). Concerning activated T cells, the specific apoptosis rate was slightly decreased in the presence of IL-7 or IL-15 compared to the medium condition (Figure 3d). Activated CD8+ T cells were similarly apoptotic as those cultured in the medium condition (Figure 3f) whereas activated-CD4+ T cells cultured with IL-2, IL-7 or IL-15 displayed a lower specific apoptosis rate (Figure 3e) compared to medium condition. However, this trend is not statistically significant.

These data show that the presence of surviving cytokines such as IL-2, IL-7 and IL-15 do not modify the kinetics of apoptosis of the resting or activated T cells following PUVA treatment.

Antigen-specific activated T cells are more sensitive to PUVA than non-specific resting T cells:

The activation of T cells by mitogens do not reproduce clinical situation since cells are strongly activated and largely polyclonal. By contrast, alloreactive T cells

involved in the pathophysiology of GvHD are antigen-specific activated T cells and supposed to be oligoclonal (19,22,23). In the aim to be close to the clinical situation, T cells were then activated in an antigen-specific manner. We chose the model of anti-influenza T cell response in which Flu-specific T cells were amplified using autologous moDC pulsed with Flu₅₈₋₆₆ peptide as described elsewhere (24). After a 14-day culture, Flu-specific T cells represented 30% of total CD8⁺ T cells (Figure 4a).

We showed that, in the same culture, Flu-specific T cells were activated (CD69⁺ : 81.9%) whereas non-specific CD8⁺ T cells present in the culture were not activated (CD69⁻ : 88.1% ; Figure 4a). These cells were then treated by PUVA and their viability was assessed. Data presented in figure 4b show that following a 24h-culture, 12.8% of untreated Flu-specific activated T cells were apoptotic compared to 1.2% for non-specific resting T cells. Conversely, 80% of PUVA-treated Flu specific activated T cells were apoptotic compared to 25.8% of resting T cells. The specific apoptosis reached 76% in tetramer⁺ population versus 15% in tetramer⁻ population ($p < 0.01$; Figure 4c). These data show that T cells activated in an antigen-specific manner are more sensitive to PUVA than resting T cells.

Discussion:

ECP is a cell therapy currently used in the treatment of both acute and chronic GvHD for several years (25). Since ECP induces, for responding patients, GvHD improvement without causing generalized immunosuppression, it is thought to induce a specific control of alloreactive T cells. However its mechanisms of action are still poorly understood (13).

Since the best characterized ECP effect is the induction of apoptosis, we investigated here if ECP could have a differential effect on alloreactive and non-alloreactive T cells. Alloreactive T cells are in an activated state in GvHD(19,20), so we studied the ECP induced apoptosis on activated and resting T cells.

In this study, we first observed that activated T cells contained into blood from patients with chronic GvHD undergo faster apoptosis than resting T cells following *in vitro* PUVA treatment. We then demonstrated that this difference exists in cells activated either by non-specific mitogens or in an antigen specific manner. This difference of kinetic is observed during the first 24h, but disappears in the following days. Moreover, T cells cannot be rescue by addition of survival cytokines.

The higher sensitivity of activated T cells could be explained by the fact that proliferating activated cells are known to be more sensitive to DNA damages (8-MOP induced cross-linking) than non-proliferating resting cells (26). A reduced difference between the specific apoptosis rate of activated versus resting T cells from patients with GvHD was observed in these experiments and may be explained by the fact that the immunosuppressive treatment of patients renders T cells more sensitive to apoptosis (27,28). Indeed, resting T cells from patients with GvHD displayed a higher specific apoptosis following ECP than resting T cells from healthy donors.

These results describe, for the first time, a differential effect of ECP on alloreactive and resting T cell apoptosis but the resulting consequences should be evaluated. Recently, it has been demonstrated that activated apoptotic T cells trigger DC maturation (29). Moreover, as described elsewhere (30), DC are able to engulf PUVA-treated apoptotic cells. Together, these data suggest that a faster apoptosis of activated T cells could lead to a specific immune response against untreated activated T cells, i.e. alloreactive T cells.

Fast apoptosis of activated T cells following ECP

In conclusion, we demonstrated a differential effect of ECP on the kinetic of apoptosis of alloreactive and non-alloreactive T cells in GVHD and more generally on activated and resting T cells. The ability of ECP-treated activated T cells to trigger DC maturation and the resulting immune responses *in vitro* are currently under investigation.

Materials and Methods :

Medium and Reagents

The cell culture medium used throughout these experiments was RPMI 1640 Glutamax (Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 1 mmol/L sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, l'Isle d'Abeau, France), non-essential amino acids (Invitrogen), 20ng/ml gentamycin (Invitrogen) and 10% heat inactivated Fetal Calf Serum (referred to as complete medium).

Immunophenotyping was performed by using FITC-, PE-, PC7- and APC-conjugated mouse monoclonal antibodies from Beckman Coulter (Marseille, France). The following antibodies directed towards: CD3, CD4, CD8, CD25, CD69 and HLA-DR have been used, as well as controls IgG1, and IgG2a. The PE-conjugated tetramer Influenza M1₅₈₋₆₆ peptide / HLA-A2 was purchased from Beckman Immunomics (Marseille, France). The FITC-AnnexinV was purchased from Beckman Coulter. The 8-methoxypsoralen (8-MOP) was produced and provided by our cell therapy unit (Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, EFS/CHU Grenoble). Flow cytometric analyses were performed using a 6-color FACSCanto II flow cytometer and the Diva Software (BD Biosciences).

Patients with chronic GVHD

Some experiments were performed using blood samples from 3 patients suffering from chronic GvHD, following an allogenic hematopoietic stem transplantation. At the beginning of ECP treatment, patients were refractory to corticoids and mycophenolate mofetil treatment.

Cells

Blood samples were collected from healthy volunteers and patients with chronic GvHD who gave their informed consent. The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient on lymphocyte separation medium (Eurobio, Les Ulis, France). T cells were purified using the human T cells enrichment cocktail EasySep kit (Stem Cell Technologies Inc, Vancouver, Canada) according to

the manufacturer instructions. Cells from patients were immediately cryopreserved in liquid nitrogen until use.

T cells activation

PBMC from healthy donors were thawed and cultured ($1 \cdot 10^6$ /ml) in a 24-well plate in complete medium for 72h in the presence of anti-CD3 antibody (0.1 μ g/ml, OKT3 clone, Orthobiotec, USA) or phytohemagglutinin (2 μ g/ml, PHA, Sigma-Aldrich).

Influenza M1 peptide-specific CD8+ T cells generation

PBMC from healthy donors were stimulated with 1 μ M Flu peptide (M1₅₈₋₆₆, HLA-A2 restricted)-pulsed autologous monocyte-derived dendritic cells (Flu-moDC). MoDC were generated from purified monocytes cultured during 6 days in the presence of GM-CSF (500U/ml) and IL-4 (10ng/ml). In a 24-well plate, PBMC ($2 \cdot 10^6$ /well) and Flu-moDC ($2 \cdot 10^5$ /well) were cultured in 2ml of complete medium, restimulated at day 7 with Flu-moDC ($2 \cdot 10^5$ /well) in the presence of IL-2 (100U/ml) and harvested on day 14. The percentage of M1-specific CD8+ T cells was evaluated using PE-conjugated M1/HLA-A2 tetramer according to the manufacturer instructions.

Experimental Psoralen/UV-A treatment (PUVA)

PBMC or purified T cells were seeded at 1×10^6 cells/ml in complete medium. Cells were incubated for 15 min at 37°C with 200ng/ml of 8-MOP in the dark and exposed to 2 J/cm² 365nm wavelength UV-A radiation (Bio Sun, Vilbert-Lourmat). After PUVA treatment, cells were washed in complete medium and then cultured in complete medium at 37°C in 5% CO₂ atmosphere.

Cell Viability

Cells ($1 \cdot 10^6$ /ml) were treated or not by PUVA. They were then cultured in complete medium for 1 to 3 days. In some cases, cells were cultured in the presence of IL-2 (20U/ml, Chiron, Emeryville, USA), IL-7 (10ng/ml, R&D System, Lille, France) or IL-15 (10ng/ml, R&D System). Apoptotic cells were quantified by AnnexinV staining according to the manufacturer's instructions and analyzed by flow cytometry.

Percentage of specific apoptosis was calculated to take into account of the number and the viability of cells as follows:

$$\frac{[(\text{nb cells}) \times (\% \text{AnnV}^+ \text{ cells})]_{\text{control}} - [(\text{nb cells}) \times (\% \text{AnnV}^+ \text{ cells})]_{\text{PUVA}}}{[(\text{nb cells}) \times (\% \text{AnnV}^+ \text{ cells})]_{\text{control}}} \times 100$$

Statistical Analysis

All the experiments were performed in triplicates and repeated at least 3 times. Statistical significance was assessed using the Student's t test and differences were considered significant when $p < 0,05$.

Acknowledgments

We would like to thank MJ. Richard, H.Egelhofer and the staff of Cell and Tissue therapy Unit of Saint-Ismier for providing us the psoralen molecule. We are also grateful to P. Drillat, F. Bernard, C. Morand, I. Michaud, C. Guitton and the staff of EFS Rhône-Alpes for blood sample collections. We thank C. Asford for helpful discussions.

References:

1. Paczesny, S., D. Hanauer, Y. Sun, and P. Reddy. New perspectives on the biology of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant* 1: 1.
2. Ferrara, J.L., J.E. Levine, P. Reddy, and E. Holler. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; 9674: 1550.
3. Sakoda, Y., D. Hashimoto, S. Asakura, et al. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2007; 4: 1756.
4. Zhang, Y., E. Hexner, D. Frank, and S.G. Emerson. CD4+ T cells generated de novo from donor hemopoietic stem cells mediate the evolution from acute to chronic graft-versus-host disease. *J Immunol* 2007; 5: 3305.
5. Martin, P.J. Biology of chronic graft-versus-host disease: implications for a future therapeutic approach. *Keio J Med* 2008; 4: 177.
6. Laurin, D., D. Hannani, M. Pernollet, et al. Immunomonitoring of graft-versus-host minor histocompatibility antigen correlates with graft-versus-host disease and absence of relapse after graft. *Transfusion* 2009;
7. Greinix, H.T., R.M. Knobler, N. Worel, et al. The effect of intensified extracorporeal photochemotherapy on long-term survival in patients with severe acute graft-versus-host disease. *Haematologica* 2006; 3: 405.
8. Rubegni, P., A. Cuccia, P. Sbanò, et al. Role of extracorporeal photochemotherapy in patients with refractory chronic graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 2005; 2: 271.
9. Foss, F.M., G.M. DiVenuti, K. Chin, et al. Prospective study of extracorporeal photopheresis in steroid-refractory or steroid-resistant extensive chronic graft-versus-host disease: analysis of response and survival incorporating prognostic factors. *Bone Marrow Transplant* 2005; 12: 1187.
10. Couriel, D.R., C. Hosing, R. Saliba, et al. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of steroid-resistant chronic GVHD. *Blood* 2006; 8: 3074.
11. Flowers, M.E., J.F. Apperley, K. van Besien, et al. A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2008; 7: 2667.
12. Suchin, K.R., M. Cassin, R. Washko, et al. Extracorporeal photochemotherapy does not suppress T- or B-cell responses to novel or recall antigens. *J Am Acad Dermatol* 1999; 6: 980.
13. Plumas, J., O. Manches, and L. Chaperot. Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy in the control of GVHD: involvement of dendritic cells. *Leukemia* 2003; 11: 2061.
14. Enomoto, D.N., P.T. Schellekens, S.L. Yong, I.J. ten Berge, J.R. Mekkes, and J.D. Bos. Extracorporeal photochemotherapy (photopheresis) induces apoptosis in lymphocytes: a possible mechanism of action of PUVA therapy. *Photochem Photobiol* 1997; 1: 177.
15. Hannani, D., F. Gabert, D. Laurin, et al. Photochemotherapy Induces the Apoptosis of Monocytes Without Impairing Their Function. *Transplantation*
16. French, L.E., T. Alcindor, M. Shapiro, et al. Identification of amplified clonal T cell populations in the blood of patients with chronic graft-versus-host disease: positive correlation with response to photopheresis. *Bone Marrow Transplant* 2002; 8: 509.
17. French, L.E., S.R. Lessin, K. Addya, et al. Identification of clonal T cells in the blood of patients with systemic sclerosis: positive correlation with response to photopheresis. *Arch Dermatol* 2001; 10: 1309.
18. French, L.E. and A.H. Rook. T cell clonality and the effect of photopheresis in systemic sclerosis and graft versus host disease. *Transfus Apher Sci* 2002; 3: 191.

19. Toubai, T., Y. Sun, and P. Reddy. GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? *Best Pract Res Clin Haematol* 2008; 2: 101.
20. Reddy, P. and J.L. Ferrara. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev* 2003; 4: 187.
21. Ma, A., R. Koka, and P. Burkett. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006; 657.
22. Tsutsumi, Y., J. Tanaka, Y. Miura, et al. Molecular analysis of T-cell repertoire in patients with graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2004; 3: 481.
23. O'Keefe, C.L., A.M. Risitano, and J.P. Maciejewski. Clinical implications of T cell receptor repertoire analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Hematology* 2004; 3: 189.
24. Asford, C., J. Charles, M.T. Leccia, et al. A novel cancer vaccine strategy based on HLA-A*0201 matched allogeneic plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 5: e10458.
25. Marshall, S.R. Technology insight: ECP for the treatment of GvHD--can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 6: 302.
26. Roos, W.P. and B. Kaina. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 2006; 9: 440.
27. Strauss, G., W. Osen, and K.M. Debatin. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clin Exp Immunol* 2002; 2: 255.
28. Vogelsang, G.B., L. Lee, and D.M. Bensen-Kennedy. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med* 2003; 29.
29. Johansson, U., L. Walther-Jallow, A. Smed-Sorensen, and A.L. Spetz. Triggering of dendritic cell responses after exposure to activated, but not resting, apoptotic PBMCs. *J Immunol* 2007; 3: 1711.
30. Zheng, D.H., L.P. Dou, Y.X. Wei, et al. Uptake of donor lymphocytes treated with 8-methoxypsoralen and ultraviolet A light by recipient dendritic cells induces CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells and down-regulates cardiac allograft rejection. *Biochem Biophys Res Commun* 4: 540.

Figure Legends:

Figure 1: Activated T cells from patients with GvHD are more sensitive to PUVA than resting T cells

On the basis of FSC/SSC parameters, T cells are defined as the CD3+ population. The activation state was evaluated on the positivity for HLA-DR molecule. (A) Representative analysis showing the annexinV labelling of resting T cells (CD3+ HLA-DR-) or activated T cells (CD3+ HLA-DR+). (B) Specific apoptosis of 3 independent experiments from 3 patients is presented regarding the activation state of the T cells one day following PUVA. * $p < 0.05$. FSC, Forward Scatter ; SSC, Side Scatter ; AnnV, Annexin V

Figure 2: Activated T cells are more sensitive to PUVA than resting T cells:

Resting T cells were activated or not by OKT3 or PHA and treated or not by PUVA. (A) Expression of activation markers (CD25, CD69, and HLA-DR) by resting, and OKT3 or PHA-activated T cells. (B,C) Resting and activated T cells were treated by PUVA and the apoptosis of total CD3+ T cells, CD4+ and CD8+ subpopulations was measured by annexin V the following days. (B) Representative analysis showing the CD3+ T cell apoptosis one day following PUVA treatment. (C) Specific apoptosis of resting and activated T cells at day 1, and (D) day 2 post PUVA. (results are shown as the mean $\pm$ SD of 3 independent experiments performed in triplicate; *** $p < 0.01$).

Figure 3: The kinetics of apoptosis of resting or activated T cells is not delayed in the presence of survival cytokines:

Resting and OKT3 activated T cells were treated by PUVA and then cultured either in medium or in the presence of survival cytokines such as IL-2, IL-7 and IL-15. The specific apoptosis of resting (A, B C) and activated (D, E, F) total CD3+ T cells, CD4+ and CD8+ subpopulations respectively was represented at 1 day post PUVA. Data show the mean $\pm$ SD of 1 representative experiment of three, performed in triplicate.

Figure 4: T cells activated in an antigen-specific manner are more sensitive to PUVA than resting T cells

(A) Flu-specific T cells were amplified *in vitro*, representing 30% of the total number of cells. The CD69 expression by activated antigen specific and resting non-specific T cells was evaluated. (B,C) These cells were then treated by PUVA and the apoptosis was assessed. (B) Representative analysis of the apoptosis of tetramer positive and negative cells one day following PUVA treatment. (C) Specific apoptosis of tetramer positive and negative cells one day following PUVA treatment. Results are shown as the mean +/- SD of 3 independent experiments performed in triplicate; *** $p < 0.01$.

Figure 1

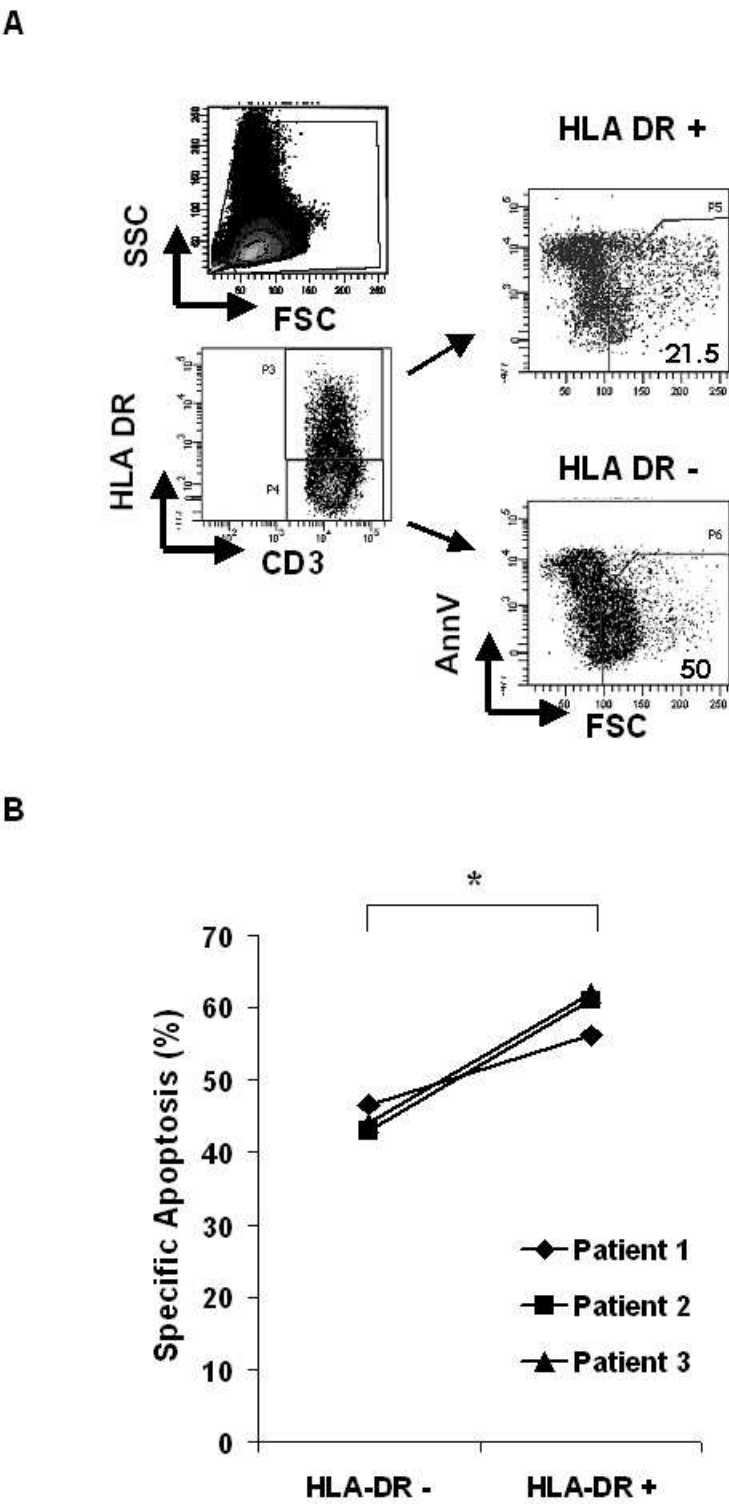


Figure 2:

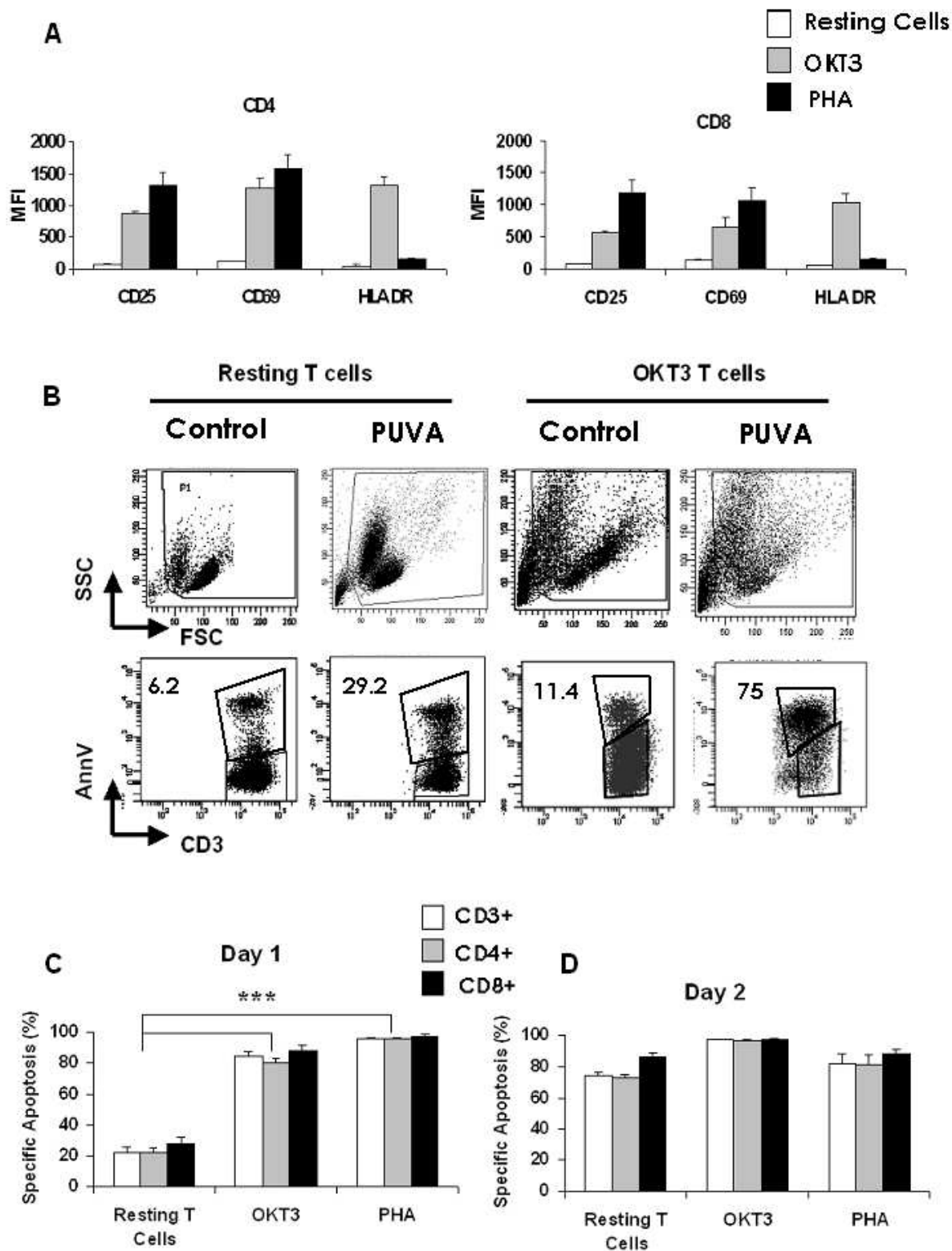


Figure 3:

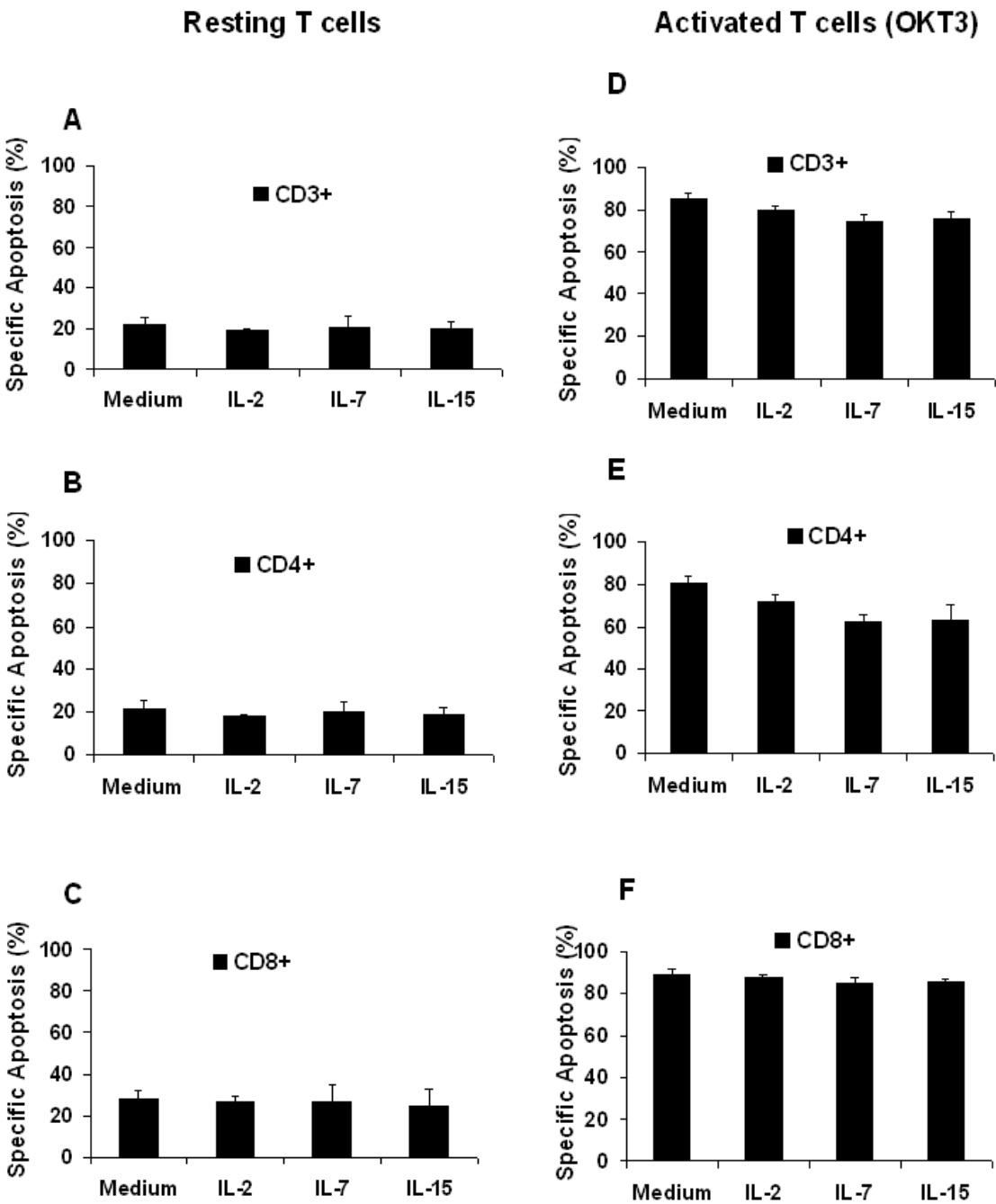
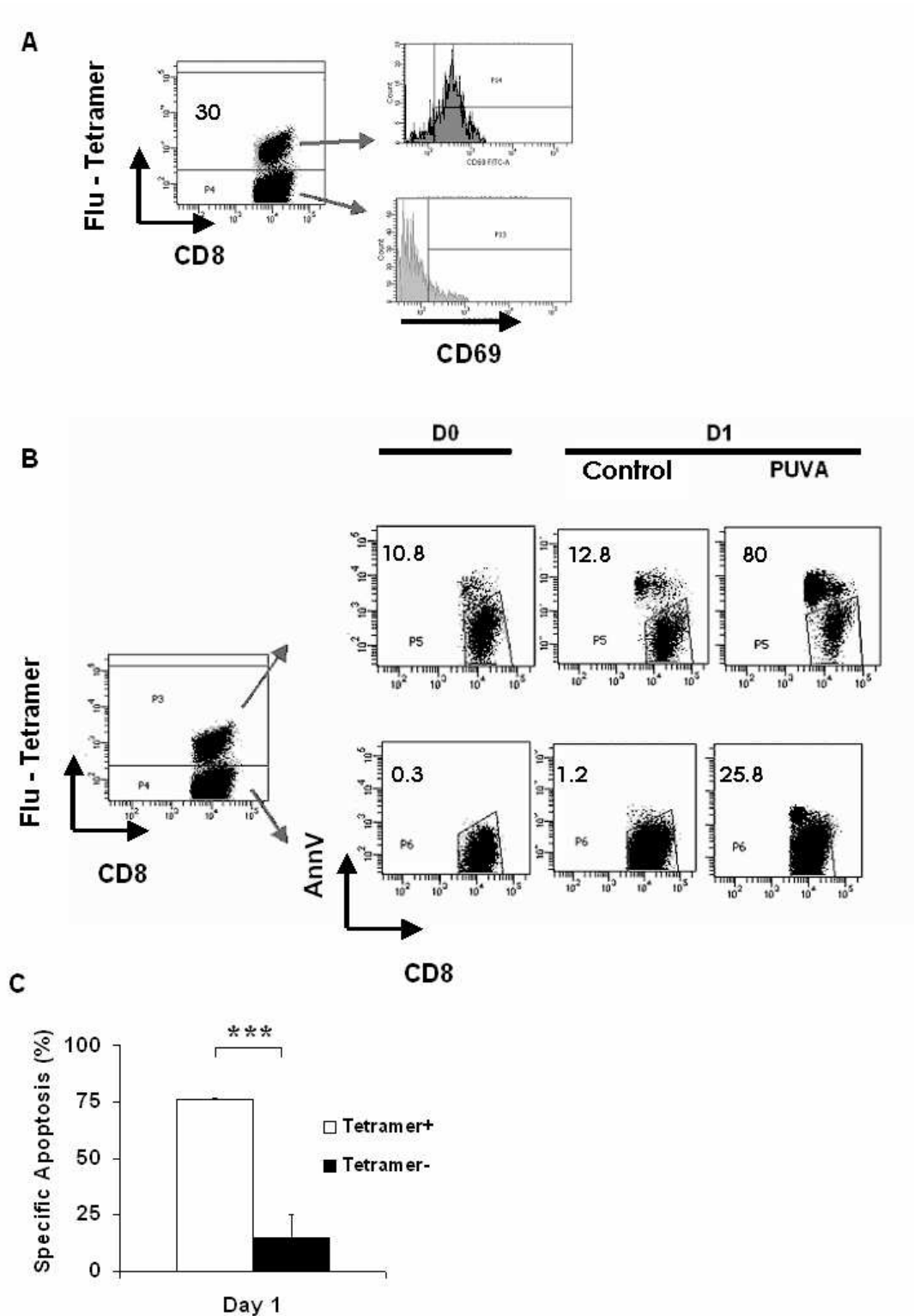


Figure 4:



C. Résultats Complémentaires

a. Immunogénicité des cellules traitées par PUVA

Introduction :

Dans la PCE, l'élaboration d'une réponse anti-clonotypique repose sur l'immunogénicité des cellules T apoptotiques traitées. Or les cellules apoptotiques ont longtemps été considérées comme strictement tolérogènes. Récemment, il a été démontré que les cellules apoptotiques pouvaient également être immunogènes(124) (Pour plus de détails Cf. Partie 3. C. b. I : Immunogénicité ou tolérogénicité des cellules apoptotiques ?) dépendant des signaux émis par ces dernières. En effet, selon ces études, une cellule apoptotique tolérogène sécrètera de l'IL-10 et du TGF β alors qu'une cellule apoptotique immunogène exposera à sa surface la calréticuline, puis sécrètera dans le milieu extracellulaire des molécules ayant des propriétés pro-inflammatoires notamment les Heat Shock Proteins (HSP), l'ATP et le High Mobility Group Box 1 (HMGB1).

Le traitement par PCE des cellules prélevées par aphérèse induit la mort par apoptose de celles-ci. A ce jour, nous ne connaissons pas encore précisément la nature de la réponse immunitaire induite suite à l'injection de ces cellules apoptotiques. Ainsi, il apparaît essentiel d'étudier les conséquences du traitement PUVA sur l'immunogénicité des cellules apoptotiques afin de nous aiguiller sur la nature de la réponse induite.

Dans cette partie, nous avons donc étudié l'effet du traitement PUVA sur l'exposition de la calréticuline en surface des cellules apoptotiques, ainsi que sur l'induction des HSP et de HMGB1 par ces dernières. Enfin, nous avons étudié le profil de production de cytokines par les cellules traitées.

Méthodologie :

Obtention des cellules T et traitement PUVA in vitro:

- Lymphocytes T purifiés au repos: Les LT au repos ont été isolés par tri négatif CD3 Easy Sep (Stem Cell) à partir de PBMC issus de volontaires sains.
- Lymphocytes T purifiés activés : Des PBMC de volontaires sains ont été cultivées durant 72h en présence d'anti-CD3 (OKT3 1µg/ml) puis les LT ont été isolés par tri négatif CD3 Easy Sep.

L'état d'activation a été confirmé par phénotypage en cytométrie en flux sur la base de l'expression des marqueurs : CD25, CD38, CD69 et HLA-DR (Cf.**Article 3 Figure 1** – données non montrées ici).

- Traitement PUVA in vitro : Cf méthode article 1

Mesure de l'expression de la calréticuline, des HSP et d'HMGB1 par les cellules T apoptotiques traitées par PUVA :

- L'exposition de la calréticuline en surface des cellules apoptotiques a été mesurée par cytométrie en flux, à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-CRT conjugué à la phycoérythrine (Abcam).
- L'expression des HSP a été mesurée dans des lysats cellulaires obtenus à partir de cultures de LT au repos ou activés, et traités ou non par PUVA. Un western blot (gel SDS-PAGE en condition dénaturante) a ensuite été réalisé à l'aide d'anticorps primaires anti- : HSP 70 (souris), HSP 90 (rat), Grp94 (rat), Actine (Lapin) et d'anticorps secondaires anti-Ig de : rat, lapin et souris couplés à la peroxydase.
- Le relargage d'HMGB1 par les cellules apoptotiques a été quantifié dans des surnageants de culture de LT apoptotiques au repos ou activés à

24h et 48h après le traitement par test ELISA sandwich (Kit ELISA HMGB1, IBL international, Allemagne).

- La production de cytokines par les cellules T apoptotiques au repos ou activées, cultivées seules, ou en présence de PBMC autologues au ratio 1 :1 (1 = 100 000 cellules, 200µl de milieu RPMI 10% SVF, en plaque 96 puits), a été mesurée en cytométrie en flux par test CBA (BD Bioscience).

Résultats :

Les cellules traitées par PUVA exposent en surface la Calréticuline au cours de l'apoptose :

Les cellules T au repos ou activées ont été traitées *in vitro* par PUVA. L'apoptose et l'exposition de la CRT en surface des cellules traitées ont été mesurées par cytométrie en flux par marquage à l'annexinV et à l'aide d'un anticorps anti-CRT. Les résultats 24h après PUVA sont représentés dans la **Figure R1**.

Ainsi, 24h après le traitement PUVA les cellules T au repos et activées entrent en apoptose atteignant une apoptose spécifique respective de 50% et 69% (**Figure R1B**). Les cellules T apoptotiques au repos ou activées annexinV⁺ sont pour la majorité CRT⁺. Les cellules T activées sont CRT⁺ à 46.6 % contre 22.9 % pour les cellules T au repos (**Figure R1A**). La MFI de la CRT est supérieure pour les LT activés (9643 vs. 6345) traduisant une exposition de la CRT en surface plus importante pour ces cellules (**Figure R1Aet B**).

La calréticuline est exposée en surface des cellules apoptotiques suite au traitement par PUVA et les cellules T activées traitées l'exposent en surface de manière plus importante que les cellules T au repos.

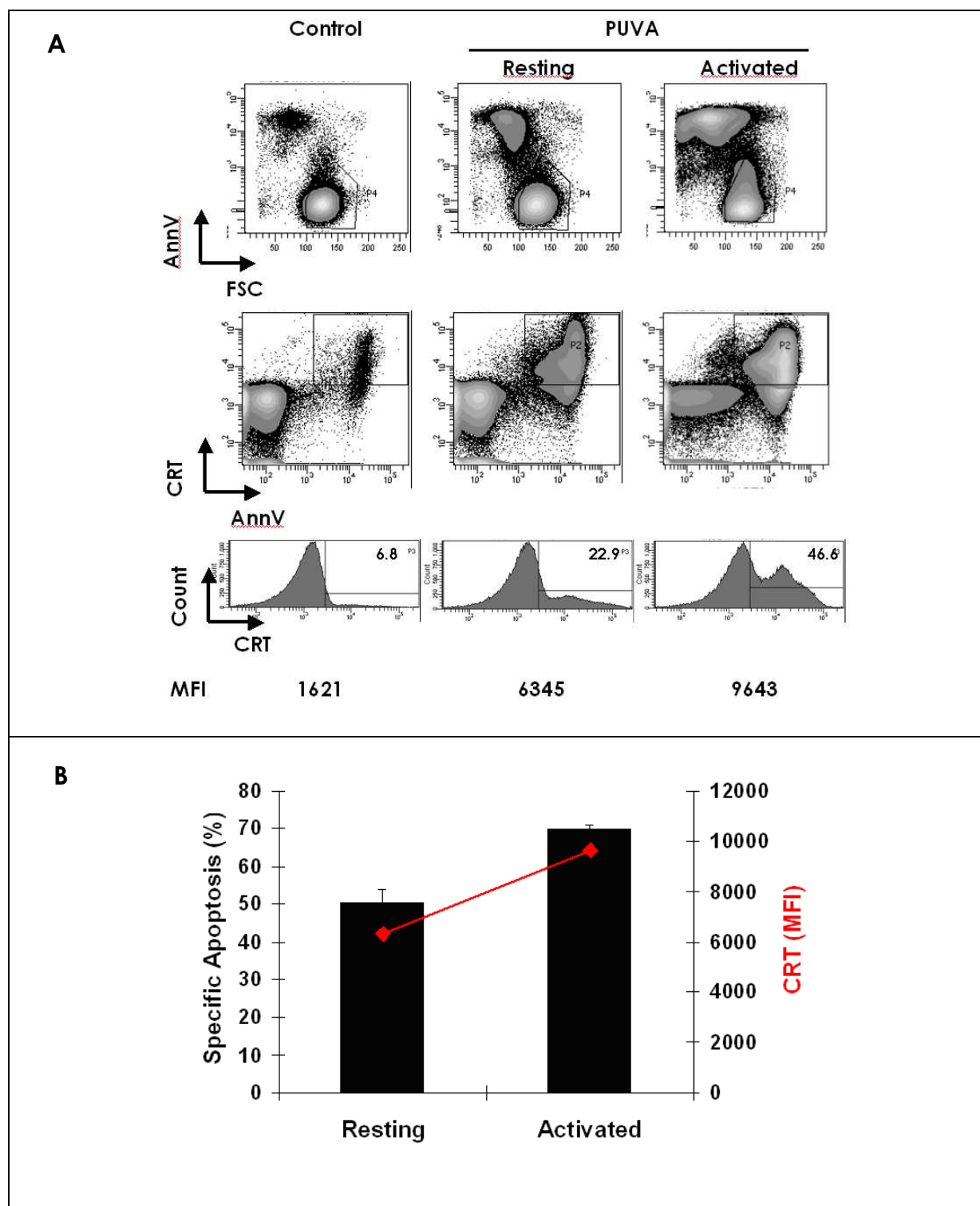


Figure R1 :

Les Lymphocytes T apoptotiques suite à un traitement par PUVA exposent en surface la Calréticuline. (A) Dot plots représentatifs des résultats obtenus par cytométrie en flux avec 2 donneurs sains. **(B)** Apoptose spécifique et MFI de la CRT des LT au repos et activés, 24h après le traitement. Control : LT non traités.

Expression des HSP par les cellules apoptotiques traitées par PUVA :

Nous avons cherché à mettre en évidence l'expression des HSP70, HSP 90 et Grp94 (HSP90 β) au sein des cellules traitées. Pour cela, des lysats cellulaires ont été obtenus à partir de cellules T traitées ou non à 4h et 24h après le traitement. En contrôle positifs, des cellules Hela positives pour les 3 HSP ou de l'HSP 70 et 90 ont été utilisées (**Figure R2**).

Aucune différence n'est observée dans l'expression des HSP 90 et Grp94 entre les conditions contrôles et PUVA à 4h et 24h après le traitement. Les résultats concernant l'expression d'HSP70 dans les conditions tests sont difficilement comparables aux contrôles positifs et ne peuvent être interprétés.

Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et devra être reproduite pour confirmer les résultats sur HPS 90 et Grp94, et obtenir des résultats interprétables sur l'expression d'HSP 70. De plus, l'expression des HSP sera également étudiée sur des lysats de cellules T activées traitées par PUVA.

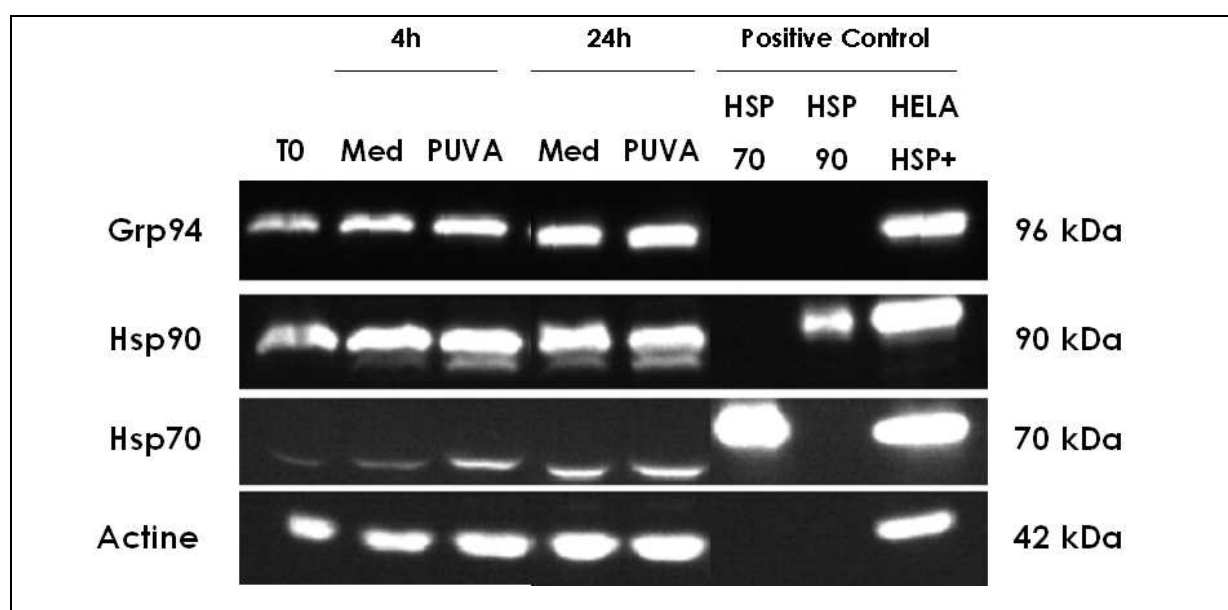


Figure R2 :

Expression des HSP 70, 90 et Grp94 au sein des cellules T au repos traitées par PUVA.
Actine : contrôle de la quantité de protéines déposée. Med : medium, les cellules ne sont pas traitées : condition contrôle. Contrôles positifs : HSP70 et 90 purifiées ; Cellules Hela exprimant les 3 HSP testées ici.

Les cellules T activées traitées par PUVA relarguent HMGB1 au cours de l'apoptose:

Afin de déterminer si les cellules T induites en apoptose par traitement PUVA relarguent HMGB1, des cellules T au repos ou activées, traitées ou non ont été cultivées durant 48h. Les surnageants de cultures ont été récupérés à 24h et 48h après le traitement et HMGB1 a été dosé par ELISA. La cinétique de relarguage d'HMGB1 est représentée dans la **Figure R3**.

En condition contrôle, les cellules T relarguent à un niveau basal HMGB1 (inférieur à 15 ng/ml) à 24h et 48h. Les cellules T au repos traitées par PUVA relarguent une quantité d'HMGB1 très légèrement supérieure au contrôle à 24h et 48h (20 et 23 ng/ml respectivement). Les cellules T activées traitées relarguent une quantité importante d'HMGB1 dès 24h (60 ng/ml) et qui est près de 2 fois plus importante à 48h (110 ng/ml). Le contrôle positif fourni dans le kit ELISA nous donne une valeur de 27 ng/ml.

Ainsi, les cellules T activées traitées par PUVA relarguent HMGB1 de façon très importante au cours de l'apoptose.

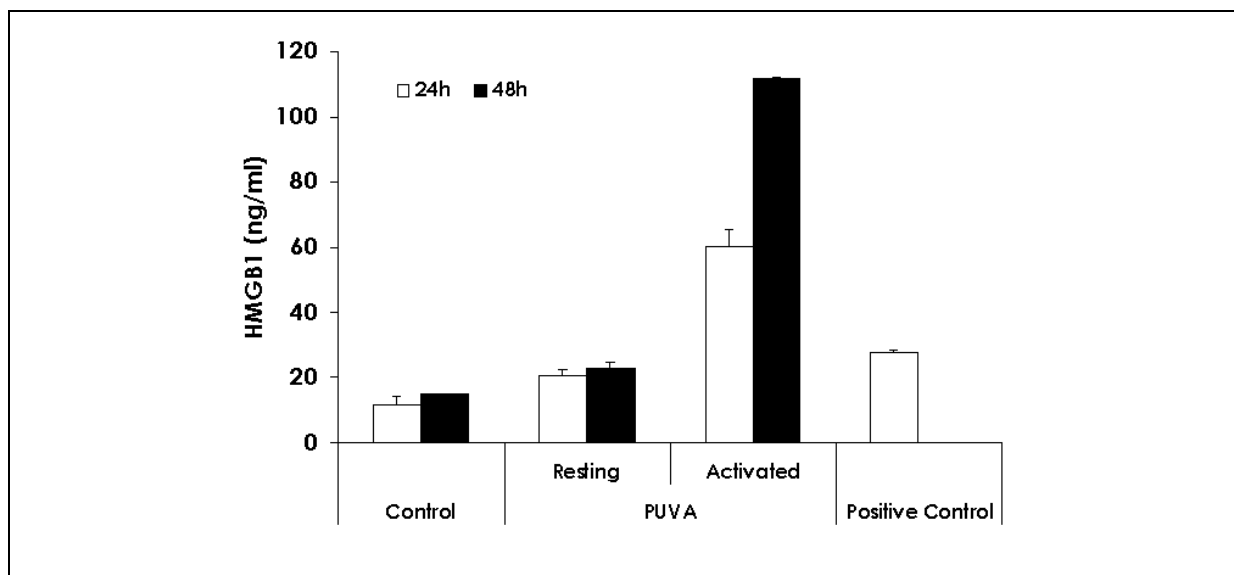


Figure R3 :

Cinétique de relarguage d'HMGB1 par les cellules T apoptotiques au repos ou activées, 24h et 48h suite au traitement PUVA. Le contrôle positif est HMGB1 purifié, fourni dans le kit ELISA. Le graphique représente une expérience réalisée en duplicats représentative de 3 expériences indépendantes.

La présence de cellules T activées induit la production massive d'IFN γ par des PBMC autologues :

La production de cytokines pro- ou anti-inflammatoires par les cellules apoptotiques est déterminante pour l'orientation et la nature de la réponse immunitaire induite. Les cellules apoptotiques peuvent sécréter des cytokines ou induire la production de cytokines par les cellules phagocytaires à leur contact. Nous avons dosé par test CBA en cytométrie en flux la production des cytokines IFN γ , IL-10, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 et TGF β par les cellules T apoptotiques au repos ou activées traitées par PUVA, seules ou co-cultivées au ratio 1 :1 avec des PBMC autologues non traitées, à 24h et 48h de culture (**Figure R4**). Aucune production de cytokine n'a été observée pour les cytokines IL-4, IL-5, IL-6, et IL-8, seuls l'IFN γ et l'IL-10 sont représentés (plusieurs difficultés rencontrées avec le CBA TGF β rendent les résultats non interprétables).

Les cellules T apoptotiques au repos ne produisent pas d'IFN γ même 48h après le traitement (**Figure R4 A**). En revanche, elles induisent une forte production d'IFN γ (100ng/ml) par les PBMC autologues après 48h de co-culture.

Les cellules T activées contrôles ou traitées produisent de grandes quantités d'IFN γ dès 24h de culture (100 ng/ml) et cette quantité n'augmente pas après 48h (**Figure R4 B**). Lorsque les cellules apoptotiques activées sont co-cultivées avec des PBMC autologues, la quantité d'IFN γ sécrétée en 24h est 10 fois plus importante (1000 ng/ml) et augmente encore à 48h atteignant 2000 ng/ml.

Les cellules T au repos contrôles et traitées cultivées seules, produisent de l'IL-10 après 48h de culture (19 et 6 ng/ml respectivement - **Figure R4C**). La quantité d'IL-10 produite par les cellules T traitées est 3 fois moins importante qu'en condition contrôle. En présence de PBMC autologues, on détecte une production d'IL-10 dès 24h atteignant 30 ng/ml, et près de 40ng/ml à 48h.

Ainsi les cellules T au repos traitées par PUVA produisent de l'IL-10 et induisent la production d'IFN γ et d'IL-10 par des PBMC autologues.

Les cellules T activées traitées par PUVA quant à elles, produisent spontanément de grandes quantités d'IFN γ et peu d'IL-10. Elles induisent une production d'IL-10 par les PBMC autologues comparable aux cellules traitées au repos. Enfin, les cellules T activées traitées par PUVA induisent une production très importante d'IFN γ par des PBMC autologues à leur contact, dès 24h.

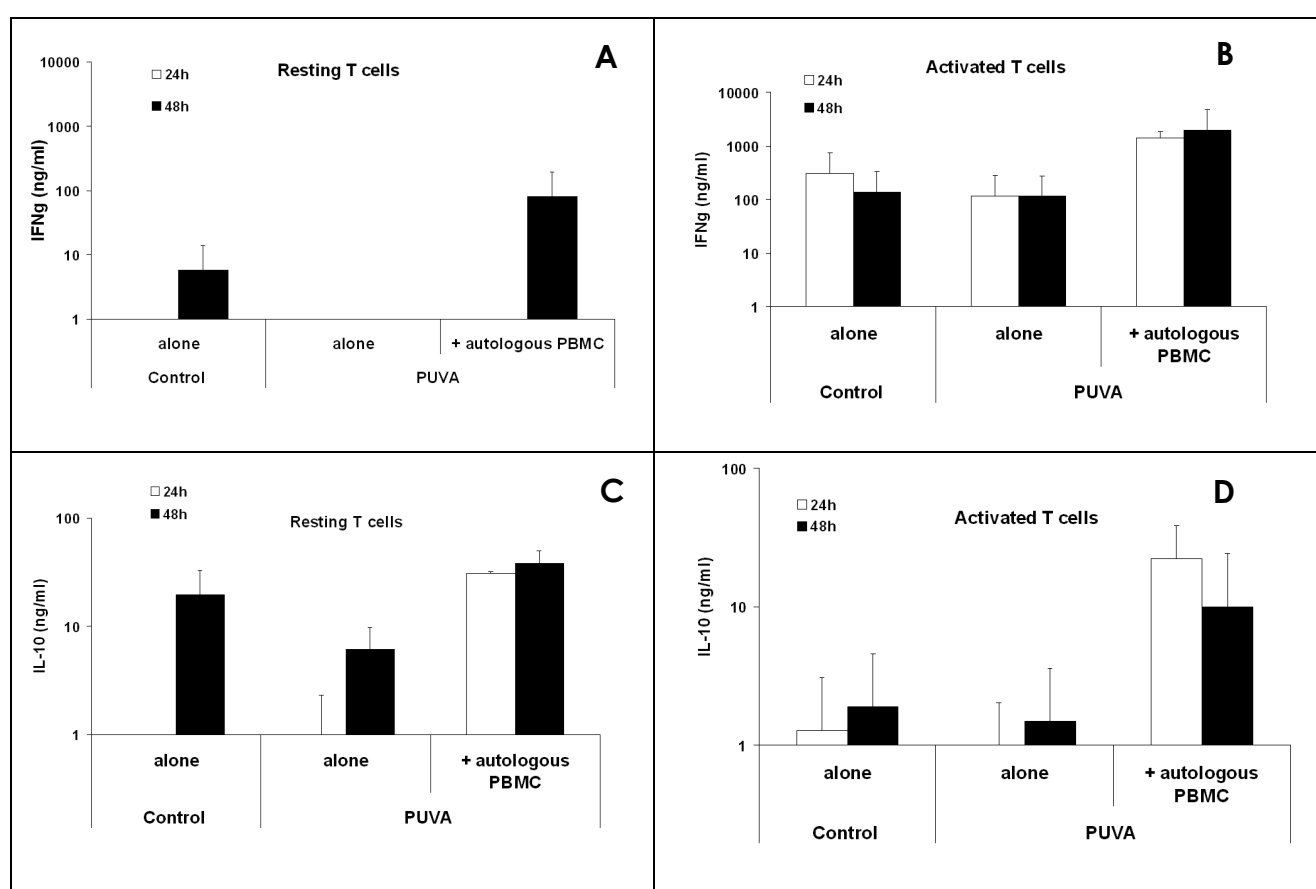


Figure R4 :

Production d'IFN γ et d'IL-10 par les cellules au repos ou activées traitées par PUVA ou par des PBMC autologues ou allogéniques co-cultivées durant 24h et 48h.

Conclusion :

L'objectif de cette étude était de déterminer si l'apoptose induite par le traitement PUVA avait des caractéristiques d'apoptose immunogène. Pour cela, nous avons caractérisé les principaux signaux d'immunogénicité de l'apoptose connus à ce jour, notamment l'exposition en surface de la calréticuline, l'expression des HSP, le relarguage d'HMGB1 et enfin, la nature des cytokines sécrétées par les cellules T apoptotiques ou par des PBMC non traitées mises à leur contact.

Nous montrons qu'au cours de l'apoptose induite par PUVA, les cellules T traitées entrant en apoptose exposent en surface la calréticuline, en quantité plus importante par les LT activés. Concernant l'expression des HSP par les cellules traitées, des expériences complémentaires doivent être envisagées. De la même manière que pour les HSP, l'ATP peut être relargué au cours d'une apoptose immunogène. Ainsi, des expériences de mesure de l'ATP relargué par les cellules T apoptotiques activées ou non sont en cours d'investigation.

HMGB1 est relargué par les cellules T traitées, en beaucoup plus forte quantité par les cellules T traitées activées comparées aux cellules T au repos.

Les cellules T activées traitées par PCE produisent spontanément de l'IFN γ dès 24h, et induisent la production de cette cytokine en très grande quantité par des PBMC non traitées autologues.

En conclusion, l'ensemble de ces données suggèrent que le traitement PUVA induit une apoptose non immunogène lorsque les cellules T traitées sont au repos. En revanche, les cellules T activées traitées présentent toutes les caractéristiques d'une apoptose immunogène. D'un point de vue fonctionnel, il est nécessaire de déterminer l'impact de ces cellules apoptotiques immunogènes sur la fonctionnalité des DC. La partie suivante est consacrée à cette étude.

b. Impact des cellules T traitées par PUVA sur la fonctionnalité des DC :

Introduction :

Nous avons vu précédemment que les LT activés entraient plus rapidement en apoptose que les LT au repos suite au traitement PUVA (**Article 3**). De plus, l'apoptose des LT activés présente un certain nombre de caractéristiques d'une apoptose immunogène. Afin d'aller plus loin dans l'analyse, nous avons voulu étudier dans cette partie l'aspect fonctionnel des cellules T apoptotiques activées ou au repos sur la fonctionnalité des cellules dendritiques.

Méthodologie :

Dans cette étude, des cellules T traitées *in vitro* par PUVA préalablement activées ou non par anti-CD3 ont été co-cultivées avec des cellules dendritiques dérivées de monocytes autologues (moDC). Après 24h, les différentes fonctionnalités des moDC ont été testées notamment :

- l'état d'activation des moDC après la co-culture,
- leur capacité à maturer après la co-culture, en présence d'un ligand de TLR,
- leur capacité d'endocytose,
- Leur capacité de stimulation des LT.

Ceci est résumé dans la **Figure R5**.

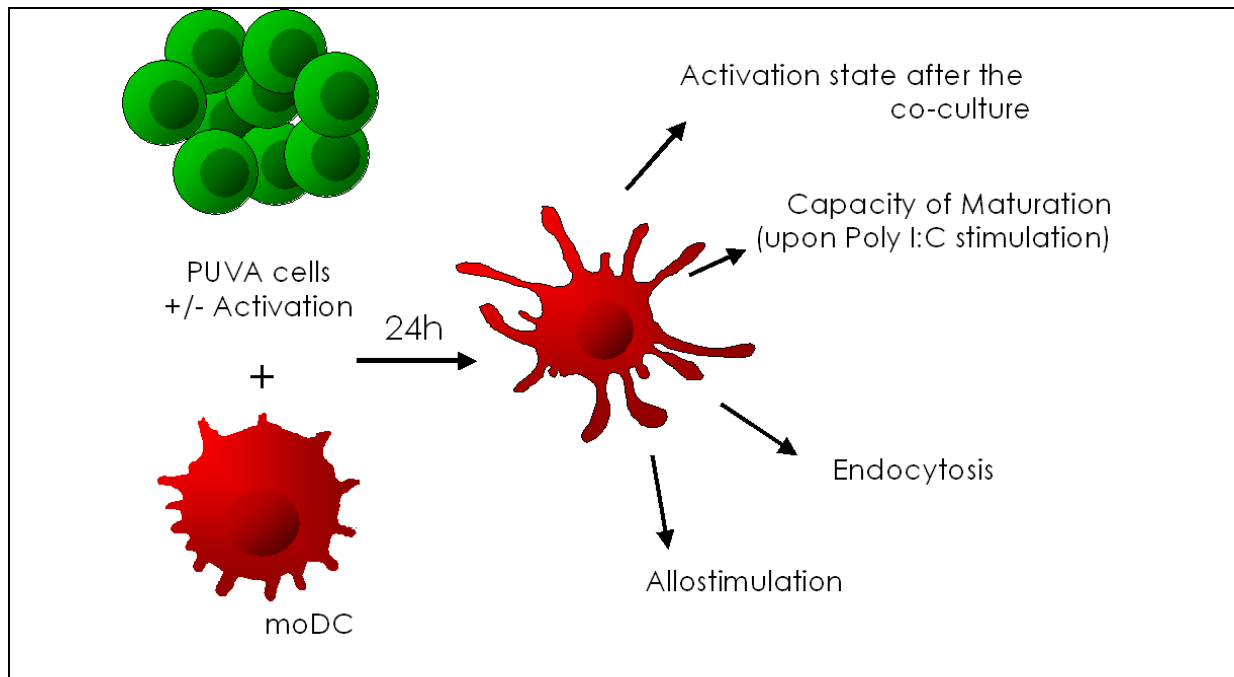


Figure R5 :

Résumé de la méthodologie expérimentale. Des moDC ont été cultivées durant 24h en présence de cellules T au repos ou activées traitées par PUVA. Puis leur état d'activation, leur capacité à maturer en présence d'un ligand de TLR, leur capacité d'endocytose et enfin d'allostimulation ont été testées dans les différentes conditions expérimentales.

Obtention des cellules :

Lymphocytes T activés et au repos :

Des PBMC ont été activées par un anti-CD3 (OKT3) durant 3 jours (**Cf. méthode Article 3**). A l'issue de ces 3 jours, les LT activés (**Article 3, figure 1**) sont purifiés (par tri négatif EasySep) puis congelés. Des LT au repos provenant des mêmes PBMC ont été triés et congelés.

Génération des moDC :

Les DC autologues aux LT ont été générées à partir des monocytes du même donneur, après 6 jours de culture en présence de GM-CSF et d'IL-4. (**Cf. méthode Article 2**).

Co-cultures moDC/cellules T traitées :

Les moDC ont été co-cultivées au ratio 1:1 (1 = 100 000 cellules, plaque 96 puits fonds ronds, dans 200µl de RPMI 10% SVF) avec des cellules T traitées par PUVA au repos, ou activées. Les moDC cultivées seules (medium) représentent le contrôle négatif, et les moDC en présence de Poly I:C (25µg/ml) représentent le contrôle positif d'activation. Ces conditions de co-cultures seront utilisées dans l'ensemble des expériences de ce travail.

Les capacités de maturation des moDC ont été testées en ajoutant un ligand TLR, le poly I:C (25µg/ml) après 24h de co-cultures moDC/cellules T traitées.

Test d'endocytose :

Des co-cultures de 24h, dans des conditions identiques aux précédentes ont été réalisées. A l'issue de la co-culture, de l'ovalbumine couplée au FITC (OVA-FITC, 0.1mg/ml) a été ajouté aux moDC ($0.5 \cdot 10^6$ cellules dans 0,5 ml de milieu RPMI 10% SVF) durant 2h. L'endocytose a ensuite été évaluée par cytométrie en flux en mesurant l'intensité de fluorescence FITC au sein de la population CD209+ (DC SIGN).

Test de phagocytose :

Les LT au repos ou activés ont été marqués au PKH26 puis traités par PUVA avant d'être co-cultivés en présence de moDC autologues durant 24h (Ratio DC:T 1:3 où 1 = 200 000 cellules ; dans 0.5 ml de RPMI 10% SVF en tube de 5 ml). Les cellules sont ensuite marquées à l'aide d'anticorps anti-CD3-APC et anti CD209-PerCP5.5. Les DC ayant phagocyté les LT sont les cellules CD209+PKH26+CD3-. Les DC CD209+PKH26+CD3+ ne sont pas comptabilisées.

Test de prolifération allogénique :

Des MLR ont été réalisées en cinétique en co-cultivant pendant 4,5 ou 6 jours des LT allogéniques (100 000 cellules) avec des moDC (20 000 cellules) préalablement cultivées pendant 24h seules, ou en présence de cellules T (100 000cellules) au repos ou activées traitées par PUVA comme suit :

moDC (20 000) +/- Cellules PUVA+/- activation (100 000) → 24h → + T allogéniques (100 000) → 6 jours.

L'incorporation de thymidine tritiée a été mesurée sur 18h de culture au 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} jour respectivement et les cellules ont été récoltées le lendemain. La prolifération est mesurée par un compteur de radioactivité (TopCount, Perkin Elmer).

Détection des LT régulateurs CD4+CD25+FoxP3+:

A l'issue de la prolifération allogénique décrite ci-dessus, les cellules ont été récoltées puis marquées à l'aide d'anticorps anti-CD4-APC et CD25-FITC (Human Regulatory T cell staining Kit, eBioscience). Les cellules ont ensuite été perméabilisées et l'anticopr anti-FoxP3-PE a été ajouté. Le protocole a été réalisée selon les recommandations du fabricant. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux. La quantité de cellules dans chaque puits a été déterminée afin de calculer la valeur absolue du nombre de Treg dans les échantillons analysés.

Résultats :

Les DC s'activent au contact des cellules T activées et traitées par PUVA :

L'état d'activation des moDC après co-culture avec des cellules T traitées au repos ou activées, a été déterminé par mesure de l'expression des marqueurs CD40 et CD80 par cytométrie en flux (MFI, **Figure R6**). Les moDC cultivées seules (medium) représentent le contrôle négatif, et en présence de Poly I:C (25µg/ml) représentent le contrôle positif de maturation.

L'expression de CD80 évolue peu selon les conditions. Les moDC contrôles expriment CD40 avec une MFI de 500. La présence de cellules T au repos traitées par PUVA induit une augmentation de l'expression de CD40 illustrée par l'augmentation de la MFI à 1200. Les cellules T activées apoptotiques activent plus fortement les moDC et le niveau d'expression de CD40 est proche du contrôle positif (MFI = 2000 et 2500 respectivement).

Ainsi, au contact des cellules T apoptotiques traitées par PUVA, les moDC s'activent en augmentant l'expression de CD40, et de façon plus importante lorsque les cellules T traitées sont préalablement activées.

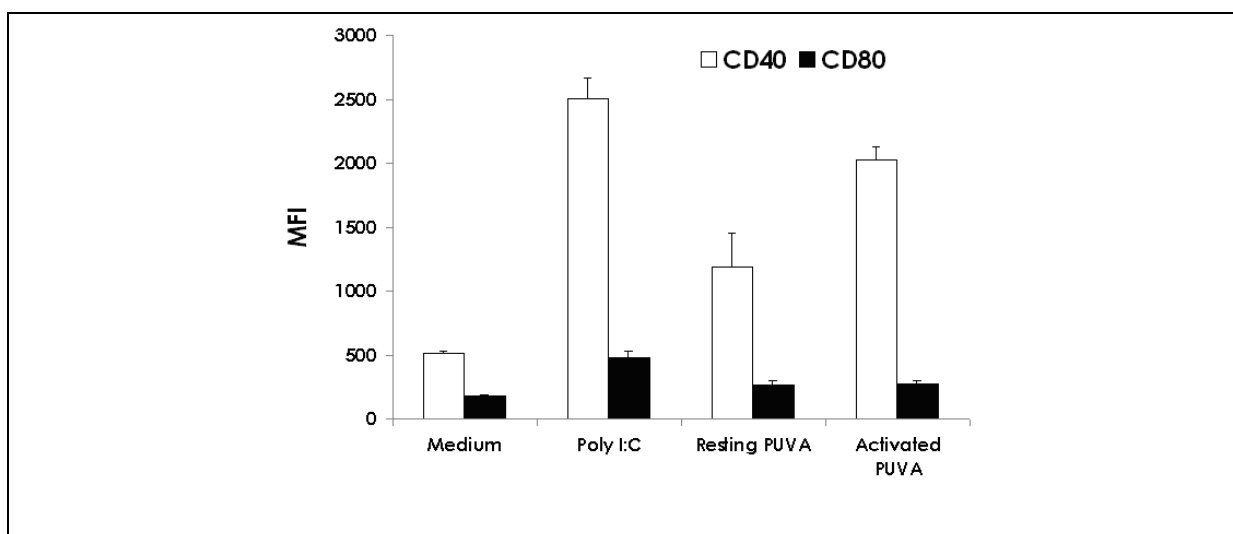


Figure R6 :

Etat d'activation des moDC en présence de cellules T au repos ou activées traitées par PUVA. Les moDC ont été cultivées durant 24h seules (medium), en présence d'un ligand de TLR, le Poly I:C (Poly I:C) ou en présence de cellules T traitées au repos (Resting PUVA) ou activées (Activated PUVA). Les résultats sont exprimés en moyenne de MFI +/- SD. Expérience réalisée en triplicatas représentative d'au moins 3 expériences indépendantes.

L'activation des DC par du LPS est plus importante au contact des cellules apoptotiques :

Il est important de déterminer si les DC restent capables de maturer après avoir interagi avec des cellules T au repos ou activées, traitées par PCE.

Ainsi, nous nous sommes intéressés à la capacité des moDC à s'activer par un ligand du TLR, en présence ou non de cellules traitées au repos ou

activées. La méthodologie est identique à la précédente à la différence qu'à l'issue de la co-culture de 24h, un ligand de TLR (Poly I:C 25µg/ml) est ajouté afin de mesurer l'état de maturation des moDC 24h plus tard. Les moDC contrôles ont été mises en culture en milieu seul durant 48h (medium, contrôle négatif) et pour le contrôle positif, les moDC ont été cultivées seules pendant 24h puis en présence de Poly I:C durant 24h supplémentaires.

Les contrôles positifs et négatifs sont tout à fait équivalents à l'expérience précédente (MFI de CD40 : 2300 et 600 respectivement – **Figure R7**). Les moDC ayant été pré-cultivées avec des cellules apoptotiques au repos ou activées ont une MFI pour CD40 supérieure au contrôle positif (3700, 5300 et 2300 respectivement).

Ainsi, les ligands de TLR induisent une activation plus forte des moDC lorsqu'elles ont été préalablement en contact avec des cellules T traitées par PUVA et tout particulièrement quand les cellules traitées sont des LT activés.

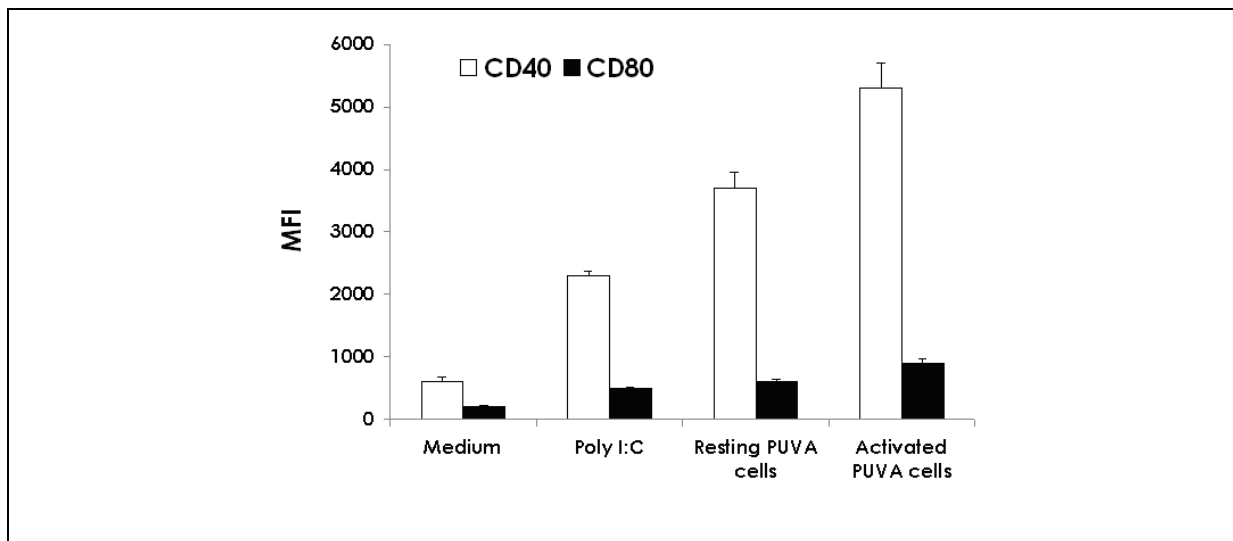


Figure R7 :

Capacité d'activation des moDC par un ligand de TLR après 24h de culture préalable en présence de cellules T au repos ou activées traitées par PUVA. Les moDC ont été cultivées durant 24h seules (medium et Poly I:C), ou en présence de cellules T traitées au repos (Resting PUVA) ou activées (Activated PUVA) durant 24h. Puis, elles ont été cultivées durant 24h supplémentaires en présence de poly I:C (25µg/ml). La condition medium représente des moDC cultivées seules durant 48h. Les résultats sont exprimés en moyenne de MFI +/- SD. Expérience réalisée en triplicatas représentative d'au moins 3 expériences indépendantes.

Les moDC activées au contact des LT activés apoptotiques ont une capacité d'endocytose réduite mais restent capables de phagocyter les cellules T traitées par PUVA :

Afin d'évaluer l'effet de la présence de cellules T apoptotiques au repos ou activées sur les capacités d'endocytose des moDC, des co-cultures de 24h, dans des conditions identiques aux précédentes ont été réalisées. A l'issue de la co-culture, de l'ovalbumine couplée au FITC (OVA-FITC) a été ajoutée durant 2h. L'endocytose a ensuite été évaluée en mesurant l'intensité de fluorescence FITC au sein de la population moDC CD209+ (DC SIGN). Les résultats de cytométrie en flux mesurant la MFI de OVA-FITC sont présentés dans la **Figure R8A**).

La MFI de l'OVA-FITC est identique entre les moDC cultivées seules ou en présence de cellules T au repos traitées par PUVA. La présence de cellules T activées traitées réduit l'intensité de fluorescence d'un tiers. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents car les LT activées traitées activent très fortement les moDC et il est connu que les DC activées perdent leur capacité d'endocytose.

Dans l'hypothèse d'une induction d'une réponse anti-clonotypique, les cellules T « pathogènes » clonales doivent être phagocytées et leurs antigènes apprêtés par les DC, pour être présentés aux LT anti-clonotypiques. Nous avons donc analysé la capacité des moDC activées par les cellules traitées PUVA à phagocyter ces mêmes cellules, et notamment les LT activés traités. Des LT au repos ou activés ont été marqués au PKH26 puis traités par PUVA avant d'être co-cultivés en présence de moDC autologues durant 24h. Les cellules sont ensuite marquées à l'aide d'anticorps anti-CD3-APC et anti CD209-PerCP5.5. Les DC ayant phagocyté les LT sont les cellules CD209+PKH26+CD3-. En 24h, 40% des moDC ont phagocyté des cellules T au repos traitées apoptotiques. En revanche 15% des moDC ont phagocyté des cellules T activées apoptotiques. Ce faible pourcentage de phagocytose

traduit l'état activé des DC au contact des cellules T activées traitées par PUVA.

En conclusion, les moDC phagocytent efficacement les cellules T au repos traitées par PUVA, et de façon moins importante les cellules T activées.

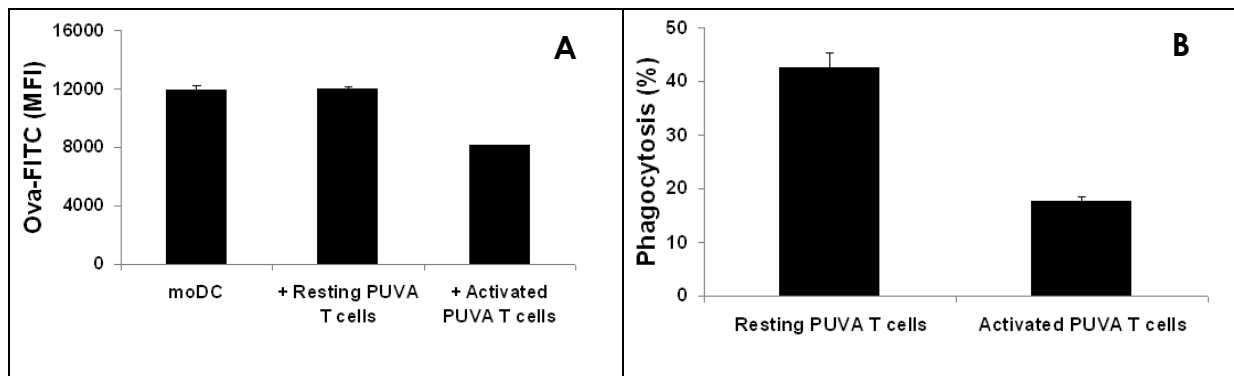


Figure R8 :

Effet des cellules T au repos ou activées traitées par PUVA sur les capacités d'endocytose et de phagocytose des moDC. (A) Endocytose de l'ovalbumine par des moDC en présence de cellules traitées par PUVA (B) Phagocytose par les moDC de cellules T au repos ou activées traitées par PUVA. Résultats d'une expérience représentative de 2, réalisées en triplicatas.

En présence de cellules T traitées par PUVA activées, les moDC acquièrent une très forte capacité d'allostimulation T :

Afin de vérifier la fonctionnalité des moDC ayant interagi avec des cellules T traitées par PUVA, des MLR ont été réalisées en cinétique en co-cultivant pendant 4, 5 ou 6 jours des LT allogéniques avec des moDC préalablement cultivées pendant 24h seules, ou en présence de cellules T au repos ou activées traitées par PUVA. La cinétique de prolifération allogénique est présentée dans la **Figure R9** ci-dessous. Le niveau de prolifération allogénique maximal est normalement atteint entre le 5^{ème} et le 6^{ème} jour. Ceci est confirmé par la condition contrôle dans laquelle la quantité d'incorporation de thymidine tritiée augmente entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jour (20 000 et 70 000 cpm respectivement). Un résultat similaire est obtenu lorsque les moDC sont préalablement cultivées en présence de cellules T au repos traitées par PUVA. La présence de cellules T activées apoptotiques modifie considérablement la cinétique de prolifération allogénique, et dès le 4^{ème}

jour, la quantité d'incorporation de thymidine tritiée dans cette condition est plus importante que la quantité de prolifération maximale atteinte en 6 jours en condition contrôle ou en présence de cellules T au repos traitées par PUVA (90 000 cpm à J4 en condition « cellules T activées traitées par PUVA » vs. 70 000 cpm à J6 en condition contrôle).

Ainsi, la présence de cellules T activées traitées par PUVA induit une augmentation des capacités d'allostimulation des moDC. Il est intéressant de noter que malgré le phénotype activé des moDC (augmentation de l'expression de CD40) au contact des cellules T au repos traitées, les moDC n'ont pas de capacité d'allostimulation augmentée.

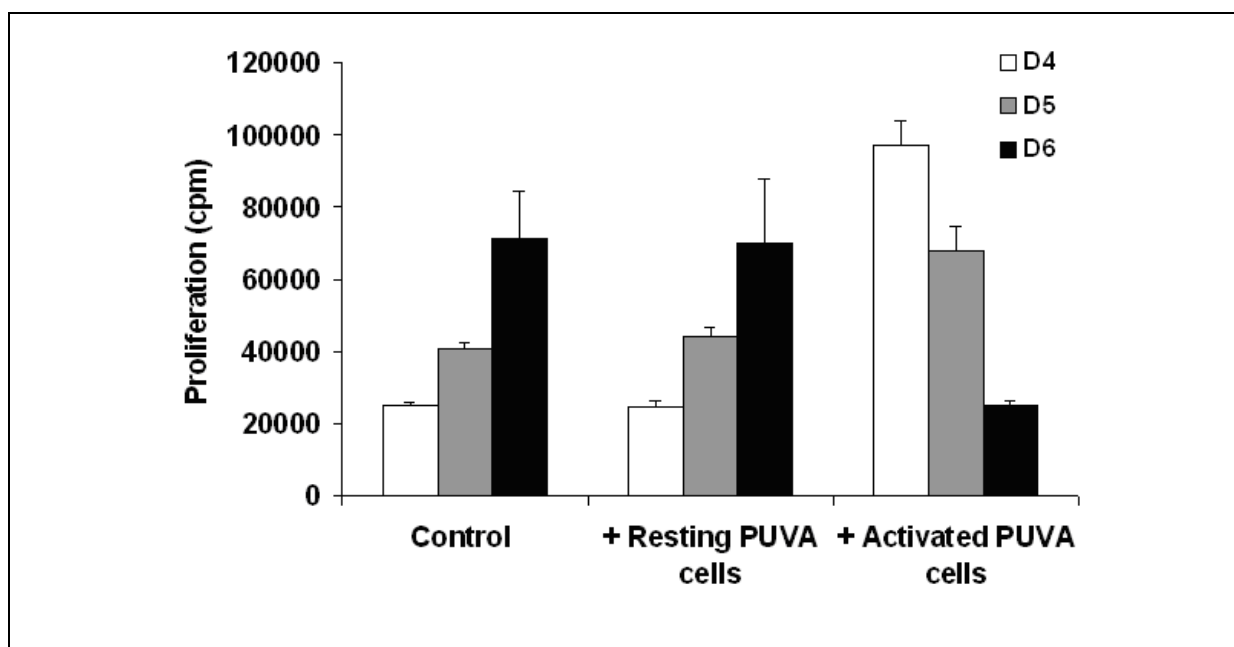


Figure R9 :

Cinétique de prolifération allogénique T induite par des DC en présence de cellules T au repos ou activées traitées par PUVA. Control : moDC seules + LT allogéniques. Resting PUVA cells : moDC + LT au repos traités par PUVA pendant 24h puis ajout des LT allogéniques. Activated PUVA cells : moDC + LT activés traités par PUVA pendant 24h puis ajout des LT allogéniques. Histogramme représentatif d'au moins 6 expériences indépendantes, réalisées en quadruplicats.

La quantité de T_{reg} induits est diminuée en présence de cellules T activées traitées par PUVA :

Afin de déterminer la nature des cellules ayant proliféré au cours des MLR réalisées précédemment, nous avons évalué la quantité de Treg CD4+ ou CD8+ et CD25+FoxP3+ induits à l'issue des 6 jours de culture en pourcentage et en valeur absolue (**Figure R10**).

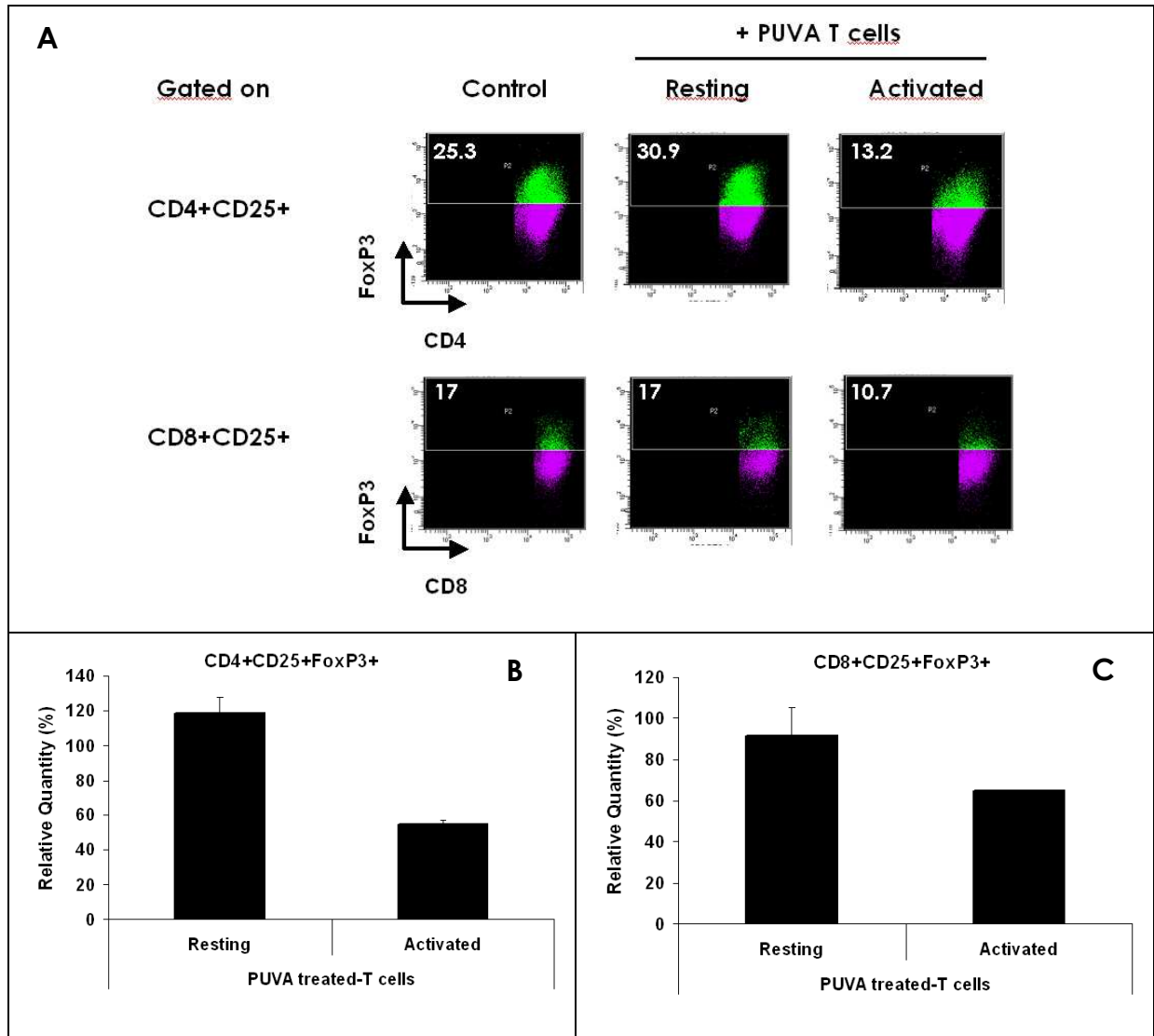


Figure R10 :

La présence de cellules T activées traitées par PUVA inhibe l'induction de Treg FoxP3+ au cours d'une MLR. Des cellules T au repos ou activées traitées ont été ajoutées à une MLR (moDC + LT allogéniques) durant 6 jours. A l'issue de la MLR, un phénotypage des Treg CD4+ ou CD8+ CD25+FoxP3+ a été réalisé par cytométrie en flux. **(A)** Dot plot représentatifs des résultats obtenus avec 2 donneurs en duplicatas. **(B)** Valeur absolue de Treg CD4+CD25+FoxP3+ présents à la fin de la MLR, exprimée en pourcentage relatif à la condition contrôle (100%). **(C)** Valeur absolue de Treg CD8+CD25+FoxP3+ présent à la fin de la MLR, exprimée en pourcentage relatif à la condition contrôle (100%). **(B et C)** représentent des moyennes +/- écart type de résultats obtenus à partir de 2 donneurs

Ainsi, en contrôle, on détecte 25% de Treg CD4⁺ CD25⁺FoxP3⁺ et 17% de Treg CD8⁺ CD25⁺FoxP3⁺ à l'issue de la culture et les résultats sont similaires en présence de cellules T au repos traitées par PUVA (**Figure R10 A**). En présence de cellules T activées traitées par PUVA, la proportion de Treg diminue et est de 13.2% et 10.2% de Treg FoxP3⁺ CD4⁺ et CD8⁺ (respectivement). Dans cette dernière condition, la prolifération allogénique est plus importante (**Figure R9**) et pourrait expliquer cette diminution en proportion. Afin de prendre en compte le niveau de prolifération, la quantité de cellules a été déterminée pour chaque puits de culture. La valeur absolue de Treg évaluée dans les puits contrôles représente 100% et est représentée en **Figure R10 B et C** la quantité relative du nombre de Treg dans les autres conditions, par rapport à la condition contrôle. Ainsi, en présence de cellules T au repos traitées par PUVA, on observe que le nombre de Treg CD4⁺ et CD8⁺ est relativement similaire à la condition contrôle (118% +/- 10 et 92% +/- 14 respectivement – **Figure R10 B**). La présence de cellules T activées traitées par PUVA induit une diminution de la valeur absolue de Treg CD4⁺ et CD8⁺ (55% +/- 2 et 65% +/- 0.5 respectivement – **Figure R10 C**).

En conclusion, la présence de cellules T activées traitées par PUVA induit une diminution de la quantité de Treg CD4⁺ et CD8⁺ CD25⁺FoxP3⁺ induits lors d'une prolifération allogénique.

Conclusion :

En conclusion, nous avons démontré que la présence de cellules T activées traitées par PUVA induit la maturation des DC et diminue leur capacité d'endocytose. Néanmoins, les DC restent capables de phagocyter des cellules T activées traitées par PUVA. La maturation des DC, induite par les cellules T traitées par PUVA, leur confère une plus forte capacité à stimuler la prolifération allogénique T, et diminue la quantité de Treg CD4⁺ et CD8⁺ CD25⁺FoxP3⁺ induits au cours de la réaction allogénique.

Ces résultats confirment le caractère immunogène ou pro-inflammatoire des cellules T activées traitées par PUVA. En perspective de ce travail, il faudra déterminer si le caractère immunogène des cellules T activées permet l'élaboration d'une réponse anti-clonotypique. Ces perspectives sont présentées dans la partie suivante.

D. Perspectives

Modèle *in vitro* de « vaccination anti-T »

Introduction :

Afin de démontrer, ou d'invalider, l'hypothèse selon laquelle le traitement par PUVA d'un clone T « pathogène » induit l'élaboration d'une réponse anti-clonotypique, nous avons développé un modèle *in vitro* de « vaccination anti-T ».

Modèle *in vitro* de « vaccination anti-T » - Méthodologie :

Des clones T CD8⁺ spécifiques du peptide M1₅₈₋₆₆ du virus de l'Influenza (peptide Flu), restreints par HLA-A2, et des clones T CD4⁺ spécifiques du peptide p30₉₄₇₋₉₇₆ de la toxine tétanique (peptide TT), restreints par HLA-DP4, seront générés, puis traités par PUVA. Ces clones T CD8⁺ ou CD4⁺ traités seront co-cultivés pendant 7 jours avec des PBMC autologues en présence de moDC autologues (**Figure R11**). Cette étape mime la stimulation du système immunitaire du patient par l'injection répétée de cellules T « pathogènes » traitées. Les PBMC seront restimulées avec le même clone T traité par PUVA et des moDC autologues pendant 7 jours afin d'amplifier des cellules T spécifiques des clones traités i.e des « LT anti-clonotypiques ». La fonctionnalité de ces cellules sera testée comme suit.

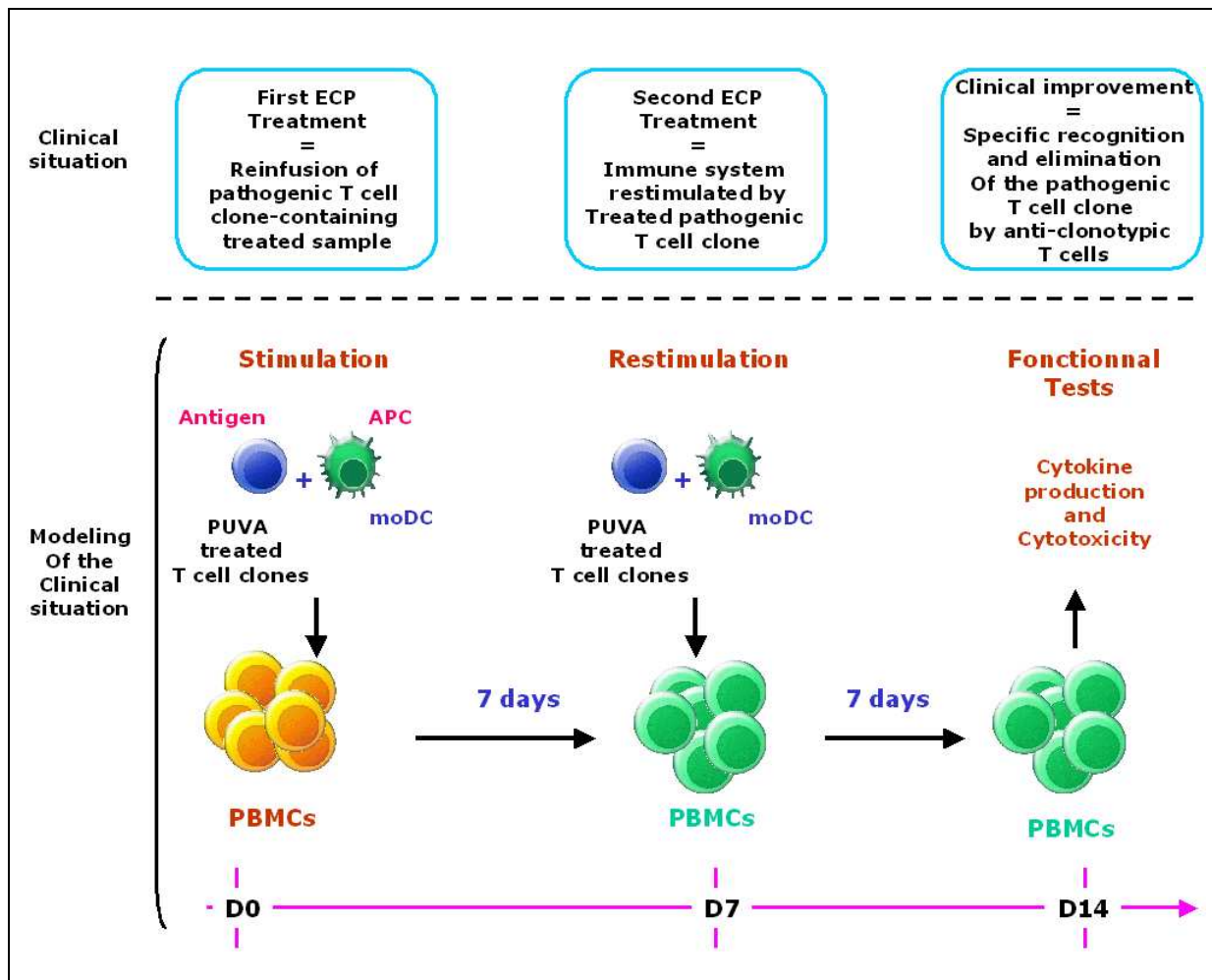


Figure R11 :

Modèle *in vitro* de « vaccination anti-T ».

Tests fonctionnels des « LT anti-clonotypiques » :

A l'issue des 14 jours de culture, nous chercherons à mettre en évidence la présence de « LT anti-clonotypiques ». Ne connaissant pas la nature des antigènes reconnus par ces « LT anti-clonotypiques », nous avons défini 2 tests fonctionnels « indirects » :

1. Evaluation du profil cytokinique des « LT anti-clonotypiques » :

Principe : Le principe du test est basé sur la capacité des LT anti-clonotypiques à être restimulés par leur antigène (TcR ou autre) exprimé par le clone T.

Méthodologie : Les LT anti-clonotypiques seront restimulés durant 24h par des clones T non traités. Un phénotype complet sera réalisé pour identifier l'émergence d'une population particulière.

2. Evaluation des capacités cytotoxiques des « LT anti-clonotypiques » :

Principe : Le principe du test est basé sur la capacité des LT anti-clonotypiques à lyser spécifiquement les clones T contre lesquels ils ont été stimulés.

Méthodologie : Les LT anti-clonotypiques seront évalués par test de cytotoxicité par relargage du chrome51.

Résultats attendus :

Grâce à ce modèle in vitro, nous espérons mettre en évidence une réponse T anti-clonotypique induite par le traitement d'un clone T « pathogène » traité par PUVA chez l'Homme.

2. Amélioration des pratiques cliniques de la PCE : optimisation du traitement de la GvHD par PCE chez l'enfant

Préambule

La finalité majeure de l'étude des mécanismes d'action de la PCE est, au delà du défi scientifique et de la connaissance fondamentale, l'amélioration des pratiques cliniques. C'est pourquoi en parallèle de la recherche des mécanismes d'actions de la PCE, notre engagement vis à vis des patients s'est traduit par un travail orienté vers la clinique, en étroite collaboration avec le service d'oncologie pédiatrique du CHU de Clermont-Ferrand, notamment avec le Dr. Etienne Merlin et les Pr. Justyna Kanold et François Deméocq.

Introduction

A. Article 4 : La PhotoChimiothérapie Extracorporelle chez l'enfant

Soumis aux « Archives Pédiatriques »

Manuscript Number:

Title: Rationnel pour une utilisation plus large de la Photochimiothérapie Extracorporelle chez l'enfant.

Article Type: Mise au point

Section/Category: Article pour numéro courant

Keywords: thérapie cellulaire; psoralène; aphérèse; immunomodulation

Corresponding Author: Dr Etienne Merlin,

Corresponding Author's Institution: CHU Clermont-Ferrand

First Author: Etienne Merlin, MD, PhD

Order of Authors: Etienne Merlin, MD, PhD; Justyna Kanold, MD, PhD; Dalil Hannani; Daniel Terral, MD; Michel D'Incan, MD, PhD; François Deméocq, MD, PhD

Abstract: Malgré l'apport des biothérapies, le traitement des maladies dysimmunitaires sévères et des conflits allogéniques de l'enfant reste difficile et entaché de nombreuses complications. Dans ce contexte, la photochimiothérapie extracorporelle (thérapie cellulaire qui repose sur l'effet immunomodulateur des cellules mononucléées du patient, prélevées par aphérèse et exposées ex vivo aux UVA en présence de psoralène) a l'avantage notable d'induire une tolérance immunitaire sans générer d'immunosuppression systémique ni de toxicité à court, moyen ou long terme. Cette immunomodulation fait intervenir notamment la génération de lymphocytes T régulateurs. Malgré cela, la PCE est peu utilisée en raison de ses contraintes logistiques et du manque de données cliniques. Nous proposons une revue des indications reconnues et potentielles de la PCE en pédiatrie. Nous insistons sur la nécessité d'une évaluation clinique spécifique à l'enfant qui ne peut se concevoir sans la participation active des cliniciens pédiatres en particulier dans le domaine de la transplantation et des maladies auto-immunes et inflammatoires.

Summary

The management of immune diseases in children remains challenging although significant advances have been made. Beside the pharmacological approaches, Extracorporeal Photochemotherapy (ECP) is distinguishable by its ability to provide immunomodulation without immune suppression or toxicity. However, in practice this therapy is not widely used due to logistical issues and to the lack of robust clinical paediatric studies. Here we discuss the potential clinical applications of ECP in children; we insist on the need of a rigorous and specifically paediatric clinical evaluation of ECP.

Suggested Reviewers: Jean-Pierre Vannier MD, PhD
Pédiatrie, CHU Rouen
Jean-Pierre.Vannier@chu-rouen.fr

Rationnel pour une utilisation plus large de la Photochimiothérapie Extracorporelle chez l'enfant.

Rationale for the use of Extracorporeal Photochemotherapy in children.

Etienne Merlin ^{1,2}, Justyna Kanold ^{1,2,3}, Dalil Hannani ⁴, Daniel Terral ¹, Michel D'Incan ⁵, François Deméocq ^{1,2,3}.

1-CHU Clermont-Ferrand, Centre Régional de Cancérologie et Thérapie Cellulaire Pédiatrique, Hôtel-Dieu, F-63001 Clermont-Ferrand, France.

2- Inserm, CIC 501, F-63003 Clermont-Ferrand, France.

3- Clermont Université, Univ Clermont1, Faculté de Médecine, F-63001 Clermont-Ferrand, France.

4- Inserm, U823, Immunobiologie et Immunothérapie des cancers, EFS La Tronche, F-38706 ; Univ Joseph Fourier, F-38041 Grenoble, France

5. CHU Clermont-Ferrand, Service de dermatologie, Hôtel-Dieu, F-63001 Clermont-Ferrand, France.

Auteur correspondant :

Etienne Merlin

Centre Régional de Cancérologie et Thérapie Cellulaire Pédiatrique

Hôtel-Dieu

63058 Clermont-Ferrand cedex

Tél. : 04 73 75 00 09

Fax : 04 73 75 00 04

Courriel : e_merlin@chu-clermontferrand.fr

Titre court : La PCE en pédiatrie

Mots clés : thérapie cellulaire ; psoralène ; aphérèse ; immunomodulation

Résumé

Malgré l'apport des biothérapies, le traitement des maladies dysimmunitaires sévères et des conflits allogéniques de l'enfant reste difficile et entaché de nombreuses complications. Dans ce contexte, la photochimiothérapie extracorporelle (thérapie cellulaire qui repose sur l'effet immunomodulateur des cellules mononucléées du patient, prélevées par aphérèse et exposées *ex vivo* aux UVA en présence de psoralène) a l'avantage notable d'induire une tolérance immunitaire sans générer d'immunosuppression systémique ni de toxicité à court, moyen ou long terme. Cette immunomodulation fait intervenir notamment la génération de lymphocytes T régulateurs. Malgré cela, la PCE est peu utilisée en raison de ses contraintes logistiques et du manque de données cliniques. Nous proposons une revue des indications reconnues et potentielles de la PCE en pédiatrie. Nous insistons sur la nécessité d'une évaluation clinique spécifique à l'enfant qui ne peut se concevoir sans la participation active des cliniciens pédiatres en particulier dans le domaine de la transplantation et des maladies auto-immunes et inflammatoires.

Summary

The management of immune diseases in children remains challenging although significant advances have been made. Beside the pharmacological approaches, Extracorporeal Photochemotherapy (ECP) is distinguishable by its ability to provide immunomodulation without immune suppression or toxicity. However, in practice this therapy is not widely used due to logistical issues and to the lack of robust clinical paediatric studies. Here we discuss the potential clinical applications of ECP in children; we insist on the need of a rigorous and specifically paediatric clinical evaluation of ECP.

1 INTRODUCTION

Les pathologies dysimmunitaires sévères et conflits allogéniques occupent une place croissante dans la pathologie pédiatrique (1-3). Leur prise en charge médicamenteuse repose en grande partie sur les immunosuppresseurs, associant les traitements pharmacologiques « conventionnels » (corticothérapie, anti-calcineurine, anti-métabolites) et les biothérapies (anticorps monoclonaux, protéines recombinantes). L'objectif du traitement est d'obtenir une immunosuppression suffisante pour une efficacité thérapeutique au prix d'un risque infectieux et d'effets indésirables les plus faibles possibles. Les biothérapies ont profondément amélioré cette prise en charge, mais leur utilisation reste associée à un risque infectieux non-négligeable (4). D'autre part, leur efficacité n'est pas constante et les conséquences de leur utilisation à long terme sont encore mal connues chez l'enfant. La recherche de traitements non-toxiques reste donc un enjeu important.

La photochimiothérapie extracorporelle (PCE) ou photophérèse est une technique de thérapie cellulaire qui repose sur l'effet immunomodulateur des cellules mononucléées (CMN) du patient, prélevées par aphérèse et exposées *ex vivo* aux UVA en présence d'une molécule photoactivable, le psoralène (5) (figure 1 et encadré). La réinjection des cellules traitées permet de réguler l'activité du système immunitaire sans entraîner d'immunosuppression généralisée ni d'effets indésirables (6). Actuellement l'indication prépondérante de la PCE, chez l'enfant comme chez l'adulte, est le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD pour *Graft versus Host Disease*) après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Cependant, compte tenu de son mécanisme d'action et de son absence de toxicité, elle pourrait être proposée dans l'arsenal thérapeutique d'autres pathologies allogéniques et dysimmunitaires de l'enfant (rejet de greffe, maladies inflammatoires du tube digestif, asthme sévère, rhumatismes inflammatoires etc.).

2 IMMUNOMODULATION PAR LA PCE

2.1 HISTORIQUE

Avant la traversée du désert, les commerçants nomades du Sahara ingéraient des racines d'*Ammi Majus*, une plante herbacée commune du pourtour méditerranéen, pour accélérer leur bronzage et se protéger des brûlures solaires. L'ingestion de plantes photosensibilisantes (respectivement *Psoralea Coryfolia* et *Ammi Majus*) suivie d'exposition solaire volontaire à but thérapeutique est mentionnée dans le livre sacré indien Antharva Veda, et a été préconisée au 11e siècle de notre ère par Ibn El Bitar pour le traitement du vitiligo (7). Les psoralènes ont été extraits de l'*Ammi Majus* en 1911, et identifiés dans d'autres végétaux (persil, panais, céleri, fenouil, bergamote, citron, tilleul, gironfle), puis purifiés et utilisés en comprimés (Meladinine[®]) dès 1948, combinés à l'exposition solaire naturelle (8). A partir de 1965 l'irradiation UVA artificielle a été utilisée avec le psoralène (alors appliqué localement) pour le traitement du psoriasis, et c'est en 1974 que la Puvathérapie a été décrite dans sa forme actuelle (ingestion de 8-MOP + exposition aux UVA contrôlée en cabine) (9) pour le traitement du psoriasis puis, à partir de 1976, pour le lymphome T cutané (10).

Une forme particulière de lymphome T cutané est caractérisée par la présence dans la circulation sanguine de lymphocytes T du clone malin (syndrome de Sézary). C'est pour le traitement de cette maladie que Richard Edelson a inventé la PCE (ou photophérèse), en s'appuyant sur le phénomène de « vaccination T » décrit en 1981 (11) : l'injection intraveineuse de clones de lymphocytes T pathogènes inactivés *ex vivo* (par irradiation) induit *in vivo* une immunité dirigée contre ces clones (réponse anti-idiotypique). Edelson a fait le postulat qu'en prélevant (par cytophérèse), en traitant *ex vivo* (par Puvathérapie) puis en réinjectant les lymphocytes T du clone malin circulant, il devait être possible de déclencher une réponse anti-idiotypique contre les lymphocytes T du même clone infiltrant la peau. La publication des résultats en 1987 attestait de l'efficacité clinique du concept de vaccination T chez l'homme et de l'excellent profil de tolérance de la PCE, rapidement reconnue par la *Food and Drug Administration* comme un traitement de choix du syndrome de Sézary (12).

La possibilité d'induire une immunité anti-idiotypique par la PCE laissait alors espérer un traitement immunomodulateur aux allures de panacée : permettant de traiter sélectivement les clones de lymphocytes T pathogènes, et dépourvu de toxicité. La PCE a alors fait l'objet d'une multitude de publications de cas isolés ou de petites séries de patients : psoriasis, complexe cutané du SIDA, rhumatismes inflammatoires chroniques, hépatite virale C, sclérose en plaque, rejet de greffe, maladie du greffon contre l'hôte (GVH) etc. Quelques études prospectives contrôlées ont permis de conclure à l'efficacité de la PCE notamment pour la prévention du rejet de greffe cardiaque (13) et pour la prévention de la sténose coronaire après angioplastie (14) ; à son inefficacité pour la prévention des poussées de sclérose en plaque (15) ; et à un effet significatif mais « cliniquement insuffisant » pour la sclérodermie systémique (16) (sauf utilisée précocement après le début des signes, où le bénéfice clinique est alors important) et pour le diabète auto-immun (17).

Actuellement, la PCE est un traitement de routine utilisé quotidiennement dans les unités d'aphérèse thérapeutique, essentiellement pour le traitement du lymphome T cutané, de la GVH aiguë et chronique, et de façon plus anecdotique du rejet de greffe d'organe, de la fibrose néphrogénique et de pathologies auto-immunes en particulier dermatologiques (lichen plan érosif, maladies bulleuses, lupus cutané, etc.).

2.2 TECHNIQUE

La PCE comprend trois étapes : 1/ prélèvement des cellules mononucléées (CMN) du patient par cytophérèse (séparation des cellules par centrifugation au cours d'une circulation extracorporelle) 2/ photosensibilisation et irradiation UVA des cellules prélevées 3/ retour au patient par voie veineuse (figure 1). Une séance dure entre 2,5 et 3 heures. Le rythme des séances dépend des indications, entre trois séances hebdomadaires et une séance mensuelle. Le prélèvement est l'étape clé : il représente la seule vraie contrainte du traitement, et conditionne à la fois la qualité du produit cellulaire (richesse et pureté) et la tolérance du patient (durée de la séance, déplétion plaquettaire et

en hémoglobine, vécu des séances). Le prélèvement ne pose pas de difficulté majeure chez l'adulte ; l'exercice pédiatrique est rendu plus difficile par les contraintes techniques, physiologiques et psychologiques propres à l'enfant.

Actuellement, deux techniques de PCE sont disponibles : la technique « en système dissocié » (dite « Vilber-Lourmat ») et la technique « en ligne » (dite « Therakos »). Le système dissocié peut être proposé aux enfants de faible poids (à partir de 10 kg), permet un prélèvement de très bonne qualité et laisse la possibilité de préparer le produit cellulaire « à la carte », mais requiert l'intervention d'un laboratoire de thérapie cellulaire (18). Le système en ligne est applicable à partir de 20 kg ou 40 kg selon le dispositif utilisé ; il ne nécessite pas de laboratoire de thérapie cellulaire, mais ne permet pas de manipulation *ex vivo* du produit cellulaire (figure 2).

2.3 MECANISME D'ACTION

2.3.1 Généralités

L'action de la PCE repose sur la neutralisation des clones de lymphocytes T pathogènes, par l'induction d'une immunité dirigée contre ces clones (immunité anti-clonotypique ou anti-idiotypique) (6). Ceci explique son effet dans le traitement du lymphome (clone malin), des conflits allogéniques (clones alloréactifs) et des maladies auto-immunes (clones auto-réactifs). La spécificité vis-à-vis d'un clone peut s'expliquer par le fait que les corps apoptotiques issus de lymphocytes activés ont un phénotype « régulateur » (augmentation du CD5, diminution du CD28 et du CD86) (19). Cette neutralisation élective aboutit à une « délétion clonale » mais préserve la capacité du système immunitaire à répondre à de nouveaux antigènes ou à la réintroduction d'antigènes connus (vaccinaux) (20). Il s'agit donc d'une immunomodulation qui ne relève pas d'un mécanisme immunosuppresseur généralisé.

Les mécanismes qui sous-tendent cette neutralisation impliquent une coopération entre lymphocytes, monocytes et cellules dendritiques. Il s'agit probablement de l'amplification d'un ou

1 plusieurs mécanismes physiologiques de régulation immunitaire déclenchés par la coexistence d'un
2 stress oxydatif et d'une population lymphocytaire T monoclonale ou oligoclonale apoptotique,
3
4 comme c'est le cas par exemple lors de la réaction inflammatoire. Les lymphocytes T régulateurs
5
6 CD4+CD25+FoxP3+ (T reg) et l'interleukine 10 sont essentiels à l'action de la PCE (21, 22).
7
8 Cependant, malgré de nombreuses recherches, les mécanismes d'action de la PCE ne sont pas
9
10 complètement élucidés. En raison de leur complexité, et vraisemblablement parce qu'il existe
11
12 plusieurs phénomènes aboutissant à la neutralisation des clones lymphocytaires T pathogènes.
13
14 Egalement parce que ces mécanismes dépendent probablement de l'état du clone traité (malignité,
15
16 prolifération, profil Th1/Th2, etc.). Enfin parce que les études chez l'homme sont difficiles à
17
18 interpréter en raison de l'hétérogénéité des patients, des traitements concomitants, et de l'absence
19
20 fréquente de groupe contrôle comparable. Nous ne présenterons ici que les données les mieux
21
22 documentées sur les mécanismes d'action de la PCE, qui sont résumés dans la figure 3.
23
24
25
26
27
28
29

30 **2.3.2 Effets de l'association 8-MOP + UVA**

31
32

33 Sous l'effet du rayonnement UVA (365 nm), le 8-MOP se lie aux biomolécules environnantes
34
35 (ADN, protéines et lipides), et constitue des ponts entre les bases thymidine de l'ADN (23). En
36
37 fonction de la dose, les lésions de l'ADN peuvent entraîner des modifications transcriptionnelles,
38
39 l'apoptose ou la nécrose cellulaire.
40
41

42 Il existe d'autres agents photosensibilisants dont l'action repose sur les mêmes mécanismes que le
43
44 8-MOP. Seules leurs caractéristiques pharmacocinétiques sont différentes, et moins avantageuses.
45
46 Le seul actuellement utilisé est un psoralène de synthèse, l'amotosalène, en combinaison aux UVA
47
48 pour l'inactivation des agents infectieux contaminant potentiellement les produits sanguins
49
50 (système Intercept) (24).
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2.3.3 Interactions cellulaires et modifications de l'environnement

Les lésions de l'ADN déclenchent l'apoptose lymphocytaire, par la voie des caspases et de Bcl2 (25). Les lymphocytes apoptotiques sont phagocytés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) contenues dans le produit cellulaire (monocytes et cellules dendritiques rendues immatures par le stress oxydatif, et dont l'apoptose est plus lente que celle des lymphocytes T (26)) et après réinjection par les CPA non-traitées. Dans le cas des conflits allogéniques, cette phagocytose entraîne une modification de l'environnement cellulaire, en particulier la production d'interleukine 10 et l'inhibition du TNF α par les cellules monocytaires et dendritiques (27). Cette interaction rend les cellules dendritiques « tolérogènes », capables de déclencher la neutralisation ou la destruction du clone phagocyté. La neutralisation fait intervenir les lymphocytes CD4 régulateurs (Treg CD4+CD25+FoxP3+) et la sécrétion d'interleukine 10 (22) ; le rôle de la molécule inhibitrice CTLA4 et des lymphocytes suppresseurs CD8+ est suspecté mais moins clairement établi (6).

2.4 ACTIVITE FRANÇAISE (DONNEES DE LA SOCIETE FRANÇAISE DE PCE)

En 2008, selon les données de la Société Française de Photochimiothérapie Extracorporelle (SFPCE), la technique était réalisée dans 15 centres français dont 6 Etablissements Français du Sang et 9 établissements de soins. Entre 2004 et 2008, le nombre de séances annuelles est passé de 2051 (131 patients) à 2846 (219 patients dont 19 enfants). Les indications majoritaires chez l'adulte étaient la GVH, le lymphome cutané et le rejet d'organe solide. La part de la GVH a augmenté régulièrement depuis 2004 (figure 4). Les centres ayant une expérience pédiatrique sont : Besançon, Clermont-Fd, Grenoble, Marseille, Nancy, Nantes, Nice, Paris Debré, Paris St-Louis, et Rouen.

3 DONNEES CLINIQUES

Les données sur la PCE concernent les conflits allogéniques, les maladies auto-immunes ou inflammatoires et les proliférations malignes clonales T à cinétique lente (ces dernières ne concernent pas l'enfant et ne seront pas discutées ici). Les données pédiatriques publiées ne

concernent que la GVH et le diabète de type 1 ; nous envisagerons ensuite les pathologies pour lesquelles il existe un rationnel clinique ou fondamental qui justifie l'évaluation de la PCE chez l'enfant et l'adolescent.

3.1 DONNEES PEDIATRIQUES

3.1.1 GVH

Après une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), la réaction allogénique du greffon contre l'hôte est à l'origine d'une expression clinique délétère (la GVHD pour *Graft Versus Host Disease* ou Maladie du Greffon contre l'Hôte) et d'un effet bénéfique par l'éradication des cellules malignes (effet du greffon contre la leucémie GVL ou contre la tumeur GVT).

Dans le cas des maladies malignes, le but de l'allogreffe est d'obtenir un effet GVL sans manifestation de GVHD. Celle-ci survient après 30 à 50 % des 300 allogreffes pédiatriques réalisées annuellement en France (28). Elle expose à un risque important de mortalité et d'altération de la qualité de vie à court, moyen et long terme, en partie à cause des traitements immunosuppresseurs qu'elle nécessite (29). Chez l'enfant de moins de 5 ans, 45% des greffes sont réalisées en traitement curatif d'une maladie non-maligne où la réaction allogénique n'a pas d'intérêt thérapeutique (3). Dans cette situation encore plus que dans le cas des maladies malignes, tout doit être mis en œuvre pour prévenir et traiter les complications dues à la GVHD et à ses traitements.

L'originalité de la PCE tient à sa capacité à traiter la GVHD sans toxicité et tout en préservant l'effet GVL. Les données pédiatriques publiées concernent 180 patients. Elles émanent de 7 équipes dans le monde (essentiellement italiennes et françaises) (30-36), et sont résumées dans le tableau 1. Ces cohortes historiques non-contrôlées doivent être considérées sous réserve des difficultés méthodologiques inhérentes à ce type d'études. Néanmoins, les taux de réponse très

encourageants font de la PCE un traitement de choix de la GVHD en cas d'efficacité insuffisante de la corticothérapie (37). Les indications de PCE sont les mêmes que chez l'adulte :

- GVH réfractaire au traitement de 1^è et/ou de 2^è ligne
- effets indésirables sévères des immunosuppresseurs
- processus évolutif ou infectieux nécessitant une diminution rapide de l'immunosuppression.

tre centre, 35 enfants ont été traités depuis 1996. Avec l'expérience, l'indication de la PCE a été posée de plus en plus tôt dans l'évolution de la GVH ; elle est maintenant systématiquement envisagée en l'absence d'effet net de la corticothérapie administrée pendant 2 à 3 jours (GVH aiguë) ou 30 jours (GVH chronique).

3.1.2 Diabète de type 1.

La préservation de la sécrétion résiduelle d'insuline est un enjeu très important pour le devenir à long terme des patients atteints de diabète de type 1. En 2000, une équipe suédoise a publié un essai contrôlé randomisé de PCE contre placebo (aphérèses « factices ») chez 40 enfants au diagnostic de diabète de type 1 (17). Ce premier essai de PCE méthodologiquement « propre » a été conduit chez des patients naïfs de tout traitement immunosuppresseur, dans une pathologie auto-immune caractérisée par des antigènes cibles peu nombreux et bien identifiés ; il s'agit donc d'un excellent modèle d'étude. Cet essai a montré que la PCE réduisait les besoins en insuline à moyen terme (3 ans), et induisait une tolérance spécifique vis-à-vis de l'auto-antigène GAD (*glutamic acide decarboxylase*) via les molécules CTLA4 et les Treg (38). Ceci atteste de la réalité du phénomène de neutralisation clonale dans le contexte d'une maladie auto-immune chez l'homme.

Dans cet essai, les patients du groupe PCE ont reçu 1 séance hebdomadaire pendant 6 semaines. Lors des 3 ans de suivi, les taux d'hémoglobine glyquée étaient similaires dans les 2 groupes. En l'absence de tests de stimulation, les patients du groupe PCE avaient une excrétion urinaire de peptide C plus élevée et des taux sanguins plus élevés que les témoins, mais ces différences n'étaient pas statistiquement significatives. Les besoins en insuline des patients traités étaient moins

élevés que ceux des témoins. Aucune donnée n'était rapportée sur le suivi à plus long terme des patients, ni sur l'incidence des accidents aigus.

Dans ces conditions, les auteurs ont estimé que des connaissances plus approfondies sur les effets de la PCE étaient nécessaires avant qu'elle puisse être considérée comme un traitement systématique, eu égard à son coût. Cependant, compte tenu de l'importance des complications tardives du diabète et de l'innocuité de ce traitement peu intensif un recul plus long serait nécessaire.

3.1.3 *Expérience personnelle de la PCE chez l'enfant (hors GVH)*

Nous avons utilisé la PCE dans les indications suivantes chez l'enfant. Chez une patiente de 8 ans atteinte **d'hémosidérose pulmonaire idiopathique** corticodépendante, l'adjonction de la PCE a permis de diminuer la dose minimale de prednisone nécessaire à la prévention des poussées. Nous avons traité deux patientes atteintes de **sclérodermie monomélisque** sévère : la première (alors âgée de 18 ans) plusieurs années après le diagnostic, alors que la sclérose cutanée était sévère, et responsable de rétractions articulaires et d'une hypotrophie du membre. Nous avons observé une modification de la pigmentation cutanée, mais pas d'amélioration significative de l'atteinte scléreuse. La seconde patiente, âgée de 5 ans, a été traitée par PCE et methotrexate 3 mois après le diagnostic de sclérodermie monomélisque étendue à l'ensemble du membre inférieur, associée à une atteinte déformante du 5^e rayon de la main et trois plaques de morphee. La sclérose cutanée et les plaques de morphee ont complètement disparu, la peau gardant une hyperpigmentation d'allure séquellaire. Après un an de traitement, une atrophie du tissu adipeux est apparue mais la fonctionnalité du membre est normale. Un enfant de 10 ans a été traité pour une **dermatopolymyosite** dont les signes cutanés persistaient après 6 semaines de corticothérapie ; l'érythème héliotrope a disparu en 2 semaines après le début de la PCE. Celle-ci a été poursuivie pendant 18 mois associée à la décroissance de la corticothérapie. Le patient est actuellement asymptomatique sans traitement avec un an de recul.

3.2 APPLICATIONS POSSIBLES EN PEDIATRIE

3.2.1 *Transplantation d'organe*

En 2008, 196 enfants de moins de 18 ans ont reçu une transplantation d'organe en France (3).

Malgré des progrès continus, la transplantation d'organe chez l'enfant reste un acte très difficile en partie à cause de l'équilibre précaire entre efficacité et complications des immunosuppresseurs. Le rejet aigu ou chronique reste la difficulté majeure. L'enfant greffé va donc être exposé pendant une durée extrêmement longue aux immunosuppresseurs, et de ce fait à leur toxicité « consentie » (augmentation du risque infectieux et de lymphoprolifération) et « non-consentie » (troubles métaboliques, endocriniens etc.). La survie à 5 ans des enfants après une greffe de poumons est de 50 % ; elle est de 67% après une transplantation cardiaque. Dix ans après une transplantation rénale, 95% des enfants sont mais la probabilité de survie d'un greffon rénal est de 68% à 10 ans (3). Les rejets et les infections sont la cause de la majorité des complications, perte du greffon ou décès (39, 40).

Chez l'adulte, l'efficacité de la PCE est très bien documentée pour la prévention et le traitement du rejet cardiaque, et de façon moins solide pour le rejet rénal et pulmonaire. Actuellement chez l'adulte deux indications de la PCE sont reconnues (16) :

- rejet malgré une immunosuppression bien conduite
- nécessité de diminuer les traitements immunosuppresseurs (infection évolutive ou menaçante, syndrome lymphoprolifératif, effet indésirable spécifique)

Chez l'enfant, il conviendrait d'en ajouter une troisième : « prévention des complications à long terme et des séquelles des traitements immunosuppresseurs ». Nous pensons qu'un effort de sensibilisation doit être effectué en direction des pédiatres greffeurs, pour que soit réalisée chez l'enfant l'évaluation clinique de la PCE telle qu'elle a apporté la preuve de son intérêt dans le domaine de la transplantation chez l'adulte.

3.2.2 Maladies auto-immunes et inflammatoires (tableau 3).

Le mécanisme d'action le mieux documenté de la PCE est l'induction de lymphocytes T régulateurs (Treg) de phénotype CD4+CD25+FoxP3+. Ces lymphocytes ont la capacité de réguler le système immunitaire pour prévenir l'émergence de maladies auto-immunes. L'importance de cette fonction régulatrice est illustrée par la gravité du syndrome IPEX (déficit congénital en Treg dû à une mutation de FoxP3) (41). Or, l'implication d'un défaut de la fonction des Treg a été montrée dans de nombreuses pathologies auto-immunes ou inflammatoires, en particulier l'asthme (42), les maladies rhumatismales (43) et la maladie de Crohn (44).

Les maladies pour lesquelles l'efficacité clinique de la PCE a été rapportée chez l'adulte recoupent en partie celles impliquant un dysfonctionnement des T reg : maladie de Crohn (45), polyarthrite rhumatoïde (18) et dermatite atopique (46) ; la PCE a également été utilisée avec succès pour le traitement du lichen plan érosif (47) et de certaines connectivites telles que la sclérodermie ou la dermatopolymyosite (48).

3.3 TOLERANCE ET REALISATION PRATIQUE CHEZ L'ENFANT

3.3.1 Effets indésirables

A ce jour, aucune complication sévère et aucun effet indésirable à long terme n'ont été imputés à la PCE. On recense un cas de chorio-rétinite chez un adulte (49), et un cas d'hyperéosinophilie importante chez un enfant (données non publiées). En dehors de ces cas exceptionnels, les effets indésirables cliniques sont rares et bénins. Dans les études contrôlées, la fréquence des bactériémies n'est pas augmentée chez les patients traités par PCE.

L'effet indésirable le plus constant est une baisse du taux d'hémoglobine d'environ 1 g/dl par séance. Elle est due à l'hémolyse mécanique et à l'hémodilution. La cytophérèse est responsable d'une diminution de 15 à 17% du taux de plaquettes (30). En dehors de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, les transfusions sont exceptionnelles.

3.3.2 Réalisation pratique de la PCE chez l'enfant

A condition de leur porter une grande attention, les trois principales difficultés propres à l'enfant sont faciles à prévenir et ne posent pas de difficulté majeure.

L'abord veineux est le problème le plus important, mais en l'absence d'atteinte cutanée sévère un traitement sur voie veineuse périphérique exclusive ou combinée au cathéter central déjà en place (patients d'onco-hématologie) est généralement possible. La circulation extracorporelle expose à un risque d'hypovolémie, d'hypocalcémie (due au citrate qui est l'anticoagulant le plus fréquemment utilisé) et d'hypothermie. Nous avons publié en 2007 des recommandations spécifiques pour la prévention de ces complications (30). En suivant ces recommandations simples, sur plus de 1000 séances chez 40 enfants nous n'avons jamais rencontré de complication y compris chez les enfants de moins de 15 kg.

La contrainte que représente la PCE est immédiate et facilement identifiable, alors que ses bénéfices sont différés (l'effet du traitement n'est pas immédiat ; il faut entre 7 jours et plusieurs semaines pour en voir les effets apparaître dans le cas de la GVH). Cette différence par rapport aux immunosuppresseurs (dont les bénéfices sont rapides et les contraintes différées) explique que le « ras-le-bol » du traitement *en général* s'exprime volontiers sous la forme d'une stigmatisation de la PCE. Il est donc fondamental, pour une bonne acceptation du traitement, que l'enfant et sa famille aient bien compris les enjeux de la PCE pour la prévention des complications à moyen et à long terme. Il faut également veiller au confort de l'enfant pendant l'aphérèse, qui peut se faire sur les genoux des parents, dans la chambre d'hospitalisation y compris sous flux laminaire ou en environnement protégé. Enfin, il est préférable de différer une séance de 24 heures et de bien réexpliquer les tenants et aboutissants du traitement plutôt que d'imposer coûte que coûte l'aphérèse à un enfant en opposition.

Les conditions de l'aphérèse (immobilité, durée, bruit, abords veineux) rendent compte de la perception souvent exagérée qu'en ont les cliniciens (y compris pédiatres) chez l'enfant. Nous

insistons sur le fait que, sous réserve d'une bonne information et d'une prise en charge adaptée à l'âge de l'enfant et à sa famille, la PCE est un traitement bien toléré.

4 QUELLE PLACE POUR LA PCE EN PEDIATRIE ?

L'effet immunomodulateur de la PCE est cliniquement significatif, dépourvu de toxicité et d'immunosuppression généralisée. En cela, la PCE diffère de la quasi-totalité des traitements proposés aux enfants atteints de pathologies à médiation immunitaire. La seule limite à son utilisation est donc liée aux contraintes logistiques et de temps, qui doivent être mises en balance avec son double bénéfice : effet thérapeutique propre, et diminution des traitements immunosuppresseurs.

La mesure de ce rapport bénéfice / contrainte ne peut pas être extrapolée des données adultes, et nécessite une évaluation clinique spécifique à l'enfant. Or, la PCE est une thérapie cellulaire dont l'évaluation et la promotion chez l'enfant ne dépendent pas de l'industrie, mais des cliniciens et des unités de thérapie cellulaire. Son utilisation thérapeutique raisonnée en pédiatrie nécessite donc que cette évaluation soit entreprise par les cliniciens pédiatres. Sous le mandat et à la demande de la Société Française de Greffe de Moelle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), nous avons ouvert en France en 2009 le premier protocole prospectif d'évaluation de la PCE en traitement de la GVH réfractaire chez l'enfant (50). Ce protocole est un premier pas important, puisqu'il a conduit à l'obtention pour les centres participants d'une autorisation de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire et des Produits de Santé (AFSSaPS) pour le procédé PCE, et au rapprochement entre eux des centres engagés dans l'évaluation clinique de la PCE chez l'enfant. Ce premier essai devrait donc faciliter la mise en place d'essais cliniques pour d'autres pathologies. Les maladies que nous identifions en particulier sont la maladie de Crohn, l'arthrite chronique juvénile et les sclérodermies.

5 CONCLUSION

La PCE est un traitement immunomodulateur puissant et dénué de toxicité, mais dont l'utilisation est limitée par la lourdeur. Pourtant, dans une équipe entraînée à la pratique de l'aphérèse chez l'enfant, ce traitement est faisable et bien toléré y compris chez les enfants de faible poids (à partir de 10 kg). Son avantage majeur – induction d'une tolérance immunitaire sans immunosuppression ni toxicité – trouve chez l'enfant un intérêt particulier. A ce jour, les données cliniques pédiatriques sont insuffisantes et ce traitement est probablement sous-exploité. Ceci justifie que soit menée une double démarche de sensibilisation et d'évaluation, en particulier dans le domaine de la transplantation d'organe et des maladies dysimmunitaires et inflammatoires sévères.

Références

1. Malaty HM, Fan X, Opekun AR, Thibodeaux C, Ferry GD. Rising incidence of inflammatory bowel disease among children: a 12-year study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*;50:27-31.
2. Borchers AT, Uibo R, Gershwin ME. The geoepidemiology of type 1 diabetes. *Autoimmun Rev* 2009.
3. Agence de la Biomédecine, rapport 2008, disponible sur <http://www.agence-biomedecine.fr/professionnels/rapport-annuel.html>.
4. Bader-Meunier B, Quartier P. [New treatments for idiopathic juvenile arthritis]. *Arch Pediatr* 2009;16:1607-11.
5. Kanold J, Halle P, Tuppin P, Demeocq F. [Cell therapy for cancer treatment in children]. *Arch Pediatr* 2004;11:130-43.
6. Marshall SR. Technology insight: ECP for the treatment of GvHD--can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3:302-14.
7. Heshmati F, Andreu G. Extracorporeal photochemotherapy: a historical perspective. *Transfus Apher Sci* 2003;28:25-34.
8. Lerner AB, Denton CR, Fitzpatrick TB. Clinical and experimental studies with 8-methoxypsoralen in vitiligo. *J Invest Dermatol* 1953;20:299-314.
9. Parrish JA, Fitzpatrick TB, Tanenbaum L, Pathak MA. Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *N Engl J Med* 1974;291:1207-11.
10. Gilchrist BA, Parrish JA, Tanenbaum L, Haynes HA, Fitzpatrick TB. Oral methoxsalen photochemotherapy of mycosis fungoides. *Cancer* 1976;38:683-9.
11. Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR. Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature* 1981;292:60-1.
12. Edelson R, Berger C, Gasparro F, et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results. *N Engl J Med* 1987;316:297-303.

13. Barr ML, Meiser BM, Eisen HJ, et al. Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac transplantation. Photopheresis Transplantation Study Group. *N Engl J Med* 1998;339:1744-51.
14. Bisaccia E, Palangio M, Gonzalez J, Klainer AS, Banas JS. Photopheresis. Therapeutic potential in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiovasc Drugs* 2003;3:43-51.
15. Rostami AM, Sater RA, Bird SJ, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of extracorporeal photopheresis in chronic progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 1999;5:198-203.
16. Knobler R, Barr ML, Couriel DR, et al. Extracorporeal photopheresis: past, present, and future. *J Am Acad Dermatol* 2009;61:652-65.
17. Ludvigsson J, Samuelsson U, Ernerudh J, Johansson C, Stenhammar L, Berlin G. Photopheresis at onset of type 1 diabetes: a randomised, double blind, placebo controlled trial. *Arch Dis Child* 2001;85:149-54.
18. Andreu G, Leon A, Heshmati F, et al. Extracorporeal photochemotherapy: evaluation of two techniques and use in connective tissue disorders. *Transfus Sci* 1994;15:443-54.
19. Stadler K, Frey B, Munoz LE, et al. Photopheresis with UV-A light and 8-methoxypsoralen leads to cell death and to release of blebs with anti-inflammatory phenotype in activated and non-activated lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;386:71-6.
20. Suchin KR, Cassin M, Washko R, et al. Extracorporeal photochemotherapy does not suppress T- or B-cell responses to novel or recall antigens. *J Am Acad Dermatol* 1999;41:980-6.
21. Maeda A. Extracorporeal photochemotherapy. *J Dermatol Sci* 2009;54:150-6.
22. Gatz E, Rogers CE, Clouthier SG, et al. Extracorporeal photopheresis reverses experimental graft-versus-host disease through regulatory T cells. *Blood* 2008;112:1515-21.
23. Gasparro FP, Song J, Knobler RM, Edelson RL. Quantitation of psoralen photoadducts in DNA isolated from lymphocytes treated with 8-methoxypsoralen and ultraviolet A radiation (extracorporeal photopheresis). *Curr Probl Dermatol* 1986;15:67-84.
24. Amotosalen: Allogeneic Cellular Immunotherapies system, INTERCEPT Plasma System, INTERCEPT Platelet System, S 59. *BioDrugs* 2003;17:66-8.
25. Szodoray P, Papp G, Nakken B, Harangi M, Zeher M. The molecular and clinical rationale of extracorporeal photochemotherapy in autoimmune diseases, malignancies and transplantation. *Autoimmun Rev*. Epub 2010.
26. Hannani D, Gabert F, Laurin D, et al. Photochemotherapy induces the apoptosis of monocytes without impairing their function. *Transplantation* 2010 Jan29.
27. Craciun LI, Stordeur P, Schandene L, et al. Increased production of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist after extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* 2002;74:995-1000.
28. Ferry C, Gemayel G, Rocha V, et al. Long-term outcomes after allogeneic stem cell transplantation for children with hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:219-24.
29. Michel G, Bordigoni P, Simeoni MC, et al. Health status and quality of life in long-term survivors of childhood leukaemia: the impact of haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:897-904.
30. Kanold J, Merlin E, Halle P, et al. Photopheresis in pediatric graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation: clinical practice guidelines based on field experience and review of the literature. *Transfusion* 2007;47:2276-89.
31. Messina C, Locatelli F, Lanino E, et al. Extracorporeal photochemotherapy for paediatric patients with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2003;122:118-27.

32. Berger M, Pessolano R, Albiani R, et al. Extracorporeal photopheresis for steroid resistant graft versus host disease in pediatric patients: a pilot single institution report. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29:678-87.
33. Calore E, Calo A, Tridello G, et al. Extracorporeal photochemotherapy may improve outcome in children with acute GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2008;42:421-5.
34. Duzovali O, Chan KW. Intensive extracorporeal photochemotherapy in pediatric patients with chronic graft-versus-host disease (cGVHD). *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:218-21.
35. Perseghin P, Dassi M, Balduzzi A, Rovelli A, Bonanomi S, Uderzo C. Mononuclear cell collection in patients undergoing extra-corporeal photo-chemotherapy for acute and chronic graft-vs.-host-disease (GvHD): comparison between COBE Spectra version 4.7 and 6.0 (AutoPBSC). *J Clin Apher* 2002;17:65-71.
36. Gonzalez-Vicent M, Ramirez M, Perez A, Lassaletta A, Sevilla J, Diaz MA. Extracorporeal photochemotherapy for steroid-refractory graft-versus-host disease in low-weight pediatric patients. Immunomodulatory effects and clinical outcome. *Haematologica* 2008;93:1278-80.
37. Kanold J, Messina C, Halle P, et al. Update on extracorporeal photochemotherapy for graft-versus-host disease treatment. *Bone Marrow Transplant* 2005;35 Suppl 1:S69-71.
38. Jonson CO, Pihl M, Nyholm C, Cilio CM, Ludvigsson J, Faresjo M. Regulatory T cell-associated activity in photopheresis-induced immune tolerance in recent onset type 1 diabetes children. *Clin Exp Immunol* 2008;153:174-81.
39. Tangeraas T, Bjerre A, Lien B, et al. Long-term outcome of pediatric renal transplantation: the Norwegian experience in three eras 1970-2006. *Pediatr Transplant* 2008;12:762-8.
40. Doherty GM, Aurora P. Update on paediatric lung transplantation. *Paediatr Respir Rev*;11:54-61.
41. Marabelle A, Meyer M, Demeocq F, Lachaux A. [From Ipex to foxp3: a new contribution of pediatrics to the understanding of the immune system]. *Arch Pediatr* 2008;15:55-63.
42. Robinson DS. Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1314-23.
43. Milojevic D, Nguyen KD, Wara D, Mellins ED. Regulatory T cells and their role in rheumatic diseases: a potential target for novel therapeutic development. *Pediatr Rheumatol Online J* 2008;6:20.
44. Himmel ME, Hardenberg G, Piccirillo CA, Steiner TS, Levings MK. The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease. *Immunology* 2008;125:145-53.
45. Abreu MT, von Tirpitz C, Hardi R, et al. Extracorporeal photopheresis for the treatment of refractory Crohn's disease: results of an open-label pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:829-36.
46. Sand M, Bechara FG, Sand D, et al. Extracorporeal photopheresis as a treatment for patients with severe, refractory atopic dermatitis. *Dermatology* 2007;215:134-8.
47. Guyot AD, Farhi D, Ingen-Housz-Oro S, et al. Treatment of refractory erosive oral lichen planus with extracorporeal photochemotherapy: 12 cases. *Br J Dermatol* 2007;156:553-6.
48. Cribier B, Faradji T, Le Coz C, Oberling F, Grosshans E. Extracorporeal photochemotherapy in systemic sclerosis and severe morphea. *Dermatology* 1995;191:25-31.
49. Vagace JM, Gervasini G, Morais F, et al. Retinal toxic reactions following photopheresis. *Arch Dermatol* 2007;143:622-5.
50. Merlin E, disponible sur <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00824954?term=merlin&rank=7>.

Conflits d'intérêt : aucun

Figure

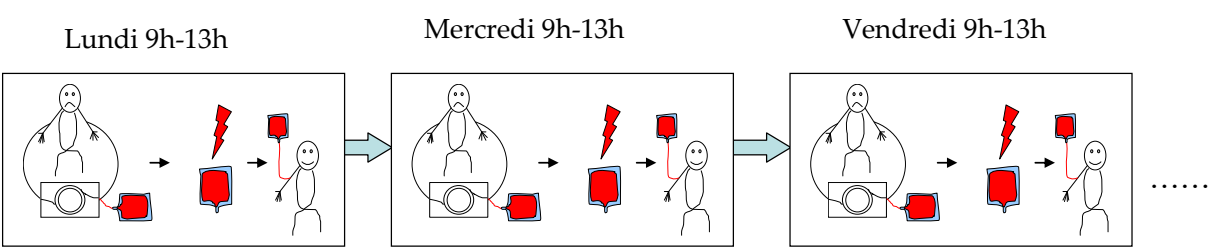


Figure 1. Schéma du traitement par PCE (le traitement d’attaque est de trois séances par semaine pour les maladies sévères, pendant 2 à 3 semaines ; les séances sont ensuite espacées progressivement).



Figure 2. Techniques de PCE. a) Système dissocié « Vilber-Lourmat ». Après le prélèvement par cytophérèse sur un séparateur cellulaire (1) les cellules mononucléées (CMN) du patient sont diluées dans du sérum physiologique pour obtenir un hémocrite final $<1\%$ (2). Le 8-MOP est ajouté dans la poche (3), puis les CMN sont transférées dans une poche perméable aux UVA (4) et irradiées au moyen d'un irradiateur externe (UVAMATIC, Vilber-Lourmat ou MACOGENIC, Macopharma) (5) avant d'être réinjectées au patient.

b) Système en ligne Therakos UVAR XTS[®] (à gauche) et Cellex[®] (milieu et droite). Ces appareils assurent dans le même temps le prélèvement, l'irradiation et la réinjection des CMN (le 8-MOP est ajouté par l'opérateur dans la poche de prélèvement avant l'irradiation). L'UVAR XTS[®] ne nécessite qu'un abord veineux mais ne peut pas être utilisé chez l'enfant à cause de son volume extracorporel élevé. Le Cellex[®] a des caractéristiques plus favorables pour la pratique pédiatrique, mais n'a pas encore été évalué chez l'enfant.

Figure 3

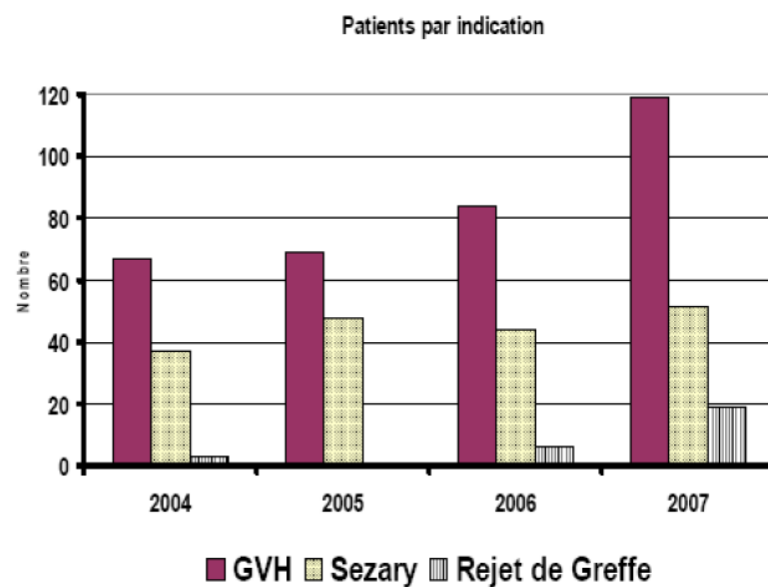


Figure 3. Nombre de patients traités par PCE selon l'indication en France entre 2004 et 2007.

Source : Société Française de Photochimiothérapie Extracorporelle.

Figure 4

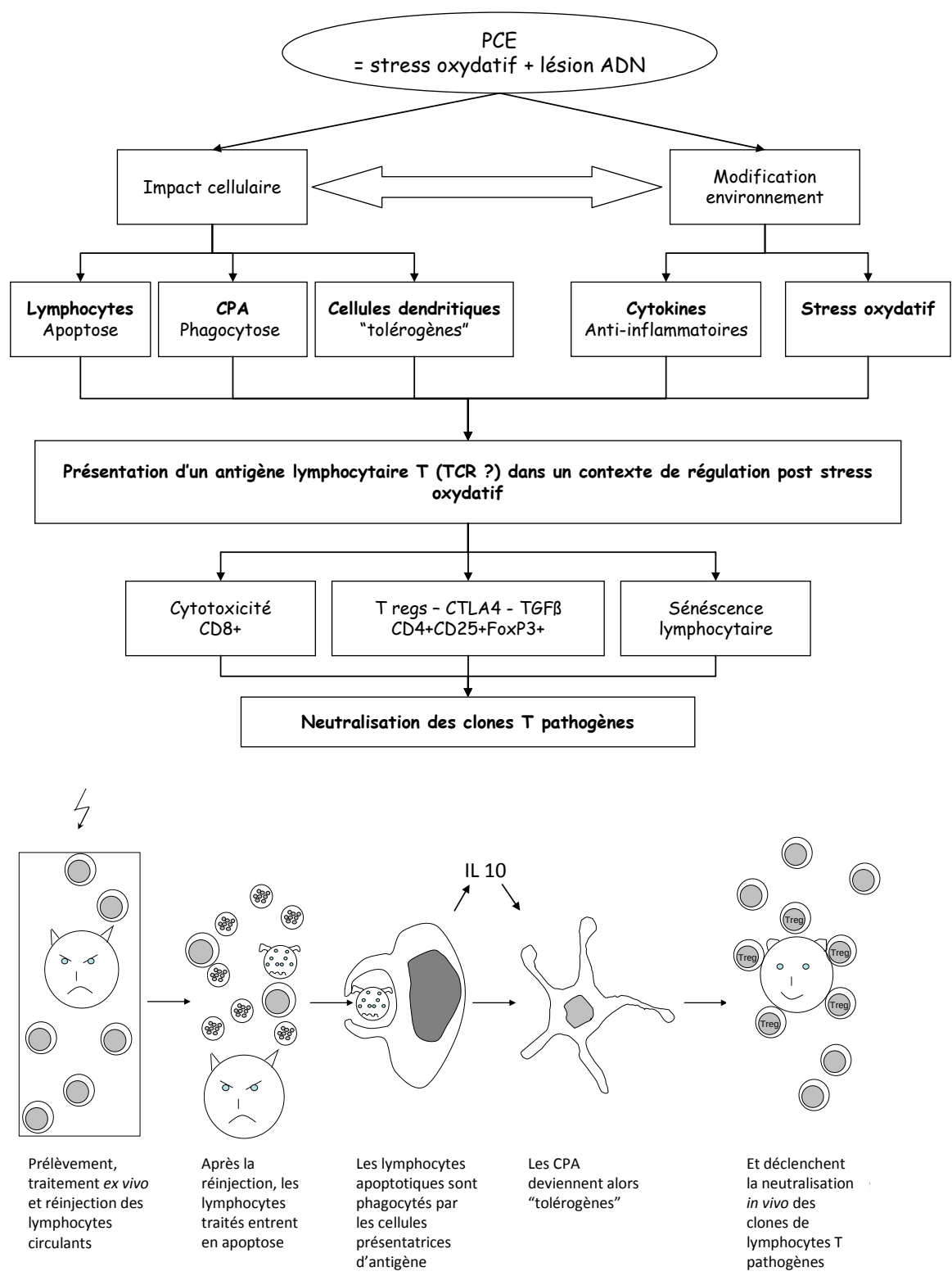


Figure 4. Proposition de schéma des mécanismes d'action de la Photochimiothérapie Extracorporelle. CPA : cellules présentatrices d'antigène.

Encadré. La Photochimiothérapie Extracorporelle : principales caractéristiques

Mécanisme d'action

- Neutralisation des clones lymphocytaires T pathogènes
- Absence d'immunosuppression généralisée

Indications pédiatriques

- Conflits allogéniques (GVH et rejets de greffes d'organe)
- Maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques

Rythme

- 2 à 3 séances par semaine au début du traitement puis espacement
- Durée d'une séance : entre 2h30 et 3 heures

Limite inférieure de poids

- Environ 10 kg

Effets indésirables / toxicité

- Pas de toxicité
- Anémie
- Difficultés liées à l'abord veineux (périphérique exclusif possible)

Inconvénients

- Répétition des prélèvements de cellules mononucléées par aphérèse
 - Nécessité d'un équipement et d'un savoir-faire
-

Tableau 1. Traitement de la GVH par PCE chez l’enfant (8 équipes, 15 publications, 176 patients).

Auteur	Année(s)	Pts	séances	Rythme initial	RC	RP	NR	Diminution de l'immunosuppression	Commentaires
Dall'Amico & Messina	1995 2003	77	ND	2/sem				arrêt : 15/44 dim 10/44	Survie à 5 ans : 96,1% répondeurs vs 58,4% si NR
Kanold & Merlin	2002-2007	27	24 (11-68)	2 à 3 /sem	11/27	10/27	6/27	30% à 10 séances	Meilleure survie chez les répondeurs.
Berger	2007	25	4-98	2/sem	13/25	2/25	10/25		100% de survie chez les répondeurs.
Calore	2008	15	ND	2/sem	7/15	1/15	3/15		Survie à 2 ans : 85%
Perseghin	2002	13	10 (2-28)	2/sem				ND	
Duzovali	2007	6	21 (3-31)	3 à 5 / sem	1/6	2/6	3/6		Survie : 3/7. Pas d'intérêt à un rythme intensifié.
Gonzales-Vicent	2008	11		2/sem	5/11	6/11	0/11		Moins de 25 kg

Abréviations : ND : non-détaillé ; NR : non-répondeurs ; RC : réponse complète ; RP : réponse partielle.

Tableau 2. Essais cliniques de traitement par PCE de maladies auto-immunes et/ou inflammatoires *

Pathologie	Auteur	Année	Nb pts	de design	principaux résultats
Diabète de type 1	Ludvigsson	2000	40	PCR vs Placebo	diminution des besoins en insuline 3 ans après le traitement
Crohn	Abreu	2009	28	Prospective simple bras	réponse clinique chez 50% des patients avec maladie modérée à sévère
	Reinisch	2000	10	Prospective simple bras	réponse chez 80% des corticodépendants
	Bisaccia	2007	2	Cas	effet sur maladie modérée ; pas d'effet sur maladie sévère
	Guariso	2003	2	Cas	effet mineur sur maladies sévères
Sclérodermie systémique	Knobler	2006	64	PCR vs Placebo	diminution modérée de l'atteinte cutanée et articulaire
	Rook	1992	56	PCR vs pénicillamine	amélioration de l'atteinte cutanée
	Enamoto	1999	19	Essai croisé	amélioration modeste de l'atteinte cutanée.
	Besnier	2002	5	Cas	pas d'amélioration
Lichen plan érosif	Guyot	2007	12	Cas	9 réponses complètes, 3 partielles
	Becherel	1998	7	Cas	7 réponses complètes
	Kunte	2005	4	Cas	3 réponses complètes, 1 partielle
	Marchesseau	2008	2	Cas	2 réponses partielles
Polyarthrite rhumatoïde	Hilliquin	1993	7	Cas	réponses partielles
Polyarthrite rhumatoïde	Malawista	1991	7	Cas	effet suspensif
Psoriasis + arthrite (ECP+PUVA)	Vahlquist	1996	8	Cas	effet sur arthrite

* les cas isolés ne sont pas mentionnés dans cette liste non-exhaustive. Abréviations : PCR : prospective contrôlée randomisée

Résumé des travaux:

L'équipe Clermontoise a publié la plus importante étude monocentrique rétrospective (27 patients) sur l'efficacité de la PCE dans le traitement de la GvHD aiguë (12 patients) ou chronique (15 patients) chez l'enfant (59).

Bien que cette étude rétrospective démontre une certaine efficacité dans le traitement de la GvHD chez l'enfant, une étude prospective reste nécessaire. C'est pourquoi, un Protocole Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) multicentrique nommé Photograft 1 a été ouvert en avril 2009. Ce protocole consiste à évaluer l'utilisation de la PCE dans le traitement de la GvHD aiguë réfractaire chez l'enfant et l'adulte jeune après greffe de cellules souches hématopoïétiques. Le Dr. Etienne Merlin est le coordinateur et l'investigateur principal. Le centre promoteur est le CHU de Clermont-Ferrand. Cette étude unique permettra de définir la place de la PCE dans l'arsenal thérapeutique utilisé pour le traitement de la GvHD chez l'enfant.

Même si la PCE est efficace chez l'enfant, son utilisation reste limitée pour différentes raisons (59) : 1) l'épreuve psychologique que représente les séances d'aphérèses à répétition chez les enfants 2) la nécessité d'avoir de bons abords veineux 3) de disposer d'un dispositif médical adapté pour réaliser la PCE (irradiateur UV).

L'idée développée par Clermont-Ferrand est la suivante (**Figure R12**):

- prélever par aphérèse une quantité plus importante de cellules en début de semaine.
- Fractionner l'échantillon en 3. Traiter la première fraction et la réinjecter au patient. Congeler les 2 autres fractions cellulaires. Elles seront décongelées au cours de la semaine puis traités avant d'être réinjecté (par transfusion à débit libre) au patient.

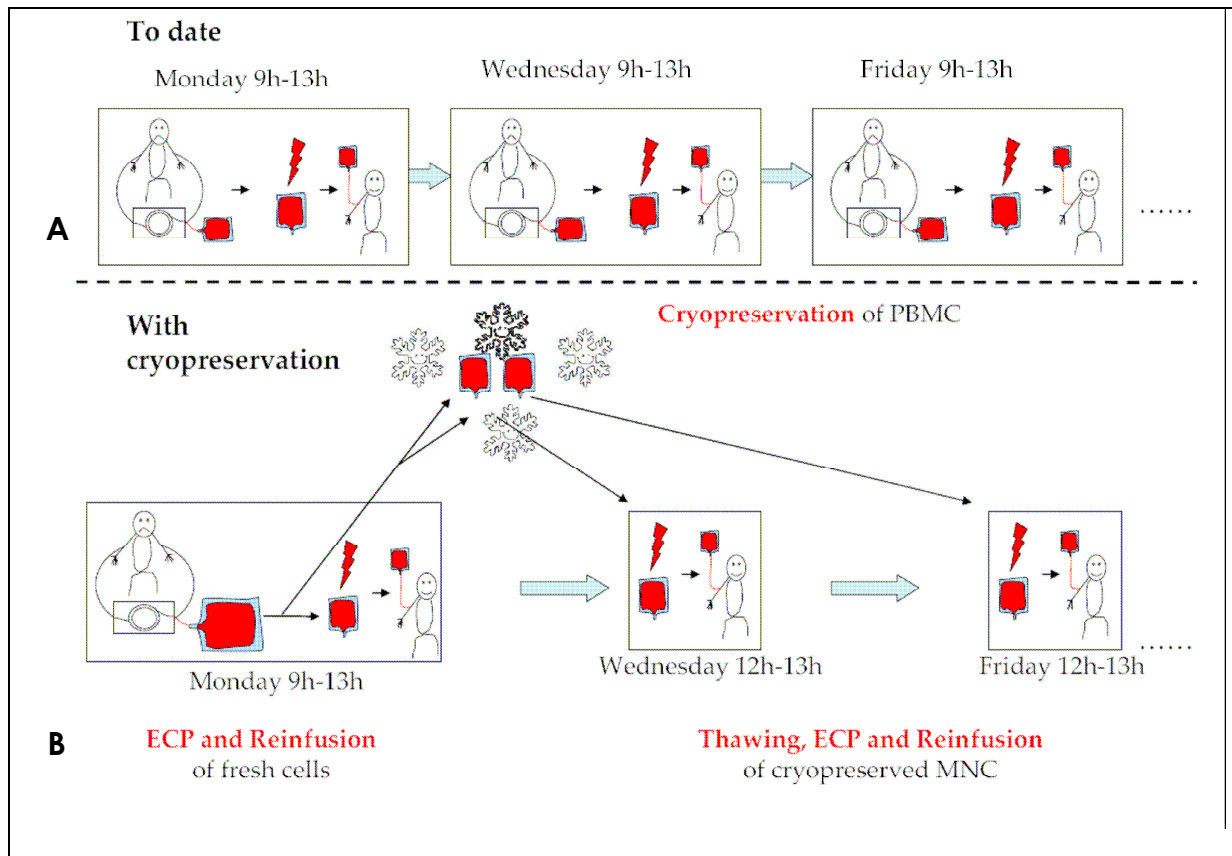


Figure R12 :

Schéma thérapeutique du traitement par PCE d'un patient pendant 1 semaine. (A) Schéma traditionnel dans lequel il est nécessaire d'effectuer autant d'aphérèses que de séances de PCE **(B)** Schéma alternatif dans lequel la cryopréservation des 2 tiers de l'échantillon prélevé, réalisée lors de la 1^{ère} aphérèse permet 2 séances de PCE supplémentaires et donc de conserver le même rythme de traitement en divisant par trois le nombre d'aphérèses réalisées.

Ce protocole permettrait de maintenir le rythme de 3 séances par semaine tout en effectuant qu'une seule aphérèse. Les enjeux sont très importants : amélioration considérable de la qualité de vie des patients , gestion des patients traités par PCE facilitée dans les centres de soins pratiquants les aphérèses et réduction des coûts de la PCE.

Pour atteindre cet objectif, 2 étapes majeures doivent être franchies : 1) valider que la cryopréservation des cellules n'altère pas l'effet immunomodulateur induit par la PCE et 2) réaliser une étude clinique permettant d'évaluer l'efficacité de PBMC congelées préalablement au traitement PUVA (cryo-PCE) comparée à la PCE « classique ».

Etienne Merlin a mis au point un test d'inhibition de prolifération basé sur un marquage au CFSE. Cette étude démontre que l'effet inhibiteur des cellules PCE n'est pas modifié par une cryopréservation préalable. Ce travail a donné lieu à un article accepté pour publication dans le journal Cytotherapy (**Article 5**). Ma contribution à ce travail a été l'optimisation du modèle ainsi que la validation de celui-ci par la technique faisant référence pour la mesure de la prolifération i.e par incorporation de thymidine tritiée.

Suite à ce travail pré-clinique, un second PHRC a été déposé et accepté début 2010 (**Annexe 1**). Ce PHRC est nommé **Photograft 2**. L'objectif principal est d'étudier l'efficacité de la PCE lorsque les cellules sont préalablement cryopréservées.

Evaluation de l'efficacité clinique observée en fonction de la dose de LT alloréactifs traités :

Bien que les mécanismes d'action de la PCE ne soient toujours pas élucidés, il est admis que la présence des LT « pathogènes » au sein de la population cellulaire traitée est déterminante à l'efficacité thérapeutique de la PCE. A ce jour, aucune corrélation n'a été faite entre la quantité de LT « pathogènes » traités et l'efficacité de la PCE observée en clinique. Ainsi, l'un des objectifs fixés, qui sera réalisé par notre équipe, est la quantification du nombre de LT alloréactifs contenus dans le prélèvement traité par PCE et la corrélation avec la réponse clinique observée chez les patients. La quantité de LT alloréactifs contenus dans l'échantillon traité sera déterminée à l'aide d'un test fonctionnel, basé sur la mesure de la production d'IFN γ par les LT alloréactifs par ELISpot IFN γ , validé par notre équipe et qui a fait l'objet d'une publication parue dans le journal Transfusion (**Article 6**).

B. Article 5 : Cryopreservation of mononuclear cells before extracorporeal photochemotherapy doesn't impair their *in vitro* antiproliferative capacities

en révision pour publication dans le journal « Cytotherapy »

Cette étude pré-clinique a pour but de vérifier que des PBMC traitées par PCE préalablement congelées (cryo-PCE) conservent leurs propriétés immunomodulatrices. Pour cela, un modèle d'étude *in vitro* a été mis au point (**Figure R13**). Ce modèle repose sur un test de prolifération par marquage au CFSE. Le principe du test est le suivant : ajouter des PBMC traitées par PCE, préalablement cryopréservées ou non à une MLR allogénique. Les propriétés immunomodulatrices des cellules traitées i.e leur capacité à inhiber la prolifération allogénique sera comparée dans les 2 conditions.

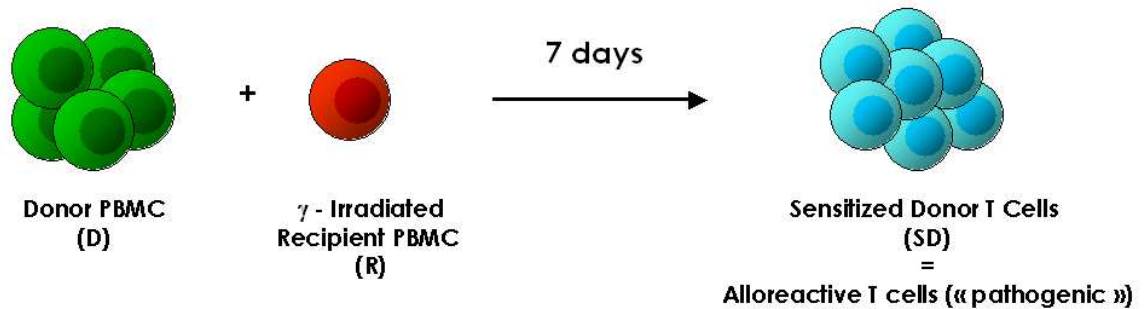
L'ajout de cellules PCE au repos induit une inhibition de la prolifération. Cette inhibition est plus forte lorsque les cellules traitées sont des cellules sensibilisées i.e alloréactives.

Concernant les cellules cryo-PCE, on observe qu'elles entrent plus rapidement en apoptose. Excepté ceci, les cellules cryo-PCE conservent leur capacité à inhiber la prolifération de cellules autologues.

Ainsi cette étude pré-clinique valide le fait que la cryopréservation des cellules avant traitement PCE n'altère pas leur capacité d'immunorégulation *in vitro*. Elle constitue donc un rationnel solide sur lequel repose le PHRC Photograft 2.

Step 1: Day - 6

Allo-Sensitization of donor cells (D)



Step 2: Day 0

MLR performed in presence of PUVA-treated Resting (D) or sensitized donor cells (SD) previously cryo-preserved or not

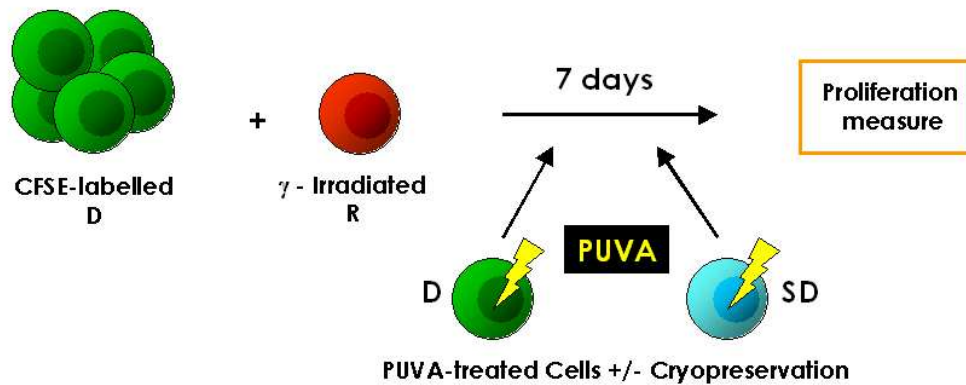


Figure R13 :

Modélisation *in vitro* de l'effet anti-prolifératif des cellules traitées par PUVA afin d'évaluer les capacités fonctionnelles de cellules traitées, préalablement cryopréservées. Etape 1 : J -6 : une MLR est réalisée afin d'obtenir des cellules sensibilisées du donneur (SD). Etape 2 : Une seconde MLR identique est réalisée en présence de différentes sortes cellules traitées par PUVA : cellules du donneur non sensibilisées (D) et cellules du donneur sensibilisées (SD). Ces cellules ont été ajoutées avec ou sans cryopréservation préalable.

Cryopreservation of mononuclear cells before extracorporeal photochemotherapy does not impair their antiproliferative capabilities.

Running title: Use of cryopreserved cells for ECP

E. Merlin^{1,2}, D. Hannani^{3,4}, R. Veyrat-Masson^{1,5}, J. Chassagne¹, F. Gabert^{3,4}, M. Berger^{1,5}, F. Deméocq^{1,2,5}, J. Plumas^{3,4}, J. Kanold^{1,2,5}

1. CHU Clermont-Ferrand, Centre Régional de Cancérologie et Thérapie Cellulaire Pédiatrique, Hôtel-Dieu, F-63003 Clermont-Fd, France

2. INSERM, CIC 501, F-63003 Clermont-Fd, France.

3. Univ Joseph Fourier, F-38041 Grenoble, France.

4. Inserm, U823, Immunobiologie et Immunothérapie des cancers, La Tronche, F-38706, France

5. Clermont-Université, Université d'Auvergne, F-63003 Clermont-Ferrand, France.

6. EFS Rhône-Alpes, La Tronche, F38701 France

Corresponding author :

Etienne Merlin

Centre Régional de Cancérologie et Thérapie Cellulaire Pédiatrique

CHU Estaing, 1 place Lucie Aubrac

63001 Clermont-Ferrand, France

Tel : + 33 4 73 750 015 Fax: + 33 4 73 750 059

e-mail: e_merlin@chu-clermontferrand.fr

Abstract

Background: The clinical benefits of extracorporeal photochemotherapy (ECP) are well recognized, but its clinical use is limited by logistical difficulties, especially due to the need to perform repeated apheresis. The cryopreservation of mononuclear cells could allow to maintain the ECP schedule while reducing the number of apheresis. The aim of our work was so to assess whether previous cryopreservation impairs the immunomodulatory function of Extracorporeal Photochemotherapy treated PBMC. **Methods:** Fresh or previously cryopreserved PBMC were exposed to ECP and were added on day 0 into a mixed lymphocyte reaction. Proliferation of alloreactive lymphocytes was measured by CFSE dye dilution. Apoptosis was quantified by annexin-7AAD staining. **Results:** ECP-induced apoptosis was slightly increased in cryopreserved cells, but the kinetics of apoptosis was similar as in fresh cells. Lymphocytes stimulated in the presence of ECP-treated PBMC displayed a significant decrease in proliferation. The suppression was enforced when ECP-treated cells had been previously activated by allogeneic stimulation. Cryopreservation before ECP exposure did not impact apoptosis triggering or anti-proliferative properties of ECP-treated cells. **Conclusion:** Our study shows that cryopreservation before ECP does not impair the immunomodulatory effects of the treated cells. These data warrant to investigate the clinical interest of using cryopreserved PBMC for ECP.

Keywords: Alloreactivity; CFSE; Human; preclinical study.

1 **Abbreviations:** CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl ester; ECP: extracorporeal
2 photochemotherapy; GVHD: graft versus host disease; MLR: mixed lymphocyte reaction;
3 MNC: mononuclear cells; 8-MOP: 8-methoxypsoralen; PBMC: peripheral blood mononuclear
4 cells

Main text

Introduction

Extracorporeal photochemotherapy (ECP) is an immunomodulatory cellular therapy relying on the injection of autologous cell products exposed to UV in the presence of a photosensitizer. The cell product is obtained by the isolation of white blood cells by cytopheresis and their subsequent *ex vivo* exposure to 8-methoxypsoralen (8-MOP) and UVA radiation (1). Treated cells are then reinfused to the patient. Several injections of the cell products are needed to obtain clinical improvement. (1)

How ECP is able to induce immune tolerance without immunosuppression is still not fully elucidated, although its mechanism of action involves lymphocyte (2, 3) and monocyte (4) apoptosis, tolerogenic immature dendritic cells and interleukin 10 (5). Several mechanisms have been hypothesized in humans such as the involvement of tolerogenic antigen presenting cells, production of immunosuppressive cytokines or generation of regulatory T cells (6). However, until now none has been clearly related to the efficacy of ECP in humans.

The clinical applications of ECP are founded on these regulatory properties. To date, the main three indications are cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)(7), GVHD (6) and solid organ rejection (5). However, its original mechanism of action combined with the absence of generalized immunosuppression or side-effects makes ECP a very attractive approach for safely treating a wide variety of T-cell-mediated pathologies (8). Depending on the clinical situation, the treatment schedule varies from three sessions a week to two sessions a month. Hence, the main obstacles to overcome for the widespread use of ECP are the logistical and psychological issues secondary to the performance of several apheresis procedures per week for several weeks.

The French technique for ECP, as described by Georges Andreu in 1991 (9), comprises two distinct steps: 1/ collection of PBMC by apheresis and 2/ treatment of the collection bag in the

cell therapy laboratory. This technique makes it possible to cryopreserve the PBMC before UV-irradiation. This approach could usefully diminish the number of apheresis runs, but it is not known whether cryopreservation affects the properties of ECP-treated cells. This *in vitro* study investigated whether cryopreservation of PBMC prior to ECP impairs their *in vitro* immunomodulatory properties after UV exposition. Using a model of allogeneic mixed leukocyte reaction (MLR), we showed that cryopreserved cells exhibit similar antiproliferative capabilities to fresh cells.

Material and methods

Model

The aim of our model was to reproduce an allogeneic conflict resembling the situation where a patient with GVHD is treated with ECP (figure 1). In this situation, the ECP-treated bag contains alloreactive and resting mononuclear donor cells. The study enrolled 6 pairs of unrelated healthy volunteers ; in each pair, one volunteer was considered as the donor (=D), and the other as the recipient (=R). To obtain alloreactive cells, donor cells were primarily exposed to recipient cells. This step consisted in a first-run mixed lymphocyte reaction. After 7-day culture, the alloreactive cells were harvested. Naive ECP-treated cells (D_{ECP}) or alloreactive ECP-treated cells (D_{SENS+ECP}) were added to a second MLR together with naive fresh cells from the “donor” (D) and the “recipient (R)”. Our judgment criterion was the intensity of the alloreactive proliferation in this second MLR.

PBMC sampling and isolation

Blood donations in this study were in conformance with local ethical committee requirements, and informed consent was obtained. Venous blood (30 ml) was collected in EDTA. PBMC were isolated by density gradient centrifugation over Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich). The

isolated cells were then washed twice in phosphate buffered saline (PBS, Gibco). Stimulating PBMC were irradiated at 30 Gy.

Generation of donor to receiver alloreactive cells (First MLR)

A first-run MLR was performed to obtain alloreactive cells from “donor” cells (D) stimulated by “recipient” cells (R). 10×10^6 reactive PBMC from D were cultured with 10×10^6 30 Gys irradiated stimulator PBMC R* for 7 days in a Falcon tube in 10 ml Dutch modified RPMI 1640 (Gibco Life technologies) supplemented with 10% fetal calf serum (Webtech lifespan), L-glutamine, streptomycin and penicillin (Sigma-Aldrich). After 7 days, the cells were centrifuged, washed twice in PBS, then treated by ECP.

Generation of immunomodulatory donor cells (PUVA exposure / Extracorporeal Photochemotherapy)

ECP was performed using the Vilber-Lourmat procedure, as previously described (10). Briefly, 5×10^6 PBMC were diluted in 20 ml normal saline solution to obtain a final hematocrit <1%, and 8-methoxypsoralen was added at 200 ng/ml. After 3-minute incubation, cells were transferred into a UV-A transparent bag (Macopharma, Tourcoing, France) and exposed to UV-A light (340 nm) at 2 J/cm^2 for 10 minutes (UVA-matic, Vilber-Lourmat, France).

CFSE labelling

CFSE is a green fluorochrome, that is retained in the cells for several weeks, without inducing problems of viability (at suitable concentrations). During each cellular division, CSFE is distributed in a strictly dichotomic fashion between both daughter cells. Cytometric analysis of its decrease thus makes it possible to follow cell proliferation (11). This method has proved suitable for lymphocyte studies in vitro (12). In our experiments, 2.5×10^6 PBMC from D

1 were suspended in 2 ml PBS (0.1%) bovine serum albumin (BSA) buffer. Cells were labeled
2 with 1 μ mol/L CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR) for 5 minutes at 37°C. Labelling was
3 stopped by adding 30 ml cold RPMI containing 10 % FCS, after which the cells were
4 maintained in ice for 5 minutes. Cells were centrifuged (800 *g* for 10 minutes at 20°C) and the
5 supernatant was removed. Cells were washed twice in PBS then suspended in 5 ml RPMI
6 with 10% FCS.

7 *Cryopreservation and thawing of PBMC.*

8 We used the same technique protocol as for haematopoietic progenitor cell cryopreservation
9 in clinical routine (13). 8×10^6 density gradient-isolated PBMC were resuspended in 5 ml of
10 PBS + 5% FCS, and transferred into 10 ml cryobags (Baxter). 5 ml of ice-cold cryoprotective
11 solution containing 7% dimethyl sulfoxide (DMSO), 10% serum albumin, 83%
12 hydroxyethylstarch was added slowly. Immediately after the cryoprotective solution was
13 added, specimens were transferred to a -80°C freezer overnight. This simplified method of
14 uncontrolled-rate freezing lowers specimen temperature by approximately 1 to 2°C per
15 minute (13). Specimens were kept in the freezer for at least 24 hours before being thawed and
16 treated with PUVA.

17 Frozen specimens were thawed in a 37°C water bath with continuous agitation until
18 completely melted, and then 40 ml of warm RPMI 1640 + 10% FCS was added directly into
19 the cryobag. Cells were transferred into a Falcon 50 and centrifuged (800 *g* for 10 minutes at
20 25°C) to remove the DMSO, then washed twice in 50 ml PBS. Then cells were resuspended
21 in RPMI 1640 and exposed to PUVA. The cells (frozen/thawed PBMC) were then assessed
22 for viability by trypan blue dye exclusion, and counted.

23 *Immunomodulation with PUVA-treated donor cells (Second MLR)*

After 7-day culture, the cells were harvested from the first MLR and treated by ECP. A second MLR was performed with 5×10^4 fresh stimulator cells (irradiated at 30 Gys) from the same recipient as the initial MLR (R^*), 1×10^5 CFSE-labeled cells from donor D (D_{CFSE}) and 1×10^5 naive or previously sensitized ECP-treated “immunomodulatory” cells from donor D was added on day 0 of the culture. The cell ratio was 1:2:2 respectively. Cells were cultured for 7 days in 96-well round-bottom plates in 250 μ l Dutch modified RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, L-glutamine, streptomycin and penicillin, and then cells were analyzed by flow cytometry (Beckman-Coulter EPICS). Each point was performed in triplicate.

Apoptosis

FITC-conjugated annexin-V coupled with PE-labeled 7-aminoactinomycin D (7AAD, Beckman-Coulter) was used to detect apoptosis. Cells were washed twice in PBS then stained with FITC-labeled annexin-V, 7AAD (in a 100 μ l of labeling solution) and incubated for 10 min in the dark according to the manufacturer’s protocol. Then, 400 μ l of buffer was added, and stained cells ($> 10,000$ events) were analyzed by flow cytometry (Beckman-Coulter EPICS). This staining protocol makes it possible to differentiate cells in early apoptosis (annexin + / 7AAD -), cells in late apoptosis (annexin + / 7AAD +) and necrotic cells (annexin - / 7AAD+) from viable cells (annexin - / 7AAD -).

Mitogen-induced proliferation assay of ECP-treated cells

After thawing, cells were placed on RPMI with phytohemagglutinin (PHA) at 10 μ g/ml. After a 3-day incubation period, 1 μ Ci of ^{3} H-thymidine (Amersham, France) was added to each well. 8 h later, DNA was transferred onto filter paper using a multiwell harvester, and ^{3} H-thymidine incorporation was measured in counts per minute (cpm) using a gas-ionization

counter. Proliferation was calculated as the mean value of the triplicates, and inhibition was calculated as: $[(\text{cpm before ECP} - \text{cpm after ECP}) \times 100 / \text{cpm before ECP}]$.

Statistical analysis

The experiments were repeated six times. The data presented show the mean of these six experiments. The error bars on the bar charts gives standard deviations (SD). Comparisons between fresh and frozen cells were run by the paired t-test, using SEM software (14).

Results

ECP induces cell apoptosis

Induction of lymphocyte apoptosis is a hallmark of the *ex vivo* exposure to ECP. As soon as two hours after ECP, the proportion of cells staining positive for annexin and negative for 7AAD was higher in ECP-treated cells compared with non-treated cells ($24.8 \pm 4\%$ vs $18.4 \pm 5\%$, $p < 0.05$). Annexin-7AAD staining was performed each day of a 6-day culture. The percentage of annexin+ cells remained higher in ECP-treated cells from day 1 ($69.1 \pm 4\%$ vs $25.7 \pm 2\%$, respectively) until day 6 ($95.9 \pm 4\%$ vs $52.3 \pm 5\%$, $p < 0.001$). The rate of late apoptotic cells (staining positive for both annexin and 7AAD) among ECP-treated was also increased as compared with non-treated cells (2 hours: $3.9 \pm 0.4\%$ vs $2.7 \pm 0.9\%$, $p = \text{NS}$ and 6 days: $55.5 \pm 5\%$ vs $29.5 \pm 6\%$, $p < 0.01$) (figure 2).

Prior cryopreservation doesn't impair ECP-induced lymphocyte apoptosis

Rapid and massive lymphocyte apoptosis is thought to be of major importance for the action of ECP. It is therefore necessary to assess whether ECP triggers apoptosis in cryopreserved cells as in fresh cells. We therefore used fresh cells collected from 6 donors. Cells were exposed to ECP after having been cryopreserved or not, then they were cultured 6 days and

apoptosis was measured at different time. In cryopreserved ECP-treated cells, the rate of early apoptosis was slightly increased compared with ECP-treated fresh cells immediately after ECP ($27.1 \pm 4\%$ vs $20.0 \pm 2\%$, $p < 0.05$). This small increase in apoptosis persisted for three days, and was no longer significant thereafter (figure 3). At any time of the study, the rate of necrotic cells (Annexin – 7AAD +) was less than 1%.

ECP-treated cells slightly inhibit alloreactive proliferation

CFSE-loading makes it possible to precisely quantify the level of alloreactive proliferation by measuring the proportion of dividing CFSE^{low} and quiescent CFSE^{bright} cells in the gate of the viable lymphocytes (11). Quiescent cells (CFSE bright) were higher in the autologous controls ($D_{CFSE} \times D^*$) than in the allogeneic MLR ($D_{CFSE} \times R^*$) reflecting higher proliferation rate in the second ones: $81.2 \pm 2.6\%$ vs $50.3 \pm 8.5\%$, respectively, $p < 0.01$ (figure 4). When ECP-treated naïve “D” cells were added (on day 0) in the culture well, proliferation was slightly but significantly decreased (CFSE^{bright}: $57.9 \pm 9.3\%$ vs $50.3 \pm 8.5\%$, respectively, $p < 0.05$).

Prior sensitization optimizes the ECP-induced anti-proliferative effect

ECP is believed to result in the selective neutralization of pathogenic T-cell clones. Moreover, activated lymphocytes are more susceptible to cell death after ECP exposure (Hannani, submitted manuscript) and their immunomodulatory capabilities exceed those of non-activated cells (15). When a patient with GVHD is treated with ECP, the ECP-treated bag contains alloreactive and resting mononuclear donor cells. Thus, to get closer to the clinical setting of active GVHD, we considered to mimic *in vitro* the step of pre-ECP alloreactive activation. To obtain alloreactive activated cells, donor cells were primarily exposed to receiver cells in a first MLR (Figure 1). We therefore assessed whether prior allogeneic

stimulation could enforce the antiproliferative effect of ECP-treated cells. In our model, the inhibition of alloreactive proliferation was stronger when the ECP-treated mononuclear cells had been previously activated by the cells from the same donor than with naive cells (CFSE^{bright} non-reactive cells: $77.5 \pm 16.3\%$ vs $57.9 \pm 9.3\%$, respectively, $p < 0.01$) (figure 4).

Cryopreservation before ECP does not impair the inhibition of PHA-induced lymphocyte proliferation

Phytohemagglutinin (PHA) is a non-specific mitogen activator of T cells. It binds the T-cell receptor and is able to trigger a massive activation and proliferation of the whole lymphocytic population. The impairment of PHA induced lymphocyte proliferation is a currently used quality control for the procedure of ECP (16). We therefore assessed whether prior cryopreservation should impact this effect of ECP. Using PHA at the concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$, proliferation was achieved in all cryopreserved samples (99357 ± 8524 cpm vs 133 ± 55 without PHA). After the ECP process, inhibition was complete (132 ± 61 cpm vs 32 ± 25 without PHA, 99% inhibition)(data not shown).

Previously cryopreserved cells retain their antiproliferative properties when treated by ECP after thawing

The ultimate aim of our study was to measure whether cryopreserved PBMC retain their immunomodulatory properties when treated by ECP after being thawed. Knowing the activated state of lymphocyte responsible of active GVHD, we used the same manipulation with a first MLR to sensitize PBMC from the “donor” to the “recipient”, followed by a second MLR to measure the inhibition of alloreactive proliferation provided by ECP-treated cells. After the second MLR, the rate of non-dividing CFSE^{bright} cells was $47.8 \pm 12\%$ in allogeneic control. The inhibition of alloreactive proliferation induced by ECP-treated-cells

1 resulted in a significant increase of non-dividing cell rate. This inhibition was similar
2 according to whether ECP-treated cells had been previously cryopreserved or not: non-
3 dividing CFSE^{bright} cells $68.6 \pm 26\%$ vs $64.5 \pm 10\%$ with cells sensitized before ECP ($p=0.8$)
4 and $60.6 \pm 9\%$ vs $57.9 \pm 9\%$ with ECP-treated cells without previous sensitization ($p=0.7$)
5 (figure 5). The inhibition of proliferation was given by the following formula: % inhibition =
6 $100 \times (\text{CFSE}^{\text{bright}}_{\text{ECP}} - \text{CFSE}^{\text{bright}}_{\text{control}}) / \text{CFSE}^{\text{bright}}_{\text{control}}$; where “ECP” is the culture with
7 ECP-treated cells and “control” is the control MLR without ECP-treated cells. Inhibition was
8 similar between fresh and cryopreserved cells (respectively: $24.6 \pm 16\%$ vs $32.2 \pm 30\%$,
9 $p=0.6$).

11 Discussion

12 ECP is a fascinating immunotherapy which uniquely provides a selective immune regulation
13 without generalized immune suppression (2). The beneficial effects of the method have been
14 observed in a variety of T-cell mediated inflammatory diseases, such as GVHD, transplant
15 rejection, or certain T cell mediated autoimmune diseases (17). However, its clinical use is
16 limited by logistical difficulties, especially due to the need to perform repeated apheresis.
17 This problem is of particular importance in small children for whom cutting exposure to
18 conventional immunosuppressive therapies is especially warranted (10).

19 One approach to reduce the number of apheresis sessions while maintaining the treatment
20 schedule is to use cryopreserved cells, as illustrated in figure 6. For example, the cell product
21 harvested in one apheresis could be divided into three aliquots: two could be cryopreserved
22 while the third could be immediately treated and reinfused. This approach offers 4
23 advantages: 1) to make ECP easier for the patients; 2) to take advantage of the temporary use
24 of a central venous line to harvest a large quantity of cells; 3) it allows patients from other
25 care centres to easily benefit from the ECP therapy; 4) it allows to standardize the quantity of

1 cells infused at each session. Here we have shown that cryopreserved cells retain their
2 immunomodulatory capabilities when treated by ECP.

3 The main drawback of cryopreservation is that it implies an overall decrease in total cell dose.
4 However, if the aphereses are spaced out, the price to pay to harvest more cells (stronger
5 platelet depletion) becomes acceptable. In our center, the mean duration of one apheresis for
6 ECP is about 100 minutes. If the frequency of aphereses decreases from 3 a week to 1 a week,
7 it becomes possible to lengthen one session to up to 150 minutes (+50%). Moreover,
8 increasing the total volume collected can enhance collection efficiency by about 20%.
9 Overall, the total cell dose can be maintained at about 60% for each reinfusion while the
10 treatment schedule is maintained with three times fewer apheresis sessions. Although
11 previously suggested (18), the effect of the cell dose has never yet been clearly established.
12 By allowing a standardization of the cell dose for each reinfusion, cryopreservation can
13 provide insightful data on this question. Another theoretical issue could stem from the toxicity
14 of repeated DMSO infusions. In our procedure, cells are frozen in a low-DMSO
15 cryoprotective solution (only 3.5%), and the cells are washed before reinfusion. As a result,
16 we assume that the toxicity of DMSO would be negligible, but this warrants rigorous
17 assessment in clinical safety trials.

18 The perspectives for clinical use make it critical to determine *in vitro* the impact of
19 cryopreservation on the properties of ECP-treated cells as a preclinical measure. The first
20 reported phenomenon is the massive induction of lymphocyte apoptosis after ECP exposure
21 (19). Apoptotic cells are engulfed by treated or untreated phagocytes and dendritic cells,
22 which are thought to trigger a regulatory immune response. In certain conditions,
23 cryopreservation is known to trigger lymphocyte apoptosis (20) and to preserve the
24 stimulatory function of dendritic cells (21, 22). To assess whether cryopreserved cells retain
25 their immunomodulatory properties after ECP, we built an *in vitro* model that is applicable to

1 healthy humans and is easy to exploit. It is known, that the adjunction of ECP-treated cells in
2 an allogeneic MLR results in an inhibited alloreactive proliferation (23). As the mechanism of
3 action of ECP remains largely unknown, we chose to measure functional inhibition of
4 alloreactive proliferation. Our model demonstrated a significant inhibition of alloreactive
5 proliferation by ECP-treated cells, and this effect was retained even when cells had been
6 cryopreserved before ECP. We therefore believe that the pros and cons of using
7 cryopreserved PBMC for ECP in clinical practice deserve to be investigated.

1 **Acknowledgment:** This work was supported by the association “Capucine” (grant attributed
2 under the control of the association “Centpoursanglavie”). We thank Magalie Diviné,
3 Florence Jacomet and Camille Confland for technical assistance.

4
5 **Disclosure of interest:** the authors have no conflict to declare.
6

References

1. Halle P, Paillard C, D'Incan M, Bordigoni P, Piguet C, De Lumley L, et al. Successful extracorporeal photochemotherapy for chronic graft-versus-host disease in pediatric patients. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11(3):501-12.
2. Marshall SR. Technology insight: ECP for the treatment of GvHD--can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3(6):302-14.
3. Plumas J, Manches O, Chaperot L. Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy in the control of GVHD: involvement of dendritic cells. *Leukemia* 2003;17(11):2061-2.
4. Hannani D, Gabert F, Laurin D, Sall M, Molens J, Hequet O, et al. Photochemotherapy induces the apoptosis of monocytes without impairing their function. *Transplantation* 2010 89(5):492-9.
5. Maeda A. Extracorporeal photochemotherapy. *J Dermatol Sci* 2009;54(3):150-6.
6. Jonson CO, Pihl M, Nyholm C, Cilio CM, Ludvigsson J, Faresjo M. Regulatory T cell-associated activity in photopheresis-induced immune tolerance in recent onset type 1 diabetes children. *Clin Exp Immunol* 2008;153(2):174-81.
7. Edelson R, Berger C, Gasparro F, Jegasothy B, Heald P, Wintroub B, et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results. *N Engl J Med* 1987;316(6):297-303.
8. Guyot AD, Farhi D, Ingen-Housz-Oro S, Bussel A, Parquet N, Rabian C, et al. Treatment of refractory erosive oral lichen planus with extracorporeal photochemotherapy: 12 cases. *Br J Dermatol* 2007;156(3):553-6.
9. Andreu G, Leon A, Heshmati F, Tod M, Menkes CJ, Baudelot J, et al. Extracorporeal photochemotherapy: evaluation of two techniques and use in connective tissue disorders. *Transfus Sci* 1994;15(4):443-54.
10. Kanold J, Merlin E, Halle P, Paillard C, Marabelle A, Rapatel C, et al. Photopheresis in pediatric graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation: clinical practice guidelines based on field experience and review of the literature. *Transfusion* 2007;47(12):2276-89.
11. Evrard B, Dosgilbert A, Jacquemot N, Demeocq F, Gilles T, Chassagne J, et al. CFSE flow cytometric quantification of lymphocytic proliferation in extracorporeal photopheresis: Use for quality control. *Transfus Apher Sci* 2009.
12. Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* 2000;243(1-2):147-54.
13. Halle P, Tournilhac O, Knopinska-Posluszny W, Kanold J, Gembara P, Boiret N, et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80 degrees C, with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. *Transfusion* 2001;41(5):667-73.
14. Kwiatkowski F, Girard M, Hacene K, Berlie J. [Sem: a suitable statistical software adapted for research in oncology]. *Bull Cancer* 2000;87(10):715-21.
15. Stadler K, Frey B, Munoz LE, Finzel S, Rech J, Fietkau R, et al. Photopheresis with UV-A light and 8-methoxypsoralen leads to cell death and to release of blebs with anti-inflammatory phenotype in activated and non-activated lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;386(1):71-6.

- 1 16. Jacob M, Manches O, Drillat P, Richard M, Plumas J, Chaperot L, et al. Quality control
2 for the validation of extracorporeal photopheresis process using the Vilbert-Lourmat UV-A
3 irradiation's system. *Transfus Apher Sci.* 2003 28(1):63-70.
- 4 17. Szodoray P, Papp G, Nakken B, Harangi M, Zeher M. The molecular and clinical
5 rationale of extracorporeal photochemotherapy in autoimmune diseases, malignancies and
6 transplantation. *Autoimmun Rev* 2010;9(6):459-64.
- 7 18. Perseghin P, Galimberti S, Balduzzi A, Bonanomi S, Baldini V, Rovelli A, et al.
8 Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of chronic graft-versus-host disease:
9 trend for a possible cell dose-related effect? *Ther Apher Dial* 2007;11(2):85-93.
- 10 19. Yoo EK, Rook AH, Elenitsas R, Gasparro FP, Vowels BR. Apoptosis induction of
11 ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell Lymphoma: relevance to
12 mechanism of therapeutic action. *J Invest Dermatol* 1996;107(2):235-42.
- 13 20. Sarkar S, Kalia V, Montelaro RC. Caspase-mediated apoptosis and cell death of rhesus
14 macaque CD4+ T-cells due to cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells can be
15 rescued by cytokine treatment after thawing. *Cryobiology* 2003;47(1):44-58.
- 16 21. Westermann J, Korner IJ, Kopp J, Kurz S, Zenke M, Dorken B, et al. Cryopreservation of
17 mature monocyte-derived human dendritic cells for vaccination: influence on phenotype and
18 functional properties. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52(3):194-8.
- 19 22. Feuerstein B, Berger TG, Maczek C, Roder C, Schreiner D, Hirsch U, et al. A method for
20 the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready
21 for clinical use. *J Immunol Methods* 2000;245(1-2):15-29.
- 22 23. Perez MI, Edelson RL, John L, Laroche L, Berger CL. Inhibition of antiskin allograft
23 immunity induced by infusions with photoinactivated effector T lymphocytes (PET cells).
24 *Yale J Biol Med* 1989;62(6):595-609.
- 25
26

Legends of the figures

Figure 1. Scheme of our model of immunomodulation by ECP-treated cells in the alloreactivity setting. The aim of this model was to mimic the situation where a patient with GVHD is treated with ECP. Six couples of healthy volunteers were enrolled in the study; in each pair, one was considered as the “donor” = D and the other as the “recipient” = R. To obtain alloreactive cells, we employed a first step of sensitizing donor (D) to recipient (R) in a first Mixed Lymphocyte Reaction with responsive cells from D and 30 grays-irradiated stimulator cells from R (DxR*). After 7-day culture, the alloreactive “sensitized” cells D_{SENS} were harvested and treated with ECP (D_{SENS+ECP}). Either fresh cells (D_{ECP}) or D_{SENS+ECP} were added into a second Mixed Lymphocyte Reaction (DxR*). Reactive cells were labelled with CFSE (D_{CFSE}) to allow the measurement of cell proliferation. In each experiment, we measured the inhibition of alloreactive proliferation due to the presence of ECP-treated cells.

Figure 2. ECP induces apoptosis. PBMC were collected from healthy donors and were cultured in 96-well plate in RPMI supplemented with fetal calf serum, glutamine and ATB. After 6 days of culture, apoptosis was measured by annexin V – 7AAD labelling allowing to differentiate cells in early apoptosis (annexin + 7-AAD -) and late apoptosis (annexin + 7-AAD +) from viable cells (annexin - 7-AAD -). **p<0.01.

Figure 3. Cryopreservation slightly increases the percentage of apoptotic cells after exposure to ECP for three days. PBMC were collected from 6 healthy donors and frozen at -80°C in an ice-cold cryoprotective solution containing 7% dimethyl sulfoxide (DMSO), 10% serum albumin 83% hydroxyethylstarch. After 24 h at -80°C, cells were thawed, washed twice in PBS, and exposed to ECP. Apoptosis was then measured at various time. (A) One representative experiment is presented. Fresh or cryopreserved ECP treated cells were

labelled with annexin and 7AA at day 2. The staining protocol makes it possible to differentiate cells in early apoptosis (annexin + 7-AAD -), cells in late apoptosis (annexin + 7-AAD +) and necrotic cells (annexin - 7-AAD+) from viable cells (annexin - 7-AAD -). (B) The kinetic of apoptosis of fresh or cryopreserved cells treated or not by ECP is presented at h2 and d1, d2, d3 and d6. Upper panel : percentage of early apoptotic cells (annexinV+7AAD-), lower panel: percentage of total apoptotic cells (annexinV+) *p<0.05 (cryopreserved cells versus fresh cells).

Figure 4. ECP-treated cells inhibit allogeneic proliferation in a mixed lymphocyte reaction. PBMC were collected from 6 couples of healthy volunteers “D” (donor) and “R” (recipient). Responsive D cells were labeled with 1 μ mol/l CFSE (D_{CFSE}) and cultured for 7 days with stimulator cells R* (irradiated at 30 Grays) and ECP-treated-cells (added on day 0 of culture). ECP-treated cells were from the donor “D”, and were naïve or had been previously sensitized in a previous 7-day MLR with R*. The ratio between R*, D_{CFSE} and ECP-treated cells was 1:2:2. A) one representative experiment B) results of the six experiments. Compared with allogeneic control: *p<0.05 **p<0.01

Figure 5. Previously cryopreserved mononuclear cells retain their anti-proliferative properties when treated with ECP. Six couples of healthy volunteers were enrolled. PBMC from healthy volunteer “D” (donor) were labeled with CFSE whereas PBMC from healthy donor “R” (recipient) were irradiated at 30 Gys and used as stimulators. ECP-treated cells were added on day 0 of the 7-day culture. The ratio between R*, D_{CFSE} and ECP-treated cells was 1:2:2. ECP-treated cells were: 1) fresh naïve cells from D; 2) cryopreserved naïve cells from D; 3) fresh cells from D previously sensitized by a 7 days MLR D $\times$ R*; 4) cryopreserved cells from

1 D previously sensitized by a 7 days MLR DxR*. * 1,2,3 and 4 vs allogeneic control: $p < 0.05$;
2 1 vs 2 and 3 vs 4: $p = \text{NS}$.

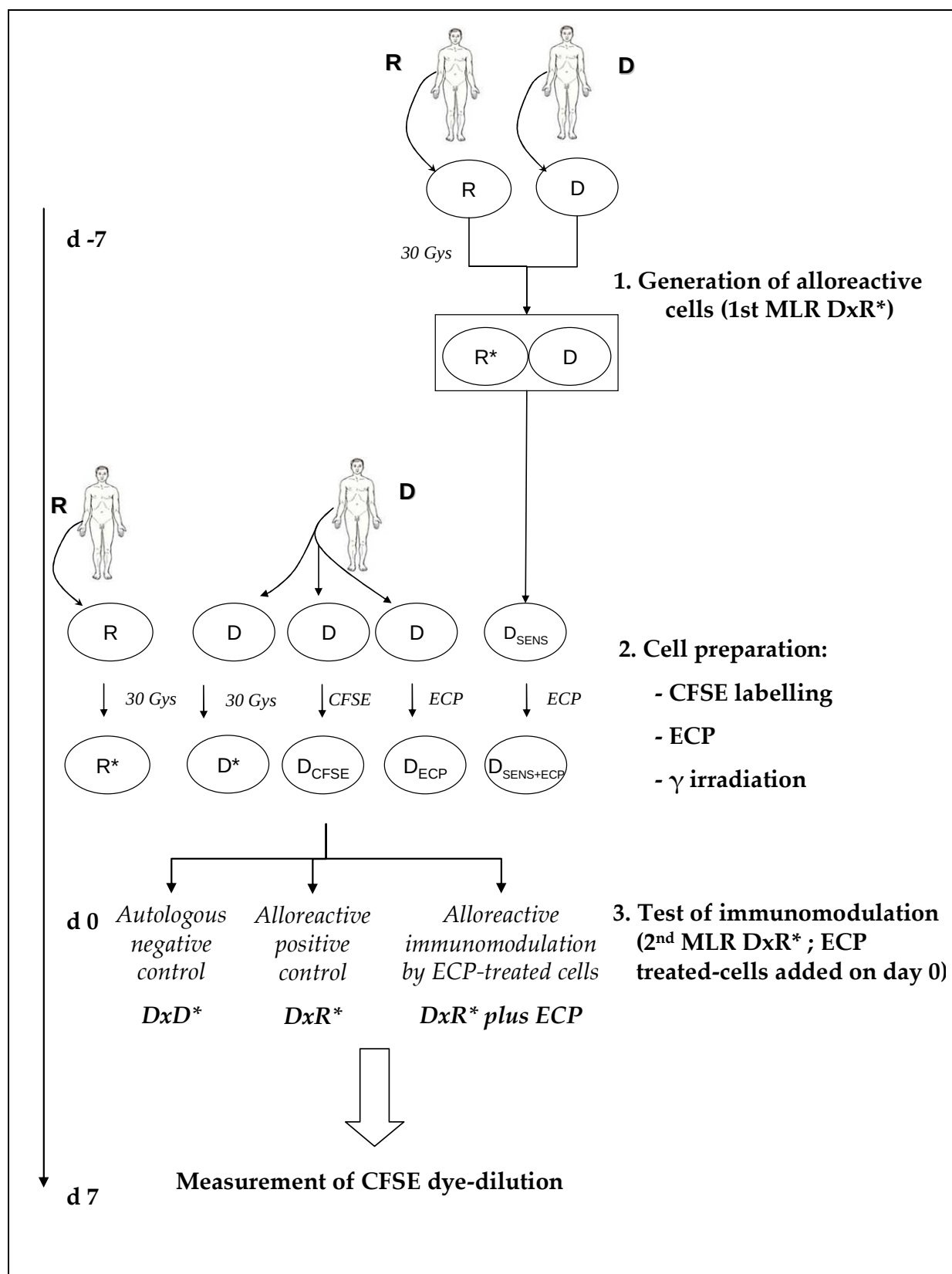
3

4 Figure 6. Clinical application of cryopreserved PBMC for ECP. a) Currently, in a schedule
5 based on three-weekly sessions, three aphereses are performed (Monday Wednesday and
6 Friday) b) Scheme of the same ECP schedule using cryopreservation. Only one apheresis
7 (Monday) should be necessary.

8

9

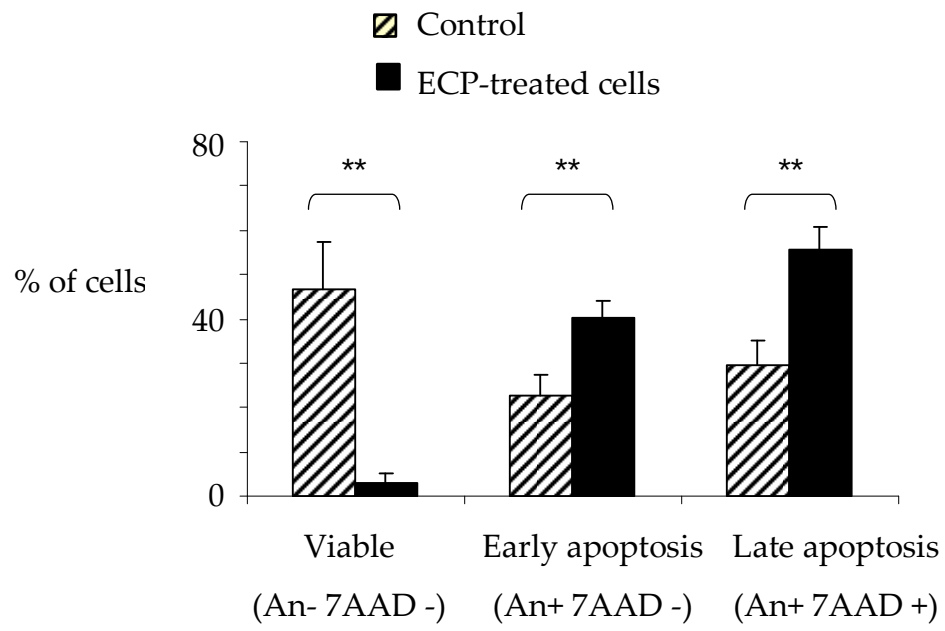
1 Figures



2

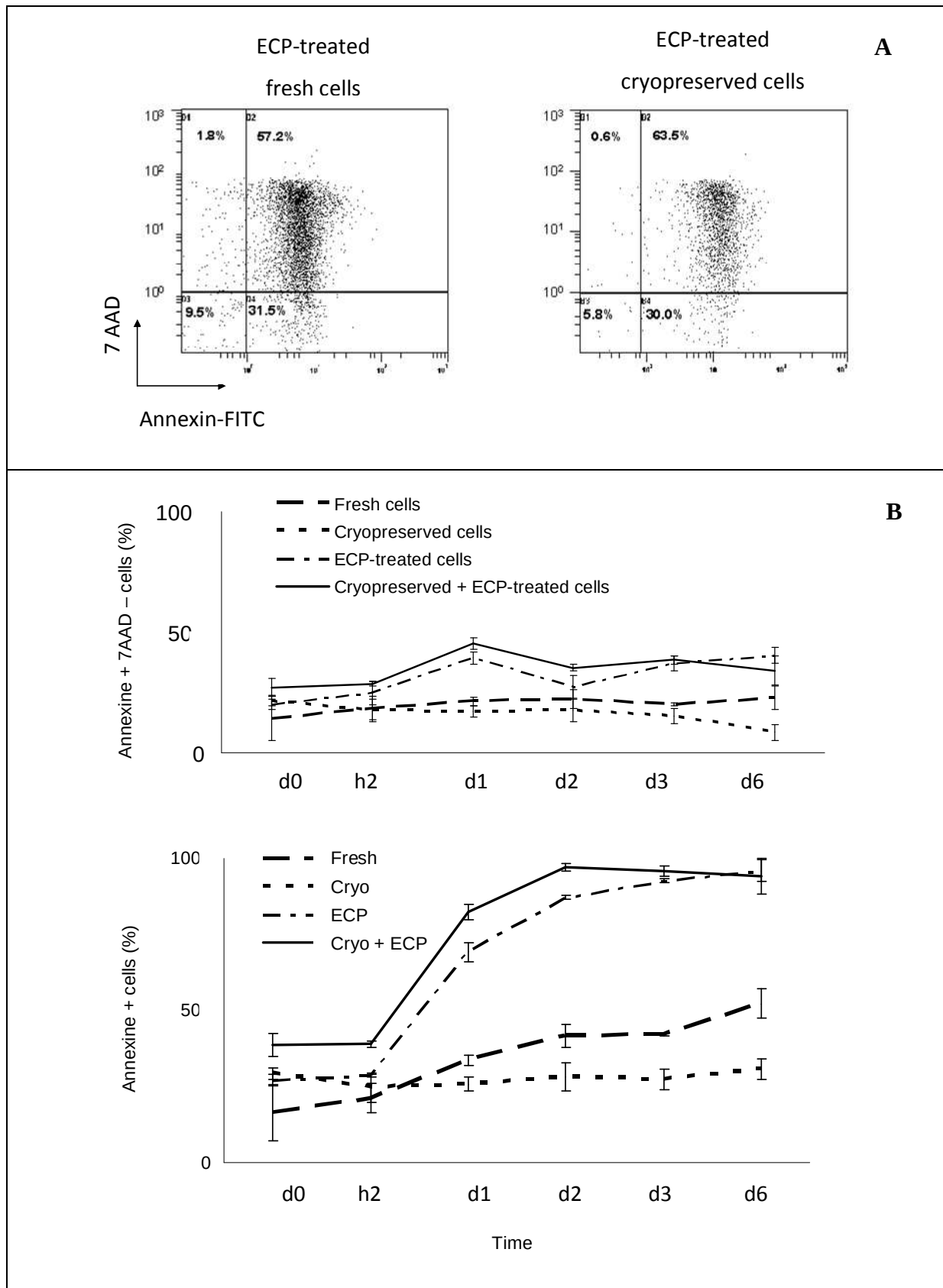
3 Figure 1.

1

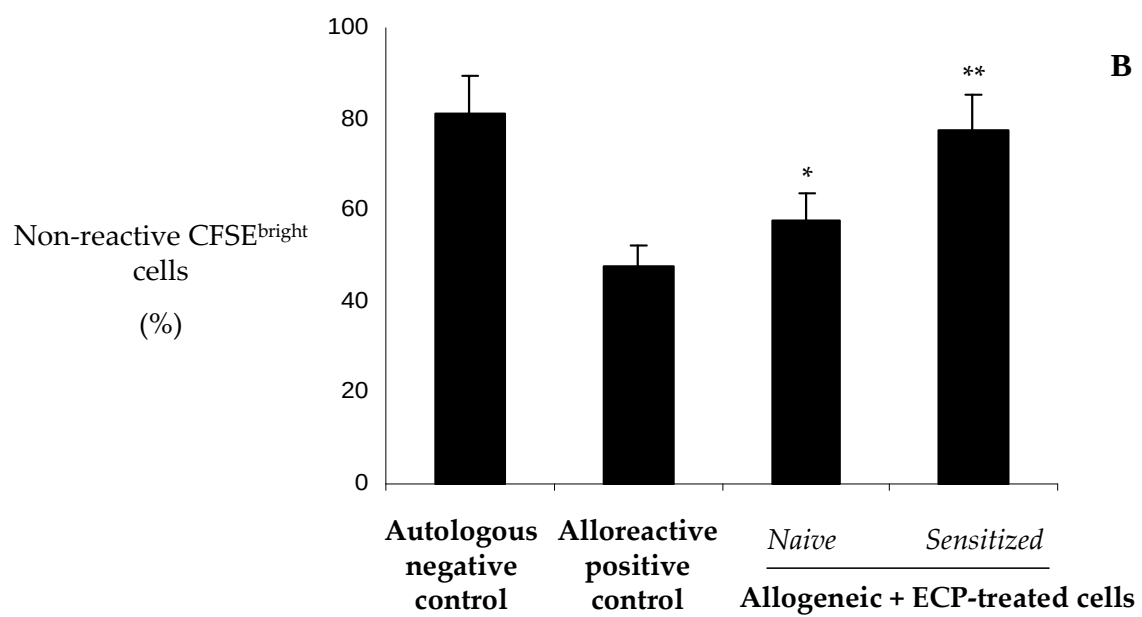
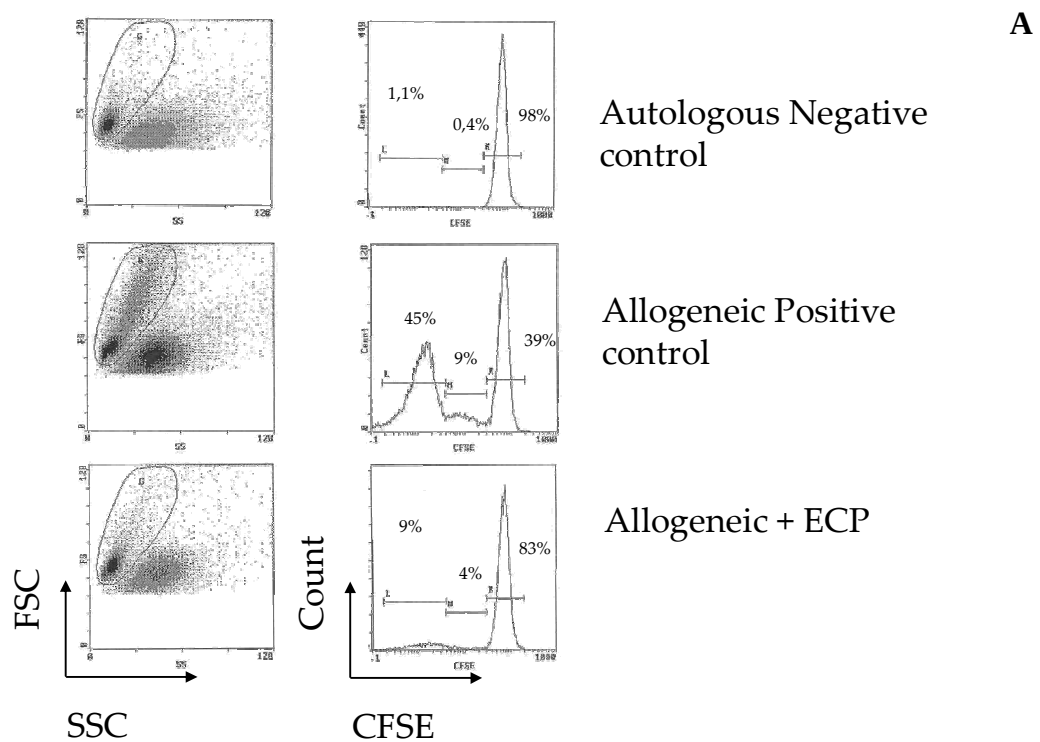


2

3 Figure 2



2 Figure 3.

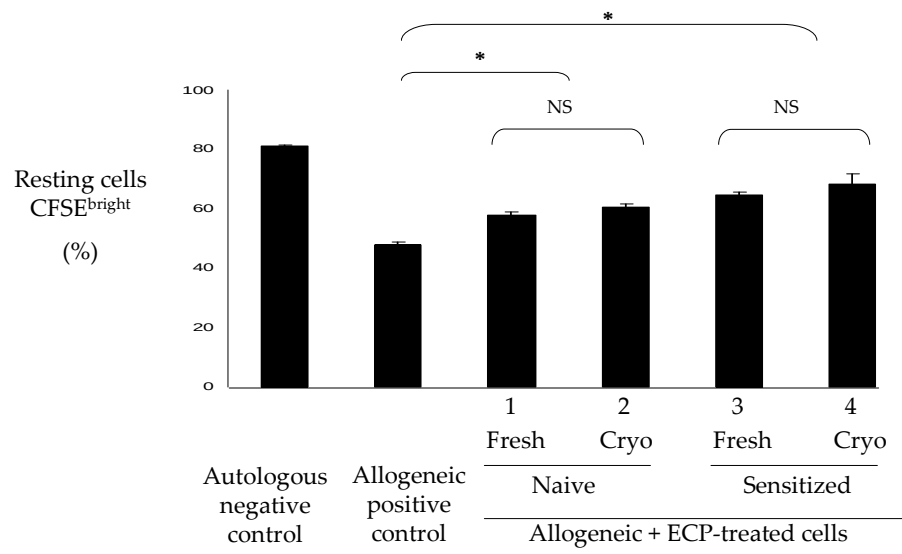


1

2 Figure 4.

3

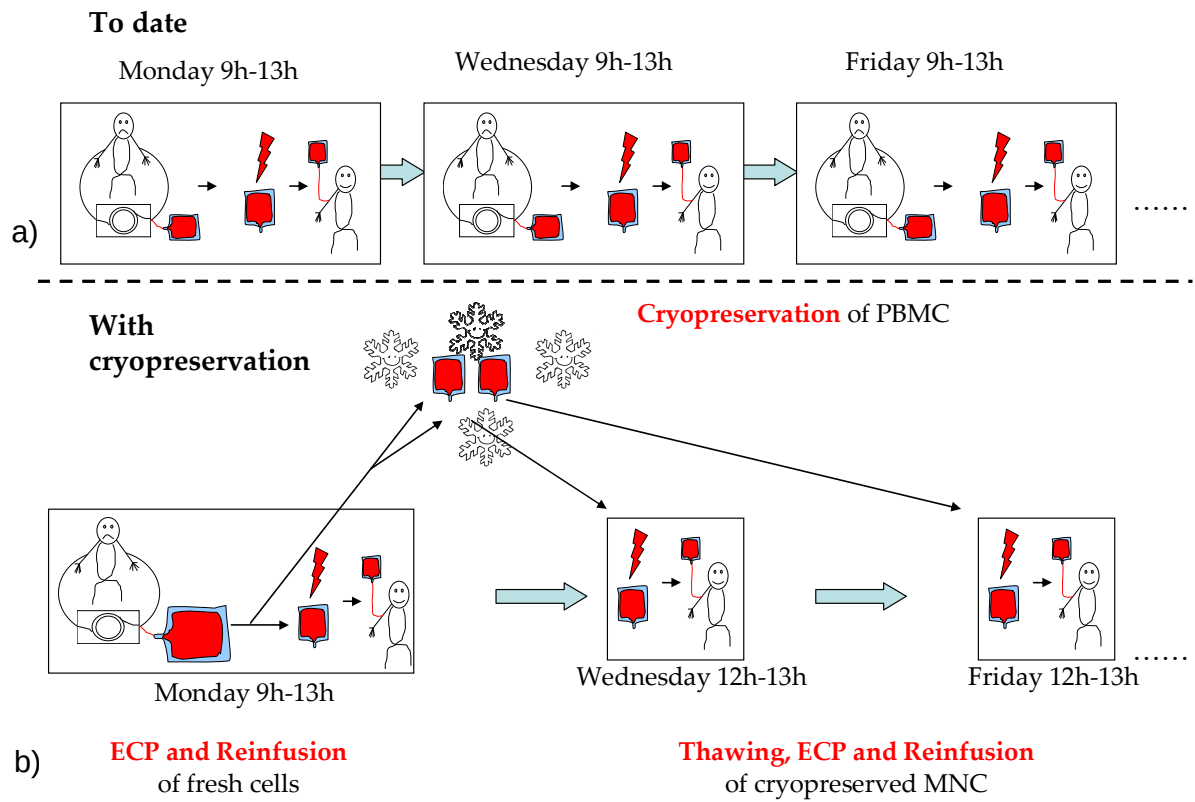
1



2

3 **Figure 5.**

1



2 Figure 6.

3

4

5

C. Article 6 : Immunomonitoring of graft-versus-host minor histocompatibility antigen correlates with graft-versus-host disease and absence of relapse after graft

Introduction et objectifs de l'étude:

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) consiste à éradiquer par chimiothérapie et irradiation γ l'hématopoïèse de patients atteints d'hémopathies malignes afin de remplacer celle-ci en leur greffant des CSH allogéniques capables de reconstituer une hématopoïèse fonctionnelle.

Le greffon contient en plus des CSH, des LT matures dont une partie va reconnaître les tissus du receveur comme étranger. Ceci va provoquer une réaction allogénique qualifiée de réaction du greffon contre l'hôte (GvH pour Graft versus Host reaction). Cet effet GvH est recherché car il s'accompagne de l'élimination des cellules tumorales résiduelles. C'est l'effet greffon contre la leucémie (GvL pour Graft versus Leukemia). Ces LT alloréactifs reconnaissent et détruisent également les tissus sains du receveur causant la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD pour Graft versus Host Disease). Afin de minimiser les risques de développement de la GvHD, les patients sont traités en prophylaxie avec des immunosuppresseurs et greffés avec des greffons HLA-compatibles. Il subsiste tout de même une incompatibilité au niveau des antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHAg pour minor Histocompatibility antigens), et malgré l'usage d'immunosuppresseurs, certains patients développent une GvHD. Cette situation clinique est extrêmement complexe car l'utilisation d'immunosuppresseurs doit être adaptée pour permettre l'arrêt de la GvHD sans altérer l'effet GvL et sans augmenter les risques infectieux des patients.

Ainsi, l'un des buts du clinicien est d'administrer le moins possible d'immunosuppresseurs. La dose est augmentée en cas de GvHD et ajustée en fonction de l'apparition de signes cliniques de la GvHD.

Malheureusement, ces signes cliniques traduisent une destruction en cours des tissus en question et il n'existe aucun test prédictif de la GvHD à ce jour.

Les LT alloréactifs sont retrouvés dans le sang. Il a été démontré que leur apparition précédait systématiquement les signes cliniques de la GvHD (35). Le but de cette étude est de mettre au point un test prédictif de la GvHD. Nous avons développé un test fonctionnel des LT alloréactifs présents dans le sang et avons corrélié cette présence à l'apparition des signes de la GvHD ainsi qu'à l'absence de rechute i.e à l'effet GvL, dans le but d'anticiper l'apparition de ces signes pour traiter en amont les patients.

Méthodes / Résultats :

Nous avons quantifié rétrospectivement l'alloréactivité chez 24 couples de donneurs/receveurs par ELISpot IFN γ sur une période de 2 ans post greffe. Nous avons étudié l'alloréactivité globale donneur contre receveur puis plus précisément l'alloréactivité dirigée à l'encontre d'antigènes mineurs d'histocompatibilité connus. Ces mesures ont été corrélées avec le développement clinique de GvHD ou d'absence de rechute considérée ici comme reflétant l'effet GvL.

Ainsi nous avons montré que la détection d'alloréactivité dans les 3 premiers mois ou après 3 mois post greffe corrèle avec le développement de GvHD aiguë et chronique respectivement. De plus, cette alloréactivité est corrélée à une absence de rechute et donc à un effet GvL. La détection de LT alloréactifs avant l'apparition des signes cliniques chez certains patients démontrent la prédictivité du test.

Conclusion :

Nos résultats démontrent que la mesure d'alloréactivité par ELISpot IFN γ , i.e la présence de LT alloréactifs fonctionnels dans le sang, corrèle avec le développement clinique de la GvHD. En plus d'être un outil de diagnostic prédictif de la GvHD, ce test permet notamment la quantification de la fréquence des LT alloréactifs dans le sang circulant des patients.

Immunomonitoring of graft-versus-host minor histocompatibility antigen correlates with graft-versus-host disease and absence of relapse after graft

David Laurin, Dalil Hannani, Martine Pernollet, Agnès Moine, Joël Plumas, Jean-Claude Bensa, Jean-Yves Cahn, and Frédéric Garban

BACKGROUND: After HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation, minor histocompatibility (mH) antigen alloreactivity plays a dominant role in the development of graft-versus-host disease (GVHD) and graft versus leukemia (GVL).

STUDY DESIGN AND METHODS: We have analyzed the mH alloreactivity (enzyme-linked immunospot [ELISpot] for interferon- γ [IFN- γ] assay) from 24 donor/recipient pairs over a period of 2 years of follow-up and correlated such alloreactivity with the development of GVHD or absence of relapse. Circulating specific T cells anti-mH with multimer HLA-peptides were also studied.

RESULTS: We show by ELISpot IFN- γ assay that alloreactivity during the first 3 months from donor versus recipient or donor versus mismatched identified mH antigens is associated with acute GVHD and GVL effect. In addition, we demonstrate that the donor-versus-recipient reactivity observed after the third month is highly associated with chronic GVHD and GVL ($p = 0.0007$). Finally, we show by multimer HLA-peptide assay that mH epitope-specific T cells present after 3 months are statistically related to the GVL effect.

CONCLUSIONS: Our results provide a robust method to monitor mH antigen graft-versus-host reaction and suggest that current identified mH have predictive value on GVHD and GVL.

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) constitutes the main curative treatment of hematologic malignancies and disorders. In HLA-matched transplantation, minor histocompatibility (mH) antigens are responsible for the allogeneic reactions of graft-versus-host disease (GVHD) and graft-versus-leukemia (GVL) effect. These allogeneic reactions are caused by donor T cells recognizing mH antigens expressed by recipient cells. Minor H antigens are polymorphic peptides, derived from endogenously processed cellular proteins and presented on the cell surface by HLA molecules.¹ These proteins are encoded by multiallelic, mostly biallelic, autosomal genes that are transmitted with Mendelian segregation or by genes on the Y chromosome.

In mice, several hundred mH antigens have been estimated between syngenic strains² but further experiments indicate that a hierarchy of immunogenicity exists among mH antigens, with a limited number of immunodominant

ABBREVIATIONS: aGVHD = acute graft-versus-host disease; cGVHD = chronic graft-versus-host disease; ELISpot = enzyme-linked immunospot; GVL = graft versus leukemia; HSCT = hematopoietic stem cell transplantation; mH = minor histocompatibility.

From the Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes, and Immunobiologie et Immunothérapie des Cancers, Centre de Recherche INSERM Albert Bonniot, La Tronche; and Clinique Universitaire d'Hématologie, CHU de Grenoble, and Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Address reprint requests to: Frédéric Garban, MD PhD, Hématologie, CHU de Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble France; e-mail: fgarban@chu-grenoble.fr.

Supported by La Ligue Contre le Cancer, Comité de l'Isère; GEFLUC; and a grant from the EFS.

Received for publication May 18, 2009; revision received July 30, 2009, and accepted August 4, 2009.

doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02440.x

TRANSFUSION 2010;50:418-428.

antigens responsible for an oligoclonal T-cell response in any MHC-identical donor/recipient pair.³ In humans, the number of mH antigens is thought to be similar to mice and the existence of immunodominant human mH antigens has been strongly suggested.⁴⁻⁶ At last, 20 mH epitopes HLA Class I restricted and three HLA Class II restricted have been described^{1,7,8} with different phenotype frequencies between the ethnic populations.⁹ However, apart from single donor/recipient pairs for a particular mH antigen, the implication of molecularly identified mH in clinical status of patients has mainly been performed by statistical analysis of molecular mH mismatches. Functional studies of mH-specific T cells have been conducted as case reports from donor/recipient pairs from whom the T cells used to characterize the epitope were sampled or from studies with a limited number of mH antigens.¹⁰

Here we set out to identify the presence of mH-specific T cells after HSCT. We developed enzyme-linked immunospot (ELISpot) interferon- γ (IFN- γ) assay to investigate donor-versus-recipient mH alloreactivity after grafts from frozen samples collected during standard follow-up. We then explored mH-specific T cells specific for currently identified mH epitopes by ELISpot IFN- γ functional test or by multimers of HLA/peptide fluorescent probes. Due to rare occurrence of mH antigens expressed only on hematopoietic cells,⁹ we focused on ubiquitously expressed mH antigens. The availability of a simple, uniform, and rapid method permitted the mH antigen typing of the patients included in this study.¹¹

Despite limited volumes of samples, we demonstrate the feasibility of monitoring mH responses and the potential usefulness of systematic measures to help with the prevention of GVHD after hematopoietic stem cell transplantation. This study provides strong evidence that currently identified mH antigens at the molecular level mainly belong to the core set of immunodominant mH antigens and significantly influence HSCT outcome for graft-versus-host balance.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) were obtained from 24 donor/recipient pairs. Patients gave their informed consent. According to ethical approval, this retrospective study was conducted on biologic samples collected before and after transplantation during the standard follow-up (at Months 1, 3, 6, 9, and 12 after transplantation). No specific or supplementary material was collected for the study.

Patients received unmanipulated HSCT and were selected on the basis of 1) HLA compatibility (either with a HLA identical sibling or with a 10/10 high-resolution

typing HLA matched unrelated donor), 2) availability of sufficient biologic samples, 3) full chimerism obtained after transplantation and at the time of assays, or 4) survival of patient at least 3 months after graft. Characteristics of patients, conditioning regimen, and clinical data about GVHD and relapse are listed in Table 1.

The median follow-up of patients included in the study is 24 months. Posttransplantation chimerism was assessed by real-time quantitative polymerase chain reaction or short-tandem-repeats standard analysis for all recipients. PBMNCs were separated by density gradients using lymphocyte separation medium (Eurobio, Les Ulis, France) and cryopreserved in liquid nitrogen, until use. Acute GVHD (aGVHD) was graded according to the standard criteria.¹² Of note, scientific investigations reported in this work were completely independent and blinded from clinical data and follow-up (GVHD occurrence, grade, and relapse).

mH antigen typing

Genomic DNA was extracted from blood and mH antigen genomic typing performed with an mH antigen typing kit (Dynal AllSet+, Invitrogen, Carlsbad, CA) developed for the 14th International and HLA Immunogenetics Workshop (Melbourne, 2005). This typing tray is based on polymerase chain reaction–sequence-specific primer method and has been described elsewhere.¹¹ The tray comprised 10 autosomally encoded molecularly identified mH antigens: HA-1, HA-2, HA-3, HA-8, HB-1, ACC-1, ACC-2, UGT2B17, and two recently published mH antigens SP110⁷ and PANE1⁸ as well as 10 Y chromosome–encoded antigens H-Y.¹

Cytofluorometric analysis

Cells were stained using fluorescein isothiocyanate-, phycoerythrin (PE)-, PC5- or PC7-, and allophycocyanin-conjugated and affinity-purified mouse MoAbs. Data were analyzed using a flow cytometer and its accompanying software (FACScan and CellQuest-Pro, respectively, BD, Erembodegem-Aalst, Belgium). The following MoAbs were purchased from Beckman Coulter (Marseille, France): anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, and isotypic control IgG₁. IgG_{2a} isotypic control was purchased from BD.

The number of CD8+ T cells expressing the specific TCR for HLA-mH peptide complexes was measured by staining the cells with “dextramers,” PE-conjugated HLA-peptide multimeric complexes engineered by Dako (Glostrup, Denmark). Briefly, 3×10^6 to 10×10^6 PBMNCs were surface labeled with the appropriate dilution of the dextramer according to the manufacturer's recommendations. PBMNCs were then incubated at 4°C in phosphate-buffered saline with 2% human AB serum for

TABLE 1. Patients, graft characteristics, and mH mismatches

UPN	Sex (R/D)	Age, years (R/D)*	Source	Diagnosis	Donor type	HLA-DP mismatch†	Conditioning regimen	Type of conditioning	GVHD prophylaxis
1	F/F	60/57	PBSC	Myeloma	HLA-id		flu bu ATG	RIC	CSA + MMF
2	M/F	51/48	PBSC	MDS	HLA-id		flu bu ATG	RIC	CSA + MMF
3	M/F	45/42	PBSC	Myeloma	HLA-id		TBI Mel	SM	CSA + MMF
4	M/M	23/31	BM	Hodgkin	10/10 MUD	No	TBI Cy cpth	SM	CSA + MMF
5	M/M	38/45	PBSC	Follicular NHL	HLA-id		flu TBI ATG	RIC	CSA + MMF
6	F/M	35/43	BM	ALL	10/10 MUD	DP*0201	TBI Cy	SM	CSA + MMF
7	M/F	37/37	PBSC	CML	HLA-id		TBI Cy ATG	SM	CSA + MMF
8	M/M	40/50	BM	ALL	HLA-id		TBI Cy	SM	CSA + MTX
9	M/M	52/43	PBSC	Lymphoma	HLA-id		flu bu ATG	RIC	CSA + MMF
10	M/F	34/41	PBSC	Hodgkin's	HLA-id		TBI Cy	SM	CSA + MMF
11	M/F	42/45	BM	CML	HLA-id		TBI Cy	SM	CSA + MTX
12	M/F	41/44	PBSC	Myeloma	HLA-id		TBI Mel	SM	CSA + MMF
13	M/F	58/54	PBSC	AML	HLA-id		flu Mel	RIC	CSA + MMF
14	M/F	34/38	BM	Pre-B-ALL	HLA-id		TBI Cy	SM	CSA + MTX
15	M/F	22/38	BM	B-ALL	10/10 MUD	DP*0201	TBI Cy ATG	SM	CSA + MTX
16	M/F	17/21	PBSC	AML	10/10 MUD	no	flu Ida Ara Cth	RIC	CSA + MMF
17	M/F	60/56	PBSC	CML	HLA-id		flu bu ATG	RIC	CSA + MMF
18	M/F	50/39	PBSC	Myeloma	HLA-id		flu bu ATG	RIC	CSA
19	F/M	49/NA	BM	Biphenotypic leukemia	10/10 MUD	DP*0201	Bu Cy	SM	CSA + MMF
20	M/M	46/50	PBSC	AML	HLA-id		Bu Cy	SM	CSA + MMF
21	M/F	47/50	PBSC	B Lymphoma	HLA-id		flu bu ATG	RIC	CSA + MMF
22	M/F	22/27	PBSC	ALL	HLA-id		TBI Cy	SM	CSA + MMF
23	F/M	55/42	BM	Pre-B-ALL	HLA-id		TBI Cy	SM	CSA + MTX
24	M/M	28/NA	BM	CML	12/12 MUD		TBI Cy ATG	SM	CSA + MMF

* Age is indicated at the time of transplantation.

† HLA-DP mismatch is indicated only in the GVH direction.

UPN = unique patient number; R = recipient; D = donor; BM = bone marrow; PBSC = peripheral blood stem cell; NA = not available; HLA-id = HLA-genotypical siblings; MUD 10/10 = matched unrelated donor for at least HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ; NHL = non-Hodgkin's lymphoma; MDS = myelodysplasia; CML = chronic myelogenous leukemia; AML = acute myelogenous leukemia; ALL = acute lymphocytic leukemia; TBI = total body irradiation; flu = fludarabine; bu = busulfan; ATG = antithymocyte globulin; cpth = campath; Cy = cyclophosphamide; Mel = melphalan; Ida = idarabycin; RIC = reduced intensity conditioning; SM = standard myeloablative.

15 minutes and followed by anti-CD3, anti-CD8 fluorescent-labeled antibodies for 15 minutes. Lymphocytes were gated according to forward/side scatter profiles and CD3+CD8^{high} cells were selected for frequency analysis. The protocol was optimized and verified using HLA-A*0201+ samples from CMV-seropositive and HIV-seronegative persons as positive and negative controls, respectively. Next HLA-A*0201+ patients mH responses were systematically compared to these controls. In the case of HLA-A*0201- responses, positivity was clearly established for a high responding sample (high frequency) harvested after graft and used as characteristic positive staining reference. Negative staining of donor PBMNCs was also used as control. Positivity was considered for frequency above 0.01% from a minimum 1×10^5 CD3 + CD8^{high} cells. Of note, dextramer analysis was compared to classical tetramer product (Beckman Coulter) and gave similar reproducible results.

ELISpot IFN- γ

Ninety-six-well polyvinylidene difluoride plates (Millipore, Molsheim, France) were hydrated by 1-minute treatment with 35% ethanol and then coated with 100 μ L of capture anti-human IFN- γ MoAb and incubated overnight

at 4°C according to the manufacturer's recommendations (Diacclone, Besançon, France). The plates were then saturated with 10% RPMI human AB serum medium and incubated for 1 hour at 37°C in 5% CO₂. After being washed, 2.5×10^5 responding PBMNCs per well were added to duplicate wells in 10% RPMI human AB serum medium. They were stimulated with 2.5×10^5 30-Gy irradiated PBMNCs or with 4 μ mol/L synthesized peptide epitopes (Eurogentec, Villepinte, France; Table 2). Cells incubated with medium alone or phytohemagglutinin (200 ng/mL) were used as negative and positive controls, respectively. The quality of recipient antigen-presenting cells was checked by representation values of MNCs similar to donors attested by CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, and CD56 frequencies. Samples were collected offset from medical interventions and at the time of complete remission for recipient PBMNCs harvested before graft. The 200 μ L/well final volumes were incubated for 20 hours at 37°C in 5% CO₂. At the end of incubation, cells were washed and the second biotinylated anti-IFN- γ MoAb (Diacclone) was added to the plate for 90 minutes at 37°C, followed by incubation with streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (Diacclone) for 1 hour at 37°C. Spots were revealed by a nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate toluidine mix (Diacclone).

TABLE 2. mH peptide and HLA restriction

	Antigen	HLA-restriction molecule	Peptide	Reference
mH	HY:SMCY	HLA-A*0201	FIDSYICQV	Meadows et al. ²⁵
	HY:SMCY	HLA-B*0702	SPSVDKARAEI	Wang et al. ²³
	HY:DFFRY	HLA-A*0101	IVDCLTEMY	Pierce et al. ²⁶ ; Vogt et al. ²⁷
	HY:UTY	HLA-B*08	LPHNHTDL	Riddell et al. ²⁸
	HY:DDX3Y	HLA-DQB1*0501/0502	HIENFSDIDMGE	Vogt et al. ²⁹
	HA-8	HLA-A*0201	RTLDKVLEV	Brickner et al. ³⁰
Control pp65 CMV	RT HIV-1	HLA-A*0201	ILKEPVHGV	Walker et al. ³¹
	HLA-A*0201	NLVPMVATV	McLaughlin-Taylor et al. ³²	

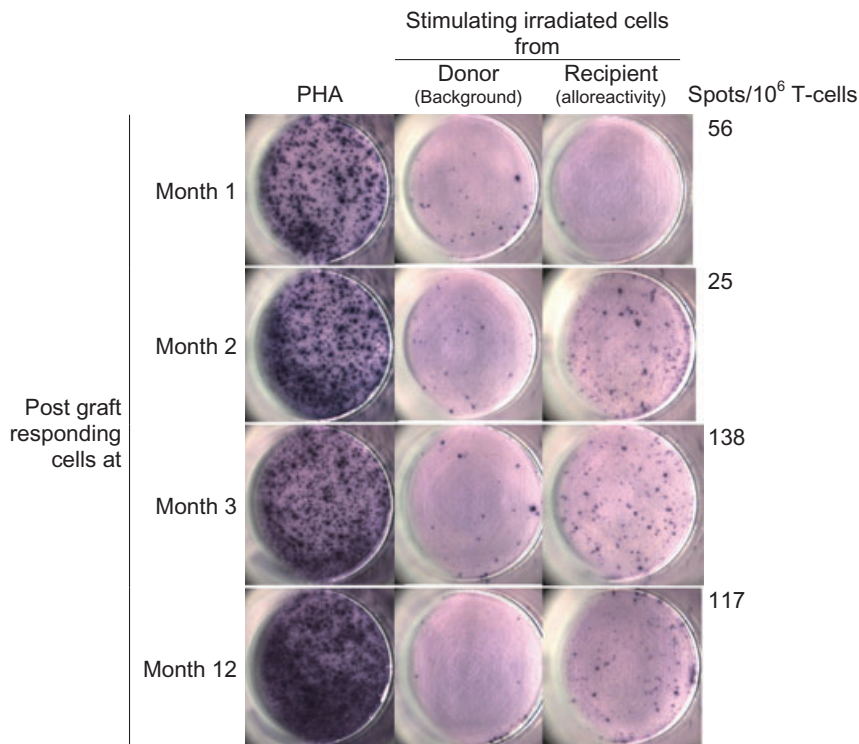


Fig. 1. Detection of mH antigen alloreactivity by ELISpot IFN- γ after HSCT. Alloreactivity of donor versus recipient was measured by ELISpot IFN- γ after graft. Responding PBMCs from recipient after graft were stimulated by phytohemagglutinin, and by PBMCs collected before HSCT, from donor or recipient. Pictures were produced from ELISpot IFN- γ wells of Patient 21.

Color development was stopped by washing under running water. After being dried at room temperature, spots were counted using an automated ELISpot reader (BioReader 4000-ProX, Bio-Sys GmbH, Karben, Germany).

A response was considered positive if the number of spots in the wells stimulated with peptides was 1.5 times as many as the number of spot-forming cells in the wells without peptide or autologous stimulating cells and a cutoff of five spots per well above mean background. During hematopoietic recovery, samples with a frequency of CD3+CD8+ or CD3+CD4+ cells below 5% were considered noninterpretable for the study of alloreactivity against mH-specific peptides presented by HLA Class I or Class II, respectively.

Statistical analysis

Comparisons were performed using the Fisher's exact test for categorical variables. In this study, two-tailed p values less than 0.001 are considered highly significant and p values of less than 0.005 are considered significant, whereas two-tailed p values between 0.005 and 0.05 reflect strong trends.

RESULTS

mH antigen alloreactivity correlates strongly with GVHD and/or free of relapse

To set up the mH alloreactivity test, the graft-versus-host reaction was measured in PBMCs from patients during HSCT follow-up. Recipient-irradiated cells obtained before transplantation were used to stimulate IFN- γ production by patient cells (donor origin) and specific T-cell frequency was evaluated in ELISpot assays (Fig. 1). Since donors and recipients were all HLA-genoidentical siblings, fully matched or 10 of 10 unrelated pairs and/or mismatched for the poorly immunogenic/permissive HLA-DP*0201¹³ (Patients 6, 15, and 19), the alloreactivity observed

was considered only attributable to mH antigen mismatches for all patients.

First we analyzed alloreactivity of samples collected at 1 and 3 months posttransplantation (or more frequently if available). A positive result observed at least once was in accordance with clinical aGVHD during the first 3 months. Among patients explored, we observed 65% positive results for mH reactivity from donor versus recipient and likewise an aGVHD incidence of 65% (Table 3 and Fig. 2). Thus, in this cohort of patients there is a strong association between IFN- γ production by allogeneic T cells and the occurrence of aGVHD ($p = 0.0012$). As expected, the absence of aGVHD complication is observed in patients with a negative test (Table 3).

TABLE 3. Alloreactivity of donor versus recipient and mH peptides*

UPN	aGVHD	cGVHD	Relapse	mH mismatch	Donor vs. recipient		Donor vs. mH peptide			
					ELISpot		ELISpot		Dextramers	
					≤3 months	>3 months	≤3 months	>3 months	≤3 months	>3 months
1	IV	+		Not known	+	+				
2	II	+		HY ^A *0201	+	+	+	+		
3	II	+		HY ^B *08	+	+	+	+		
4	O/I	-		Not known	-	-				
5	II	+		Not known	+	+				
6	III	+		Not known	+	+				
7	O/I	+		HY ^A *0201	-	+	-	-		
8	II	+		Not known	+	-				
9	O/I	-	+	Not known	+	-				
10	IV	-		HY ^A *0201 HY ^{DOB1} *0501	+	-	+	HY ^A *0201	+	HY ^A *0201
11	O/I	+	+	HY ^A *0201	-	-	-	-	+	HY ^B *0702
12	IV	+		HY ^A *0201 HY ^B *0702 HY ^{DOB1} *0502	NA	NA			+	HY ^B *0702
13	O/I	-	+	HY ^A *0101	-	-	+	HY ^A *0201	-	-
14	II	+		HY ^A *0201 HY ^{DOB1} *0502	+	+	+	HY ^A *0201		
15	II	-	+	HY ^A *0201	NI	-	-	-		
16	II	+		HY ^A *0201 HY ^B *0702	+	+	+	+	HY ^B *0702	+
17	II	+		HY ^A *0101 HY ^A *0201 HY ^{DOB1} *0501	NA	NA	+	+	HY ^A *0101	+
18	O/I	+	+	HY ^A *0201 HY ^{DOB1} *0501	-	-	-	-	-	-
19	O/I	+	+	Not known	-	+				
20	II	+		Not known	-	+				
21	II	+		HY ^A *0201 HY ^{DOB1} *0502	+	+	-	-	-	+
22	II	+		HY ^A *0101	+	+	-	-	+	+
23	II	+		Not known	+	+	+	+		
24	IV	+		HA-8 ^A *0201	NA	NA	+	+		

* Alloreactivity of donor versus recipient or versus specific mH peptide alone was measured by ELISpot IFN- γ . Alloreactivity of donor-versus-recipient peptide was also measured by dextramers. Results are indicated during the first 3 months (≤3 months) and after the third month (>3 months). aGVHD is considered positive if Grade II to IV.
+ = positive result observed at least once during these phases; NA = not available; NI = not interpretable.

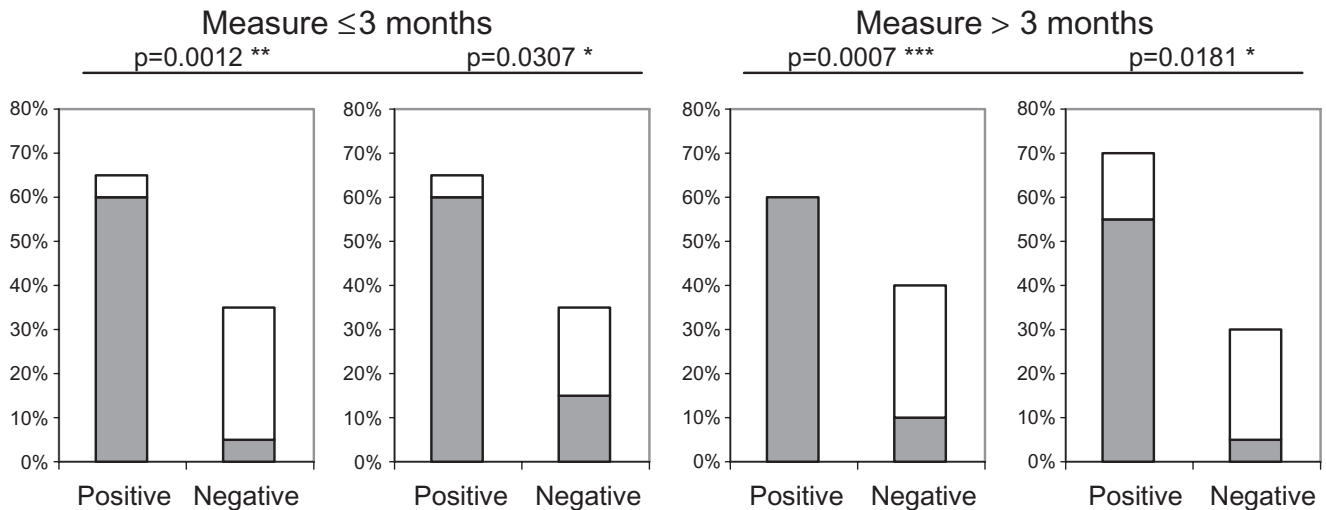


Fig. 2. Post-HSCT alloreactivity measured by ELISpot IFN- γ . Percentages of positive or negative ELISpot IFN- γ results observed during the first 3 months (≤ 3 months) and next to the first 3 months (> 3 months). aGVHD is considered positive if Grade II or more. (□) No aGVHD; (■) aGVHD.

Overall, the positive predictive value of mH alloreactivity detected during the first 3 months posttransplantation by ELISpot IFN- γ assay for aGVHD occurrence was more than 92%.

To establish a correlation between alloreactivity and GVL we compared the alloreactivity during the first 3 months after HSCT and GVL effect as indicated by the absence of relapse. A concordant observation of alloreactivity measured and GVL or in contrast the absence of alloreactivity measured and relapse represented 92.3% of cases (Table 3). Therefore, alloreactivity as measured by ELISpot IFN- γ assay strongly correlated with the absence of relapse ($p = 0.0307$; Table 3 and Fig. 2).

We next analyzed if alloreactivity detection beyond 3 month after HSCT would be predictive of chronic GVHD (cGVHD) occurrence. In this cohort of patients, 70% underwent cGVHD and 60% were tested positive (Table 3). ELISpot IFN- γ assay from graft versus host during this period were highly associated with the subsequent development of cGVHD ($p = 0.0007$; Fig. 2). Graft-versus-host alloreactivity measured after 3 months posttransplantation was predictive of GVL effect observed as absence of relapse ($p = 0.0181$). It was predictive in 91.7% of cases (Table 3 and Fig. 2).

Interestingly all patients detected as positive with our test were also diagnosed with cGVHD. Hence we have not observed false positives measured beyond 3 months, which means that the positive predictive value of ELISpot IFN- γ assay observed in this group (100%) is very encouraging. We can conclude that ELISpot IFN- γ assay follow-up for graft-versus-host alloreactivity strongly correlates (as expected) with aGVHD and cGVHD but also with absence of relapse even analyzed in the long term after HSCT.

The detection of functional single mH-specific T cells after HSCT strongly predicts GVHD occurrence but not GVL effect

Total mH alloreaction analysis allows the monitoring of the patient's status but requires the availability of samples from donor and from recipient harvested and frozen before graft at the time of complete remission. Since 20 mH ubiquitously expressed MHC Class I-restricted antigens were described at the beginning of our study, we refined our test for a specific single mH mismatch. With this aim, ELISpot IFN- γ assays were performed to enumerate T cells responding to mismatched mH synthetic peptides after HSCT.

During the first 3 months after transplantation, 6 of 12 patients (50%) responded positively to a ubiquitous mH peptide mismatch (Table 3) and this result correlates with the clinical observation of aGVHD ($p = 0.0143$; Fig. 3A). In line with this observation, the presence of single mH-specific CD8 $^{+}$ -responding T cells from donors detected by ELISpot IFN- γ is also statistically related to the absence of relapse, herein considered as GVL effect ($p = 0.0455$). Therefore, for this cohort, our test has a positive predictive value of 100% for the occurrence of both aGVHD and an absence of relapse (GVL) during the first 3 months posttransplantation.

In contrast, alloreactivity against a single mH epitope explored 3 months after HSCT is not relevant to cGVHD (Fig. 3A). Indeed cGVHD occurred in 76.9% of cases followed by the assay whereas only 25% were positively responding to the test. In concordance with this observation, no association has been found between GVL and detection of single-peptide mH alloreactivity by the ELISpot IFN- γ assay.

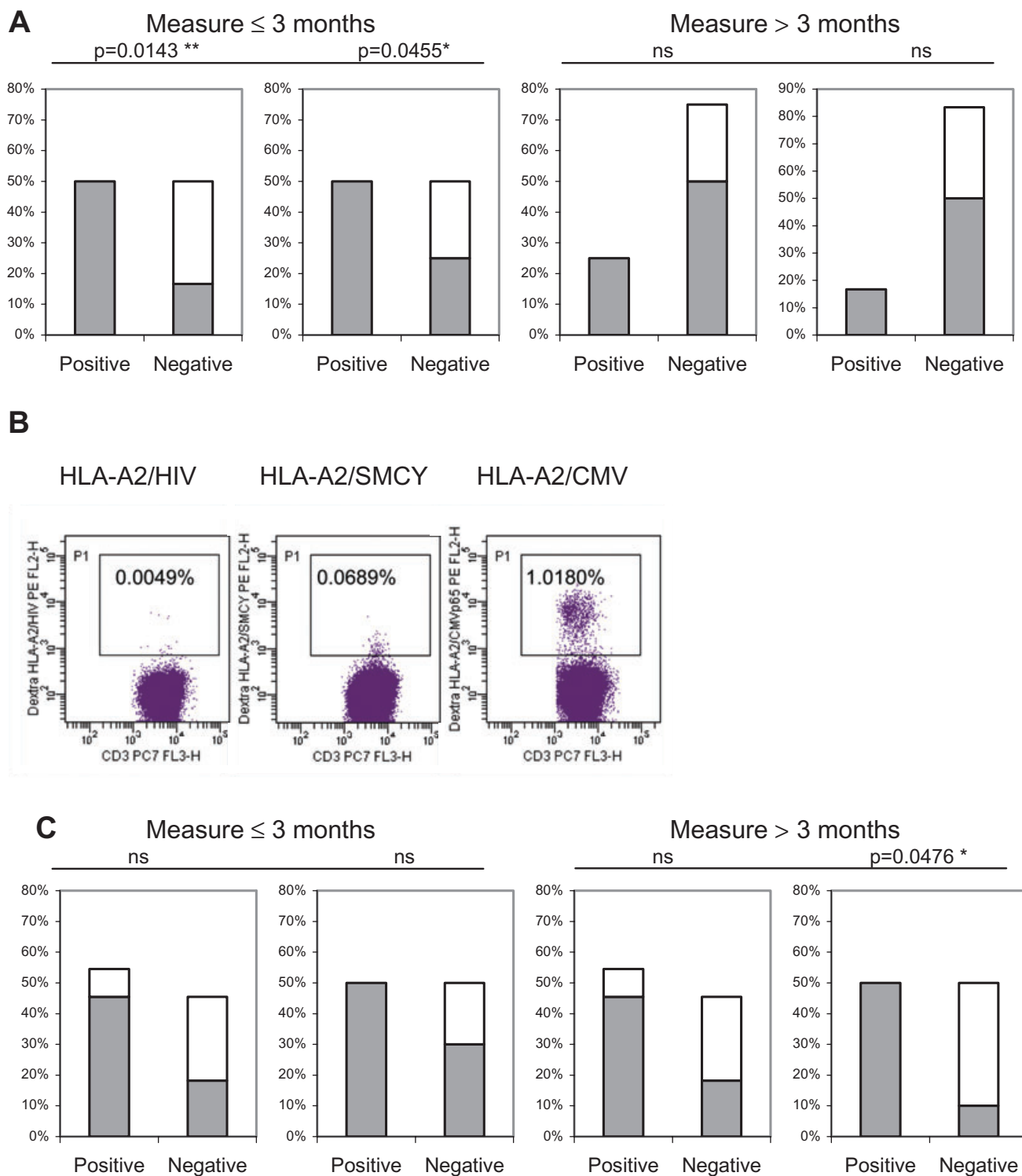


Fig. 3. Donor-versus-recipient mH. (A) Percentages of positive or negative alloreaction observed for donor-versus-recipient mH measured by ELISpot IFN- γ . **(B)** Frequency of dextramers; Patient 16 at 1 month is represented. Background control (HLA-A2/HIV), mH (HLA-A2/SMCY), and positive control (HLA-A2/CMV) are represented. **(C)** Percentages of positive or negative alloreaction observed for donor-versus-recipient mH measured by dextramer. ns = not significant. (□) No aGVHD; (■) aGVHD.

Four patients were studied for their alloreactivity against ubiquitously expressed mH peptide presented by HLA Class II DQB1*0501/0502: no positive response was observed during the first 3 months or beyond (Table 3).

Late detection of mH antigen-specific CD8+ T cells by flow cytometry correlates with GVL effect

Since early detection of allogeneic IFN- γ -producing and mH epitope-specific T cells correlates with aGVHD and absence of relapse, we investigated the predictivity of specific T-cell presence on patients' follow-up regardless of their functionality. This was performed by using peptide-loaded HLA molecule multimers named dextramer by the manufacturer. The advantage of the multimer assay compared to ELISpot is that samples from patients before graft are not necessary. In addition, this test is less time-consuming (few hours vs. 3 days). Specific binding of dextramers was controlled by positive staining of a CMV HLA-A2 dextramer and negative staining HIV HLA-A2 dextramer from PBMNC patients identified, respectively, as seropositive and seronegative (Fig. 3B).

After dextramer staining, specific CD8+ T cells' anti-mH epitopes were observed in 71.4% of patients suffering from aGVHD. However, the presence of mH-specific T cells during the first 3 months after graft did not correlate with aGVHD or with the absence of relapse (Fig. 3C and Table 3). Therefore, the only presence of T cells specific of mH epitopes was not enough to predict aGVHD. This observation opposes the results of the ELISpot IFN- γ assay and should be observed regarding absence of functionality in multimers assays.

The presence of mH-specific T cells 3 months after graft was observed in 5 of 10 patients (50%; Table 3). The presence of these allogeneic T cells was not correlated to cGVHD occurrence. Interestingly, it was linked to GVL effect as defined as the absence of relapse ($p = 0.0476$; Fig. 3C). In support of these results, all relapsing patients from this cohort did not have specific CD8+ T cells against ubiquitously expressed mH antigens next to the first 3 months. In brief, the detection of mH epitope-specific T cells without regard to their functionality is not predictive of the GVHD risk but correlates with the absence of relapse after 3 months.

DISCUSSION

For years, mH antigens have been assumed to play a key role in allogeneic transplantation either in GVHD or in GVL in mice.¹⁴ In humans, the clinical relevance of mH antigens has been much more difficult to establish. The most important feature is the statistical demonstration of reduced risk of relapse in the case of sex mismatch (female donor, male recipient) as has been shown in retrospective series of allogeneic transplantation for leukemia¹⁵⁻¹⁷ and

in addition, a higher risk of GVHD. These statistical data were recently confirmed by a study demonstrating the direct association between mH antigen mismatch, GVHD, and relapse.¹⁸ However, functional data in humans are not frequent. The presence of anti-mH antigen CTLs during aGVHD has been reported.¹⁰ One of the most interesting implications of mH antigen in humans was published by Marijt and colleagues,¹⁹ demonstrating that expansion of anti-mH CTL specific to hematopoietic cells was concomitant to clinical response against leukemia for three patients. This observation was later observed by others²⁰ and finally confirmed on ubiquitously expressed mH.²¹ Hence, alloreactivity of donor-versus-recipient mH can lead to both clinical observations: the risk of GVHD development and the GVL effect related to absence of relapse.

In this study, we chose to explore not only the presence of mH-specific CTL but also their functionality. The study was retrospectively conducted on a panel of patients with the aim to establish direct correlations between functional detection of CTL anti-mH antigens, GVHD, and a lower risk of relapse. We explored the 20 ubiquitous human molecularly identified mH from the first ones described in 1995^{22,23} up to latest published at the beginning of our study.^{7,8} This work establishes that during the first 3 months after transplantation, donor-versus-recipient alloreactivity, that is, global mH mismatches, has a direct relation with aGVHD ($p = 0.0012$) as well as GVL ($p = 0.0307$). This was also observed after the third month associated with cGVHD ($p = 0.0007$) and GVL ($p = 0.0181$). This observation was expected since GVH reactivity observed by the assay should reflect clinical event independently from conditioning or immunomodulation. This study validates the use of ELISpot IFN- γ assay for donor-versus-recipient immune response follow-up.

Since alloreactivity measured the total donor-versus-recipient response, it potentially included CD4+ and CD8+ T-cell responders to mH antigens. Therefore, we analyzed limited responses to specific mH epitopes. Interestingly, we found the functional detection of minor antigen CTL producing IFN- γ in response to mH peptide appeared more relevant to aGVHD ($p = 0.0143$) than direct detection using multimer HLA loaded with specific peptides during the first 3 months. Hence this study showed that the presence of mH T cells is insufficient to monitor the patient's clinical status for aGVHD, maybe because these lymphocytes are not functional. Immunosuppressive drugs used for GVHD prevention could impact functional T-cell responses in a way that they would not be able to produce IFN- γ in response to their mH antigen. Another interesting element is that detection of anti-mH antigen CTL response occurred early after transplantation and appeared more significant in terms of risk of relapse or GVHD when observed in the first 3 months. Moreover, the detection of mH-specific CTL after 3 months was not

associated with cGVHD, although their presence was investigated by functional ELISpot assay or dextramers. This observation is in accordance with the higher implication of CD4+ helper T cells in cGVHD previously reported.²⁴

Very interestingly, the presence of mH dextramer+ T cells after 3 months was associated with GVL effect ($p = 0.0476$). The association of GVL and the presence of mH-specific CTL during the chronic phase is in accordance with a previously published case report.²¹ Analysis of the complete phenotype and functionality of these CD8+ T cells will be very useful in further studies built on larger quantities of PBMCs than were available for this study. We conclude that the follow-up of patients beyond 3 months posttransplantation could be improved by using simple investigations with multimer HLA-peptide.

Peripheral functional anti-mH antigen CTL detection during the first 3 months after transplantation (ubiquitous or non-lineage-specific mH antigens) correlates with a lower risk of relapse and a higher risk of GVHD. Since the mean follow-up was 24 months, this result is in accordance with the hypothesis that the GVL effect of the graft is determined soon after transplantation. Moreover, this study tends to show that current identified mH antigens that are presented by HLA Class I are mainly immunodominant and clinically relevant. Nevertheless, mismatches observed in our group were mainly sex-based since mismatches for known mH are not highly frequent,⁹ so the occurrence of other mH has to be further evaluated. Interestingly, for one case we were able to detect the presence of functional T cells some days before clinical manifestation of GVHD. The reliability of this detection deserves to be investigated further, because this test could be used to analyze or confirm GVHD occurrence before clinical manifestations allowing prophylactic treatment. The use of well-described and used methods for the analysis is important for the transfer from the laboratory to the bed of patients and for technical transfer.

In our cohort of patients, only one mH epitope mismatch among three identified¹ presented by HLA Class II was present and could be analyzed in four patients. No IFN- γ production was observed even though this epitope is suspected to be immunodominant.⁶ The absence of specific T cells for this epitope cannot be excluded, but other hypothesis such as poor CD4+ T cell representation in PBMCs or no IFN- γ production in response to the mH peptide can also be considered. The development of HLA Class II multimers will be very useful to monitor helper T cells in GVHD. Analysis of mH epitopes presented to CD8+ T cells by HLA Class I molecules is easier to investigate using commercially available products. This type of analysis will be more informative than retrospective statistical studies based on DNA typing even though this latter approach permits recruitment of larger cohorts of patients. Indeed functional studies should reflect the

status of the GVHD risk of occurrence and GVL effect. Contrary to cytotoxic or helper T-cell precursor frequency assays, ELISpot or more recently available multimer HLA-peptide tests allow mH peptide-specific T-cell detection and are easier to transfer for routine use. Finally, this study demonstrates that the current knowledge of mH-defined epitopes can be adapted to routinely monitor patient status and may be used for follow-up after HLA-identical HSCT.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M.C. Jacob, MD (CHU Grenoble & EFS, Grenoble, France) for her expert advice on flow cytometry assays, D. Masson, MD (EFS, La Tronche, France) for providing HLA typing, and A. Reinicke (EFS and UJF) for critical review of the manuscript. We thank J.H. Frederik Falkenburg (Leiden University Medical Center, the Netherlands) for providing us the DBY peptide. We would address also a special thanks to Prof Gérard Socié (CHU St Louis, Paris, France) for critical remarks and helpful comments.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare having no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Spierings E, Goulmy E. Expanding the immunotherapeutic potential of minor histocompatibility antigens. *J Clin Invest* 2005;115:3397-400.
2. Bailey DW. Four approaches to estimating number of histocompatibility loci. *Transpl Proc* 1970;2:32-8.
3. Yin L, Poirier G, Neth O, Hsuan JJ, Totty NF, Stauss HJ. Few peptides dominate cytotoxic T lymphocyte responses to single and multiple minor histocompatibility antigens. *Int Immunol* 1993;5:1003-9.
4. Rufer N, Wolpert E, Helg C, Tiercy JM, Gratwohl A, Chapuis B, Jeannet M, Goulmy E, Roosnek E. HA-1 and the SMCY-derived peptide FIDSYICQV (H-Y) are immunodominant minor histocompatibility antigens after bone marrow transplantation. *Transplantation* 1998;66:910-6.
5. van Els CA, D'Amaro J, Pool J, Blokland E, Bakker A, van Elsen PJ, van Rood JJ, Goulmy E. Immunogenetics of human minor histocompatibility antigens: their polymorphism and immunodominance. *Immunogenetics* 1992;35: 161-5.
6. Laurin D, Spierings E, van der Veken LT, Hamrouni A, Falkenburg JH, Souillet G, Vermeulen C, Farre A, Galambrun C, Rigal D, Bertrand Y, Goulmy E, Eljaafari A. Minor histocompatibility antigen DDX3Y induces HLA-DQ5-restricted T cell responses with limited TCR-Vbeta usage both in vivo and in vitro. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:1114-24.

7. Warren EH, Vigneron NJ, Gavin MA, Coulie PG, Stroobant V, Dalet A, Tykodi SS, Xuereb SM, Mito JK, Riddell SR, Van den Eynde BJ. An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order. *Science* 2006;313:1444-7.
8. Brickner AG, Evans AM, Mito JK, Xuereb SM, Feng X, Nishida T, Fairfull L, Ferrell RE, Foon KA, Hunt DF, Shabanowitz J, Engelhard VH, Riddell SR, Warren EH. The PANE1 gene encodes a novel human minor histocompatibility antigen that is selectively expressed in B-lymphoid cells and B-CLL. *Blood* 2006;107:3779-86.
9. Spierings E, Hendriks M, Absi L, Canossi A, Chhaya S, Crowley J, Dolstra H, Eliaou JF, Ellis T, Enczmann J, Fasano ME, Gervais T, Gorodezky C, Kircher B, Laurin D, Leffell MS, Loiseau P, Malkki M, Markiewicz M, Martinetti M, Maruya E, Mehra N, Oguz F, Oudshoorn M, Pereira N, Rani R, Sergeant R, Thomson J, Tran TH, Turpeinen H, Yang KL, Zunec R, Carrington M, de Knijff P, Goulmy E. Phenotype frequencies of autosomal minor histocompatibility antigens display significant differences among populations. *PLoS Genet* 2007;3:e103.
10. Mutis T, Gillespie G, Schrama E, Falkenburg JH, Moss P, Goulmy E. Tetrameric HLA class I-minor histocompatibility antigen peptide complexes demonstrate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease. *Nat Med* 1999;5:839-42.
11. Spierings E, Drabbe J, Hendriks M, Pool J, Spruyt-Gerrits M, Claas F, Goulmy E. A uniform genomic minor histocompatibility antigen typing methodology and database designed to facilitate clinical applications. *PLoS ONE* 2006;1:e42.
12. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18:295-304.
13. Zino E, Frumento G, Marktel S, Sormani MP, Ficari F, Di Terlizzi S, Parodi AM, Sergeant R, Martinetti M, Bontadini A, Bonifazi F, Lisini D, Mazzi B, Rossini S, Servida P, Ciceri F, Bonini C, Lanino E, Bandini G, Locatelli F, Apperley J, Bacigalupo A, Ferrara GB, Bordignon C, Fleischhauer K. A T-cell epitope encoded by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissive mismatches for hematologic stem cell transplantation. *Blood* 2004;103:1417-24.
14. Roopenian D, Choi EY, Brown A. The immunogenomics of minor histocompatibility antigens. *Immunol Rev* 2002;190:86-94.
15. Nash RA, Pepe MS, Storb R, Longton G, Pettinger M, Anasetti C, Appelbaum FR, Deeg HJ, Doney K, Martin PJ, Sullivan KJ, Sanders J, Witherspoon RP. Acute graft versus host disease: analysis of risk factors after allogeneic marrow transplantation and prophylaxis with cyclosporine and methotrexate. *Blood* 1992;80:1838-45.
16. Zecca M, Prete A, Rondelli R, Lanino E, Balduzzi A, Messina C, Fagioli F, Porta F, Favre C, Pession A, Locatelli F; AIEOP-BMT Group, Italian Association for Pediatric Hematology and Oncology-Bone Marrow Transplant. Chronic graft-versus-host disease in children: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Blood* 2002;100:1192-200.
17. Atkinson K, Horowitz MM, Gale RP, van Bekkum DW, Gluckman E, Good RA, Jacobsen N, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdén O, Rozman C, Sobocinski KA, Zwaan FE, Bortin MM. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:2459-64.
18. Randolph SS, Gooley TA, Warren EH, Appelbaum FR, Riddell SR. Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 2004;103:347-52.
19. Marijt WA, Heemskerk MH, Kloosterboer FM, Goulmy E, Kester MG, van der Hoorn MA, van Luxemburg-Heys SA, Hoogeboom M, Mutis T, Drijfhout JW, van Rood JJ, Willemze R, Falkenburg JH. Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2742-7.
20. de Rijke B, van Horssen-Zoetbrood A, Beekman JM, Otterud B, Maas F, Woestenenk R, Kester M, Leppert M, Schattenberg AV, de Witte T, van de Wiel-van Kemenade E, Dolstra H. A frameshift polymorphism in P2X5 elicits an allogeneic cytotoxic T lymphocyte response associated with remission of chronic myeloid leukemia. *J Clin Invest* 2005;115:3506-16.
21. Takami A, Sugimori C, Feng X, Yachie A, Kondo Y, Nishimura R, Kuzushima K, Kotani T, Asakura H, Shiobara S, Nakao S. Expansion and activation of minor histocompatibility antigen HY-specific T cells associated with graft-versus-leukemia response. *Bone Marrow Transplant* 2004;34:703-9.
22. den Haan JM, Sherman NE, Blokland E, Huczko E, Koning F, Drijfhout JW, Skipper J, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, et al. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 1995;268:1476-80.
23. Wang W, Meadows LR, den Haan JM, Sherman NE, Chen Y, Blokland E, Shabanowitz J, Agulnik AI, Hendrickson RC, Bishop CE, et al. Human H-Y: a male-specific histocompatibility antigen derived from the SMCY protein. *Science* 1995;269:1588-90.
24. Yamashita K, Choi U, Woltz PC, Foster SF, Sneller MC, Hakim FT, Fowler DH, Bishop MR, Pavletic SZ, Tamari M, Castro K, Barrett AJ, Childs RW, Illei GG, Leitman SF, Malech HL, Horwitz ME. Severe chronic graft-versus-host disease is characterized by a preponderance of CD4(+) effector memory cells relative to central memory cells. *Blood* 2004;103:3986-8.

25. Meadows L, Wang W, den Haan JM, Blokland E, Reinhardus C, Drijfhout JW, Shabanowitz J, Pierce R, Aulnik AI, Bishop CE, Hunt DF, Goulmy E, Engelhard VH. The HLA-A*0201-restricted H-Y antigen contains a posttranslationally modified cysteine that significantly affects T cell recognition. *Immunity* 1997;6:273-81.
26. Pierce RA, Field ED, den Haan JM, Caldwell JA, White FM, Marto JA, Wang W, Frost LM, Blokland E, Reinhardus C, Shabanowitz J, Hunt DF, Goulmy E, Engelhard VH. Cutting edge: the HLA-A*0101-restricted HY minor histocompatibility antigen originates from DFFRY and contains a cysteinylated cysteine residue as identified by a novel mass spectrometric technique. *J Immunol* 1999;163:6360-4.
27. Vogt MH, de Paus RA, Voogt PJ, Willemze R, Falkenburg JH. DFFRY codes for a new human male-specific minor transplantation antigen involved in bone marrow graft rejection. *Blood* 2000;95:1100-5.
28. Riddell SR, Murata M, Bryant S, Warren EH. Minor histocompatibility antigens—targets of graft versus leukemia responses. *Int J Hematol* 2002;76(Suppl 2):155-61.
29. Vogt MH, van den Muijsenberg JW, Goulmy E, Spierings E, Kluck P, Kester MG, Van Soest RA, Drijfhout JW, Willemze R, Falkenburg JH. The DBY gene codes for an HLA-DQ5-restricted human male-specific minor histocompatibility antigen involved in graft-versus-host disease. *Blood* 2002;99:3027-32.
30. Brickner AG, Warren EH, Caldwell JA, Akatsuka Y, Golovina TN, Zarling AL, Shabanowitz J, Eisenlohr LC, Hunt DF, Engelhard VH, Riddell SR. The immunogenicity of a new human minor histocompatibility antigen results from differential antigen processing. *J Exp Med* 2001;193:195-206.
31. Walker BD, Flexner C, Birch-Limberger K, Fisher L, Paradis TJ, Aldovini A, Young R, Moss B, Schooley RT. Long-term culture and fine specificity of human cytotoxic T-lymphocyte clones reactive with human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:9514-8.
32. McLaughlin-Taylor E, Pande H, Forman SJ, Tanamachi B, Li CR, Zaia JA, Greenberg PD, Riddell SR. Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol* 1994;43:103-10. 

D. Perspectives

Nos résultats complémentaires suggèrent que les LT « pathogènes » activent le système immunitaire, et les observations en clinique indiquent que la présence des LT « pathogènes » dans l'échantillon traité corrèle positivement à l'efficacité clinique de la PCE (93, 226). Ces 2 éléments constituent un rationnel sur lequel nous nous basons pour proposer des perspectives de traitements allégés en médecine personnalisée.

Si la dose de LT « pathogènes » traités est bien déterminante pour l'efficacité clinique de la PCE, nous pourrions proposer un protocole de PCE simplifié et personnalisé, comme suit :

- 1- Prélever à la première séance de PCE les PBMC du patient par aphaérèse
- 2- Amplifier ex vivo les LT alloréactifs en grande quantité
- 3- Fractionner en « doses injectables » les LT alloréactifs amplifiés et les congeler.
- 4- A chaque séance de PCE : décongeler une dose de LT alloréactifs, les traiter et les injecter au patient.

Le détail du protocole est résumé dans la **Figure R14** ci dessous.

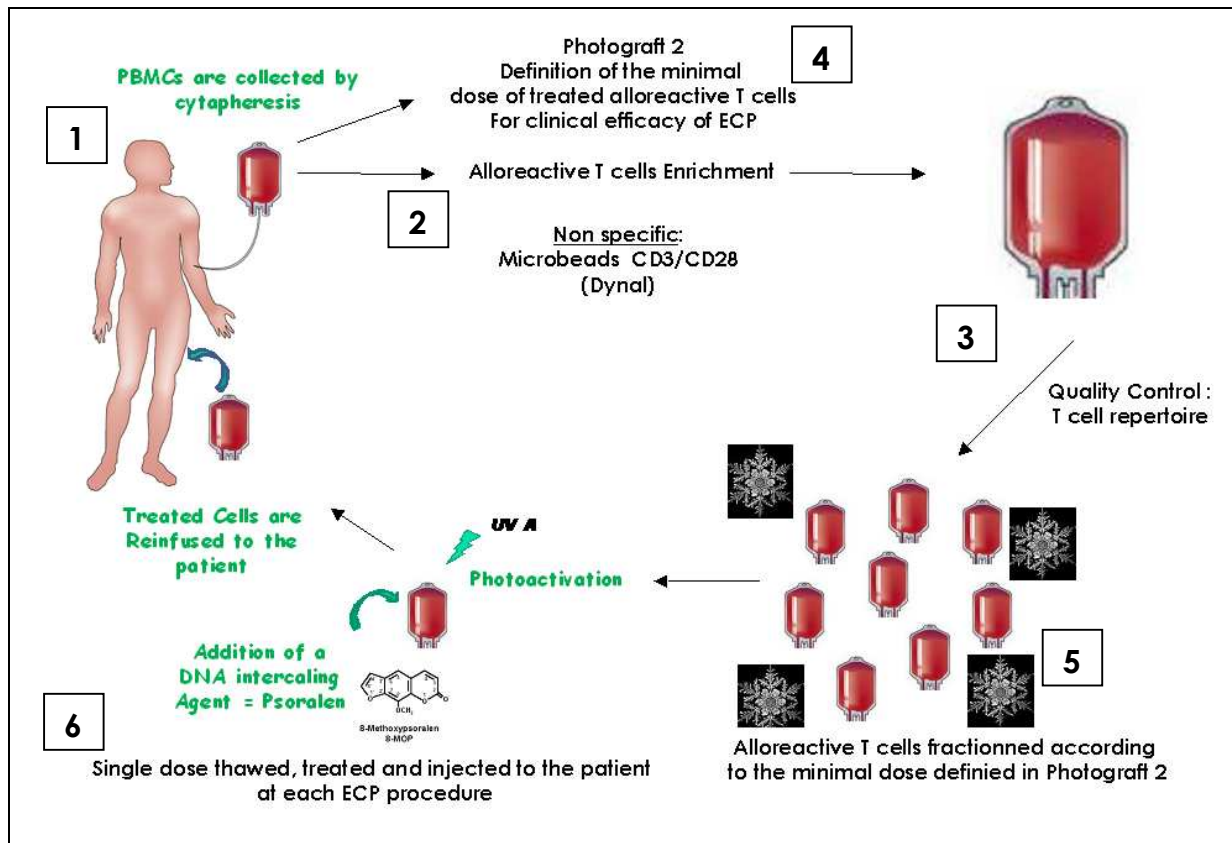


Figure R14 :

Protocole personnalisé de PCE. (1) Les PBMcs sont collectées par aphérèse « classique » (2) les LT alloréactifs seront amplifiés en condition GMP à l'aide du système Dynabeads ClinExVivo CD3/CD28 » proposé par Invitrogen. (3) Le répertoire T sera évalué et comparé avant et après amplification afin de s'assurer que l'on réinjecte après amplification un produit de PCE équivalent à l'échantillon initialement prélevé. (4) la dose de cellules T alloréactives traitées nécessaire à l'efficacité thérapeutique aura été évaluée au cours du protocole clinique photograft 2. (5) Les doses seront préparées et cryopréservées de la même manière que le protocole Photograft 2. (6) réinjection au patient d'une dose de cellules amplifiées, décongelées et traitées. L'utilisation de cellules cryopréservées avant le traitement PCE aura été validée par le protocole Photograft 2.

Notre travail sur les mécanismes d'action de la PCE nous permet de proposer l'élaboration d'un produit de thérapie cellulaire standardisé, enrichi en LT alloréactifs, pour le traitement de la GvHD par PCE. Ainsi, si nos hypothèses sur les mécanismes d'action de la PCE s'avèrent correctes i.e l'induction d'une réponse anti-clonotypique, ce protocole permettra un traitement par PCE moins lourd, avec très peu d'aphérèses, et optimisé car le produit de thérapie cellulaire sera standardisé et enrichi en LT alloréactifs, ce qui devrait faciliter l'induction d'une réponse anti-clonotypique.

E. Annexe 1 : Résumé du PHRC Photograft 2

Titre : Utilisation de cellules mononucléées autologues cryoconservées pour l'immunomodulation par la photochimiothérapie extracorporelle :

Application au traitement de la maladie du greffon contre l'hôte

Coordinateur et investigateur principal:

Dr Etienne Merlin - Unité Bioclinique de Thérapie Cellulaire

Hôtel-Dieu 11 Bd Léon Malfreyt 63 000 Clermont-Ferrand

Tel: 04-73-75-00-09 / Fax: 04-73-75-00-04

Email: e_merlin@chu-clermontferrand.fr

Promoteur:

CHU de Clermont-Ferrand

58, rue Montalembert 63 000 Clermont-Ferrand

Investigateurs associés :

Dr Joël Plumas ; Pr Mauricette Michallet ; Dr Jérôme Cornillon ; Dr Valérie Mialou ; Pr Dominique Plantaz ; Pr Jean-Louis Stéphan .

RESUME

Caractéristiques du projet : Etude multicentrique prospective de phase II à un seul bras.

Objectif principal : Déterminer si les cellules mononucléées autologues cryoconservées gardent une activité d'immunomodulation lorsqu'elles sont traitées par photochimiothérapie extracorporelle (PCE), dans le but de valider la technique de PCE avec cellules cryoconservées (technique de cryo-PCE).

Objectifs secondaires :

- Déterminer la quantité de cellules T alloréactives contenues dans le produit cellulaire ; évaluer la corrélation avec la réponse clinique.
- Déterminer la tolérance de réinjections successives de produits cellulaires lavés contenant des traces résiduelles d'agent cryoprotecteur (diméthylsulfoxyde ou DMSO)

Population étudiée et durée de l'étude : patients adultes et enfants souffrant d'une GVH aiguë pour laquelle a été posée l'indication de la PCE (GVH réfractaire ou intolérance aux immunosuppresseurs ou processus évolutif imposant la diminution de l'immunosuppression). Durée d'inclusion : 2 ans. Nombre d'inclusions attendues : 11.

Critère d'évaluation principal : pourcentage de patients répondeurs à la PCE après un moins de traitement, incluant : réponses complètes (disparition de tous les signes de GVH), réponses partielles (amélioration de l'atteinte d'un organe, stabilité des autres atteintes), réponses dissociées (amélioration d'un

organe, aggravation des autres), et diminution d'au moins 50% de la corticothérapie sans aggravation de la GVH.

Rationnel : La PCE est un traitement immunomodulateur dont l'efficacité est bien reconnue, dépourvu d'effets secondaires sévères, et qui a l'avantage notable de ne pas induire d'immunosuppression généralisée. Malgré ces avantages, elle est peu utilisée en particulier à cause de la lourdeur et de la difficulté de la répétition des prélèvements de cellules mononucléées (CMN) par aphérèse. L'utilisation de la cryo-PCE (PCE appliquée aux cellules mononucléées cryoconservées) permettrait de diviser par trois le nombre d'aphérèses nécessaires, tout en maintenant le rythme des réinjections, sans diminuer significativement la quantité de cellules traitées (puisque l'espacement des aphérèses permet d'augmenter la quantité unitaire de cellules traitées). Dans un modèle d'alloréactivité *in vitro*, nous avons montré que l'étape de cryoconservation des CMN avant la PCE n'altérerait pas leurs propriétés d'immunomodulation (soumis à *Cytotherapy*). Ce protocole a pour but d'évaluer l'efficacité clinique d'un traitement par PCE intégrant une étape de cryoconservation (cryo-PCE). Le traitement de la GVH aiguë est la situation qui se prête le mieux à cette évaluation pour les raisons suivantes :

- l'efficacité de la PCE conventionnelle est bien reconnue dans cette indication
- le taux de réponse à la PCE est d'au moins 50%
- la réponse clinique est observée rapidement (dans les 4 à 6 semaines après le début du traitement)
- l'évolution spontanée de la maladie est exceptionnellement favorable
- les critères d'évaluation cliniques sont bien standardisés

Expérience locale : la PCE est une thématique phare du CHU de Clermont-Fd, tant en pédiatrie (plus grande série française publiée [Kanold & Merlin

2007]) qu'en médecine adulte (en particulier en dermatologie [D'Incan]). En 2009, nous avons ouvert un protocole prospectif multicentrique de traitement par PCE de la GVH aiguë chez l'enfant et l'adulte jeune (étude *Photograft 1*). L'expérience de la PCE nous a conduits à étudier *in vitro* l'effet de la congélation sur l'effet immunomodulateur des cellules traitées, dans le but d'évaluer la possibilité du transfert de cette technique à l'usage clinique. Depuis 2009, la collaboration avec l'équipe de Grenoble nous a permis d'envisager l'étude biologique présentée dans ce protocole pour utiliser une technique validée de mesure de l'alloréactivité.

Lieu de l'étude et centres participants : Centre Régional de Cancérologie et Thérapie Cellulaire Pédiatrique –(CIC-INSERM 501). Etude biologique : INSERM U 823, EFS Rhône Alpes (site de La Tronche, Grenoble). Centres participants : CHU Clermont-Fd, Institut Cancérologique de la Loire (St-Etienne), Hôpital Edouard Herriot et Institut d'Hématologie et Oncologie Pédiatrique (IHOP, Lyon), CHU de Grenoble.

Critères d'inclusion :

GVH aiguë post-allogreffe ou post-DLI et :

réfractaire - aux corticostéroïdes à une dose supérieure ou égale à 2 mg/kg/j (progression après au moins 2 jours ou absence de réponse d'au moins un grade ou réponse dissociée après 4 jours de corticothérapie) - ou à un traitement de deuxième ligne administré pendant au moins 8 jours (absence de réponse d'au moins un grade ou réponse dissociée).

Ou intolérance aux immunosuppresseurs

Ou corticodépendance (réactivation de la GVH lors de la diminution de la corticothérapie)

Ou processus infectieux ou néoplasique imposant la diminution rapide de l'immunosuppression

Documentation histologique pour au moins un organe.

Affiliation à un régime de sécurité sociale.

Consentement du patient et/ou de ses représentants légaux.

Critères de non-inclusion : Etat clinique ou biologique contre-indiquant la réalisation des cytophérèses. Traitement antérieur par sérum anti-lymphocytaire (à l'exception du conditionnement de la greffe). Absence de consentement.

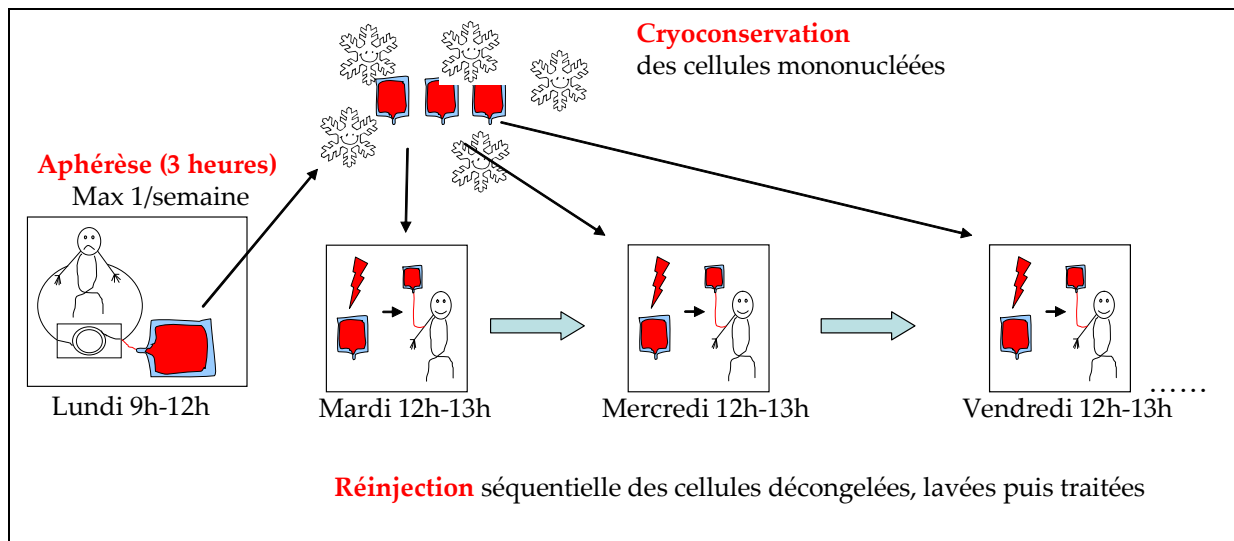
Etude statistique : Critère d'évaluation principal : pourcentage de patients répondeurs à la PCE (réponse complète ou réponse partielle ou réponse dissociée). Schéma en une étape de Fleming. Hypothèses définissant la zone de rejet : - borne basse : efficacité < 20% - borne haute : efficacité > 60%. α : 0,1, β : 0,2. 11 patients.

Etude biologique : la quantification des cellules alloréactives sera réalisée sur les produits des aphérèses n° 1, 3 et 6. Elle consistera en une mesure par Elispot des cellules sécrétrices d'interféron gamma après culture cellulaire mixte en présence des cellules du receveur prélevées avant la greffe, selon la technique validée (**Laurin Transfusion, 2009**)

Retombées cliniques attendues : amélioration de la faisabilité du traitement par PCE, qui permet 1/ amélioration des conditions de traitement 2/ élargissement des indications de la PCE 3/ possibilité de traiter des patients de centres non-équipés pour la PCE 4/ standardisation du produit cellulaire

Schéma d'étude :

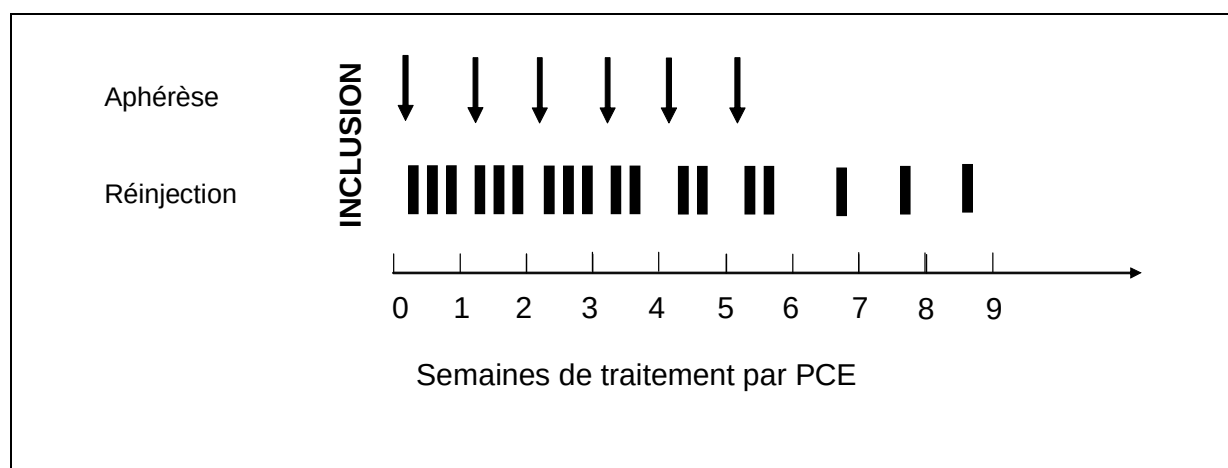
Pour tous les patients, à chaque aphérèse le produit cellulaire est séparé en trois fractions aliquotes qui sont congelées, puis décongelées traitées et réinjectées immédiatement (les jours de la semaine sont à titre indicatif).



Le schéma thérapeutique est le même pour tous les patients. Pour tous les patients, quel que soit le nombre de cellules prélevées, à chaque aphérèse le produit cellulaire sera séparé en trois fractions aliquotes. Tous les patients ont une aphérèse par semaine pendant 6 semaines. Le rythme des réinjections est le suivant :

- trois réinjections par semaine pendant 3 semaines
- deux réinjections par semaine pendant 3 semaines
- une réinjection par semaine pendant 3 semaines

Au total, chaque patient aura 6 aphérèses et 18 réinjections en 9 semaines. Traitements complémentaires : en cas de nécessité, un traitement systémique complémentaire peut être ajouté à partir de la troisième semaine. Dans ce cas, la réponse du patient prise en compte sera celle au moment de l'introduction du nouveau traitement ; hormis en cas d'effets indésirables imputés à la cryo-PCE, celle-ci sera poursuivie au rythme prévu par le protocole.



Chapitre 3 - Discussion

La PCE est une technique de thérapie cellulaire dont le produit, généré à chaque séance, est constitué de PBMC modifiées par photochimie (Psoralène + UV-A). La PCE semble offrir l'avantage d'induire une immunomodulation spécifique sans immunosuppression généralisée et pourrait ainsi représenter une bonne alternative à l'usage des immunosuppresseurs dans des pathologies médiées par des lymphocytes T comme la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) ou le lymphome T cutané (CTCL). La PCE reste cependant lourde à mettre en œuvre, coûteuse et non standardisée. Bien qu'elle soit utilisée depuis 23 ans, ses mécanismes d'action restent inconnus. Une meilleure connaissance des fondements de son efficacité permettrait de proposer un traitement adapté à chaque patient, ou à chaque type de pathologie.

L'objectif de ma thèse était double : La 1^{ère} partie, plus fondamentale, a consisté à contribuer à l'analyse et à la compréhension des mécanismes d'action de la PCE en vue d'apporter des fondements scientifiques à son efficacité. La 2^{ème} partie, plus clinique, a consisté en l'amélioration des pratiques cliniques de la PCE dans son utilisation, en particulier auprès de jeunes enfants.

Au niveau des mécanismes d'actions, le phénomène le mieux documenté de la PCE est l'apoptose des lymphocytes T traités. En revanche, au commencement de mes travaux de thèse, le débat sur le devenir et l'implication des monocytes traités était ouvert. En effet, selon les études, les monocytes ont été décrits comme résistants ou sensibles à l'apoptose induite par la PCE. L'équipe d'Edelson a même proposé que le traitement PUVA des monocytes de l'échantillon d'aphérèse induirait leur différenciation en 24h en DC. Les monocytes sont des cellules qui représentent une large population des cellules traitées (30%) et ayant des fonctions importantes dans l'immunité innée et adaptative, ils sont des précurseurs de DC in vivo. Ainsi, il était important de déterminer l'effet de la PCE sur les monocytes traités car ils pouvaient agir directement dans l'immunomodulation induite par la PCE.

Ainsi, nous avons dans un premier temps focalisé nos efforts à étudier le rôle du traitement sur de nombreuses fonctions monocytaires. Nos résultats démontrent que les monocytes traités par PUVA entrent en apoptose en 6 jours sans modifications significatives de leurs fonctions durant ce temps. De plus, le traitement PUVA ne permet pas une différenciation spontanée en DC, même après 6 jours, contrairement aux travaux d'Edelson (**Article2**). Les données de la littérature ainsi que nos résultats démontrent que l'ensemble des cellules traitées par PCE (lymphocytes, monocytes etc..) sont destinées à mourir par apoptose et ne semblent pas jouer un rôle direct dans la stimulation du système immunitaire. Il apparaît donc nécessaire d'étudier l'impact des cellules traitées par PCE réinjectées *in vivo* sur le développement des réponses immunitaires.

Il est intéressant de noter que les cellules traitées n'ont pas la même sensibilité à l'apoptose selon leur état d'activation. Nous avons montré que les LT activés meurent plus vite par apoptose que les LT au repos après traitement PUVA (**Article3**). Dans la GvHD, les LT activés étant des LT alloréactifs, la PCE semble donc avoir un effet « sélectif » sur ces cellules. Il a été montré récemment que l'apoptose pouvait être un phénomène immunogène. Nos résultats préliminaires suggèrent que le traitement PUVA induit bien une apoptose immunogène des cellules T activées, à travers l'exposition de la calréticuline à la surface des cellules apoptotiques, le relargage d'HMGB1 et la production de cytokines pro-inflammatoires par ces cellules ou par des PBMC à leur contact. Nous montrons également que ces cellules T activées traitées ont la propriété d'induire la maturation des DC, leur conférant une forte capacité de stimulation T.

Parmi les hypothèses de régulation induite par la PCE, la génération de Treg a souvent été mise en avant, notamment dans le traitement de la GvHD. Cependant, ces derniers ne constituent pas de bons candidats pour rendre compte de la spécificité d'action de la PCE envers les LT « pathogènes ». De plus, ils ne permettent pas d'expliquer le mode d'action de la PCE dans

toutes les pathologies, notamment le CTCL. Nous pensons que l'hypothèse de l'induction d'une réponse anti-clonotypique est la plus plausible, notamment parce que cette réponse est spécifique car elle cible les clones T pathogènes dans l'échantillon traité, et demeure valable dans toutes les pathologies traitées par la PCE.

L'ensemble de nos résultats ainsi que les données de la littérature nous permettent d'apporter des arguments en faveur de l'élaboration d'une réponse anti-clonotypique comme mécanisme d'action de la PCE (**Figure R15**) : Ainsi, dans la GvHD, les LT alloréactifs constituent une population activées, oligoclonale et majoritaire comparée aux LT non-alloréactifs représentant une population au repos, polyclonale. Après traitement PUVA, les LT alloréactifs entreront rapidement en apoptose de type immunogène. Ils représenteront, dans les heures qui suivent la réinjection, une source importante d'antigènes et pourront être phagocytés par des DC. Les signaux immunogènes émis par les cellules apoptotiques activées traitées induiront la maturation des DC qui pourront alors présenter les antigènes issus des LT alloréactifs pour induire une réponse T anti-clonotypique. Ce schéma pourrait également expliquer le contrôle spécifique des LT alloréactifs dans le cadre de transplantations d'organes solides et pour les LT autoréactifs dans les pathologies d'autoimmunités médiées par les LT.

Dans le cadre du CTCL, les LT tumoraux représentent une population clonale et majoritaire. La réinjection répétée de cellules apoptotique pourrait conduire à une rupture de tolérance du système immunitaire envers les antigènes des clones tumoraux.

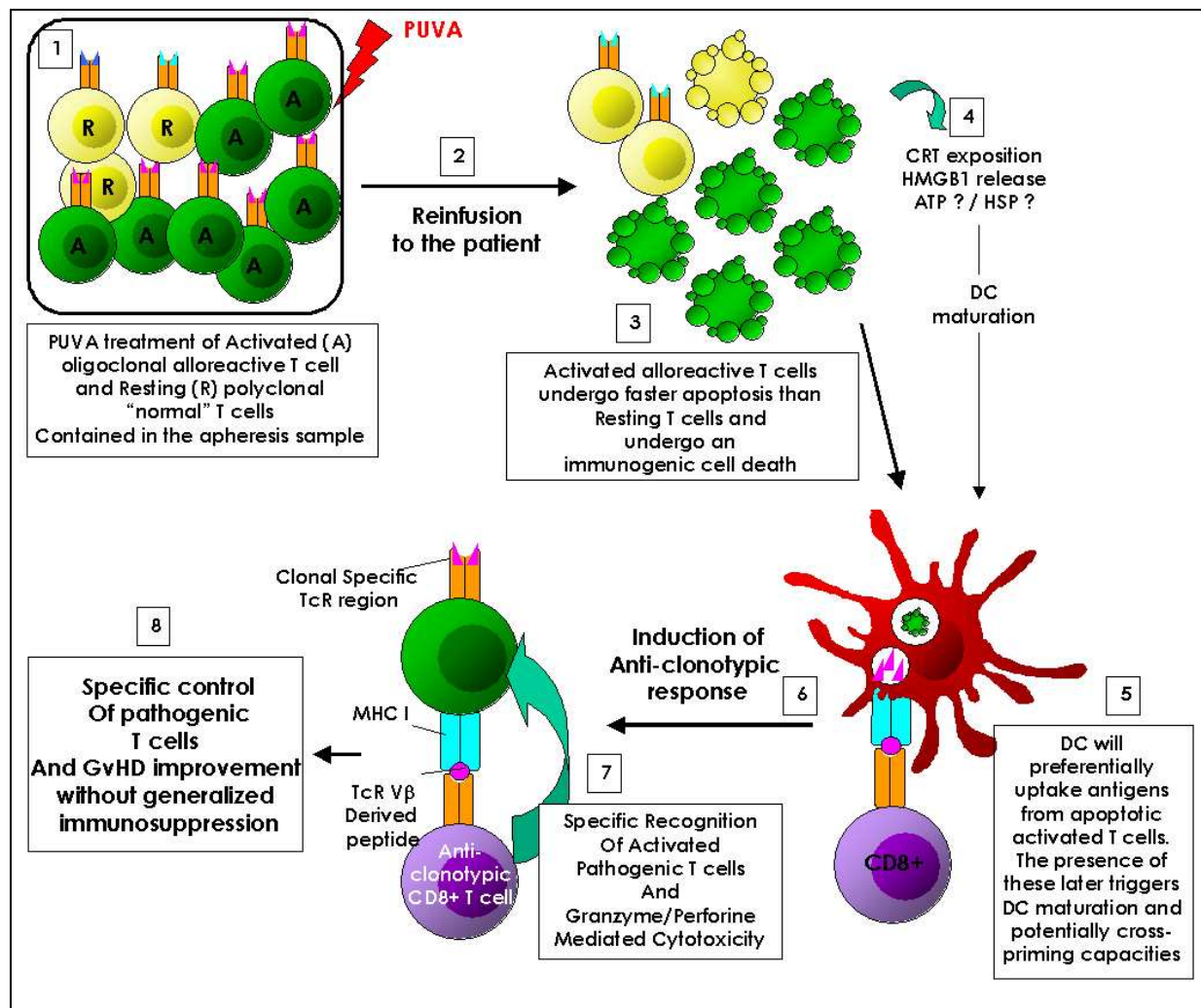


Figure R15 :

Induction d'une réponse anti-clonotypique par la PCE dans la GvHD. (1) Les LT alloreactifs activés sont majoritaires comparés aux LT « normaux » au repos dans l'échantillon traité. (2) les cellules traitées sont réinjectées au patient, et (3) les LT activés vont être les 1^{er} à entrer en apoptose. Ces cellules succombent à une mort immunogène en (4) exposant la calréticuline en surface (CRT), en relarguant HMGB1 et potentiellement les HSP et l'ATP. (5) Durant cette fenêtre de temps, les DC vont pouvoir phagocyter préférentiellement les antigènes provenant des cellules T activées apoptotiques car elles représentent dans les premières heures après réinjection la source principale d'antigènes. Au contact des cellules apoptotiques activées, les DC mûrent et acquièrent de plus fortes capacités de stimulation T. (6) La présentation d'antigènes spécifiques des LT alloréactifs permet la mise en place d'une réponse anti-clonotypique. (7) Les LT anti-clonotypiques vont reconnaître spécifiquement les LT alloréactifs et les éliminer par cytotoxicité. (8) L'élimination ciblée des LT alloréactifs par les LT anti-clonotypiques va aboutir à l'amélioration des signes cliniques de la GvHD sans immunosuppression du patient.

En perspective de ce travail, les résultats complémentaires devront être confirmés en répétant les expériences avec plus de volontaires sains. L'étape suivante sera de tenter de mettre en évidence l'élaboration d'une réponse anti-clonotypique à l'aide du modèle *in vitro* de « vaccination anti-T » que nous avons développé. Enfin, la mise en place d'un modèle *in vivo* de souris humanisée pourrait aider à mettre en évidence les mécanismes d'action de la PCE.

En parallèle de l'étude des mécanismes d'action, nous avons mené une réflexion sur l'amélioration des pratiques cliniques de la PCE. En effet, c'est une technique relativement lourde au quotidien, tant pour les patients « subissant » plusieurs aphérèses en début de traitement que pour les centres de soins en terme de logistique, notamment lorsqu'il s'agit de patients pédiatriques.

Au cours de l'évolution de la technique PCE, 2 techniques ont été développées (système dissocié et en ligne). Elles conduisent à des variations de la qualité du produit de PCE (nature/proportion des cellules prélevées, nombre de cellules traitées, contamination en globules rouges, en granulocytes etc..) et pourtant, une efficacité similaire est observée. De façon étonnante, aucune étude ne s'est réellement intéressée à la relation entre la nature du produit cellulaire traité par PCE, le nombre ou la fréquence des séances réalisées et l'efficacité clinique du traitement. L'étude réalisée par French *et al.* met en évidence que les patients ayant un clone circulant répondent mieux au traitement PCE, mais aucune étude ne s'est intéressée à la quantité « minimale » de LT « pathogènes » à traiter pour observer un effet thérapeutique.

Le Dr. Merlin, pédiatre oncologue au CHU de Clermont-Ferrand, est témoin au quotidien de la lourdeur de la technique notamment chez le sujet jeune. Il a développé l'idée d'alléger le nombre de cytophèses en prélevant une plus grande quantité de PBMC à la 1^{ère} séance puis de fractionner l'échantillon en 3 (**Article 4**). La 1^{ère} partie des cellules sera

immédiatement traitée et réinjectée au patient et les 2 autres seront congelées, puis décongelées, traitées et réinjectées au patient lors des 2 autres séances de la semaine (cryo-PCE). Ainsi, la cryo-PCE permettra de maintenir le nombre de séances tout en divisant le nombre de cytophères par 3. Notre collaboration avec le Dr Merlin a porté sur la mise au point d'un modèle *in vitro* d'étude pré-clinique validant ce principe (**Article 5**). Le Dr Merlin est investigateur principal d'un essai clinique, ouvert cette année et auquel nous sommes associés, visant à évaluer l'efficacité de la cryo-PCE.

Au cours de l'essai clinique portant sur la cryo-PCE, notre équipe aura pour objectif d'évaluer la quantité de LT alloréactifs (LT « pathogènes ») contenus dans l'échantillon fractionné et traité à l'aide d'une technique de mesure d'alloréactivité que nous avons mis au point (**Article 6**). Cette quantité de LT alloréactifs traités sera mise en relation avec l'efficacité clinique de la PCE et si une corrélation existe, cela ouvrira de plus grandes perspectives pour alléger et optimiser la technique de PCE. En effet la définition d'une dose « minimale » de LT « pathogènes » traités nous permettrait de proposer un traitement en médecine personnalisée avec la mise en place de standards de traitement (**Figure R14**). L'idée est de prélever une seule fois le patient, d'amplifier les LT alloréactifs *ex vivo*, de fractionner et de congeler en « doses injectables » les cellules. Celles-ci pourront être décongelées et traitées le jour de la séance du patient. Ce protocole offre plusieurs avantages : 1) réduction encore plus importante du nombre d'aphèreses donc amélioration de la qualité de vie des patients adultes et pédiatriques 2) enrichissement de la quantité de LT alloréactifs dans l'échantillon traité ; on s'attend donc à observer une efficacité augmentée du traitement 3) raccourcissement du temps de chaque séance et allègement des coûts. Le rationnel de cette proposition repose sur les études de French *et al.*, et sur nos résultats complémentaires traduisant de l'immunogénicité des cellules traitées et l'hypothèse retenue de la mise en

œuvre d'une réponse anti-clonotypique à la base de l'immunomodulation spécifique comme mode d'action de la PCE.

Afin d'aller encore plus loin dans la simplification de la technique PCE, nous pourrions imaginer de remplacer l'irradiation PUVA par l'irradiation γ , déjà utilisée notamment en transfusion sanguine. Il est connu que l'irradiation γ induit l'apoptose des PBMC. Nos travaux indiquent que la cinétique d'apoptose des cellules irradiées par irradiation γ est similaire à celle des cellules traitées par PCE (données non montrées dans cette thèse). Ainsi, si l'apoptose des cellules T activées induite par l'irradiation γ est aussi immunogène que celle induite par PCE, nous pourrions proposer de traiter les cellules par irradiation γ , évitant la nécessité de manipuler le prélèvement en centre de thérapie cellulaire. Ceci permettrait à plus de centres de pratiquer la PCE et réduirait encore les coûts de chaque séance.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de faire avancer la connaissance sur les mécanismes d'action de la PCE, de proposer une hypothèse objective des mécanismes d'action tenant compte de la spécificité et de l'efficacité thérapeutique de la PCE, et représente un nouveau point de départ dans la poursuite de la recherche des mécanismes d'action. Enfin, ce travail a contribué à l'amélioration de la technique dans le traitement de la GvHD en pédiatrie et permet de proposer en perspective un protocole « rationalisé » de PCE basé sur des fondements scientifiques.

Chapitre 4 - Références Bibliographiques

1. **Fahmy IR, Abu-Shady H.** The isolation and properties of ammoidin, ammidin and majudin, and their effect in the treatment of leukoderma. **Q J Pharm Pharmacol** 1948; 21 (4): 499.
2. **Lerner AB, Denton CR, Fitzpatrick TB.** Clinical and experimental studies with 8-methoxypsoralen in vitiligo. **J Invest Dermatol** 1953; 20 (4): 299.
3. **El-Moffy AM.** Further study on treatment of leucoderma with Ammi mafus linn. **J Egypt Med Assoc** 1952; 35 (1): 1.
4. **Walter JF, Kelsey WH, Voorhees JJ, Duell EA.** Psoralen plus black light inhibits epidermal DNA synthesis. **Arch Dermatol** 1973; 107 (6): 861.
5. **Walter JF, Voorhees JJ.** Psoriasis improved by psoralen plus black light. **Acta Derm Venereol** 1973; 53 (6): 469.
6. **Gilchrest BA, Parrish JA, Tanenbaum L, Haynes HA, Fitzpatrick TB.** Oral methoxsalen photochemotherapy of mycosis fungoides. **Cancer** 1976; 38 (2): 683.
7. **Morison WL, Parrish JA, McAuliffe DJ, Bloch KJ.** Sensitivity of mononuclear cells to PUVA: effect on subsequent stimulation with mitogens and on exclusion of trypan blue dye. **Clin Exp Dermatol** 1981; 6 (3): 273.
8. **Kraemer KH, Waters HL, Cohen LF, et al.** Effects of 8-methoxypsoralen and ultraviolet radiation on human lymphoid cells in vitro. **J Invest Dermatol** 1981; 76 (2): 80.
9. **Andreu G, Leon A, Heshmati F, et al.** Extracorporeal photochemotherapy: evaluation of two techniques and use in connective tissue disorders. **Transfus Sci** 1994; 15 (4): 443.
10. **Schooneman F.** Extracorporeal photopheresis technical aspects. **Transfus Apher Sci** 2003; 28 (1): 51.
11. **Edelson R, Berger C, Gasparro F, et al.** Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results. **N Engl J Med** 1987; 316 (6): 297.
12. **Diamandidou E, Cohen PR, Kurzrock R.** Mycosis fungoides and Sezary syndrome. **Blood** 1996; 88 (7): 2385.
13. **Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, et al.** Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Blood** 2007; 110 (6): 1713.
14. **Heald PW, Perez MI, Christensen I, Dobbs N, McKiernan G, Edelson R.** Photopheresis therapy of cutaneous T-cell lymphoma: the Yale-New Haven Hospital experience. **Yale J Biol Med** 1989; 62 (6): 629.
15. **Dall'Amico R, Zacchello G, Heald P.** [The application of photopheresis in the therapy of cancerous and autoimmune diseases]. **Recenti Prog Med** 1991; 82 (5): 294.

16. **Prinz B, Behrens W, Holzle E, Plewig G.** Extracorporeal photopheresis for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma--the Dusseldorf and Munich experience. **Arch Dermatol Res** 1995; 287 (7): 621.
17. **Owsianowski M, Garbe C, Ramaker J, Orfanos CE, Gollnick H.** [Therapeutic experiences with extracorporeal photopheresis. Technical procedure, follow-up and clinical outcome in 31 skin diseases]. **Hautarzt** 1996; 47 (2): 114.
18. **Zic JA, Stricklin GP, Greer JP, et al.** Long-term follow-up of patients with cutaneous T-cell lymphoma treated with extracorporeal photochemotherapy. **J Am Acad Dermatol** 1996; 35 (6): 935.
19. **Gottlieb SL, Wolfe JT, Fox FE, et al.** Treatment of cutaneous T-cell lymphoma with extracorporeal photopheresis monotherapy and in combination with recombinant interferon alfa: a 10-year experience at a single institution. **J Am Acad Dermatol** 1996; 35 (6): 946.
20. **Duvic M, Hester JP, Lemak NA.** Photopheresis therapy for cutaneous T-cell lymphoma. **J Am Acad Dermatol** 1996; 35 (4): 573.
21. **Russell-Jones R, Fraser-Andrews E, Spittle M, Whittaker S.** Extracorporeal photopheresis in Sezary syndrome. **Lancet** 1997; 350 (9081): 886.
22. **Zouboulis CC, Schmuth M, Doepfner S, Dippel E, Orfanos CE.** Extracorporeal photopheresis of cutaneous T-cell lymphoma is associated with reduction of peripheral CD4+ T lymphocytes. **Dermatology** 1998; 196 (3): 305.
23. **Jiang SB, Dietz SB, Kim M, Lim HW.** Extracorporeal photochemotherapy for cutaneous T-cell lymphoma: a 9.7-year experience. **Photodermatol Photoimmunol Photomed** 1999; 15 (5): 161.
24. **Wollina U, Liebold K, Kaatz M, Looks A, Stuhlert A, Lange D.** Survival of patients with cutaneous T-cell lymphoma after treatment with extracorporeal photochemotherapy. **Oncol Rep** 2000; 7 (6): 1197.
25. **Crovetti G, Carabelli A, Berti E, et al.** Photopheresis in cutaneous T-cell lymphoma: five-year experience. **Int J Artif Organs** 2000; 23 (1): 55.
26. **Bisaccia E, Gonzalez J, Palangio M, Schwartz J, Klainer AS.** Extracorporeal photochemotherapy alone or with adjuvant therapy in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma: a 9-year retrospective study at a single institution. **J Am Acad Dermatol** 2000; 43 (2 Pt 1): 263.
27. **Wollina U, Looks A, Meyer J, et al.** Treatment of stage II cutaneous T-cell lymphoma with interferon alfa-2a and extracorporeal photochemotherapy: a prospective controlled trial. **J Am Acad Dermatol** 2001; 44 (2): 253.
28. **Knobler E, Warmuth I, Cocco C, Miller B, Mackay J.** Extracorporeal photochemotherapy--the Columbia Presbyterian experience. **Photodermatol Photoimmunol Photomed** 2002; 18 (5): 232.
29. **Quaglino P, Fierro MT, Rossoffo GL, Savoia P, Bernengo MG.** Treatment of advanced mycosis fungoides/Sezary syndrome with fludarabine and potential adjunctive benefit to subsequent extracorporeal photochemotherapy. **Br J Dermatol** 2004; 150 (2): 327.

30. **Rao V, Ryggen K, Aarhaug M, Dai HY, Jorstad S, Moen T.** Extracorporeal photochemotherapy in patients with cutaneous T-cell lymphoma: is clinical response predictable? *J Eur Acad Dermatol Venereol* **2006**; 20 (9): 1100.
31. **Knobler R, Girardi M.** Extracorporeal photochemoimmunotherapy in cutaneous T cell lymphomas. *Ann N Y Acad Sci* **2001**; 941: 123.
32. **Edelson RL.** Photopheresis: a new therapeutic concept. *Yale J Biol Med* **1989**; 62 (6): 565.
33. **Miller JD, Kirkland EB, Domingo DS, et al.** Review of extracorporeal photopheresis in early-stage (IA, IB, and IIA) cutaneous T-cell lymphoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **2007**; 23 (5): 163.
34. **Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB.** Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* **1994**; 83 (8): 2360.
35. **Mutis T, Gillespie G, Schrama E, Falkenburg JH, Moss P, Goulmy E.** Tetrameric HLA class I-minor histocompatibility antigen peptide complexes demonstrate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease. *Nat Med* **1999**; 5 (7): 839.
36. **Laurin D, Hannani D, Pernellet M, et al.** Immunomonitoring of graft-versus-host minor histocompatibility antigen correlates with graft-versus-host disease and absence of relapse after graft. *Transfusion* **2009**.
37. **Goulmy E.** Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol Rev* **1997**; 157: 125.
38. **Falkenburg JH, Willemze R.** Minor histocompatibility antigens as targets of cellular immunotherapy in leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* **2004**; 17 (3): 415.
39. **Ichiki Y, Bowlus CL, Shimoda S, Ishibashi H, Vierling JM, Gershwin ME.** T cell immunity and graft-versus-host disease (GVHD). *Autoimmun Rev* **2006**; 5 (1): 1.
40. **Copelan EA.** Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* **2006**; 354 (17): 1813.
41. **Shlomchik WD.** Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* **2007**.
42. **Koh LP, Chao NJ.** Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplant using mismatched/haploidentical donors: a review. *Blood Cells Mol Dis* **2008**; 40 (1): 20.
43. **Yin L, Poirier G, Neth O, Hsuan JJ, Totty NF, Stauss HJ.** Few peptides dominate cytotoxic T lymphocyte responses to single and multiple minor histocompatibility antigens. *Int Immunol* **1993**; 5 (9): 1003.
44. **Laurin D, Hannani D, Pernellet M, et al.** Immunomonitoring of graft-versus-host minor histocompatibility antigen correlates with graft-versus-host disease and absence of relapse after graft. *Transfusion*; 50 (2): 418.

45. **Chao NJ, Schmidt GM, Niland JC, et al.** Cyclosporine, methotrexate, and prednisone compared with cyclosporine and prednisone for prophylaxis of acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med* **1993**; 329 (17): 1225.
46. **Deeg HJ, Flowers ME, Leisenring W, Appelbaum FR, Martin PJ, Storb RF.** Cyclosporine (CSP) or CSP plus methylprednisolone for graft-versus-host disease prophylaxis in patients with high-risk lymphohemopoietic malignancies: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood* **2000**; 96 (3): 1194.
47. **Nash RA, Antin JH, Karanes C, et al.** Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* **2000**; 96 (6): 2062.
48. **Bates JS, Engemann AM, Hammond JM.** Clinical Utility of Rituximab in Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Ann Pharmacother* **2009**; 43 (2): 316.
49. **Ghoreschi K, Thomas P, Penovici M, et al.** PUVA-bath photochemotherapy and isotretinoin in sclerodermatous graft-versus-host disease. *Eur J Dermatol* **2008**; 18 (6): 667.
50. **Creamer D, Martyn-Simmons CL, Osborne G, et al.** Eczematoid Graft-vs-Host Disease: A Novel Form of Chronic Cutaneous Graft-vs-Host Disease and Its Response to Psoralen UV-A Therapy. *Arch Dermatol* **2007**; 143 (9): 1157.
51. **Goulmy E.** Minor histocompatibility antigens: from transplantation problems to therapy of cancer. *Hum Immunol* **2006**; 67 (6): 433.
52. **Passweg JR, Koehl U, Uharek L, Meyer-Monard S, Tichelli A.** Natural-killer-cell-based treatment in haematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* **2006**; 19 (4): 811.
53. **Dall'Amico R, Zulian F, Montini G, et al.** Applications of extracorporeal photochemotherapy in "non-oncological" diseases. *Int J Artif Organs* **1993**; 16 Suppl 5: 168.
54. **Flowers ME, Apperley JF, van Besien K, et al.** A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood* **2008**; 112 (7): 2667.
55. **Kanold J, Paillard C, Halle P, D'Incan M, Bordigoni P, Demeocq F.** Extracorporeal photochemotherapy for graft versus host disease in pediatric patients. *Transfus Apher Sci* **2003**; 28 (1): 71.
56. **Kanold J, Merlin E, Halle P, et al.** Photopheresis in pediatric graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation: clinical practice guidelines based on field experience and review of the literature. *Transfusion* **2007**; 47 (12): 2276.
57. **Marshall SR.** Technology insight: ECP for the treatment of GvHD--can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? *Nat Clin Pract Oncol* **2006**; 3 (6): 302.
58. **Smith EP, Snieckiński I, Dagis AC, et al.** Extracorporeal photochemotherapy for treatment of drug-resistant graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* **1998**; 4 (1): 27.

59. **Salvaneschi L, Perotti C, Zecca M, et al.** Extracorporeal photochemotherapy for treatment of acute and chronic GVHD in childhood. **Transfusion** 2001; 41 (10): 1299.
60. **Messina C, Locatelli F, Lanino E, et al.** Extracorporeal photochemotherapy for paediatric patients with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. **Br J Haematol** 2003; 122 (1): 118.
61. **Garban F, Drillat P, Makowski C, et al.** Extracorporeal chemophototherapy for the treatment of graft-versus-host disease: hematologic consequences of short-term, intensive courses. **Haematologica** 2005; 90 (8): 1096.
62. **Greinix HT, Knobler RM, Worel N, et al.** The effect of intensified extracorporeal photochemotherapy on long-term survival in patients with severe acute graft-versus-host disease. **Haematologica** 2006; 91 (3): 405.
63. **Perfetti P, Carlier P, Strada P, et al.** Extracorporeal photopheresis for the treatment of steroid refractory acute GVHD. **Bone Marrow Transplant** 2008; 42 (9): 609.
64. **Besnier DP, Chabannes D, Mahe B, et al.** Treatment of graft-versus-host disease by extracorporeal photochemotherapy: a pilot study. **Transplantation** 1997; 64 (1): 49.
65. **Child FJ, Ratnaveil R, Watkins P, et al.** Extracorporeal photopheresis (ECP) in the treatment of chronic graft-versus-host disease (GVHD). **Bone Marrow Transplant** 1999; 23 (9): 881.
66. **Zic JA, Miller JL, Stricklin GP, King LE, Jr.** The North American experience with photopheresis. **Ther Apher** 1999; 3 (1): 50.
67. **Apisarnthanarax N, Donato M, Korbling M, et al.** Extracorporeal photopheresis therapy in the management of steroid-refractory or steroid-dependent cutaneous chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: feasibility and results. **Bone Marrow Transplant** 2003; 31 (6): 459.
68. **Bisaccia E, Palangio M, Gonzalez J, Adler KR, Rowley SD, Goldberg SL.** Treating refractory chronic graft-versus-host disease with extracorporeal photochemotherapy. **Bone Marrow Transplant** 2003; 31 (4): 291.
69. **Rubegni P, Cuccia A, Sbano P, et al.** Role of extracorporeal photochemotherapy in patients with refractory chronic graft-versus-host disease. **Br J Haematol** 2005; 130 (2): 271.
70. **Foss FM, DiVenuti GM, Chin K, et al.** Prospective study of extracorporeal photopheresis in steroid-refractory or steroid-resistant extensive chronic graft-versus-host disease: analysis of response and survival incorporating prognostic factors. **Bone Marrow Transplant** 2005; 35 (12): 1187.
71. **Couriel DR, Hosing C, Saliba R, et al.** Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of steroid-resistant chronic GVHD. **Blood** 2006; 107 (8): 3074.

72. **Suchin KR, Cassin M, Washko R, et al.** Extracorporeal photochemotherapy does not suppress T- or B-cell responses to novel or recall antigens. **J Am Acad Dermatol** 1999; 41 (6): 980.
73. **Rook AH.** Photopheresis in the treatment of autoimmune disease: experience with pemphigus vulgaris and systemic sclerosis. **Ann N Y Acad Sci** 1991; 636: 209.
74. **Hilliquin P, Andreu G, Heshmati F, Menkes CJ.** [Treatment of refractory rheumatoid polyarthritis by extracorporeal photochemotherapy]. **Rev Rhum Ed Fr** 1993; 60 (2): 125.
75. **Gollnick HP, Owsianowski M, Taube KM, Orfanos CE.** Unresponsive severe generalized pemphigus vulgaris successfully controlled by extracorporeal photopheresis. **J Am Acad Dermatol** 1993; 28 (1): 122.
76. **Williams WV, Rook AH, Freundlich BF, et al.** T-cell receptors in scleroderma skin. The effect of photopheresis. **Ann N Y Acad Sci** 1995; 756: 424.
77. **Malawista SE, Trock DH, Edelson RL.** Treatment of rheumatoid arthritis by extracorporeal photochemotherapy. A pilot study. **Arthritis Rheum** 1991; 34 (6): 646.
78. **Malawista SE, Trock D, Edelson RL.** Photopheresis for rheumatoid arthritis. **Ann N Y Acad Sci** 1991; 636: 217.
79. **Knobler RM, Graninger W, Lindmaier A, Trautinger F.** Photopheresis for the treatment of lupus erythematosus. Preliminary observations. **Ann N Y Acad Sci** 1991; 636: 340.
80. **Knobler RM, Graninger W, Graninger W, Lindmaier A, Trautinger F, Smolen JS.** Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of systemic lupus erythematosus. A pilot study. **Arthritis Rheum** 1992; 35 (3): 319.
81. **de Misa RF, Azana JM, Harto A, Ledo A.** Extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe psoriatic arthropathy. **Br J Dermatol** 1992; 127 (4): 448.
82. **Ludvigsson J, Samuelsson U, Ernerudh J, Johansson C, Stenhammar L, Berlin G.** Photopheresis at onset of type 1 diabetes: a randomised, double blind, placebo controlled trial. **Arch Dis Child** 2001; 85 (2): 149.
83. **Reinisch W, Nahavandi H, Santella R, et al.** Extracorporeal photochemotherapy in patients with steroid-dependent Crohn's disease: a prospective pilot study. **Aliment Pharmacol Ther** 2001; 15 (9): 1313.
84. **Costanzo-Nordin MR, Hubbell EA, O'Sullivan EJ, et al.** Photopheresis versus corticosteroids in the therapy of heart transplant rejection. Preliminary clinical report. **Circulation** 1992; 86 (5 Suppl): II242.
85. **Costanzo-Nordin MR, Hubbell EA, O'Sullivan EJ, et al.** Successful treatment of heart transplant rejection with photopheresis. **Transplantation** 1992; 53 (4): 808.
86. **Slovis BS, Loyd JE, King LE, Jr.** Photopheresis for chronic rejection of lung allografts. **N Engl J Med** 1995; 332 (14): 962.

87. **Horina JH, Mullegger RR, Horn S, et al.** Photopheresis for renal allograft rejection. **Lancet** 1995; 346 (8966): 61.
88. **Lehrer MS, Ruchelli E, Olthoff KM, French LE, Rook AH.** Successful reversal of recalcitrant hepatic allograft rejection by photopheresis. **Liver Transpl** 2000; 6 (5): 644.
89. **Bisaccia E, Berger C, DiSpaltro FX, Klainer AS.** Extracorporeal photopheresis in the treatment of AIDS-related complex: extended trial. **J Acquir Immune Defic Syndr** 1993; 6 (4): 386.
90. **Ingen-Housz-Oro S, Bussel A, Flageul B, et al.** A prospective study on the evolution of the T-cell repertoire in patients with Sezary syndrome treated by extracorporeal photopheresis. **Blood** 2002; 100 (6): 2168.
91. **Ingen-Housz-Oro S, Bussel A, Flageul B, et al.** Follow-up of the T-cell clonality in Sezary patients treated by extracorporeal photopheresis using a new assay: the immunoscope technique. **Transfus Apher Sci** 2003; 28 (1): 35.
92. **Haley HR, Davis DA, Sams WM.** Durable loss of a malignant T-cell clone in a stage IV cutaneous T-cell lymphoma patient treated with high-dose interferon and photopheresis. **J Am Acad Dermatol** 1999; 41 (5 Pt 2): 880.
93. **French LE, Alcindor T, Shapiro M, et al.** Identification of amplified clonal T cell populations in the blood of patients with chronic graft-versus-host disease: positive correlation with response to photopheresis. **Bone Marrow Transplant** 2002; 30 (8): 509.
94. **Heshmati F, Tavakoli R, Michel A, et al.** Extracorporeal photochemotherapy: a treatment for organ graft rejection. **Ther Apher** 1997; 1 (2): 121.
95. **Perez M, Edelson R, Laroche L, Berger C.** Inhibition of antiskin allograft immunity by infusions with syngeneic photoinactivated effector lymphocytes. **J Invest Dermatol** 1989; 92 (5): 669.
96. **Perez MI, Edelson RL, John L, Laroche L, Berger CL.** Inhibition of antiskin allograft immunity induced by infusions with photoinactivated effector T lymphocytes (PET cells). **Yale J Biol Med** 1989; 62 (6): 595.
97. **Ullrich SE.** Photoinactivation of T-cell function with psoralen and UVA radiation suppresses the induction of experimental murine graft-versus-host disease across major histocompatibility barriers. **J Invest Dermatol** 1991; 96 (3): 303.
98. **Girardi M, Herreid P, Tigelaar RE.** Specific suppression of lupus-like graft-versus-host disease using extracorporeal photochemical attenuation of effector lymphocytes. **J Invest Dermatol** 1995; 104 (2): 177.
99. **van Iperen HP, Beijersbergen van Henegouwen GM.** An animal model for extracorporeal photochemotherapy based on contact hypersensitivity. **J Photochem Photobiol B** 1992; 15 (4): 361.
100. **Lin RH, Wang LF.** The treatment of autoimmune disease in (NZB/NZW)F1 mice with syngeneic photomodulated splenocytes. **Scand J Immunol** 1994; 39 (5): 446.

101. **Perez MI, Berger CL, Yamane Y, John L, Laroche L, Edelson RL.** Inhibition of anti-skin allograft immunity induced by infusions with photoinactivated effector T lymphocytes--the congenic model. ***Transplantation* 1991**; 51 (6): 1283.
102. **Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR.** Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. ***Nature* 1981**; 292 (5818): 60.
103. **Ben-Nun A, Cohen IR.** Vaccination against autoimmune encephalomyelitis (EAE): attenuated autoimmune T lymphocytes confer resistance to induction of active EAE but not to EAE mediated by the intact T lymphocyte line. ***Eur J Immunol* 1981**; 11 (11): 949.
104. **Hannani D, Gabert F, Chaperot L, Richard MJ, Plumas J.** [Extracorporeal photochemotherapy or immunotherapy using cells modified by photochemistry]. ***Rev Med Interne***; 31 (4): 321.
105. **Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN.** Life and death in peripheral T cells. ***Nat Rev Immunol* 2007**; 7 (7): 532.
106. **Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al.** Foxp3CD25CD4 natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. ***Immunol Rev* 2006**; 212: 8.
107. **Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY.** Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. ***J Exp Med* 2005**; 202 (7): 901.
108. **Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY.** Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. ***Immunity* 2005**; 22 (3): 329.
109. **Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F.** Thymic regulatory T cells. ***Autoimmun Rev* 2005**; 4 (8): 579.
110. **Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM.** Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. ***Immunity* 2006**; 24 (6): 677.
111. **Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO.** The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. ***J Invest Dermatol* 2009**; 129 (6): 1339.
112. **van den Berg WB, Miossec P.** IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. ***Nat Rev Rheumatol* 2009**; 5 (10): 549.
113. **Brand S.** Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. ***Gut* 2009**; 58 (8): 1152.
114. **Ichiozan C, Yu Y, Liu C, et al.** Th17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease. ***Biol Blood Marrow Transplant* 2009**.
115. **Chen W, Jin W, Hardegen N, et al.** Conversion of peripheral CD4+CD25-naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. ***J Exp Med* 2003**; 198 (12): 1875.
116. **von Herrath MG, Harrison LC.** Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. ***Nat Rev Immunol* 2003**; 3 (3): 223.

117. **Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, et al.** PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* **2009**; 206 (13): 3015.
118. **Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM.** TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* **2001**; 14 (6): 715.
119. **Gao Y, Herndon JM, Zhang H, Griffith TS, Ferguson TA.** Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J Exp Med* **1998**; 188 (5): 887.
120. **Tomimori Y, Ikawa Y, Oyaizu N.** Ultraviolet-irradiated apoptotic lymphocytes produce interleukin-10 by themselves. *Immunol Lett* **2000**; 71 (1): 49.
121. **Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G.** Immunogenic and tolerogenic cell death. **2009**; 9 (5): 353.
122. **Gershon RK, Kondo K.** Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* **1970**; 18 (5): 723.
123. **Gilliet M, Boonstra A, Paturel C, et al.** The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **2002**; 195 (7): 953.
124. **Najafian N, Chitnis T, Salama AD, et al.** Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest* **2003**; 112 (7): 1037.
125. **Sarantopoulos S, Lu L, Cantor H.** Qa-1 restriction of CD8+ suppressor T cells. *J Clin Invest* **2004**; 114 (9): 1218.
126. **Feger U, Tolosa E, Huang Y-H, et al.** HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation
10.1182/blood-2006-11-057125. *Blood* **2007**; 110 (2): 568.
127. **Rouas-Freiss N, Naji A, Durrbach A, Carosella ED.** Tolerogenic functions of human leukocyte antigen G: from pregnancy to organ and cell transplantation. *Transplantation* **2007**; 84 (1 Suppl): S21.
128. **Bahri R, Hirsch F, Josse A, et al.** Soluble HLA-G Inhibits Cell Cycle Progression in Human Alloreactive T Lymphocytes. *J Immunol* **2006**; 176 (3): 1331.
129. **Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, Suzuki H.** Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med* **2004**; 200 (9): 1123.
130. **Shi Z, Okuno Y, Rifa'i M, et al.** Human CD8+CXCR3+ T cells have the same function as murine CD8+CD122+ Treg. *Eur J Immunol* **2009**; 39 (8): 2106.
131. **Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, et al.** Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* **2003**; 102 (12): 4107.
132. **Joosten SA, van Meijgaarden KE, Savage ND, et al.** Identification of a human CD8+ regulatory T cell subset that mediates suppression through

- the chemokine CC chemokine ligand 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**; 104 (19): 8029.
133. **Mahic M, Henjum K, Yaqub S, et al.** Generation of highly suppressive adaptive CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur J Immunol* **2008**; 38 (3): 640.
 134. **Gilliet M, Liu YJ.** Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **2002**; 195 (6): 695.
 135. **Xystrakis E, Dejean AS, Bernard I, et al.** Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* **2004**; 104 (10): 3294.
 136. **Cai J, Lee J, Jankowska-Gan E, et al.** Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8+ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance. *J Exp Med* **2004**; 199 (7): 1017.
 137. **Filaci G, Fravega M, Negrini S, et al.** Nonantigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Hum Immunol* **2004**; 65 (2): 142.
 138. **Uss E, Rowshani AT, Hooibrink B, Lardy NM, van Lier RA, ten Berge IJ.** CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8+ T cells. *J Immunol* **2006**; 177 (5): 2775.
 139. **Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, et al.** Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* **1994**; 372 (6502): 190.
 140. **Hadley GA, Bartlett ST, Via CS, Rostapshova EA, Moainie S.** The epithelial cell-specific integrin, CD103 (alpha E integrin), defines a novel subset of alloreactive CD8+ CTL. *J Immunol* **1997**; 159 (8): 3748.
 141. **El-Asady R, Yuan R, Liu K, et al.** TGF- β -dependent CD103 expression by CD8(+) T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease. *J Exp Med* **2005**; 201 (10): 1647.
 142. **Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, et al.** Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**; 99 (20): 13031.
 143. **Bellgrau D, Wilson DB.** Immunological studies of T-cell receptors. I. Specifically induced resistance to graft-versus-host disease in rats mediated by host T-cell immunity to alloreactive parental T cells. *J Exp Med* **1978**; 148 (1): 103.
 144. **Ben-Nun A, Cohen IR.** Spontaneous remission and acquired resistance to autoimmune encephalomyelitis (EAE) are associated with suppression of T cell reactivity: suppressed EAE effector T cells recovered as T cell lines. *J Immunol* **1982**; 128 (3): 1450.
 145. **Vandenbark AA, Hashim G, Offner H.** Immunization with a synthetic T-cell receptor V-region peptide protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature* **1989**; 341 (6242): 541.

146. **Jiang H, Zhang SI, Pernis B.** Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. **Science** **1992**; 256 (5060): 1213.
147. **Ware R, Jiang H, Braunstein N, et al.** Human CD8+ T lymphocyte clones specific for T cell receptor V beta families expressed on autologous CD4+ T cells. **Immunity** **1995**; 2 (2): 177.
148. **Jiang H, Ware R, Stall A, Flaherty L, Chess L, Pernis B.** Murine CD8+ T cells that specifically delete autologous CD4+ T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule. **Immunity** **1995**; 2 (2): 185.
149. **Jiang H, Curran S, Ruiz-Vazquez E, Liang B, Winchester R, Chess L.** Regulatory CD8+ T cells fine-tune the myelin basic protein-reactive T cell receptor V{beta} repertoire during experimental autoimmune encephalomyelitis
10.1073/pnas.1432871100. **PNAS** **2003**; 100 (14): 8378.
150. **Jiang H, Kashleva H, Xu LX, et al.** T cell vaccination induces T cell receptor Vbeta-specific Qa-1-restricted regulatory CD8(+) T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** **1998**; 95 (8): 4533.
151. **Kumar V.** Homeostatic control of immunity by TCR peptide-specific Tregs. **J Clin Invest** **2004**; 114 (9): 1222.
152. **Smith TR, Tang X, Maricic I, Garcia Z, Fanchiang S, Kumar V.** Dendritic cells use endocytic pathway for cross-priming class Ib MHC-restricted CD8alphaalpha+TCRalphabeta+ T cells with regulatory properties. **J Immunol** **2009**; 182 (11): 6959.
153. **Jiang H, Chess L.** An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. **J Clin Invest** **2004**; 114 (9): 1198.
154. **Mimran A, Mor F, Carmi P, Quintana FJ, Rotter V, Cohen IR.** DNA vaccination with CD25 protects rats from adjuvant arthritis and induces an antiertgotypic response. **J Clin Invest** **2004**; 113 (6): 924.
155. **Flohe SB, Bruggemann J, Lendemann S, et al.** Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. **J Immunol** **2003**; 170 (5): 2340.
156. **Zanin-Zhorov A, Nussbaum G, Franitza S, Cohen IR, Lider O.** T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. **Faseb J** **2003**; 17 (11): 1567.
157. **Quintana FJ, Carmi P, Mor F, Cohen IR.** DNA fragments of the human 60-kDa heat shock protein (HSP60) vaccinate against adjuvant arthritis: identification of a regulatory HSP60 peptide. **J Immunol** **2003**; 171 (7): 3533.
158. **Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA.** Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. **J Invest Dermatol** **2009**; 129 (7): 1628.
159. **Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB.** Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. **Nat Immunol** **2003**; 4 (12): 1230.
160. **Sakuishi K, Oki S, Araki M, Porcelli SA, Miyake S, Yamamura T.** Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. **J Immunol** **2007**; 179 (6): 3452.

161. **Beaudoin L, Laloux V, Novak J, Lucas B, Lehuen A.** NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. *Immunity* **2002**; 17 (6): 725.
162. **Novak J, Beaudoin L, Griseri T, Lehuen A.** Inhibition of T cell differentiation into effectors by NKT cells requires cell contacts. *J Immunol* **2005**; 174 (4): 1954.
163. **Griseri T, Beaudoin L, Novak J, et al.** Invariant NKT cells exacerbate type 1 diabetes induced by CD8 T cells. *J Immunol* **2005**; 175 (4): 2091.
164. **Kramer DM, Pathak MA.** Photoaddition of psoralen and of 4,5',8-trimethylpsoralen to DNA. *Photochem Photobiol* **1970**; 12 (4): 333.
165. **Gasparro FP, Chan G, Edelson RL.** Phototherapy and photopharmacology. *Yale J Biol Med* **1985**; 58 (6): 519.
166. **Tambur AR, Ortelgel JW, Morales A, Klingemann H, Gebel HM, Tharp MD.** Extracorporeal photopheresis induces lymphocyte but not monocyte apoptosis. *Transplant Proc* **2000**; 32 (4): 747.
167. **Enomoto DN, Schellekens PT, Yong SL, ten Berge IJ, Mekkes JR, Bos JD.** Extracorporeal photochemotherapy (photopheresis) induces apoptosis in lymphocytes: a possible mechanism of action of PUVA therapy. *Photochem Photobiol* **1997**; 65 (1): 177.
168. **Lee S, Dorken B, Schmitt CA.** Extracorporeal photopheresis in graft-versus-host disease: ultraviolet radiation mediates T cell senescence in vivo. *Transplantation* **2004**; 78 (3): 484.
169. **Bladon J, Taylor PC.** Extracorporeal photopheresis induces apoptosis in the lymphocytes of cutaneous T-cell lymphoma and graft-versus-host disease patients. *Br J Haematol* **1999**; 107 (4): 707.
170. **Di Renzo M, Rubegni P, Sbano P, et al.** ECP-treated lymphocytes of chronic graft-versus-host disease patients undergo apoptosis which involves both the Fas/FasL system and the Bcl-2 protein family. *Arch Dermatol Res* **2003**; 295 (5): 175.
171. **Craciun LI, Stordeur P, Schandene L, et al.** Increased production of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist after extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* **2002**; 74 (7): 995.
172. **Jacob MC, Manches O, Drillat P, et al.** Quality control for the validation of extracorporeal photopheresis process using the Vilbert-Lourmat UV-A irradiation's system. *Transfus Apher Sci* **2003**; 28 (1): 63.
173. **Di Renzo M, Rubegni P, Pasqui AL, et al.** Extracorporeal photopheresis affects interleukin (IL)-10 and IL-12 production by monocytes in patients with chronic graft-versus-host disease. *Br J Dermatol* **2005**; 153 (1): 59.
174. **Rao V, Saunes M, Jorstad S, Moen T.** In vitro experiments demonstrate that monocytes and dendritic cells are rendered apoptotic by extracorporeal photochemotherapy, but exhibit unaffected surviving and maturing capacity after 30 Gy gamma irradiation. *Scand J Immunol* **2008**; 68 (6): 645.
175. **Legitimo A, Consolini R, Di Stefano R, Bencivelli W, Mosca F.** Psoralen and UVA light: an in vitro investigation of multiple immunological

- mechanisms underlying the immunosuppression induction in allograft rejection. **Blood Cells Mol Dis** 2002; 29 (1): 24.
176. **Yoo EK, Rook AH, Elenitsas R, Gasparro FP, Vowels BR.** Apoptosis induction of ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell Lymphoma: relevance to mechanism of therapeutic action. **J Invest Dermatol** 1996; 107 (2): 235.
 177. **Reinheckel T, Bohne M, Halangk W, Augustin W, Gollnick H.** Evaluation of UVA-mediated oxidative damage to proteins and lipids in extracorporeal photoimmunotherapy. **Photochem Photobiol** 1999; 69 (5): 566.
 178. **Zarebska Z, Waszkowska E, Caffieri S, Dall'Acqua F.** PUVA (psoralen + UVA) photochemotherapy: processes triggered in the cells. **Farmaco** 2000; 55 (8): 515.
 179. **Schmitt IM, Chimenti S, Gasparro FP.** Psoralen-protein photochemistry--a forgotten field. **J Photochem Photobiol B** 1995; 27 (2): 101.
 180. **Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM.** Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J Clin Invest** 1998; 101 (4): 890.
 181. **Ronchetti A, Rovere P, Iezzi G, et al.** Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. **J Immunol** 1999; 163 (1): 130.
 182. **Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C.** A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nat Rev Immunol** 2002; 2 (12): 965.
 183. **Albert ML.** Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? **Nat Rev Immunol** 2004; 4 (3): 223.
 184. **Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al.** Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. **Nat Med** 2007; 13 (1): 54.
 185. **Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al.** Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. **Nat Med** 2007; 13 (9): 1050.
 186. **Spisek R, Charalambous A, Mazumder A, Vesole DH, Jagannath S, Dhodapkar MV.** Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. **Blood** 2007; 109 (11): 4839.
 187. **Lotze MT, Tracey KJ.** High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. **Nat Rev Immunol** 2005; 5 (4): 331.
 188. **Hanspal M, Hanspal JS.** The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. **Blood** 1994; 84 (10): 3494.
 189. **Wang H, Bloom O, Zhang M, et al.** HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. **Science** 1999; 285 (5425): 248.

190. **Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME.** Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. **Nature** **2002**; 418 (6894): 191.
191. **Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, et al.** Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. **Embo J** **2003**; 22 (20): 5551.
192. **Bell CW, Jiang W, Reich CF, 3rd, Pisetsky DS.** The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. **Am J Physiol Cell Physiol** **2006**; 291 (6): C1318.
193. **Qin S, Wang H, Yuan R, et al.** Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. **J Exp Med** **2006**; 203 (7): 1637.
194. **Bianchi ME, Manfredi AA.** High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. **Immunol Rev** **2007**; 220: 35.
195. **Aymeric L, Apetoh L, Ghiringhelli F, et al.** Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. **Cancer Res**; 70 (3): 855.
196. **Kleinclauss F, Perruche S, Masson E, et al.** Intravenous apoptotic spleen cell infusion induces a TGF-beta-dependent regulatory T-cell expansion. **Cell Death Differ** **2006**; 13 (1): 41.
197. **Erwig LP, Henson PM.** Clearance of apoptotic cells by phagocytes. **Cell Death Differ** **2008**; 15 (2): 243.
198. **Maeda A, Schwarz A, Kernebeck K, et al.** Intravenous infusion of syngeneic apoptotic cells by photopheresis induces antigen-specific regulatory T cells. **J Immunol** **2005**; 174 (10): 5968.
199. **Perruche S, Zhang P, Liu Y, Saas P, Bluestone JA, Chen W.** CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. **Nat Med** **2008**; 14 (5): 528.
200. **Sun E, Gao Y, Chen J, et al.** Allograft tolerance induced by donor apoptotic lymphocytes requires phagocytosis in the recipient. **Cell Death Differ** **2004**; 11 (12): 1258.
201. **Saas P, Bonnefoy F, Kury-Paulin S, Kleinclauss F, Perruche S.** Mediators involved in the immunomodulatory effects of apoptotic cells. **Transplantation** **2007**; 84 (1 Suppl): S31.
202. **Mevorach D, Zhou JL, Song X, Elkon KB.** Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. **J Exp Med** **1998**; 188 (2): 387.
203. **Klein I, Crispe IN.** Complete differentiation of CD8+ T cells activated locally within the transplanted liver. **J Exp Med** **2006**; 203 (2): 437.
204. **Crispe IN.** Hepatic T cells and liver tolerance. **Nat Rev Immunol** **2003**; 3 (1): 51.
205. **Di Renzo M, Sbano P, De Aloe G, et al.** Extracorporeal photopheresis affects co-stimulatory molecule expression and interleukin-10 production by dendritic cells in graft-versus-host disease patients. **Clin Exp Immunol** **2008**; 151 (3): 407.

206. **Gerner M, Holig K, Wehner R, et al.** Extracorporeal photopheresis efficiently impairs the proinflammatory capacity of human 6-sulfo LacNAc dendritic cells. *Transplantation* **2009**; 87 (8): 1134.
207. **Spisek R, Gasova Z, Bartunkova J.** Maturation state of dendritic cells during the extracorporeal photopheresis and its relevance for the treatment of chronic graft-versus-host disease. *Transfusion* **2006**; 46 (1): 55.
208. **Mellor AL, Munn DH.** IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* **2004**; 4 (10): 762.
209. **Liu Q, Zhang C, Sun A, Zheng Y, Wang L, Cao X.** Tumor-educated CD11b^{high}IL10^{low} regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I. *J Immunol* **2009**; 182 (10): 6207.
210. **Bladon J, Taylor P.** Extracorporeal photopheresis normalizes some lymphocyte subsets (including T regulatory cells) in chronic graft-versus-host-disease. *Ther Apher Dial* **2008**; 12 (4): 311.
211. **Biagi E, Di Biaso I, Leoni V, et al.** Extracorporeal photochemotherapy is accompanied by increasing levels of circulating CD4⁺CD25⁺GITR⁺Foxp3⁺CD62L⁺ functional regulatory T-cells in patients with graft-versus-host disease. *Transplantation* **2007**; 84 (1): 31.
212. **Rubegni P, Sbano P, Cevenini G, et al.** CD4⁺CD25⁺ lymphocyte subsets in chronic graft versus host disease patients undergoing extracorporeal photochemotherapy. *Int J Immunopathol Pharmacol* **2007**; 20 (4): 801.
213. **Lamioni A, Parisi F, Isacchi G, et al.** The immunological effects of extracorporeal photopheresis unraveled: induction of tolerogenic dendritic cells in vitro and regulatory T cells in vivo. *Transplantation* **2005**; 79 (7): 846.
214. **Lamioni A, Carsetti R, Legato A, et al.** Induction of Regulatory T Cells After Prophylactic Treatment With Photopheresis in Renal Transplant Recipients. *Transplantation* **2007**; 83 (10): 1393.
215. **Schmitt S, Johnson TS, Karakhanova S, Naher H, Mahnke K, Enk AH.** Extracorporeal photopheresis augments function of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells by triggering adenosine production. *Transplantation* **2009**; 88 (3): 411.
216. **Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al.** Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* **2007**; 110 (4): 1225.
217. **Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al.** Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* **2007**; 204 (6): 1257.
218. **Maeda A, Schwarz A, Bullinger A, Morita A, Peritt D, Schwarz T.** Experimental Extracorporeal Photopheresis Inhibits the Sensitization and Effector Phases of Contact Hypersensitivity via Two Mechanisms: Generation of IL-10 and Induction of Regulatory T Cells. *J Immunol* **2008**; 181 (9): 5956.

219. **Gatza E, Rogers CE, Clouthier SG, et al.** Extracorporeal photopheresis reverses experimental graft-versus-host disease through regulatory T cells. **Blood** 2008; 112 (4): 1515.
220. **Heid JB, Schmidt A, Oberle N, et al.** FOXP3(+)CD25(-) Tumor Cells with Regulatory Function in Sezary Syndrome. **J Invest Dermatol** 2009.
221. **Jiang H, Chess L.** Qa-1/HLA-E-restricted regulatory CD8+ T cells and self-nonsel discrimination: An essay on peripheral T-cell regulation. **Hum Immunol** 2008.
222. **Ferrara JL.** Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors. **J Hematother Stem Cell Res** 2000; 9 (3): 299.
223. **Johansson U, Walther-Jallow L, Smed-Sorensen A, Spetz AL.** Triggering of dendritic cell responses after exposure to activated, but not resting, apoptotic PBMCs. **J Immunol** 2007; 179 (3): 1711.
224. **Brochu S, Baron C, Hetu F, Roy DC, Perreault C.** Oligoclonal expansion of CTLs directed against a restricted number of dominant minor histocompatibility antigens in hemopoietic chimeras. **J Immunol** 1995; 155 (11): 5104.
225. **Toubai T, Sun Y, Reddy P.** GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? **Best Pract Res Clin Haematol** 2008; 21 (2): 101.
226. **French LE, Lessin SR, Addya K, et al.** Identification of clonal T cells in the blood of patients with systemic sclerosis: positive correlation with response to photopheresis. **Arch Dermatol** 2001; 137 (10): 1309.

Résumé :

La photochimiothérapie extracorporelle (PCE) est une thérapie cellulaire prometteuse utilisée avec succès dans le traitement de pathologies impliquant des lymphocytes T (LT) telles que les lymphomes T cutanés et la GvHD. Contrairement aux immunosuppresseurs, la PCE semble induire une immunomodulation dirigée spécifiquement à l'encontre des LT « pathogènes » sans immunosuppression généralisée, cependant son mode d'action reste inconnu.

Afin de comprendre ces mécanismes d'action, nous avons caractérisé dans un premier temps l'effet de la PCE sur la fonctionnalité des monocytes présents en forte proportion dans l'échantillon traité. Ils entrent en apoptose lente et les cellules encore vivantes conservent leur propriétés fonctionnelles.

Dans la GvHD, nous avons montré qu'après PCE, les LT « pathogènes » activés entraînent plus rapidement en apoptose que les LT « normaux » au repos. L'apoptose des LT activés est immunogène et induit la maturation des cellules dendritiques, leur conférant des propriétés de stimulation T plus fortes tout en diminuant la proportion de T régulateurs induits. Nous développons un modèle *in vitro* afin de mettre en évidence l'induction d'une réponse anti-clonotypique fortement suggérée par nos résultats.

Enfin, en collaborant avec des pédiatres oncologues, nous avons participé au développement d'un modèle *in vitro* pré-clinique validant un protocole allégé de la technique pour le traitement de la GvHD en pédiatrie, conduisant à l'ouverture d'un essai clinique.

Nos travaux constituent une étape clé dans la compréhension des mécanismes d'action de la PCE et contribuent à l'amélioration des pratiques cliniques et ainsi de la qualité de vie des patients.

Mots Clés : PhotoChimiothérapie Extracorporelle, Apoptose, Réponse anti-clonotypique, GvHD

Abstract :

Extracorporeal Photochemotherapy (ECP) is a promising cell therapy currently used in the treatment of T cell-mediated diseases such as Cutaneous T cell lymphoma and GvHD. Conversely to immunosuppressive drugs, ECP appears to induce an immunomodulation specifically directed toward "pathogenic" T cells, without causing generalized immunosuppression. However, its mechanisms of action are not well understood.

To gain further insight in these mechanisms, we first characterized the effects of ECP on Monocytes which represent a large proportion of treated cells. ECP induces a slow apoptosis of monocytes while surviving treated cells conserve their functionalities.

In GvHD, we show that following ECP, "pathogenic" activated T cells undergo faster apoptosis than "normal" resting T cells. ECP induced apoptosis is immunogenic and activated-treated cells trigger dendritic cell maturation, increasing their capacity to stimulate T cells with a reduced proportion of induced-regulatory T cells. We are developing an *in vitro* model to identify an anti-clonotypic response which is strongly suggested by our data.

Finally, in collaboration with Paediatric oncologists, we participated in the development of a pre-clinical *in vitro* model validating a less invasive protocol for the technique for treating paediatric GvHD patients. A clinical trial has been started to evaluate this protocol.

This work represents a key step in the understanding of the mechanisms of action of ECP and contributes to an improvement of clinical practices and thus, a better patients' quality of life.

Keywords : Extracorporeal Photochemotherapy, Apoptosis, Anti-Clonotypic Response, GvHD