



Etude des mécanismes d'action de la photochimiothérapie extracorporelle

Céline Coppard

► To cite this version:

Céline Coppard. Etude des mécanismes d'action de la photochimiothérapie extracorporelle. Immunologie. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV055 . tel-01691026

HAL Id: tel-01691026

<https://theses.hal.science/tel-01691026>

Submitted on 23 Jan 2018

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : Virologie – Microbiologie - **Immunologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Céline COPPARD

Thèse dirigée par **Mme le docteur Laurence Chaperot** (EFS) et
codirigée par **Madame le docteur Françoise GABERT** (UGA)

préparée au sein du **Laboratoire « Immunobiology and
Immunotherapy in chronic diseases »**, IAB UMR1209 INSERM
/ CNRS/ UGA / Etablissement Français du Sang
dans l'**École Doctorale de Chimie et Science du Vivant
(EDSCV)**

Etude des mécanismes d'action de la Photochimiothérapie extracorporelle

Thèse soutenue publiquement le **25 septembre 2017**,
devant le jury composé de :

Mme. le Pr. Nathalie CHAPUT-GRAS Université de Paris Sud	Rapporteur
Mr. le Pr. Hervé BENOIST Université de Toulouse	Rapporteur
Mr. le Dr. Sylvain PERRUCHE Université Bourgogne Franche-Comté	Président Jury
Mr. le Dr. Serge CANDEIAS Université Grenoble Alpes	Examineur
Mr. le Dr. Philippe FRACHET Université Grenoble Alpes	Examineur
Mme. le Dr. Laurence CHAPEROT Université Grenoble Alpes	Examineur
Mme. le Dr. Françoise GABERT Université Grenoble Alpes	Co-Directrice de Thèse



« Aucune science ne profite à celui qui n'y prend goût »

Fernando de Rojas, XVIème siècle

Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier mes deux directrices de thèse, Laurence Chaperot et Françoise Gabert pour m'avoir donné la chance de réaliser ma thèse, leur soutien, leurs conseils, mais avant tout j'ai envie de les remercier pour leur compréhension et leur énorme capacité humaine qu'elles possèdent toutes les deux, qui aujourd'hui est un peu mis de côté dans le monde de la science... Merci.

J'exprime ma gratitude aux deux professeurs qui ont accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, les professeurs Nathalie Chaput et Hervé Benoist pour avoir pris le temps de relire entièrement et en détail ma thèse et pour m'avoir donné l'opportunité de la présenter. Aux docteurs Philippe Frachet, Serge Candéias et Sylvain Perruche d'accepter d'évaluer mon travail en tant qu'examinateur.

Un merci tout particulier à Sylvain Perruche et Serge Candéias, qui m'ont fait l'honneur de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Merci pour vos précieux conseils, votre accompagnement, votre recul sur le sujet et pour vos rassurantes appréciations lors de mon dernier CST. Sylvain, je tiens également à te remercier pour m'avoir accueilli au sein de ton laboratoire à Besançon et pour l'aide fournie lors de notre collaboration.

De ce fait, je remercie également Francis Bonnefoy pour m'avoir accordé une partie de son précieux temps afin d'apprendre à maîtriser le modèle murin.

Merci à Omayra, qui m'a intégré au sein du laboratoire de Besançon, mais également auprès de ses amis... Gracias Omy !

Merci à toi Napo... Je crois qu'il est difficile de retranscrire sur papier combien je dois te remercier ! Tes convictions scientifiques, ton amour pour la science, tes conseils, tes mots toujours positifs qui nous tire vers l'avant et ta bonne humeur (surtout après 50 IV) sont un exemple !

Merci mon Castor pour tes conseils, tes blagues, tes pronostics météo, nos grands moments de comptage thymidine et pour m'avoir accompagné pendant ces 3 années de thèse.

Merci ma Tanita de m'avoir adopté dès le début au sein du labo, pour nos grands moments de discussion, pour ton soutien moral et pour être devenue une très bonne amie au fil du temps !

Merci à ma Noufnouf de m'avoir fait une place au labo dès mon arrivée, de ta franchise, de tes conseils (surtout manicure ! je plaisante !!) et d'avoir malgré la distance été à mes côtés pendant ces 3 ans de pur bonheur !!

Je tiens également à remercier les autres membres du labo, notamment Kévin pour avoir instauré dès ton arrivée une ambiance made in Zouk, pour ta bonne humeur et tes

bonnes vieilles blagues bien pourries ! L'intrus nommé Dindounette, pour tes « coucous » en speed, pour nos discussions de thésards déprimés et pour avoir été dans la même galère que moi et... en même temps ! A Quick pour tes bons conseils et nos moments de rigolade ! Merci Caro, pour être l'exemple de ce labo et pour la passion dont tu fais preuve au quotidien pour ton travail et pour la science (Vive les pDCs et le T $\gamma\delta$!!). Merci Gatto (même si tu fais partie de la com', tu fais quand même plus partie du labo !), pour ton soutien et ta motivation (surtout pour l'apéro !), Khémary, Olivier (le Texan !!), Manu (Chori !) Laurissa et les autres...

Merci à tous les membres de l'EFS avec qui j'ai eu de nombreuses discussions notamment Mireille, Michelle, Nicole et plus récemment Joëlle.

Merci aux docteurs Marta Alarcón et Concepción Marañón de m'avoir donné la chance de vous rencontrer, de profiter de vos conseils et expériences ainsi que de m'avoir guidé dans mes débuts au sein d'un laboratoire. Gracias por todo !

Merci à tous mes amis, d'ici et d'ailleurs !!! Merci à ma « famille » française : TomTom, Sisi, Pépette, Max, Charlie, Susu, Chloé, Mimi, ... et à mi « familia » española : Ale, Chipi, Raul, Negro, Raquel, Cristian, Llamas, las chicas de la facu, ... pour votre soutien malgré la distance pour certains et pour les nombreux moments que j'ai passé auprès de vous tout au long de ces années !

Merci à toi Dou, pour ta patience au quotidien et lors de mes « pétages » de câbles, pour ton amour, mais également pour ta capacité à croire en moi et en ce que je fais (ça m'aide vraiment !) ... Merci beaucoup ! Je t'aime !

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement toute ma famille sans qui ce travail n'aurait pas existé et sans qui je ne serai pas ce que je suis aujourd'hui (ce qui serait dommage !!! ahahahah), merci de supporter mes humeurs et la personne pas toujours facile que je suis ! Merci ma mounette ! Merci Jo ! Merci mon petit padre... Je vous aime !

Je dédicace ce travail à toute ma famille, notamment à Nana et Lionel...

Table des Matières

INTRODUCTION.....	9
I. La Photochimiothérapie Extracorporelle.....	13
A. Un peu d’histoire.....	13
B. La PCE.....	14
C. Les effets directs du traitement PUVA	17
D. Les effets indirects de la PCE	18
II. Le lymphome T cutané.....	20
A. Les différents types de CTCL	20
a. Mycosis Fongoïde	20
b. Syndrome de Sézary	21
B. Application de la PCE dans le CTCL	22
a. Données cliniques.....	22
b. Données biologiques	25
III. La maladie du greffon contre l’hôte	26
A. Définition et physiopathologie	28
a. GvHD aigüe.....	28
b. GvHD chronique	30
B. Données cliniques de la PCE sur la GvHD.....	31
a. Réponses chez les patients.....	31
b. Analyses cellulaires	34
C. Modèles murins de GvHD	36
IV. La polyarthrite rhumatoïde.....	37
A. Polyarthrite rhumatoïde et PCE.....	37
a. Physiopathologie	37
b. Etudes cliniques.....	39
B. Modèles murins	40
V. Les mécanismes d’action de la PCE.....	42
A. Rétrospectives	42
B. Réinjection de cellules apoptotiques et conséquences sur le système immunitaire dans différentes situations	43
a. Modèles de réinjection de cellules apoptotiques associés à un effet tolérogène et PCE	44

i.	Concept de mort immunogène dans le cancer	48
ii.	Mort immunogène et Thérapie Photo-Dynamique	51
iii.	Mort immunogène et PCE – Hypothèse	52
C.	Prise en charge de cellules apoptotiques	55
a.	Reconnaissance des cellules apoptotiques.....	55
b.	Prise en charge des cellules apoptotiques et ses conséquences, maturation des APCs ? ..	57
D.	Comment la PCE pourrait-elle induire une réponse spécifique des T pathogènes ?....	64
E.	Hypothèses émises des mécanismes d'action de la PCE	68
RESULTATS ET DISCUSSION.....		71
 Chapitre I: Etudes <i>in vitro</i> des mécanismes d'action du traitement PUVA: Cellules alloréactives actives		
		73
A.	Matériels et méthodes.....	75
B.	Résultats	80
C.	Conclusions	96
D.	Discussion et perspectives.....	97
 Chapitre II: Etudes des mécanismes d'action du traitement PCE in vivo: Modèle de polyarthrite rhumatoïde murine		
		103
A.	Matériels et méthodes.....	105
B.	Résultats	107
C.	Conclusions	117
D.	Discussion et perspectives.....	117
CONCLUSIONS		121
ANNEXES.....		Error! Bookmark not defined.
BIBLIOGRAPHIE		125

INTRODUCTION

Table des Abréviations

PCE :	PhotoChimiothérapie Extracorporelle
8-MOP :	8-Méthoxypsoralène
CTCL :	Lymphome Cutané à cellules T
GvHD :	Graft-versus-Host Disease
aGvHD :	GvHD aiguë
cGvHD :	GvHD chronique
PUVA :	Psoralène + UV-A
PBMCs :	Peripheral Blood Mononuclear Cells/ Cellules mononucléées
moDCs :	monocyte derived Dendritic Cells
APCs :	Antigen presenting cells/ Cellules présentatrices d'antigènes
DC :	Dendritic cells / Cellules dendritiques
pDC :	plasmacytoid Dendritic Cells/ Cellule dendritique plasmacytoïde
mDC :	myeloid Dendritic Cell/ cellule dendritique myéloïde
CSH :	Cellule Souche Hématopoïétique
MHC :	Major Histocompatibility Complex/ Complexe majeur d'histocompatibilité
mHA :	minor Histocompatibility Antigen/ Antigène mineur d'histocompatibilité
IL :	Interleukine
CTL :	Cytotoxic T lymphocyte/ Lymphocyte T cytotoxique
NK :	Natural killer
LT :	Lymphocyte T
LTreg :	Lymphocyte T régulateur
iTreg :	Lymphocyte T régulateur induit
SlanDC :	6-SulfoLacNac dendritic cell
MDSC :	Myeloid-derived suppressor cell/ cellule myéloïde suppressive
MF :	Mycosis fongoïde
SS :	Syndrome de Sézary
CIA :	Collagen induced arthritis
CFA :	Complete Freund adjuvant/ Adjuvant complet de Freund
CII :	Collagen bovin de type 2
EAE :	Experimental autoimmune encephalomyelitis
CHS :	Hypersensibilité de contact
DAMPs :	Damage-associated molecular patterns
CRT :	Calréticuline
HMGB1 :	High mobility group box 1
PDT :	Photodynamic therapy/ Thérapie photodynamique
RE :	Réticulum Endoplasmique

I. La Photochimiothérapie Extracorporelle

A. Un peu d'histoire

La photothérapie est utilisée depuis de très nombreuses années. Les égyptiens, le long du Nil ingéraient les feuilles d'une plante appartenant à la famille des Apiacées, l'Ammi majus, pour ensuite s'exposer au soleil. Cette technique était utilisée afin de traiter le vitiligo (maladie auto-immune responsable d'une dépigmentation de la peau). A cette époque, ils étaient déjà conscients que l'association de cette plante et de la lumière était essentielle au bon fonctionnement de ce traitement (1).



Figure 1. L'Ammi majus, plante d'où a été extrait le 8-méthoxypsoralène

En 1948, Fahmy réussit à purifier et caractériser le principe actif de l'Ammi majus, le 8-méthoxypsoralène (8-MOP) (2). Cette molécule sera ensuite utilisée par Parrish, pour le développement du traitement PUVA (ingestion de méthoxalène + exposition à une lumière de haute longueur d'onde, UV-A (320-340nm) comme thérapie contre le psoriasis (3). Le 8-MOP était ingéré par les patients et les zones à traiter étaient exposées aux UV-A 1 à 2h après.

C'est en 1987 que R. Edelson développe la photochimiothérapie extracorporelle « moderne », dans le traitement de la forme avancée du lymphome cutané à cellules T, le syndrome de Sézary (4). Dans ce contexte de photochimiothérapie, le 8-MOP est administré par voie orale. Deux heures plus tard, les cellules mononucléées sont prélevées par cytophérèse et irradiées aux UV-A. Les données cliniques montraient cependant que les patients développaient des effets secondaires liés à l'ingestion du 8-MOP, au niveau oculaire et intestinal (nausée, vomissement), ainsi qu'une certaine photosensibilité. De plus, la variabilité d'absorption gastrointestinale provoquait des variations quant

à la concentration sanguine de 8-MOP et donc une différence quant à sa pharmacocinétique ; un suivi des fonctions hépatiques était également nécessaire puisque le 8-MOP est métabolisé par le foie (5).

Ce n'est qu'en 1992 que le 8-MOP commence à être injecté directement dans la poche de cellules mononucléées préalablement prélevées par leucaphérèse. La poche est ensuite irradiée aux UV-A et les cellules réinjectées par voie intraveineuse au patient, évitant ainsi les différents effets secondaires liés à l'ingestion du 8-MOP et à l'irradiation directe du patient, c'est la **Photochimiothérapie extracorporelle** telle qu'on la connaît aujourd'hui (6-8). La thérapie PUVA, d'irradiation directe de la peau après ingestion de 8-MOP, reste aujourd'hui utilisée pour le traitement de certaines maladies de la peau, telle que le psoriasis ou encore les formes exclusivement cutanées du CTCL.

La PCE a été approuvée pour le traitement du CTCL, par la US Food and Drug Administration (FDA), en 1988. Depuis, elle est utilisée dans le monde entier, pour le traitement de nombreuses pathologies (que nous verrons dans les chapitres à venir) selon deux types de procédure, qui se définissent par l'appareillage utilisé :

- Le système en ligne (online) qui comprend un appareil unique réalisant la séparation cellulaire, l'injection de 8-MOP, l'irradiation ainsi que la réinjection (THERAKOS™ CELLEX™, Johnson & Johnson company). Ce système est le seul approuvé par la FDA, aux Etats Unis, puisqu'il limite les risques d'erreur et d'infection.
- Le système dissocié (off-line), où la séparation cellulaire et l'irradiation se font dans deux appareils différents (9). Ce système est beaucoup utilisé en France.

B. La PCE

La Photochimiothérapie extracorporelle (PCE) telle qu'utilisée actuellement est une immunothérapie autologue basée sur la réinjection de cellules photochimiquement modifiées. Elle consiste à prélever par aphérèse les cellules mononucléées (PBMCs) d'un patient, les mettre en présence d'un agent photosensibilisant, le 8-methoxypsoralène (8-MOP), les irradier par rayonnement UV-A (320-400nm) ($2\text{J}/\text{cm}^2$) pour ensuite les réinjecter par voie intraveineuse au patient (10). Les travaux de Just et al. ont montré grâce au marquage à l'indium des cellules, qu'après traitement PCE, les PBMCs s'accumulaient rapidement au niveau de la rate et du foie (11).

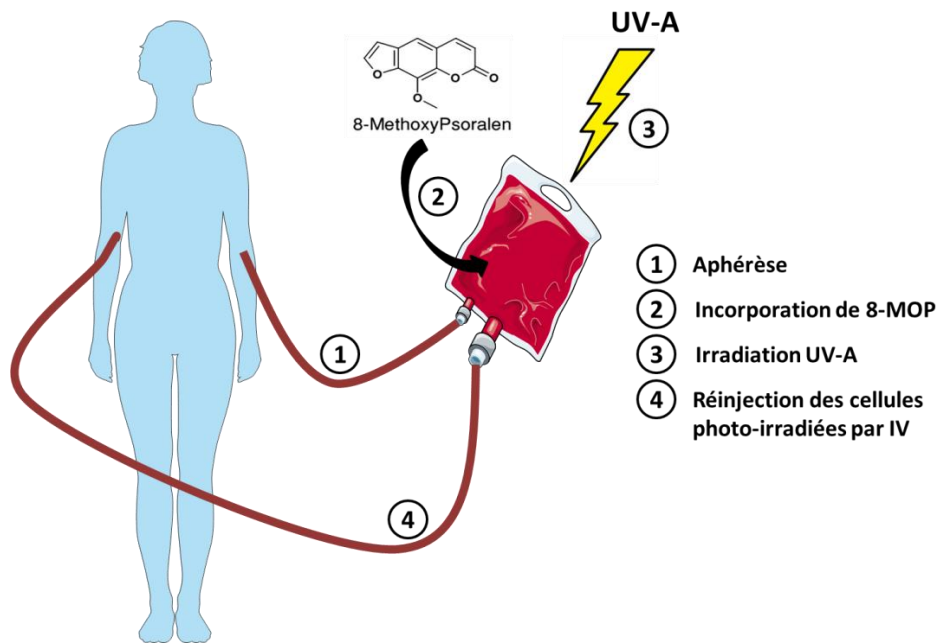


Figure 2 : Schéma du processus de traitement par photochimiothérapie extracorporelle (PCE) chez un patient.

La PCE est utilisée depuis 1988, en première ligne de traitement pour le syndrome de Sézary. Aujourd'hui elle est également utilisée en deuxième ligne de traitement de différentes pathologies telles que la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD : Graft versus Host Disease) (12-14), certains rejets de greffe d'organe (cœur ou des poumons) (15-17) ou encore certaines maladies auto-immunes (psoriasis, polyarthrite rhumatoïde, maladie de Crohn, etc...)(18, 19). De nombreuses études cliniques ont été réalisées sur l'application de la PCE dans le traitement de ces différentes pathologies (Table 1).

Ces pathologies, bien que très diverses, possèdent un point en commun : la présence de lymphocytes T « pathogènes » circulants, qu'ils soient tumoraux dans le cas du syndrome de Sézary, alloréactifs pour la GvHD et les rejets de greffe ou encore auto-immuns pour les pathologies auto-immunes. Ces Lymphocytes T « pathogènes » sont impliqués dans l'induction, le développement et le maintien de ces pathologies. La présence de lymphocytes T « pathogènes » dans l'échantillon traité semble être essentielle pour le bon fonctionnement et l'efficacité du traitement (10, 20). Lors d'un traitement PCE, seule une fraction de lymphocytes T « pathogènes » du patient sont traités et non l'ensemble.

Pathologies		Etudes Cliniques	Nb de patients
CTCL	Mycosis Fongoide erythémateux	34	857
	Syndrome de Sézary		
GvHD	GvHD aigue	10	235
	GvHD chronique	22	656
Pathologies auto-immunes	Sclérose systémique	12	179
	Maladie de Crohn	5	72
	Sclérose en plaque	4	27
	Lupus erythémateux systémique	6	17
	Polyarthrite Rhumatoïde	2	15
Rejet d'organes	Poumons	11	170
	Cœur	6	124

Tableau 1. Tableau récapitulatif des différentes pathologies traitées par PCE et de leurs principales études cliniques. Synthèse des revues (5, 19, 21).

Dans le cas du traitement du CTCL, les patients sont généralement traités pendant 2 jours consécutifs, toutes les 2 ou 3 semaines, pendant 6 mois. Il existe cependant une grande variété de procédures selon les indications, les centres de soin, ou encore l'état de santé des patients (5). Chaque procédure de traitement PCE dure en moyenne 3h.

In vitro le traitement PCE est couramment appelé PUVA (Psoralène + UV-A) : les cellules mononucléées traitées sont mises en présence de 8-MOP (200ng/ml final) et sont irradiées aux UV-A (2J/cm²).

Comme nous le verrons dans les paragraphes à venir, la PCE va avoir un effet direct sur les cellules traitées, mais va également engendrer une réponse indirecte entraînant la modulation du système immunitaire après réinjection des cellules traitées par PUVA.

C. Les effets directs du traitement PUVA

Le 8-méthoxypsoralène (8-MOP), de la famille des furocoumarines, est un agent intercalant de l'ADN, photoactivable.

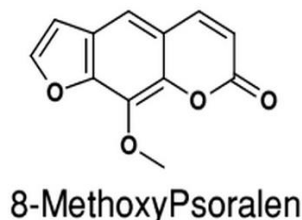


Figure 3 : Formule chimique du 8-méthoxypsoralène(8-MOP)

Dans le contexte de la PCE, le 8-MOP est injecté dans la poche de PBMCs, il va alors pénétrer à l'intérieur des cellules, jusqu'au noyau. Cette molécule non-activée n'a aucun effet. Ce n'est que lorsque le 8-MOP est activé par un rayonnement compris entre 320 et 400nm (UV-A) qu'il forme des liaisons covalentes avec des bases pyrimidiques, entre les deux brins d'ADN, (22, 23). Ces liaisons aberrantes et leur non-réparation par les systèmes cellulaires vont provoquer l'entrée en apoptose des cellules traitées, notamment des cellules T (24-26). Selon certaines études, 12h après la fin du traitement, 20% des lymphocytes T sont apoptotiques, environ 50% après 24h et 90% après 48h (27, 28). La durée du traitement PCE est en moyenne de 3h, les cellules T traitées, réinjectées au patient se trouvent donc en phase d'entrée en apoptose, en apoptose précoce.

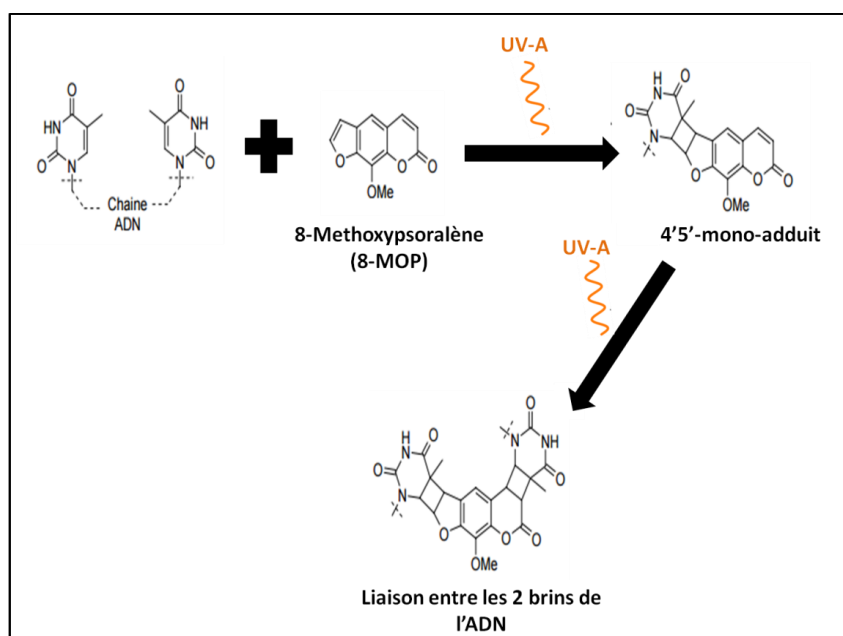


Figure 4 : Schéma des liaisons possibles du 8-MOP avec une molécule d'ADN en présence de rayons UV-A. Le 8-MOP en captant un photon va s'associer à une base azotée (Thymidine) de l'ADN et former un mono-adduit (4'5' ou 3,4-mono-adduit), la présence d'un deuxième photon va provoquer la liaison de ce mono-adduit à une autre base azotée et créer la liaison covalente entre les 2 brins de l'ADN, bloquant ainsi sa réplication. Inspiré du schéma de Gasparro(23).

Le 8-MOP est également capable de se lier à d'autres composants de la cellule tels que les protéines ou encore les lipides (29). Sa liaison avec les protéines se fait à travers certains acides aminés : l'histidine, la tyrosine, la phénylalanine ou le tryptophane et provoquerait la dégradation de ces protéines (30, 31). Les lipides sont également une cible du 8-MOP, sa liaison avec certains phospholipides de la membrane a été montrée (32).

En ce qui concerne l'apoptose des Lymphocytes T, des études ont montré que leur apoptose était d'autant plus rapide qu'ils étaient activés (28, 33). Dans l'étude de l'apoptose des lymphocytes T après traitement PUVA faite par Hannani et al. au sein du laboratoire, il est montré qu'à 24h, 78.5% des lymphocytes T alloréactifs activés traités PUVA sont apoptotiques contre 50% des lymphocytes T au repos. La cinétique d'apoptose des Lymphocytes T activés (HLA-DR+) traités PUVA est plus rapide que celle des Lymphocytes T au repos (28).

Parmi les cellules mononucléées, le devenir des monocytes après traitement PUVA est quant à lui plus controversé selon les modalités d'étude. L'équipe d'Edelson a montré que des monocytes issus de cellules mononucléées préalablement prélevés par aphérèse, soumis au traitement PUVA *in vitro* ne meurent pas et sont capables de se différencier en moDCs grâce notamment à leur interaction avec les plaquettes et le plastique de la poche (34, 35). Ces cellules présentatrices d'antigènes (APCs) seraient capables de présenter les antigènes issus des Lymphocytes T pathogènes aux Lymphocytes T non traités du patient, après réinjection.

Au sein de notre laboratoire, Hannani et collab. ont montré qu'après traitement PUVA les monocytes purifiés mouraient par apoptose, avec cependant une cinétique plus lente que celle des lymphocytes T ; il faut attendre 6 jours pour atteindre 80% d'apoptose des monocytes alors que seulement 48h sont nécessaires pour les Lymphocytes T (36). Des résultats similaires quant à l'apoptose des monocytes lors du traitement PUVA ont été obtenus par d'autres laboratoires (27, 37). L'effet du traitement PUVA après réinjection au patient serait dû, indirectement, à la prise en charge des cellules T « pathogènes » apoptotiques par les différentes APCs non traitées du patient et non pas par la prise en charge directe par les APCs traitées, contenues dans la poche de prélèvement (hypothèse de transimmunisation de l'équipe d'Edelson (38, 39)).

Une donnée importante à noter est que la cinétique d'apoptose induite par le traitement PCE *in vivo* est la même que lorsque les cellules sont traitées PUVA *in vitro* (27).

D. Les effets indirects de la PCE

Comme nous venons de le voir, la mise en présence des cellules avec le 8-MOP et leur irradiation UV-A provoquent l'entrée en apoptose, notamment des lymphocytes T. Lors d'un traitement PCE, une fraction (environ 5 à 10%), des lymphocytes T circulants totaux (contenant en partie des Lymphocytes T « pathogènes ») sont traités (40) et réinjectés au patient. Les résultats obtenus chez les patients montrent une amélioration globale systémique de l'état de certains de ces patients avec la disparition totale des lymphocytes T « pathogènes ». Cela suggère donc l'existence d'un mécanisme indirect induit par la réinjection de ces lymphocytes T « pathogènes » en voie

d'apoptose permettant de réguler ou éliminer la totalité des lymphocytes T responsables de la pathologie, on peut parler d'une immunomodulation.

Les données cliniques obtenues après traitement PCE chez des patients ne montrent pas d'immunosuppression généralisée, ni d'effets secondaires autres que ceux liés à l'aphérèse. En effet, le traitement PCE provoque une disparition du clone T pathogène circulant chez des patients atteints de CTCL, une amélioration de la pathologie chez les patients atteints de GvHD qui se traduit par la diminution de leur prise d'immunosuppresseurs voire même leur arrêt (13, 14, 41). Ces données cliniques suggèrent que la PCE pourrait donc être responsable d'une immunomodulation spécifique à l'encontre des T pathogènes.

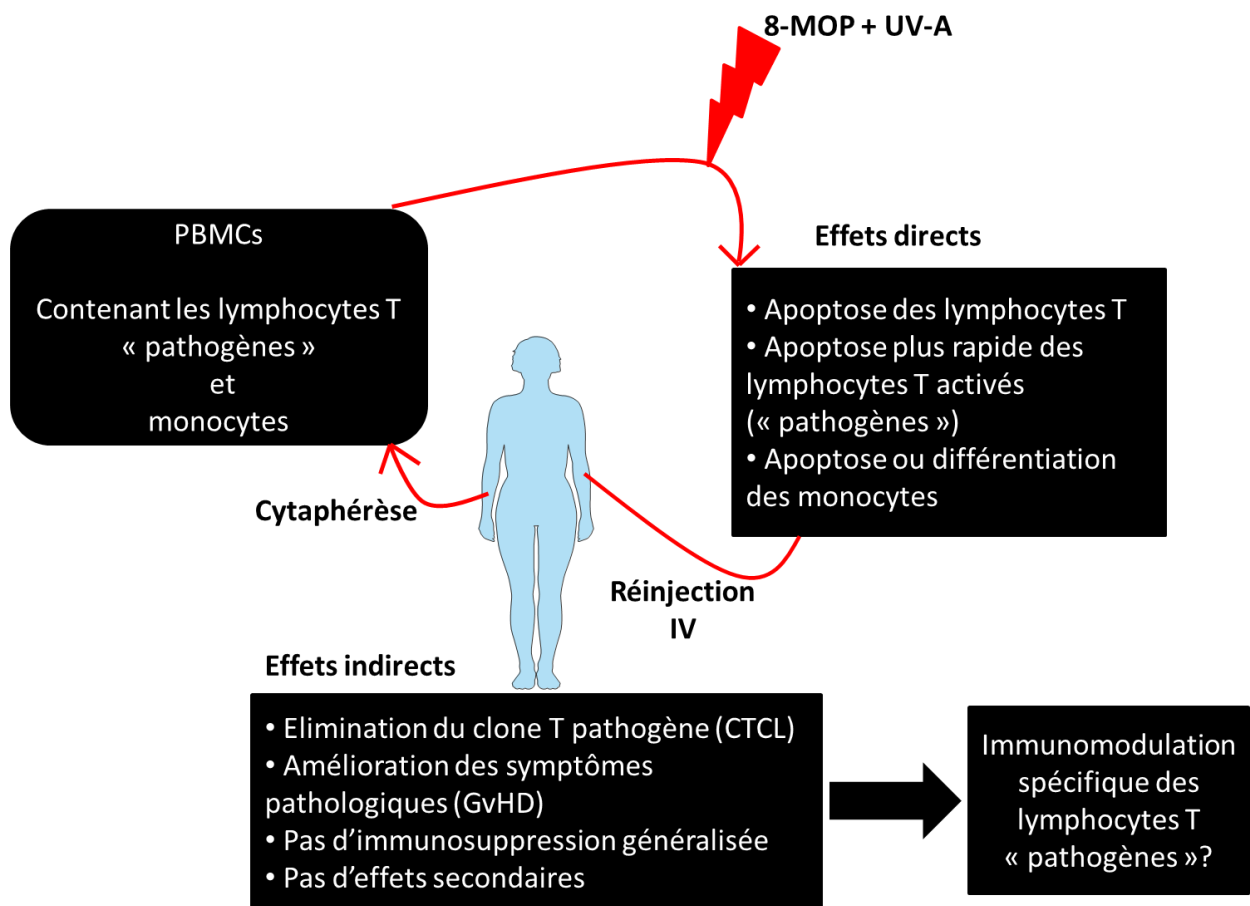


Figure 5 : Schéma récapitulatif des effets directs et indirects de la PCE

Avant d'aborder les différentes hypothèses des mécanismes d'action de la PCE, nous allons détailler 3 situations cliniques (le CTCL, la GvHD et la polyarthrite rhumatoïde) d'utilisation de la PCE qui ont permis de développer des hypothèses quant aux mécanismes d'action impliqués dans l'effet thérapeutique de la PCE.

II. Le lymphome T cutané

Le lymphome cutané à cellules T (CTCL) est décrit comme un groupe hétérogène de maladies lymphoprolifératives non-Hodgkiniennes rares, caractérisé par l'infiltration de clones de lymphocytes T « pathogènes » dans la peau. L'incidence annuelle des CTCLs est de 0,5 pour 100 000 personnes (42).

Les types de CTCLs les plus communs sont le mycosis Fongoïdes, le syndrome de Sézary et les pathologies lymphoprolifératives primaires cutanées CD30+ (7, 43, 44).

Nous aborderons la définition du syndrome de Sézary et des mycosis Fongoïdes, leurs immunophénotypes et également quelles sont les différentes études réalisées sur l'application de la PCE comme traitement de ces pathologies. En revanche, les autres types de CTCLs ne seront pas abordés puisque la PCE n'est pas utilisée pour le traitement de ces pathologies.

A. Les différents types de CTCL

a. *Mycosis Fongoïde*

Le Mycosis Fongoïde (MF), longtemps appelé la maladie d'Alibert, est la forme la plus commune des CTCLs, il représente 60% des lymphomes T cutanés primaires. Cette pathologie est souvent diagnostiquée chez des patients âgés de 55 à 60 ans, plus fréquente chez les hommes que chez les femmes (2/1) et est généralement d'évolution lente et indolore.

Le MF est caractérisé par la prolifération et l'accumulation dans la peau de lymphocytes T mémoires, de taille petite ou moyenne, avec un noyau cérébriforme, de phénotype CD3+, CD4+, CD45RO+, CD8⁻ (dans certains cas rares, les Lymphocytes T tumoraux peuvent être CD4- CD8+). Près de 84% des échantillons prélevés dans des lésions cutanées montrent la présence d'une population T clonale.

Au début de la pathologie, le principal symptôme est le prurit (démangeaisons) de certaines parties de la peau, où ensuite on observe l'apparition de « patchs érythémateux » et de plaques rouges, parfois recouvertes de fines pellicules, des squames. Des microabcès de Pautrier sont également présents au niveau de l'épiderme (agrégats de Lymphocytes T « pathogènes » et de cellules de langherhans). La maladie peut évoluer vers l'apparition de tumeur cutanée (5, 7, 45-47).

Le pronostic vital des patients atteints de Mycosis Fongoïde va dépendre du stade de leur pathologie. Si les patients ont une atteinte cutanée inférieure à 10%, leur moyenne de survie est supérieure à 10 ans, dans 97-98% des cas. Lorsque ces patients atteignent le stade tumoral, 42% d'entre eux ont une médiane de survie supérieure à 10 ans et seulement 20% si les ganglions lymphatiques sont atteints.

b. Syndrome de Sézary

Le syndrome de Sézary (SS) est quant à lui la forme la plus agressive des lymphomes cutanés à cellules T. Il s'agit d'une pathologie rare (5% des CTCL) qui apparaît exclusivement chez les adultes. C'est la forme leucémique du CTCL dans laquelle, la population clonale dominante de cellules T (CD4+) circule dans le sang (+ de 5% des LTs périphériques) et peut affecter des organes internes tels que les poumons ou encore la rate (48).

Le SS est cliniquement caractérisé par la présence d'érythrodermie, de lymphadénopathie généralisée et de cellules T néoplasiques (cellules de Sézary) dans la peau, les ganglions lymphatiques et le sang périphérique. Les cellules de Sézary possèdent un noyau enroulé sur lui-même (concovoluté), ont un immunophénotypage de type CD3+, CD4+, CD8- et souvent perdent l'un des antigènes panT tels que le CD7, le CD5, ou encore le CD26. La présence d'un clone T « pathogène » dans le sang périphérique permet de différencier le diagnostic d'un SS, de celui d'un autre type de pathologie. Ce clone T « pathogène » peut représenter dans certains cas, jusqu'à 90% des lymphocytes T périphériques (5, 7, 45-47).

Le pronostic vital des patients atteints du syndrome de Sézary est très engagé puisque la moyenne de survie est de 2 à 4 ans. Une étude faite sur une cohorte de 52 patients allemands et autrichiens entre 1986 et 2002 montre que seuls 24% des patients survivent 5 ans après le diagnostic de leur pathologie (45).

Les étiologies du syndrome de Sézary comme du mycosis fongoïde sont aujourd'hui peu connues. Certains auteurs maintiennent l'hypothèse que l'activation des cellules de la peau par des bactéries (*Staphylococcus aureus* et *Chlamydia pneumoniae*) pourrait être à l'origine de ces pathologies (49, 50). D'autres évoquent plutôt une implication virale (51). Les cellules dendritiques semblent avoir un rôle dans la pathogénèse, notamment en favorisant la survie et de la prolifération des Lymphocytes T « pathogènes ».

L'équipe d'Edelson (48, 47) suggère que les lymphocytes T CD4+ tumoraux monoclonaux reconnaissent un antigène spécifique présenté par les cellules de Langherhans (cellules qui selon cette hypothèse seraient infectées par un rétrovirus). Les lymphocytes T pourraient être continuellement activés du fait de l'interaction entre le TCR clonal et le peptide antigénique spécifique présenté par les molécules du HLA à la surface de ces cellules dendritiques (DCs). Au niveau des lésions cutanées se trouvent, des cellules CTCL, mais également des DCs, qui pourraient jouer un rôle dans la stimulation du CTCL (52, 53). De plus, les cellules CTCL pourraient produire et relarguer des cytokines anti-inflammatoires telle que l'Il-10, inhibant ainsi les réponses immunes de l'hôte et favorisant la prolifération des T pathogènes. Cette hypothèse pourrait expliquer l'efficacité de l'irradiation UV, en diminuant le nombre de cellules de Langherhans, dans les stades précoces.

Le déséquilibre cytokinique (en faveur des Th2 au détriment des Th1) semble jouer un rôle direct dans la pathogénèse des aberrations immunologiques observées dans le CTCL.

Chez les patients atteints du syndrome de Sézary, le groupe de Klemke montre l'absence de Treg au niveau des atteintes cutanées ainsi que dans le sang périphérique. Cette absence de cellules régulatrices pourrait être responsable de l'agressivité de la maladie et l'avancée de la pathologie (54).

B. Application de la PCE dans le CTCL

Le mycosis fongoïde et le syndrome de Sézary, sont souvent incurables. Il existe aujourd'hui, différentes modalités de thérapies, proposées pour le traitement du MF et du SS. Le type de thérapie utilisée va dépendre principalement du stade de la pathologie au moment où le patient va être pris en charge, mais également de son évolution pendant l'application du traitement.

Les thérapies locales cutanées parmi lesquelles on retrouve le traitement PUVA (ingestion de 8-MOP et irradiation directe de la zone à traiter aux UV-A) sont utilisées pour le traitement des lésions cutanées développées lors d'un mycosis fongoïde. En fonction de l'évolution de la pathologie d'autres méthodes comme des chimiothérapies et des immunothérapies peuvent être utilisées (42, 46).

Depuis 1987 et grâce aux travaux de l'équipe d'Edelson, la PCE est utilisée en première ligne de traitement du syndrome de Sézary (4), mais également dans les formes érythrodermique du MF (forme avancée). Elle a été approuvée par la FDA, en 1988, pour le traitement le CTCL.

En effet, la PCE, seule ou en combinaison avec certains immunomodulateurs tel que l'IFN α , est le traitement le plus efficace contre le SS et les formes érythrodermique du MF avec 30 à 80 % de réponse globale dont 14 à 25% sont des réponses complètes (45). Dans le paragraphe suivant, nous analyserons les différentes études cliniques d'application de la PCE en tant que traitement du CTCL, afin d'analyser son efficacité.

a. Données cliniques

Le traitement par PCE n'est envisagé que chez des patients immunocompétents, capables de développer une réponse du système immunitaire à l'encontre de la population T pathogène clonale (55). Le traitement est réalisé 2 jours consécutifs, toutes les 2 à 4 semaines, pendant 6 mois. La prolongation du protocole ou sa combinaison (après 6 mois de traitement PCE sans réponse) avec d'autres thérapies (immunostimulantes : IFN- γ , GM-CSF,...) dépend de l'évolution de la pathologie, de sa sévérité et de la réponse aux différents traitements (5).

Contrairement au traitement de la GvHD, l'augmentation du nombre de cycles de PCE pour le traitement du CTCL n'apporte pas de bénéfice supplémentaire (56).

La première étude clinique, mise en place par Edelson, en 1987, est réalisée sur un ensemble de 37 patients, atteints de CTCLs, résistants aux traitements conventionnels et qui ont été traités par PCE (4). Sur ces 37 patients, 73% soit 27 patients ont montré une amélioration des symptômes après une moyenne de 22 semaines de traitement. 24 d'entre eux ont eu une amélioration de plus de 75% de leurs lésions cutanées, et 15% des patients atteints d'une érythrodermie extensive ont atteint un stade de rémission complète. De plus, d'après cette étude, la PCE ne semble pas induire les effets secondaires habituellement observés après un traitement par chimiothérapie classique (perte de cheveux, nausées, etc...) (4).

Cette étude a permis de conclure que la PCE avait un effet bénéfique dans le traitement du syndrome de Sézary et également dans les formes érythrodermiques du MF. C'est pour cette raison et après la validation, par la FDA de cette thérapie, que plusieurs centres de soin ont réalisé d'autres études cliniques de traitement du MF et du SS par thérapie PCE.

Comme le montre la table 2, de 1987 à 2017, 42 études cliniques de la PCE comme traitement du CTCL ont été réalisées, l'ensemble de ces études regroupe 1045 patients. Sur la totalité de ces patients atteints de CTCL, 62,2% développent une réponse globale et 20,8% sont des réponses complètes. Les mêmes observations avaient été faites par Scarisbrick dans une revue moins exhaustive, où 63% des patients traités par PCE montrent une réponse globale, parmi lesquels 20% sont des réponses complètes (57). Les 8 études analysées sur des patients atteints de CTCL (au total, 234 patients) traités par PCE en monothérapie montrent que 63,5% de ces patients développent une réponse globale et 19,9%, une réponse complète.

Aucun de ces auteurs ne mentionne l'apparition d'effets secondaires ou d'immunosuppression généralisée chez les patients traités par PCE. En effet la thérapie semble être très bien tolérée par l'ensemble des patients.

Mis à part quelques-unes de ces études cliniques, la plupart regroupent peu de patients, probablement car ces 2 pathologies restent rares. Les différences de taux de réponse obtenus après traitement PCE peuvent être dues aux variations entre les centres de santé quant à la sélection des patients, au stade de leur pathologie au moment du traitement, aux protocoles utilisés, à la durée du traitement ou encore à la définition de la réponse.

Auteur	Année	N° Patients	Réponse globale (%)	Réponse complète (%)	Réponse partielle (%)
Edelson et al. (4)	1987	37	73	24	35
Heald et al. (58)	1989	32	-	23	45
Armus et al. (59)	1990	8	75	-	6
Nagatania et al. (60)	1990	7	43	-	-
Zic et al. (61)	1992	20	55	25	30
Koh et al. (62)	1994	34	53	15	38
Prinz et al. (63)	1995	17	71	0	41
Duvic et al. (64)	1996	34	50	18	32
Gottlieb et al. (65)	1996	28	71	25	46
Owsianowski et al. (66)	1996	21	-	-	-
Stevens et al. (67)	1996	17	53	29	24
Zic et al. (68)	1996	20	50	25	25
Kostantinow et al. (69)	1997	12	67	8	42
Miracco et al. (70)	1997	7	86	14	71
Dippel et al. (71)	1997	19	-	26	15.8
Russell-Jones et al. (72)	1997	19	53	16	37
Vonderheid et al. (73)	1998	36	33	14	19
Zouboulis et al. (74)	1998	20	65	-	-
Jiang et al. (75)	1999	25	80	20	60
Bisaccia et al. (76)	2000	37	54	14	41
Crovetti et al. (77)	2000	30	73	33	40
Wollina et al. (78)	2000	20	65	50	15
Evans et al. (79)	2001	23	57	0	57
Wollina et al. (80)	2001	14	50	29	21
Bouwhuis et al. (81)	2002	55	80	62	18
Knobler et al. (82)	2002	20	50	15	54
Suchin et al. (83)	2002	47	79	26	53
Quaglino et al. (84)	2004	19	63	-	-
De Misa et al. (85)	2005	10	60	10	-
Rao et al. (86)	2006	16	44	-	-
Gasova et al. (87)	2007	2	100	-	-
Tsirigotis et al. (88)	2007	5	80	20	60
Arulogun et al. (89)	2008	13	62	15	46
Booken et al. (90)	2010	12	33	0	33
McGirt et al. (91)	2010	21	57	14	19
Raphael et al. (92)	2011	98	74	30	45
talpur et al. (93)	2011	19	63	11	53
Siakantaris et al. (94)	2012	18	61	-	-
Knobler et al. (95)	2012	39	74	41	33
Shiue et al. (96)	2015	18	66,7	-	-
Quaglino et al. (97)	2013	48	60	13	48
Atila et al. (98)	2017	50	42	-	-
Total/Moyennes		1045	62,2	20,8	37,6

Tableau 2. Tableau récapitulatif des différentes études cliniques utilisant la PCE dans le traitement des CTCLs, seule ou en combinaison avec d'autres traitements. Sont signalées en bleu, les études de PCE en monothérapie (5, 99, 100).

b. Données biologiques

Dans de nombreuses études (101-107), il a été observé chez les patients atteints de CTCL et notamment du syndrome de Sézary, une augmentation de production de cytokines IL-4 et d'IL-5 (101, 102, 104, 105), cytokines caractéristiques de cellules Th2, une baisse de production d'IFN- γ (cytokines Th1) ainsi que d'IL-12 (102-104, 106). Une étude incluant 3 patients atteints du SS, traités PCE montre une diminution des cytokines de type Th2 (IL-4) et une augmentation des cytokines Th1 (IFN- γ) après le traitement (107). Ces données suggèrent que le clone T pathogène responsable de la pathologie serait de type Th2.

Di renzo, en 1997, a publié une étude réalisée sur 8 patients atteints de CTCL et traités PCE. Des PBMCs de chaque patient sont prélevés avant et après traitement. Ils montrent que ces PBMCs après traitement PCE incubés avec un mitogène (PHA) ou en présence de LPS (ligand du TLR-4), sécrètent une quantité inférieure d'IL-4, mais supérieure d'IFN- γ et d'IL-12 en comparaison avec des PBMCs issus des mêmes patients avant le traitement. Ils observent également un rétablissement de la balance Th1/Th2 après traitement PCE, que l'on retrouve chez les sujets sains (108). Tokura et al. montrent également que le traitement PUVA *in vitro* de PBMCs issus de patients atteints de SS, induit la sécrétion de cytokines Th1 (IFN- γ) qui aurait un effet bénéfique sur la pathologie médiée par les lymphocytes Th2 (109).

Vowels et collab., en 1992 décrivent qu'*in vitro*, la mise en culture, de monocytes issus de patients atteints de CTCL traités par PCE, provoque une sécrétion plus élevée de TNF- α que les monocytes de ces mêmes patients, prélevés avant le traitement. En revanche le traitement PUVA *in vitro* de monocytes issus de donneurs sains ou de patients, ne montre pas de différence quant à la quantité de TNF- α recueillie dans le surnageant, entre les deux groupes. La mise en présence des monocytes de patients avant et après traitement PCE avec de l'IFN- γ provoque une augmentation de la sécrétion de TNF- α (110). Le mécanisme impliqué dans cette sécrétion de TNF- α par les monocytes, induite par le traitement PCE n'est pas connu. Le TNF- α jouerait indirectement un rôle important dans l'élimination des lymphocytes T « pathogènes », en participant à la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques, responsables de l'élimination directe des lymphocytes T « pathogènes ». La disparition du syndrome de Sézary est associée à la disparition du clone T tumoral présent dans le sang périphérique, responsable de la pathologie et également à une restauration du profil cytokinique Th1, conséquence directe de la disparition du clone leucémique (107).

Les patients atteints de CTCL montrent un déséquilibre de leur balance Th1/Th2 puisque le clone T leucémique responsable de la pathologie est de type Th2 et peut représenter jusqu'à 90% des lymphocytes T périphériques. La PCE serait donc impliquée dans le rétablissement de cette balance Th1/Th2, à travers la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de type Th1 qui pourraient à leur tour promouvoir une réponse anti-tumorale contre le clone T leucémique.

Cependant, ces données sont limitées, notamment au niveau clinique et reflètent le manque d'études randomisées indispensables pour analyser non seulement l'efficacité de la PCE, mais également son mode d'action.

Les hypothèses développées pour la compréhension des mécanismes d'action de la PCE lors du traitement du CTCL seront développées dans le chapitre n°V.

III. La maladie du greffon contre l'hôte

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est aujourd'hui utilisée comme traitement de certaines hémopathies malignes, telles que les leucémies ou encore les lymphomes. La greffe est réalisée après plusieurs chimiothérapies à haute dose qui détruisent l'hématopoïèse en plus de détruire les cellules tumorales. Dans ces pathologies, la greffe de CSH a pour but de restaurer une hématopoïèse « normale » et d'éliminer les cellules tumorales (effet GvL). Différentes sources de cellules sont utilisées dans les greffes de CSH allogéniques, les CSH provenant de la moelle osseuse, de cordon ombilical ou encore du sang périphérique. Le donneur sélectionné est le plus souvent un membre de la fratrie, néanmoins, en l'absence de donneur familial, la greffe peut être réalisée à partir d'un donneur allogénique compatible, non apparenté.

Selon l'agence de Biomédecine, en 2015, l'activité de greffe allogéniques de CSH en France représentait 1964 patients greffés, dans 38 centres nationaux. Ce chiffre est en constante augmentation.

Même si la nécessité et l'efficacité de ces greffes allogéniques sont reconnues, elles sont cependant associées à une complication majeure, la maladie du greffon contre l'hôte (Graft versus Host Disease, GvHD). La GvHD est une des principales causes de décès après une greffe de CSH et constitue une pathologie dans laquelle, les tissus du receveur (peau, foie, intestin, muqueuses, ...) sont attaqués par les cellules immunocompétentes du donneur (NK, lymphocytes T et macrophages). La GvHD peut apparaître chez 30 à 50% des patients recevant un greffe de CSH (allogéniques) HLA-compatible, la GvHD est alors dirigée contre les antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHAs) tels qu'HA-1, HA-2, LRH-1 ou encore ACC-2. Le taux d'apparition de la GvHD augmente lorsqu'il y a mismatch entre les typages HLA du donneur et du receveur (donneur allogénique) (111, 112).

Les lymphocytes T, comme nous le verrons ultérieurement sont majoritairement responsables de la pathologie et sont dans de nombreux cas déplétés dans le greffon, afin d'éviter les risques de GvHD. Cependant, Les lymphocytes T du greffon permettant également l'élimination des cellules tumorales résiduelles (effet GvL), leur déplétion peut entraîner un risque accru de rechute. En clinique et en cas de rechute, une injection de lymphocytes T du donneur (DLI) est envisagée, même si elle augmente le risque de développer une GvHD. Il est important, chez les patients d'évaluer la balance entre l'effet GvHD et l'effet GvL, afin de permettre à l'effet GvL d'avoir lieu et ainsi éviter la rechute leucémique, tout en contrôlant le développement d'une GvHD.

Les lymphocytes T responsables du développement de la GvHD (lymphocytes T alloréactifs), sont des lymphocytes T immunocompétents issus du greffon, autrement dit, du donneur.

Dans un contexte de GvHD, plusieurs types d'allo-reconnaissance sont impliqués (fig. 6) :

- L'allo-reconnaissance directe des HLA de classe I et de classe II
- L'allo-reconnaissance indirecte
- L'allo-reconnaissance semi-directe

L'allo-reconnaissance directe est médiée par les alloantigènes exprimés par les APC de l'hôte, principalement par les cellules dendritiques (DCs) reconnus par les lymphocytes T du donneur (avec des molécules HLA de classe I et II différentes qui peuvent être reconnus par des lymphocytes T CD4+ et CD8+ respectivement), ce qui va engendrer une réponse allogénique à l'encontre du receveur. Les cellules alloréactives de spécificité directe représentent environ 90% des lymphocytes alloréactifs (responsables de la pathologie) présents chez un patient atteint de GvHD.

L'allo-reconnaissance indirecte est quant à elle médiée par la reconnaissance de peptides allogéniques (HLA, Ag mineur) présentés par les molécules HLA exprimées par les APCs du donneur aux lymphocytes T du donneur.

Enfin l'allo-reconnaissance semi-directe est engendrée par la reconnaissance par les lymphocytes T du donneur d'allopeptides présentés par un complexe HLA de l'hôte à la surface d'APCs du donneur.

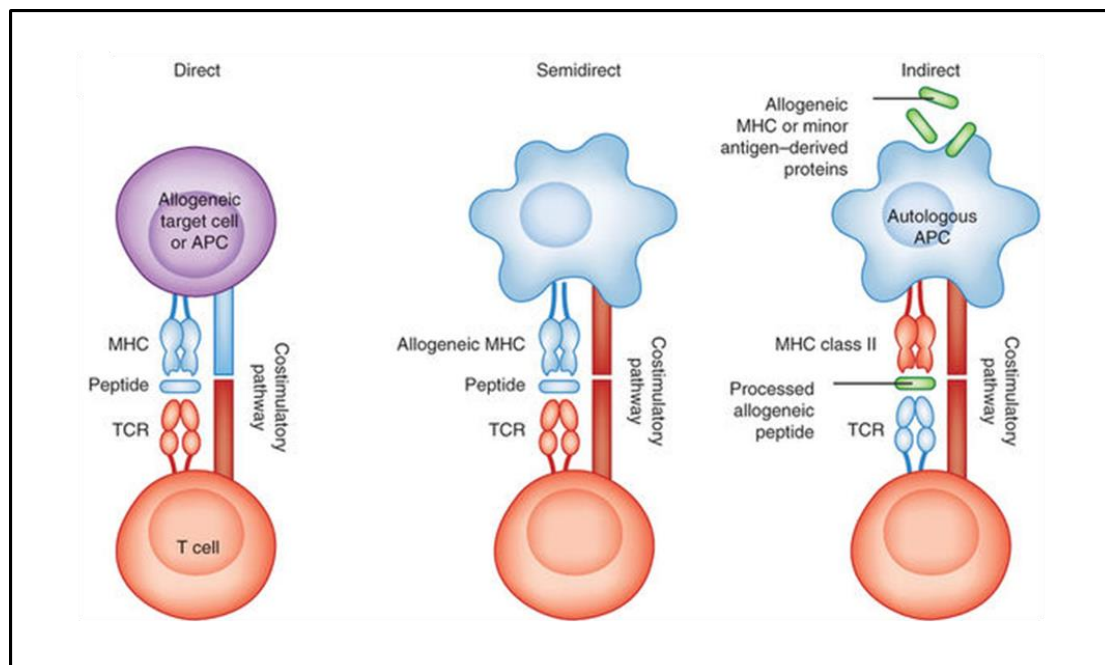


Figure 6 : Mécanismes d'allo-reconnaissance et activation des lymphocytes T alloréactifs. Dans le développement de la GvHD, 3 mécanismes d'allo-reconnaissance sont mis en évidence : l'allo-reconnaissance directe, indirecte et semi-directe, ayant pour but, l'activation des lymphocytes T allogéniques du donneur. D'après l'article de Zakrzewski, *Overcoming immunological barriers in regenerative medicine*, publié dans Nature biotechnology en 2014.

La GvHD est divisée en deux catégories, la GvHD aiguë (a-GvHD) et la GvHD chronique (c-GvHD). Habituellement, les GvHD aiguës et chroniques sont décrites pour se distinguer par le délai d'apparition de la pathologie post-greffe : si l'apparition a lieu dans les 100 jours post-greffe, il s'agit d'une GvHD aiguë ; au-delà, il s'agit d'une GvHD chronique. Aujourd'hui, cette définition n'est plus satisfaisante car il a été montré que les deux types de GvHD possèdent des caractéristiques cliniques ainsi qu'une physiopathologie différentes (113). La caractérisation de la GvHD aiguë et/ou chronique

aujourd'hui prend en compte la combinaison des symptômes cliniques et du délai de développement post-greffe.

La GvHD aiguë est divisée en deux sous-groupes : La GvHD aiguë classique et la GvHD aiguë persistante, récurrente, d'apparition tardive.

La GvHD chronique est elle aussi divisée en deux sous-groupes : la GvHD chronique classique où le patient ne montre pas de signes cliniques similaires à la GvHD aiguë et le syndrome de chevauchement où les signes cliniques de la GvHD aiguë et chronique apparaissent en même temps (une ou plusieurs caractéristiques rattachées à la aGvHD) (114, 115).

<u>GvHD</u> aiguë classique	Eruptions <u>maculopapuleuses</u> , nausées, vomissements, anorexie, diarrhée abondante, iléus ou <u>cholectase</u> hépatique: symptômes qui surviennent dans les 100 jours suivant la transplantation ou la perfusion de lymphocytes du donneur et sans diagnostic ou signes distincts de <u>GvHD</u> chronique.
<u>GvHD</u> aiguë persistante, récurrente ou tardive	Caractéristiques de la <u>GvHD</u> aiguë classique sans diagnostic ou manifestations distinctes de la <u>GvHD</u> chronique survenant au-delà de 100 jours après la transplantation ou la perfusion de lymphocytes du donneur .
<u>GvHD</u> chronique classique	<u>GvHD</u> chronique classique sans caractéristiques de la <u>GvHD</u> aiguë.
Syndrome de chevauchement	<u>GvHD</u> chronique classique avec caractéristiques de la <u>GvHD</u> aiguë.

Tableau 3. Les différentes formes de GvHD, inspiré du tableau proposé par Hart dans l'article *Extracorporeal photopheresis in the treatment of graft-versus-host disease: evidence and opinion*, publié dans *Therapeutic Advances in Hematology*, en 2013 (115).

L'influence du type de greffe dans le développement de la GvHD aiguë ou chronique est très controversée. Certains auteurs montrent un pourcentage d'apparition de cGvHD supérieur (16%) lorsque la greffe provient de cellules souches du sang périphérique que lorsqu'elle provient de CSH de la moelle osseuse (116). Lee et al. montrent que l'utilisation de CSH provenant de cordon ombilical augmente les risques d'apparition de GvHD chronique (117). D'autres auteurs ne montrent pas d'impact du choix de la source de CSH sur le développement de la GvHD (118, 119).

A. Définition et physiopathologie

a. *GvHD* aiguë

L'apparition d'une GvHD aiguë après une greffe de cellules souches hématopoïétiques survient chez 20 à 70% des patients greffés (118).

Trois conditions nécessaires pour le développement d'une GvHD ont été définies par Billingham en 1966 (120) : le greffon doit contenir des cellules immunocompétentes, le receveur doit posséder des alloantigènes absents chez le donneur et l'hôte doit être immunodéprimé.

L'apparition de la a-GvHD se développe en trois étapes : une phase afférente, une phase d'induction et d'expansion et enfin une phase effectrice. Dans ces trois phases, des effecteurs du système immunitaire (lymphocytes T) et des médiateurs cytokiniques interviennent (Fig. 7).

Les patients atteints d'hémopathie, avant une greffe de CSH sont soumis à des cessions répétées de chimio ou radiothérapie afin d'éradiquer une grande partie des cellules tumorales et d'arrêter « l'hématopoïèse maligne ». Ces traitements « pré-greffe » engendrent des lésions au niveau tissulaire, notamment au niveau endothélial qui se traduisent par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IFN- γ , IL-1 ou TNF- α). Cette sécrétion de cytokines caractérise la première phase de l'a-GvHD, la phase afférente. Ces cytokines vont contribuer à l'augmentation de l'expression des molécules du HLA et d'adhérence, à la surface des cellules de l'hôte et à créer un environnement favorable à la reconnaissance des antigènes mineurs d'histocompatibilité et du HLA de l'hôte par les lymphocytes T du donneur.

La reconnaissance directe des molécules du HLA par les lymphocytes T allogéniques, immunocompétents du donneur à travers leur interaction avec les APCs de l'hôte (alloreconnaissance directe) puis leur activation, vont participer à la seconde phase, d'induction et d'expansion de ces lymphocytes. L'activation des lymphocytes provoque la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ (réponse Th1). Ces cytokines favorisent l'amplification de la réponse T allogénique, l'activation des natural killer (NK), le relargage de TNF- α par les macrophages, responsable des lésions inflammatoires de la peau et de l'intestin. Les antigènes mineurs d'histocompatibilité mHAs jouent un rôle important dans cette phase lorsqu'il s'agit d'une greffe d'un donneur apparenté HLA compatible. Les APCs du donneur vont également jouer un rôle dans la réaction de GvHD puisqu'elles vont présenter des alloantigènes de l'hôte aux lymphocytes T alloréactifs du donneur (alloreconnaissance indirect).

Enfin la réponse cytotoxique, médiée par les lymphocytes T CD8+ (CTL) du donneur aura lieu lors de la phase effectrice. Cette phase est amplifiée par un signal secondaire provenant des produits bactériens de l'intestin, tels que le LPS ou encore certaines endotoxines qui vont être transloquées de par les lésions intestinales, du lumen de l'intestin vers la circulation (121). Ces stimuli vont promouvoir l'amplification locale de la lésion tout comme la réponse inflammatoire et vont ensemble, avec les CTLs et les natural killer (NK), engendrer la destruction de certains tissus cibles. L'endommagement des voies intestinales et le relargage de LPS sont à l'origine du relargage de cytokines caractéristiques de l'a-GvHD. Les Lymphocytes T cytotoxiques ainsi que les NK vont alors attaquer les cellules du receveur par contact direct par l'interaction Fas-FasL ou par la sécrétion de perforine, de Granzyme A ou encore de TNF- α (3 voies cytolytiques) et donc être responsables des signes cliniques observés lors de cette pathologie (121-127). La figure de Ferrara, ci-dessous résume les trois phases d'apparition de la GvHD aiguë.

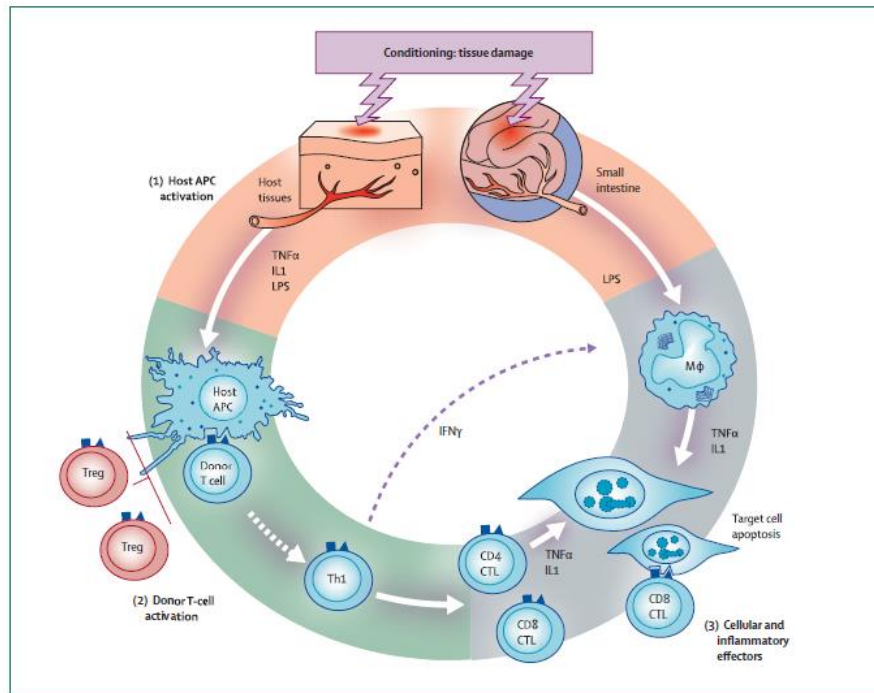


Figure 7 : Les 3 phases d'induction de la GvHD aiguë. Le conditionnement pré-greffe (chimio- et radiothérapie) entraîne des lésions au niveau de certains tissus et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 (1). L'augmentation de sécrétion de ces cytokines provoque l'activation des APCs du receveur. Ces APCs vont activer les lymphocytes T matures du donneur provoquant ainsi leur prolifération et leur différenciation (2), ce qui va produire de nouveaux effecteurs (CTLs, TNF- α , IL-1 et NK) responsables de la lésion des tissus (3). Le relargage de LPS suite aux lésions de la muqueuse intestinale provoque une sécrétion additionnelle de TNF- α et d'IL-1, par les tissus du receveur vers la circulation. Le TNF- α peut directement endommager les tissus en induisant nécrose et apoptose dans la peau et les voies digestives, à travers les récepteurs du TNF ou les voies de Fas. Figure tirée de l'article *Graft-versus-host disease* publié dans le journal *Lancet*, en 2009 par J. Ferrara (127).

L'a-GvHD touche principalement 3 organes distincts, la peau, le foie et le tube digestif. Le degré de disparité des molécules du HLA et de genre entre le donneur et le receveur, l'âge du patient, la source de CSH ou encore l'intensité du régime de conditionnement pré-greffe représentent des facteurs de risques pour le développement d'une a-GvHD.

b. GvHD chronique

Ce type de GvHD (c-GvHD) apparaît chez 50 à 70% des patients après une greffe de cellules souches hématopoïétiques (128).

La physiopathologie de la GvHD chronique est moins bien connue que celle de l'a-GvHD notamment du fait de sa complexité. Certains auteurs déplorent le manque de modèles expérimentaux afin qui permettraient de mieux comprendre son apparition (113).

La c-GvHD présente des caractéristiques similaires à celles d'une maladie auto-immune telle que le lupus érythémateux systémique ou encore la polyarthrite rhumatoïde avec la production d'auto-anticorps et de lymphocytes T alloréactifs. L'excès de production du facteur d'activation des cellules B (BAFF) accompagné d'une distorsion de l'homéostasie de ces cellules vont provoquer l'apparition d'auto-anticorps anormaux.

De plus, ces patients développent un défaut dans la tolérance immune induite, présentent une activation et une expansion de Lymphocytes T dirigés contre des Antigènes du Soi (clones T autoréactifs) (129). Ces Lymphocytes T autoréactifs activés sont associés à une lésion du thymus causée par la chimio, la radiothérapie ou la GvHD elle-même (attaque directe du stroma par les cellules effectrices) et à une défaillance de la sélection négative dans le thymus (130, 131). Une défaillance dans l'apoptose ou l'élimination des thymocytes auto-réactifs provoque une rupture de la tolérance. L'expansion et la fonction effectrice des lymphocytes T autoréactifs vont provoquer le développement du phénomène auto-immun (111, 115, 127). Ainsi à l'alloréactivité, s'ajoute une composante auto-immune. La c-GvHD atteint principalement la peau, les muqueuses et le foie.

B. Données cliniques de la PCE sur la GvHD

a. Réponses chez les patients

La PCE n'est pas utilisée en première ligne de traitement pour la GvHD, les patients sont soignés dans un premier temps par corticothérapie. Environ 50% des patients répondent favorablement aux corticoïdes, en revanche pour l'autre moitié, il est nécessaire de mettre en place une autre stratégie de traitement. Plusieurs thérapies médicamenteuses sont possibles pour les patients corticorésistants, parmi celles-ci, on retrouve la PCE. Cette thérapie a été appliquée pour la première fois, dans le cadre du traitement de la c-GvHD en 1994 par l'équipe de Owsianowski (132). Elle est aujourd'hui utilisée dans les deux types de GvHD, principalement pour le traitement de la c-GvHD.

Il n'existe pas de recommandations précises quant à l'utilisation de la PCE chez les patients, cependant, ceux-ci reçoivent en général et selon le guide d'utilisation rédigé en 2014 par un groupe d'hématologues, un cycle de 2 traitements PCE toutes les une à deux semaines pour les GvHD chroniques et deux à trois traitements par semaine pour la GvHD aiguë. Après 12 semaines, dans le cas de la GvHD chronique, l'intervalle entre les traitements augmente et le patient ne reçoit plus qu'un cycle de traitement toutes les 3 semaines. Ce schéma change en fonction de l'état du patient, de ses types de lésions, de l'étendue de la pathologie ou encore de la réponse clinique obtenue après traitement (5).

Comme le montre le tableau n°5, de nombreuses études ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité de la PCE pour le traitement des différentes formes de GvHD aussi bien chez les enfants que chez les adultes. Les études faites sur 256 patients atteints de a-GvHD traités PCE montrent que 76,7% des patients présentant une manifestation cutanée, 64,7% présentant une atteinte hépatique et 64,8% une atteinte au niveau des voies digestives développent une réponse complète après traitement. En ce qui concerne les études faites sur la c-GvHD, elles regroupent 582 patients parmi lesquels 71.6%

atteints au niveau des muqueuses, 69% avec une atteinte cutanée et 61,9% avec des manifestations hépatiques développent une réponse complète, après traitement PCE.

Ces données montrent donc l'efficacité de la PCE sur la GvHD, qu'elle soit aiguë ou chronique. La PCE étant utilisée en deuxième de traitement, l'ensemble des patients sont préalablement traités avec d'autres types d'immunothérapies (immunosuppresseurs, ...), ce qui peut expliquer les variations de résultats entre les différentes études cliniques.

Pathologie	Auteur et année de l'étude clinique	Nb de patients	Taux de Réponse globale (%)	Réponse complète Peau (%)	Réponse complète Foie (%)	Réponse complète Tube digestif (%)
GvHD aigue	Greinix, 2000 (12)	21		60	67	-
	Salvaneschi, 2001 (133)	9		67	33	60
	Dall'amico, 2002 (134)	14		71	57	60
	Messina, 2003 (135)	33		67	60	75
	Garban, 2005 (136)	12		67	0	40
	Greinix, 2006 (137)	59		82	61	60
	Kanold, 2007 (138)	12		90	56	83
	Calore, 2008 (139)	15		92	-	100
	Gonzales-vicent, 2008 (140)	8		100	100	57
	Perfetti, 2008 (141)	23		65	27	40
	Perotti, 2010 (142)	50		83	67	73
Total		256		76,7	64,7	64,8
	Auteur et année de l'étude clinique	Nb de patients	Taux de Réponse globale (%)	Réponse complète Peau (%)	Réponse complète Foie (%)	Réponse complète Muqueuses (%)
GvHD chronique	Rossetti, 1996 (143)	7	-	33	100	-
	Dall'amico, 1997 (144)	4	-	67	-	-
	Greinix, 1998 (13)	15	-	80	70	100
	Salvaneschi, 2001 (133)	14	-	83	67	67
	Halle, 2002 (145)	8	-	88	67	-
	Perseghin, 2002 (146)	9	-	88	100	67
	Messina, 2003 (135)	44	-	56	60	-
	Apisarnthanarax, 2003 (147)	32	56	59	0	-
	Seaton, 2003 (148)	28	36	48	32	21
	Foss, 2005 (149)	25	64	64	0	46
	Rubegni, 2005 (150)	32	69	81	77	92
	Couriel, 2006 (151)	71	61	57	71	78
	Greinix, 2006 (137)	47	83	93	84	95
	Duzovali, 2007 (152)	7	-	-	-	-
	Rubegni, 2007 (153)	14	86	50	21	50
	Kanold, 2007 (138)	15	-	75	82	86
	Perseghin, 2007 (154)	25	-	67	67	78
	Gonzales-vicent, 2008 (140)	3	-	100	100	-
	Flowers, 2008 (14)	48	-	40	29	53
	Perotti, 2010 (142)	23	-	96	100	80
	Greinix, 2011 (155)	29	-	31	50	70
	Dignan, 2012 (156)	82	74	92	-	91
Total		582		69,0	61,9	71,6

Tableau 4. Récapitulatif des études cliniques d'application de la PCE sur la GvHD de 1996 à nos jours.

Sur la partie supérieure les traitements PCE concernant la a-GvHD et sur la partie inférieure ceux concernant la c-GvHD, dans un contexte pédiatrique comme adulte.

Sur 21 études, il n'existe qu'une seule étude randomisée de traitement PCE sur des patients atteints de c-GvHD, celle de Flowers, en 2008.

Dans son étude, l'équipe de Flowers compare la réponse obtenue face au traitement de deux groupes de patients différents : un groupe traité par thérapie conventionnelle (groupe contrôle) représentant 47 patients et un autre de 48 patients traités en plus de cette thérapie conventionnelle, par PCE. Après 12 semaines de traitement, 20,8% des patients du groupe PCE montrent une baisse de la prise de corticoïdes d'environ 50%, contre 6,4% des patients du groupe « contrôle ». En ce qui concerne les réponses obtenues au niveau tissulaire, 40% des patients du groupe PCE développent une réponse complète ou partielle contre leurs atteintes cutanées, alors que seulement 10% des patients du groupe contrôle montre ce genre de réponse. Pour les atteintes oculaire et oral, 30% et 53% des patients du groupe PCE montrent une réponse contre 7% et 27% des patients de l'autre groupe (14).

En ce qui concerne l'étude de l'efficacité de la PCE sur la a-GvHD, la méta-analyse réalisée en 2015, par Zhang et collab., montre que sur 517 études identifiées d'application de la PCE pour le traitement de la a-GvHD chez des patients corticorésistants, seules 7 études sont réellement exploitables. Le manque de critères uniformes entre les différentes études explique que seules sept d'entre elles ont été incluses dans cette analyse. Cette méta-analyse multicentrique se base quand même sur un ensemble de 121 patients, dans 8 centres de traitements différents. Parmi ces 121 patients, le taux de réponse globale (réponse complète et réponse partielle) est de 0,71 et est également de 0,71 pour le taux de réponse complète. Cette étude réalise également une comparaison du taux de réponse, en fonction des organes atteints. Lorsque les patients a-GvHD ont une atteinte cutanée, du foie ou encore de l'intestin, les taux de réponse sont de 0,86, 0,60 et 0,68 respectivement (157).

Toutes ces études faites aussi bien chez les adultes que chez des enfants montrent que le traitement PCE a fait ses preuves quant à son efficacité dans le traitement de la GvHD, notamment au niveau cutané, qu'elle soit aiguë ou chronique. Elles montrent également que cette thérapie n'engendre pas d'effets secondaires, ni d'immunosuppression généralisée, et est généralement très bien tolérée par les patients, les taux de réponse au traitement ne sont pas les mêmes en fonction de l'atteinte tissulaire, la peau semble être l'organe avec un meilleur taux de réponse après traitement PCE.

La PCE est le seul traitement utilisé contre la GvHD, qui ne provoque pas d'immunosuppression généralisée et qui maintient l'effet GvL, essentiel pour le traitement des différentes hémopathies qui ont recours à la greffe de cellules souches hématopoïétiques. La PCE montre un réel bénéfice pour les patients atteints de GvHD.

b. Analyses cellulaires

L'étude de l'effet de la PCE sur la GvHD est difficile à réaliser, car il n'existe pas de standardisation des protocoles de traitement, l'intervalle entre le début de la GvHD et le traitement PCE varie. De plus, les complications pré-PCE des patients peuvent influencer la survie, indépendamment de l'efficacité de la PCE. La PCE permet une diminution sélective de la GvHD, sans

augmenter le nombre d'infections chez les patients, elle permet également la diminution, voire l'arrêt de la prise de corticostéroïdes et d'immunosuppresseurs (158).

Plusieurs analyses cliniques suggèrent une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs circulants après traitement PCE chez des patients atteints de GvHD et de rejets de greffe (153, 159, 160).

La co-culture, ex vivo, de lymphocytes (isolés du sang) récupérés après traitement PCE de patients atteints de GvHD, avec des PBMCs autologues non traités (répondeurs) en présence de LPS, provoque une augmentation significative des niveaux d'ARNs messagers d'IL-10 et d'IL-1Ra des monocytes et macrophages, en comparaison avec les niveaux obtenus après la co-culture avec des Lymphocytes autologues avant traitement (161). Le traitement PCE des lymphocytes T semble induire la production de cytokines anti-inflammatoires par les macrophages et les monocytes après leur mise en contact avec ces Lymphocytes T traités.

L'étude Di Biaso et al., sur le nombre de lymphocytes T régulateurs (Tregs) (CD4+CD25+ FoxP3+) chez des patients atteints de GvHD (9 : a-GvHD et 18 : c-GvHD), avant et après traitement PCE montre qu'il augmente après 6 cycles de thérapie PCE, pour diminuer par la suite. Ils montrent également que ce sont les patients qui répondent favorablement à la PCE qui développent une augmentation de leur Tregs (162). Une étude antérieure du même groupe de recherche sur 10 patients atteints de GvHD montre que ces Tregs obtenus après traitement PCE ne synthétisent pas d'IL-10 ni de TGF- β , contrairement aux démonstrations faites par Craciun in vitro. Ils possèderaient néanmoins une capacité inhibitrice sur l'alloréactivité, suggérant une action de ces cellules par contact direct (160).

L'étude réalisée par Rubegni et al. montre que le traitement PCE de 14 patients atteints de c-GvHD provoque l'augmentation des Tregs (CD4+ CD25+) après 6 mois de traitement en comparaison avec le nombre de Tregs observés avant le traitement. Cependant la croissance de ces Tregs est similaire entre les différents groupes (Non répondeurs, répondeurs partiels et répondeurs complets), ce qui peut paraître étrange. De plus, leur définition des Tregs (CD4+ CD25+) par l'expression seule de CD25 est quelque peu biaisée puisque les cellules T activées ont également ce phénotype, ce qui remet en doute les résultats obtenus dans cette étude. Pour différencier les lymphocytes T activés des Tregs les auteurs auraient pu par exemple utiliser un marquage intra-cytoplasmique afin de détecter le facteur de transcription FoxP3, caractéristique des Tregs (153).

Les DCs ayant également un rôle central dans la physiopathologie de la GvHD (polarisation des lymphocytes T helper, activation des lymphocytes T effecteurs, cytolytiques), quelques études ont été réalisées sur les possibles changements et variations des différentes populations de DCs après traitement PCE. Alcindor et al. en 2001, se sont intéressés à deux types de sous-populations cellulaires, qu'ils nomment les DC1 et DC2 décrites pour engendrer une réponse T de type Th1 et Th2 respectivement. L'étude est réalisée sur 10 patients atteints de GvHD, corticorésistants, traités par PCE. Chez 7 patients répondeurs ils observent une augmentation de la population NK et une modulation des DCs, à travers la diminution des DC1 (CD123+/CD80+) (163). La même analyse est faite par Gorgun et al. sur des patients atteints eux aussi de GvHD. Ils démontrent une diminution du nombre de DC1 (CD123+/CD80+) après traitement PCE, alors que les DC2 (CD86+/CD83+) augmentent. Ils montrent également, la restauration de la balance Th1/Th2 après plusieurs cycles de PCE (164).

Cette approche reste très incomplète et imprécise quant à la définition des DCs (pDCs versus mDCs) ; les sous populations de DCs chez l'Homme sont définies par l'expression différentielle de CD123 et de CD11c. Chez l'Homme, les DCs myéloïdes (conventionnelles) sont CD11c+ CD123low et les DCs plasmacytoïdes (pDCs) sont CD11c- CD123high (165). De plus, des marqueurs tels que CD86, CD83 ou encore CD80 ne constituent pas des marqueurs spécifiques des DCs mais des marqueurs impliqués dans la costimulation, caractéristiques d'une maturation des DCs.

Comme nous l'avons déjà évoqué, le manque d'études prospectives et randomisées rend l'analyse de l'efficacité de la PCE pour le traitement de la GvHD inaboutie. Il serait souhaitable que les différents centres cliniques réalisent des études randomisées et homogènes quant au protocole PCE utilisé afin de pouvoir confirmer les paramètres d'efficacité de la PCE dans la GvHD, d'analyser les différentes populations cellulaires ainsi que la sécrétion de cytokines chez les patients, avant et après traitement.

Il est évident qu'une étude standardisée chez l'Homme est compliquée à réaliser du fait de l'hétérogénéité des symptômes chez les patients et de leur réaction au traitement. C'est pourquoi certaines équipes développent des modèles murins de GvHD afin de pouvoir étudier les changements tant au niveau cellulaire qu'au niveau de la production de cytokines, chez les souris malades, après traitement PCE.

C. Modèles murins de GvHD

On recense dans la littérature plusieurs modèles murins de GvHD appliqués à l'observation des changements symptomatiques et cellulaires induits, après un traitement PCE. Il est évident qu'au vu du faible volume sanguin murin, une cytophérèse n'est pas possible. La thérapie est donc généralement réalisée *ex vivo*, à partir de splénocytes de souris « donneuses », mis en présence avec le 8-MOP et irradiés UV-A *in vitro* (traitement PUVA).

Gatza et al., en 2008, ont développé un modèle d'étude de traitement de la GvHD par PCE. Dans le premier modèle, les donneurs et les receveurs sont H-2 identiques, l'apparition de GvHD est due à des disparités entre les antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHAs) et médiée par des lymphocytes T CD8+. Dans un second modèle, la greffe est réalisée dans un contexte haploidentique, la GvHD est alors médiée par les lymphocytes T CD4+ (disparités entre les molécules H-2 de classe II). Les souris, traitées par une injection intraveineuse de $30 \cdot 10^6$ cellules alloréactives (issues d'une souris ayant développé une GvHD) traitées PUVA, 4 fois par semaine à partir du 7^{ème} jour post-greffe, présentent une diminution des symptômes de la GvHD, une amélioration des lésions histologiques au niveau du foie, de l'intestin et de la peau, ainsi qu'une reconstitution considérable du système immunitaire (hématopoïèse). Cette diminution des symptômes est accompagnée d'une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs (CD25+/FoxP3+ : Tregs). L'inhibition de l'effet engendré par la réinjection des cellules traitées PUVA sur la GvHD, lorsque les cellules CD25+ sont déplétées permet à l'auteur de confirmer l'implication des Tregs dans ce mécanisme (166).

Contrairement à Gatza, Budde et al. en 2014, n'observent pas d'augmentation significative du nombre de Treg après la réinjection de cellules alloréactives traitées PUVA ($1 \cdot 10^6$ cellules/ traitement, 4 fois par semaine) chez des souris atteintes de GvHD. Il montre également dans cette étude que la

réinjection de cellules « saines » traitées PUVA ne provoque pas d'amélioration du taux de survie ou du score clinique des souris traitées. C'est la réinjection répétée de cellules alloréactives traitées PUVA qui induit une amélioration de la GvHD (20). Ce modèle confirme que la présence de lymphocytes T « pathogènes » dans l'échantillon traité est nécessaire au bon fonctionnement de la PCE.

Enfin, Capitini, dans un modèle de GvHD murine, montre en 2011 que la réinjection de splénocytes traités PUVA à des souris atteintes de GvHD atténue la perte de poids de ces souris et est accompagnée d'une augmentation du nombre de cellules B220+ et des lymphocytes T régulateurs, au niveau des ganglions. De plus, l'exposition de cellules dendritiques myéloïdes (mDCs) activées (LPS) issues de la moelle osseuse avec des splénocytes traités PUVA ne provoque pas de changement d'expression des marqueurs de surface de ces mDCs ni de leur production de TNF- α , en revanche cette co-culture provoque l'augmentation de leur production d'IL-10. Les auteurs montrent également que l'IL-10 sécrétée par les cellules de la moelle osseuse greffées est nécessaire à l'effet bénéfique de la réinjection de cellules traitées PUVA (167). Dans ce modèle, l'efficacité de la PCE est la même quand les splénocytes traités et réinjectés sont déplétés en T et en B suggérant que l'effet bénéfique de la PCE proviendrait du traitement de cellules autres que les lymphocytes. Ces résultats sont étonnants, puisque la plupart des auteurs montre l'importance de la présence de lymphocytes T « pathogènes » dans l'échantillon traité.

Dans l'ensemble, les études cliniques comme les modèles *in vivo* semblent montrer une augmentation du nombre de Tregs chez les patients ou souris atteints de GvHD, après traitement PCE. Cependant, l'hétérogénéité de la réponse, notamment chez les patients ainsi que les moyens utilisés pour définir les Tregs remettent en cause l'interprétation des résultats.

IV. La polyarthrite rhumatoïde

Aujourd'hui, la PCE est également utilisée en deuxième ligne de traitement de certaines pathologies auto-immunes, parmi lesquelles, on retrouve le psoriasis, la maladie de Crohn ou encore la polyarthrite rhumatoïde. Nous allons nous intéresser à la polyarthrite rhumatoïde. Ce modèle animal sera développé ultérieurement pour l'étude des mécanismes d'action de la PCE.

A. Polyarthrite rhumatoïde et PCE

a. Physiopathologie

La polyarthrite rhumatoïde (RA) est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation synoviale persistante, une production d'auto-anticorps (Facteur rhumatoïde, anticorps anti-peptide cyclique citrulliné qui reconnaissent par exemple le collagène) (168), une destruction des os et des cartilages et par des dysfonctionnements systémiques (problèmes cardiovasculaires, pulmonaires, etc...). Elle touche plus fréquemment les femmes que les hommes (4 fois plus), peut apparaître à tout âge, mais est principalement développée entre 40 et 60 ans, et affecte plus de 1% de la population mondiale. Les causes d'apparition de la polyarthrite rhumatoïde ne sont aujourd'hui pas connues. Elle

implique une prédisposition génétique et différents facteurs environnementaux. La susceptibilité de développer une polyarthrite semble être liée au HLA-DR4 et DR1, avec près de 90% des patients porteurs de ces types de HLA (169).

Historiquement, la RA était considérée, comme beaucoup de maladies auto-immunes, comme étant médiée par des cellules T de type Th1. Or à ce moment-là, les lymphocytes T Th17 n'étaient pas encore connus. Aujourd'hui, le rôle de ces deux types cellulaires dans le développement de la RA n'est pas clair, même si les deux sous-populations semblent être impliquées (170). De plus, les patients atteints de RA semblent montrer une dérégulation de leur balance Th17/Treg, en faveur des Th17 (171, 172). Les Th17 joueraient un rôle important dans l'inflammation synoviale ainsi que dans l'érosion osseuse à travers leur sécrétion d'IL-23 et d'IL-17. Les études faites sur différents modèles murins de RA montrent l'implication de la cytokine IL-17 (sécrétée par les Th17) dans le développement de la pathologie (173). L'IL-17 synergise avec le TNF- α et l'IL-1 afin de promouvoir l'activation des fibroblastes et des chondrocytes, responsables de l'inflammation synoviale et l'érosion osseuse (171, 172).

Le caractère inflammatoire de la RA vient de la quantité importante de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-17, IL-1, etc..) en comparaison de celle des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, etc...) (170). En effet, une étude clinique montre une forte présence de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-18, TNF- α) chez les patients atteints de RA (174). Le tableau n°5 reprend l'implication des différentes cytokines dans la pathogénèse de la RA.

Cytokines	Fonctions clés liées aux maladies
TNF-α	Active les leucocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes synoviales, induisant la production de cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion et les enzymes de la matrice, suppression des fonctions des lymphocytes T régulateurs; activation des ostéoclastes; résorption du cartilage et des os; impliquée dans les dysfonctions métabolique et cognitive.
Interleukine-1α et 1β	Activent les leucocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes synoviales; induisent la production d'enzyme de la matrice par les chondrocytes; activent les ostéoclastes; engendrent la fièvre; augmentent le métabolisme du glucose; et réduisent les fonctions cognitives
Interleukine-6	Active les leucocytes et les ostéoclastes; est impliquée dans la différenciation des lymphocytes B; régule le métabolisme des lipides, les réponses de phase aiguë et l'anémie des maladies chroniques; et est impliquée dans la dysfonction de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et la fatigue.
Interleukine-7 et 15	Promeuvent et maintiennent l'activation des cellules T et des cellules Natural Killer et les cellules T mémoires, bloquent l'apoptose et maintiennent les interactions entre les macrophages et les cellules T.
Interleukines-17A et 17F	Agissent synergiquement pour augmenter l'activation des fibroblastes synoviaux, des chondrocytes et des ostéoclastes
Interleukine-18	Promeut l'activation des Th1, des neutrophiles et des cellules Natural Killer
Interleukine-21	Active les Th17 et sous populations de cellules B
Interleukine-23	Accroît le nombre de Th17
Interleukine-32	Active la production de cytokines par différents leucocytes et promeut la différenciation des ostéoclastes
Interleukine-33	Active les mastocytes et les neutrophiles

Tableau 5. Cytokines impliquées dans la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde et leurs fonctions. Inspiré de la revue publiée par Mc Innes en 2011 dans le journal *The New England Journal of Medicine* (171).

Les cellules B CD20+ joueraient également un rôle dans le développement de la pathologie ; il a été montré que l'usage de Rituximab (anti CD20) a une efficacité de traitement sur la RA (175). Le rôle des lymphocytes B serait principalement lié à la production d'auto-anticorps, la présentation d'auto-antigènes et la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α).

b. Etudes cliniques

Les lymphocytes T CD4+ (Th1 et/ou Th17) seraient responsables de la polyarthrite rhumatoïde. Comme nous l'avons déjà mentionné, le traitement PCE est efficace dans le traitement de certaines pathologies médiées par les lymphocytes T, différents auteurs ont donc appliqué la PCE dans le traitement de cette pathologie. Le traitement PCE est utilisé afin de réduire les symptômes de l'arthrite chez le patient, à travers l'élimination des lymphocytes T « pathogènes ». Il existe peu d'études cliniques d'utilisation de la PCE pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. En effet seules deux études sont recensées dans la littérature avec un total de 24 patients (dont la maladie progresse malgré les traitements conventionnels). 49% des patients traités montre une réponse, une diminution de leurs symptômes après traitement (176, 177). D'autres études ont été réalisées dans l'étude du traitement sur les atteintes cutanées de l'arthrite (psoriasis), où là encore, la PCE démontre son efficacité.

Auteur	Année	N° Patients	Type d'arthrite	Réponse globale (%)
Malawista S (176)	1991	7	PAR	57
Valhquist C	1996	8	AP	50
Zic JA (177)	1999	17	PAR	41
Molochkov VA (178)	2012	52	AP	94

Tableau 6. Récapitulatif des études cliniques publiées du traitement PCE sur l'arthrite. PAR : polyarthrite rhumatoïde, AP : Arthrite psoriasique. (176-179).

Une étude clinique de phase 2 a été récemment réalisée par l'équipe de Keystone Edwards afin d'évaluer l'effet thérapeutique de la PCE sur des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, réfractaires aux traitements conventionnels. Cette étude réunit 86 patients traités dans différents centres de soins (France, Allemagne, Canada, etc...), entre 2003 et 2006 ; les données obtenues ne sont pas accessibles pour le moment, néanmoins ce travail montre l'intérêt actuel d'appliquer la PCE pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

La PCE semble montrer une certaine efficacité pour traiter cette pathologie, il serait réellement nécessaire d'augmenter le nombre d'études cliniques afin de conclure sur l'effet bénéfique de cette thérapie pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

L'étude de la pathogénèse et des mécanismes immunitaires impliqués dans la polyarthrite rhumatoïde a été fortement facilitée grâce au développement d'un modèle murin induit par l'injection de collagène, modèle reconnu pour ses similitudes avec la pathologie humaine.

B. Modèles murins

Il existe plusieurs modèles murins de polyarthrite rhumatoïde murine induite par :

- injection de collagène d'origine xénogénique (CIA),
- transfert d'Ac d'arthrite induite par le collagène,
- injection de complexes immuns
- injection de peptidoglycan-polysaccharide.

Le modèle murin de RA induite par le collagène (collagen-induced arthritis, CIA) est un modèle d'arthrite auto-immune. Il reproduit les caractéristiques immunologiques et pathologiques de la RA chez l'Homme (180). Généralement la pathologie est induite et développée chez des mâles de type DBA/1 (H2^q) âgés de 6 à 8 semaines (181). L'immunisation des souris se fait par une injection d'une émulsion de collagène bovin de type II (CII) et d'adjuvant complet de Freund (CFA), à la base de la queue, en sous-cutané. Les premiers symptômes d'inflammation apparaissent 21 jours après l'immunisation, au niveau des différentes articulations des pattes. La pathologie se développe chez 80 à 100% des souris souches susceptibles (182).

De la même façon que chez l'Homme, les souris ont une susceptibilité à développer la CIA liée à leurs molécules de CMH. Il a été montré que les souris d'haplotypes H2^q et/ou H2^r étaient sensibles au développement de cette pathologie, contrairement à d'autres souches (180). Ce modèle est aujourd'hui très largement utilisé pour comprendre le développement de la RA chez l'Homme, mais également dans le but de trouver de nouvelles thérapies pour le traitement de cette pathologie.

Chez la souris, le mécanisme de développement du CIA est peu connu, néanmoins l'implication de lymphocytes T semble claire ainsi que celle des lymphocytes B à travers leur production d'Ac auto-réactifs. La présence d'auto-anticorps spécifiques du collagène de type II semble être responsable de l'apparition d'une inflammation au niveau articulaire, ce serait le premier mécanisme dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde (180, 183). De nombreuses données montrent également l'implication de lymphocytes T CD4⁺ auto-réactifs. En effet, 3 semaines après l'immunisation, des Lymphocytes T CD4⁺ spécifiques du Collagène de type II sont observés dans les ganglions lymphatiques et la rate. Des lymphocytes T (CD4⁺) spécifiques sont également détectés au niveau des articulations (184), le répertoire TCR de ces lymphocytes T spécifiques est restreint (185).

Localement, au niveau du site d'injection les DCs vont prendre en charge la protéine de collagène. Du fait de la présence d'adjuvant (CFA), les DCs vont maturer tout en migrant vers les ganglions lymphatiques où elles vont présenter les peptides issus du collagène aux lymphocytes T naïfs et engendrer une réponse cellulaire contre ce collagène. Le collagène de type II se trouvant exclusivement dans les articulations, celles-ci seront la cible des lymphocytes T (184). Les conditions de l'injection de CII et de CFA seraient favorables au développement d'un environnement propice à une réponse de type Th1 (sécrétion d'IFN- γ). La pathologie est également exacerbée par injection d'IL-12 et/ou d'IL-18 (186). La nature des lymphocytes T CD4⁺ était décrite pour être des Th1, aujourd'hui certaines études montrent également l'implication de lymphocytes T Th17. Comme nous l'avons déjà précisé, la caractérisation des Th17 est arrivée après celle des Th1.

Dans la CIA, une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires a été observée au niveau articulaire telles que l'IL-1 β , IL-6 ou encore le TNF- α (187). De plus, la régression de la pathologie

observée après l'inhibition du TNF- α et de l'IL-1 β ont montré l'implication de ces deux cytokines dans le développement de la CIA (188, 189).

Le travail réalisé par Park et al. montre que lorsque des souris sont greffées avec une moelle osseuse de souris KO pour le gène de l'IL-17 et immunisées par injection de CII en émulsion avec du CFA ne développent pas de CIA. De plus, la quantité d'IL-1 β , de TNF- α et d'IL-6 est inférieure chez ces animaux à celle retrouvée chez des souris ayant développé une CIA. Ils démontrent également une diminution de l'ostéoclastogénèse et une augmentation du nombre de Tregs chez ces souris IL-17 $^{-/-}$, néanmoins la production d'IFN- γ ne semble pas être affectée (190). Nakae et al. montrent également la suppression de l'induction de CIA chez les souris déficientes en IL-17 (191). En revanche, les souris IFN- γ $^{-/-}$ (cytokine impliquée dans le développement des lymphocytes Th1) restent capables de développer la pathologie (192).

De son côté, Korn montre que l'inhibition de l'IL-17A (par des Anticorps anti-IL-17A) provoque la diminution du développement de CIA et une diminution de la production d'IL-6 (173), ce qui démontre l'importance de cette cytokine IL-17 et donc des cellules Th17 dans le développement du CIA. Comme chez l'Homme, les souris atteintes semblent présenter un déséquilibre de la balance Th17/Treg en faveur des Th17.

La présence de lymphocytes T CD4+auto-réactifs spécifiques du collagène, probablement des lymphocytes T Th17 serait impliqué dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde.

Comme nous le verrons ultérieurement, nous avons choisi le modèle d'induction de la CIA pour notre étude des mécanismes d'action de la PCE. Comme nous l'avons déjà vu, la PCE est efficace sur des pathologies où la présence de lymphocytes T « pathogènes » et de lymphocytes T « pathogènes » circulants sont impliqués, ce qui semble bien être le cas dans le modèle de CIA.

V. Les mécanismes d'action de la PCE

A. Rétrospectives

Bien que la PCE soit utilisée en routine depuis 30 ans, aujourd'hui ses mécanismes d'action demeurent peu connus.

La PCE a montré son efficacité pour le traitement de différentes pathologies (CTCL, GvHD, rejet de greffes, maladies autoimmunes). Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, la réinjection de cellules traitées PCE (donc apoptotiques) engendre une immunomodulation qui se manifeste différemment selon le type de pathologies. En effet, les résultats thérapeutiques obtenus après traitement PCE chez des patients atteints de CTCL, montrent la disparition complète ou partielle du clone T « pathogène » leucémique (réponse anti-tumorale), tandis que dans le traitement des patients atteints de GvHD, les résultats montrent une diminution des lymphocytes T « pathogènes », une diminution des symptômes, données cliniques qui sont également observées chez des patients atteints

de maladies auto-immunes, ce qui laisse penser à un effet tolérogène de la PCE lorsqu'elle est appliquée sur ce type de pathologie.

L'ensemble des données cliniques ne montre pas d'immunosuppression généralisée chez les patients traités, l'immunomodulation induite par la PCE semble donc être spécifique et ciblée contre les lymphocytes T « pathogènes ».

L'enjeu aujourd'hui de l'étude des mécanismes d'action de la PCE est de comprendre comment à partir d'un même traitement, on obtient des effets qui suggèrent la mise en œuvre de mécanismes d'action différents selon les pathologies concernées (115). Le seul point commun entre toutes ces pathologies est la présence de lymphocytes T « pathogènes » circulants, qu'ils soient tumoraux dans le cas du CTCL, alloréactifs dans la GvHD et les rejets d'organe ou encore auto-immuns dans les pathologies auto-immunes. La présence de ces lymphocytes T dans l'échantillon traité est nécessaire au bon fonctionnement de la thérapie (10, 129), on peut donc supposer que le contexte dans lequel ces pathologies se développent va influencer le mécanisme immunitaire conséquent.

L'effet thérapeutique de la PCE reste encore aujourd'hui une énigme. Il pourrait l'intervention du système immunitaire à l'encontre des lymphocytes T « pathogènes » et de l'induction d'une réponse de type « immunogène » ou « tolérogène », selon les contextes. Deux hypothèses peuvent être avancées afin d'expliquer l'effet immunomodulateur anti-T spécifique de la PCE : une réponse spécifique anti-T « pathogènes » induite par la génération de lymphocytes T régulateurs générés par un processus de « mort tolérogène » ou bien par la génération de lymphocytes T cytotoxiques à l'issue d'un processus de « mort immunogène ».

Un des scénarios hypothétiques pourrait être le suivant : les lymphocytes T apoptotiques (induits par le traitement PUVA), une fois réinjectés seraient pris en charge par les APCs non traitées du patient. La prise en charge de ces cellules apoptotiques serait l'élément initial, déclenchant selon le contexte immunologique de la pathologie traitée, d'une immunomodulation spécifique des lymphocytes T « pathogènes ». Dans un premier temps, nous allons évoquer certaines études de réinjection de cellules apoptotiques en prévention ou traitement de différentes pathologies, pour ensuite détailler les différents éléments (expression de molécules, prise en charge par les macrophages et les cellules dendritiques et l'élaboration d'une réponse T) impliqués dans l'élaboration d'une réponse induite par la prise en charge de ces cellules apoptotiques.

B. Réinjection de cellules apoptotiques et conséquences sur le système immunitaire dans différentes situations

De nombreux patients atteints de pathologies inflammatoires chroniques (GvHD, polyarthrite, etc...) sont traités de façon conventionnelle par immunosuppresseurs ou autres drogues. Une partie de ces patients (environ 30% chez des patients atteints de RA) ne montrent pas de réponses à ces traitements (193) ; de plus les immunosuppresseurs ou autres traitements conventionnels montrent de nombreux effets secondaires (risque accru d'infections, etc ...) et une certaine toxicité pour les patients. Le développement d'autres stratégies thérapeutiques était donc nécessaire. Les données de la littérature semblaient montrer que la réinjection de cellules apoptotiques possédait un effet

immunosuppresseur, tolérogène. C'est pour cela que différents groupes (194-200) ont travaillé sur la réinjection de cellules apoptotiques afin d'offrir une alternative thérapeutique à ces patients réfractaires aux traitements conventionnels et ont utilisés des modèles *in vivo* de maladie chronique inflammatoire telle que l'EAE (196), la GvHD (194), d'hypersensibilité de contact (195, 197) ou encore la polyarthrite rhumatoïde (198-200) pour évaluer et démontrer l'efficacité de la réinjection de cellules apoptotiques et de comprendre les mécanismes impliqués dans leur prise en charge. La réinjection de cellules apoptotiques, contrairement aux traitements conventionnels n'engendre pas de toxicité pour le patient (193).

La voie d'injection de ces cellules apoptotiques est importante puisqu'en fonction de celle-ci, les cellules apoptotiques ne vont pas être prises en charge par les mêmes phagocytes et donc ne vont pas engendrer les mêmes types de réponses (201, 202). Dans les modèles que nous allons décrire, les cellules apoptotiques sont injectées par voie intraveineuse et vont donc être prises en charge au niveau de la rate principalement par les macrophages (193). Les travaux de Miyake et al. ainsi que ceux de McGaha et al. ont montré que dans un modèle d'EAE, la réinjection de cellules apoptotiques a un effet bénéfique de tolérance sur la pathologie. En revanche lorsque les macrophages de la zone marginale de la rate sont déplétés, les auteurs observent une altération de la prise en charge des cellules apoptotiques injectées par IV et le maintien de la pathologie. Ces résultats suggèrent l'importance de ces macrophages dans la prise en charge des cellules apoptotiques (196, 203).

En vue d'étudier comment la prise en charge des cellules apoptotiques peut générer un processus anti-inflammatoire ou une réponse pro-inflammatoire, de nombreuses équipes ont réalisé des études *in-vivo* de réinjection de cellules apoptotiques dans différents types de pathologies (arthrite, EAE, GvHD). Dans un premier temps, nous allons développer les modèles *in vivo* induisant une réponse anti-inflammatoire, tolérogène et ensuite nous verrons d'autres modèles où cette fois-ci la réinjection de cellules apoptotiques peut engendrer une réponse de type pro-inflammatoire (immunogène). Dans les deux cas, nous allons associer des études de la PCE qui pourrait expliquer l'une ou l'autre des théories (tolérogène vs immunogène).

a. Modèles de réinjection de cellules apoptotiques associés à un effet tolérogène et PCE

i. Modèles de réinjection de cellules apoptotique, un effet tolérogène ?

Chez la souris, la réinjection de cellules apoptotiques ou l'induction d'apoptose *in vivo* ont montré, dans plusieurs modèles, une certaine efficacité tant dans la prévention que dans le traitement de différentes pathologies auto-immunes (diabète de type I, polyarthrite rhumatoïde murine, modèle expérimental de sclérose en plaque (Experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE), etc...) et d'autres pathologies inflammatoires (Sepsis, GvHD, hypersensibilité au contact,...).

Dans une étude faite sur l'EAE, Perruche et al. montrent que l'induction d'apoptose des lymphocytes T *in vivo* à l'aide d'anticorps anti-CD3 et leur prise en charge par des macrophages et des cellules dendritiques immatures provoquent une amélioration des symptômes et la sécrétion de TGF- β par ces phagocytes. Cette sécrétion de TGF- β *in vivo* va engendrer la génération de lymphocytes T régulateurs (204).

Dans un modèle murin de GvHD, De Carvalho et al. montrent que la réinjection de cellules apoptotiques de la souris « donneuse » pendant une greffe allogénique de moelle osseuse favorise la prise de cette greffe et suggèrent l'implication de deux cytokines anti-inflammatoires, le TGF- β et l'IL-10 dans l'induction de cette tolérance, favorisant la prise des cellules du donneur (205). Des résultats similaires sont obtenus par l'équipe de Sun et collab., sur un modèle d'allogreffe de cœur chez le rat. L'injection de splénocytes apoptotiques du donneur par voie intraveineuse plusieurs jours avant l'allogreffe, favorise la prise de la greffe allogénique. Ils montrent également que la phagocytose des cellules apoptotiques jouent un rôle crucial dans l'induction de la tolérance (206).

Une autre étude réalisée par Kleinclauss et al., sur un modèle de GvHD montre que la réinjection par intraveineuse de splénocytes (de la souris « donneuse ») en apoptose précoce (induite par une irradiation γ) simultanément avec la greffe de moelle osseuse à des souris allogéniques, inhibe le développement de la GvHD. Cet effet bénéfique des cellules apoptotiques observé serait dû à la prise en charge de ces cellules par les macrophages présents dans la souris « receveuse » et provoquerait dans ce modèle l'expansion de lymphocytes T régulateurs au niveau de la rate. Cette expansion des lymphocytes T régulateurs disparaît lorsque les souris sont traitées au préalable avec un anticorps anti-TGF- β , ce qui suggère que le TGF- β joue un rôle important dans l'effet préventif induit par les cellules apoptotiques (194).

Enfin dans le modèle de la polyarthrite rhumatoïde murine (CIA), développé par Bonnefoy et al., la réinjection de thymocytes irradiés (Rayon X) d'un donneur provoque la diminution des symptômes arthritiques. Cette diminution est due à la sécrétion de TGF- β puisque l'inhibition de cette cytokine bloque l'effet bénéfique de l'injection de cellules apoptotiques (diminution des symptômes). Ils observent également la génération de T régulateurs spécifiques du collagène au niveau de la rate, chez les souris traitées (200).

Ces données suggèrent que la réinjection de cellules apoptotiques provoque l'induction d'un phénomène immunorégulateur lui-même initié par la prise en charge de ces cellules apoptotiques, notamment par les macrophages et les DCs immatures. Dans la revue récente publiée par P. Saas en 2013, les différents modèles de réinjection de cellules apoptotiques sont décrits, les différentes cellules responsables de leur prise en charge montrent que dans la majorité des cas, cette prise en charge engendre la synthèse de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) et l'inhibition de cytokines pro-inflammatoires (193).

Dans des contextes de pathologies inflammatoires, la réinjection de cellules apoptotiques et leur prise en charge semble induire un effet tolérogène, de par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et la génération de lymphocytes T régulateurs spécifiques.

ii. Mort tolérogène et PCE

La PCE pourrait être considérée comme une thérapie dont le principe repose sur la réinjection de cellules apoptotiques. Sur cette base et selon l'état des données des recherches, on pourrait supposer que la réinjection de cellules traitées PCE provoque la génération de lymphocytes T régulateurs spécifiques et ainsi, est à l'origine de l'immunorégulation observée chez les patients atteints de GvHD, de rejets de greffes ou encore de maladies auto-immunes. Certaines études appuient

l'hypothèse selon laquelle l'effet de la PCE serait dû au développement d'un phénomène toléro-gène (153, 159, 160, 166, 195, 207, 208).

Chez la souris, les travaux réalisés par les équipes de Gatz et de Maeda, montrent, dans deux modèles murins distincts (hypersensibilité de contact : CHS et GvHD), que la réinjection de splénocytes « pathogènes » préalablement traités PUVA induit l'amélioration des symptômes, mais également la génération de lymphocytes T régulateurs spécifiques. L'apparition des cellules T régulatrices spécifiques est liée, dans ces modèles à la sécrétion de TGF- β et d'IL-10 par les APCs ayant phagocyté les cellules traitées PCE (apoptotiques) (166, 195).

Chez l'Homme plusieurs études montrent également une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs après traitement PCE chez différents patients atteints de GvHD ou de rejets de greffe (153, 159, 160, 207, 208). Dans ces études faites chez l'Homme, les modalités de caractérisation des lymphocytes T régulateurs (153, 207, 208), l'hétérogénéité des résultats observés au sein d'une même étude, ainsi que le faible nombre de patients étudiés permettent d'émettre des réserves sur ces affirmations (159, 160).

Les travaux réalisés par Gerner et al., chez des patients atteints de GvHD, montrent l'effet direct du traitement PCE sur les 6-sulfo LacNAc DC (sIDCs) (population de cellules dendritiques inflammatoires humaines présentes abondamment dans le sang (311)). Ces cellules après PCE présentent un défaut de maturation. Le traitement provoque une diminution de leur sécrétion de TNF- α , IL-12 et IL-1 β et engendre une diminution de leur capacité à induire la prolifération des lymphocytes T CD4+ et CD8+ ainsi que la polarisation Th1 (312). La modification fonctionnelle des sIDCs par traitement PCE (défaut de maturation, etc...) pourrait engendrer la génération de lymphocytes T régulateurs et ainsi la réponse toléro-gène observée dans la GvHD.

L'étude réalisée par Rieber et al. sur des patients atteints de GvHD, traités PCE montre une augmentation de cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes (MDSCs) de type neutrophile chez les patients GvHD traités PCE en comparaison avec la quantité trouvée chez les patients non traités ou avant traitement (313). Ces cellules sont capables de supprimer directement la prolifération des lymphocytes T CD4+ et CD8+ qui pourraient être responsables de la pathologie et donc pourraient également expliquer la réponse observée chez les patients atteints de GvHD après traitement PCE.

In vitro, chez l'Homme, la co-culture de monocytes traités PCE (issus de patients atteints de rejet de greffe) avec des monocytes non traités et en présence de GM-CSF et d'IL-4 provoque la différenciation de ces monocytes en cellules dendritiques toléro-gène (faible expression de molécules de costimulation et haute expression de molécules MHC) (208, 209). La mise en culture de DCs avec des lymphocytes T autologues traités PUVA, en présence de LPS semble provoquer la baisse d'expression de molécules de costimulation des DCs (CD40, CD80 et CD54), ainsi que le maintien d'une forte expression d'HLA-DR. Les DCs présentent également la capacité de sécréter de l'IL-10 (210, 211). De même, la coculture de lymphocytes T traités PUVA avec des PBMCs autologues non traités provoque une augmentation de synthèse de mRNA d'IL-10 et d'IL-1Ra (dépendante de l'IL-10) (161).

On peut donc émettre l'hypothèse qu'après la réinjection des cellules traitées PUVA, les cellules apoptotiques (dont le stade « d'apoptose » reste à déterminer) seraient prises en charge par des DCs immatures ayant une grande capacité de phagocytose ; selon la quantité, la qualité des cellules apoptotiques, leur capture par les DCs pourrait provoquer une diminution de la production de

cytokines pro-inflammatoires et une augmentation des anti-inflammatoires. Ces APCs ayant phagocyté les cellules apoptotiques montreraient une diminution d'expression de molécules de co-stimulation et donc une perte de la capacité à stimuler une réponse T. La sécrétion d'IL-10 et de TGF- β par ces APCs provoquerait la génération de lymphocytes T régulateurs, capables de réguler ou d'inhiber spécifiquement les lymphocytes T effecteurs responsables de pathologies telles que la GvHD, les rejets d'organes ainsi que certaines pathologies auto-immunes (Fig. 8).

Différents types de lymphocytes T régulateurs pourraient être impliqués dans les mécanismes d'action engendrés par le traitement PCE :

- Les lymphocytes T régulateurs induits en périphérie (iTreg)
- Les lymphocytes T régulateurs CD8+

Les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg) représentent un sous-type de lymphocytes T CD4+ régulateurs qui sont induits dans les organes lymphoïdes secondaires à partir de la différenciation de lymphocytes T naïfs après leur contact avec des APCs. L'induction de iTreg va dépendre de l'environnement dans lequel se fait la polarisation des lymphocytes T naïfs. Deux sous-populations de iTreg ont été décrites : les Tr1 et les Th3 (314). Les Tr1 sont des lymphocytes T CD4+ induit par la présence d'IL-10 lors de leur polarisation, qui possèdent des capacités régulatrices et exercent leur fonction par la sécrétion de grande sécrétion d'IL-10 et en moindre quantité de TGF- β . Les Tr1 expriment FoxP3 lorsqu'ils sont activés mais cette expression n'est pas nécessaire pour l'induction de ces cellules ni pour exercer leur fonction régulatrice. Les Tr1 sont souvent identifier par leur profil cytokinique (IL-10^{high}, TGF- β ^{high}, IL-2^{low} et l'absence d'IL-4 après leur activation). Les Th3 sont définis phénotypiquement par leur expression de CD4, CD25 et FoxP3, sont induits par la présence de TGF- β et d'IL-4 lors de leur polarisation et exercent leur capacité suppressive par la sécrétion massive de TGF- β et en moindre quantité d'IL-10 (315).

Il existe également une autre population de lymphocytes T régulateurs, moins connus que les Treg CD4+, caractérisés par leur expression de CD8 : les lymphocytes T régulateurs CD8+. Ces lymphocytes T et en particulier la sous-population de lymphocytes Treg CD8+ CD103+ pourraient être impliqués dans les mécanismes impliqués lors du traitement PCE chez les patients atteints de GvHD ou de rejet de greffe puisqu'ils sont spécifiques des allo-antigènes. Bien que ces lymphocytes T CD8+ sécrètent de grande quantité d'IL-10, leur fonction suppressive est contact dépendante (316).

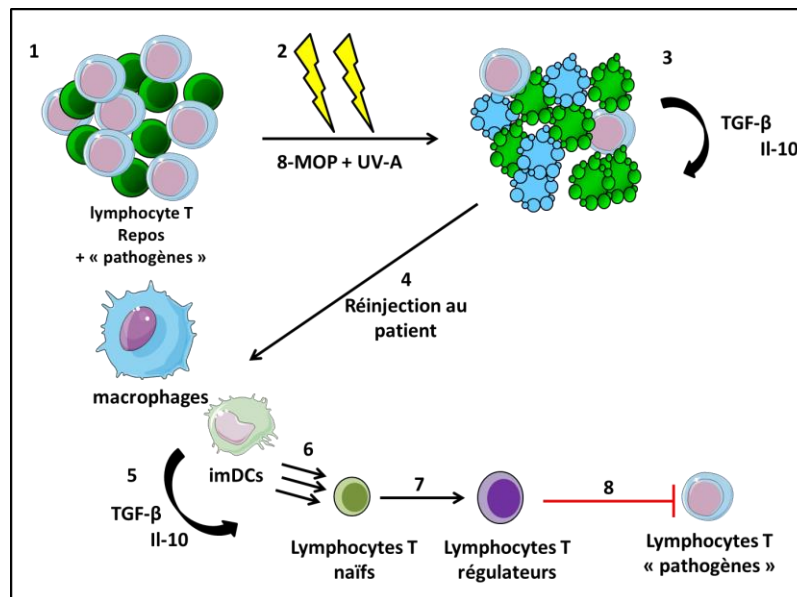


Figure 8 : Elaboration d'une réponse associée à la mort « toléro-gène » par la PCE. Schéma inspiré de différentes revues (167, 212-214). Les PBMCs du patient sont prélevées par cytophérèse (1), sont mises en présence de 8-MOP et irradiées aux UV-A (2), ce qui provoque l'entrée en apoptose des lymphocytes T, notamment des lymphocytes T « pathogènes » (3). Ces cellules apoptotiques vont sécréter des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou le TGF-β (immunosuppression directe). Les cellules traitées vont être réinjectées au patient par voie intraveineuse (4) et vont être prises en charges par les APCs (macrophages et cellules dendritiques) qui relargueront également des cytokines anti-inflammatoires (5). Les DCs immatures (toléro-géniques) présentent les antigènes dérivés des cellules apoptotiques aux lymphocytes T naïfs (6), expriment peu de molécules de costimulation ce qui provoque la génération de lymphocytes T régulateurs (7) qui inhibent/régulent les lymphocytes pathogènes, responsables de la pathologie (8).

b. Modèles de réinjection de cellules apoptotiques associés à un effet immunogène

La majorité des études réalisées sur la réinjection de cellules apoptotiques montrent l'induction d'une réponse de type « toléro-gène », en revanche, dans d'autres situations, cette réinjection peut engendrer une réponse plutôt de type « immunogène ».

i. Concept de mort immunogène dans le cancer

Le groupe de L. Zitvogel, en 2007 montre que suite à des traitements de chimiothérapie ou radiothérapie (anthracycline, radiothérapie γ) induisant la mort des cellules cancéreuses une réponse anti-tumorale est développée, médiée par des lymphocytes T CD8+, avec la production de cytokines pro-inflammatoires, phénomène décrit comme « mort immunogène ».

Les premières observations ont été faites chez la souris dans un modèle de carcinome de colon. Dans ce modèle (CT26), l'injection de cellules tumorales (carcinome de colon, CT26) induites en

apoptose par des drogues de chimiothérapie : anthracyclines (Doxorubine) entraîne une réponse systémique anti-cancéreuse.

Dans cette étude, des souris sont injectées avec des cellules tumorales préalablement traitées aux anthracyclines (ce qui entraîne leur apoptose) dans un de leurs flancs. Une semaine plus tard, des cellules issues de la même lignée tumorale (vivantes) sont injectées à ces souris, dans le flanc opposé. Les auteurs observent que les souris préalablement « vaccinées » avec des cellules tumorales apoptotiques traitées aux anthracyclines ne développent pas de tumeur (Fig. 9). En revanche les souris qui n'ont pas reçu cette première injection de cellules traitées aux anthracyclines développent une tumeur. Cette réponse anti-tumorale disparaît après inhibition des caspases ou déplétion des cellules CD8⁺ montrant ainsi l'implication des lymphocytes T CD8⁺ dans l'effet anti-tumorale après la réinjection de ce type de cellules. De plus cette protection n'a lieu que si le même type de cellules est inoculé, ce qui montre une spécificité de cette réponse anti-tumorale. Cet effet protecteur est également maintenu à long terme et lorsque les splénocytes de souris traitées sont prélevés et réinjectés par voie intraveineuse à des souris saines injectées a posteriori avec la même lignée tumorale (transfert de la protection) (215).

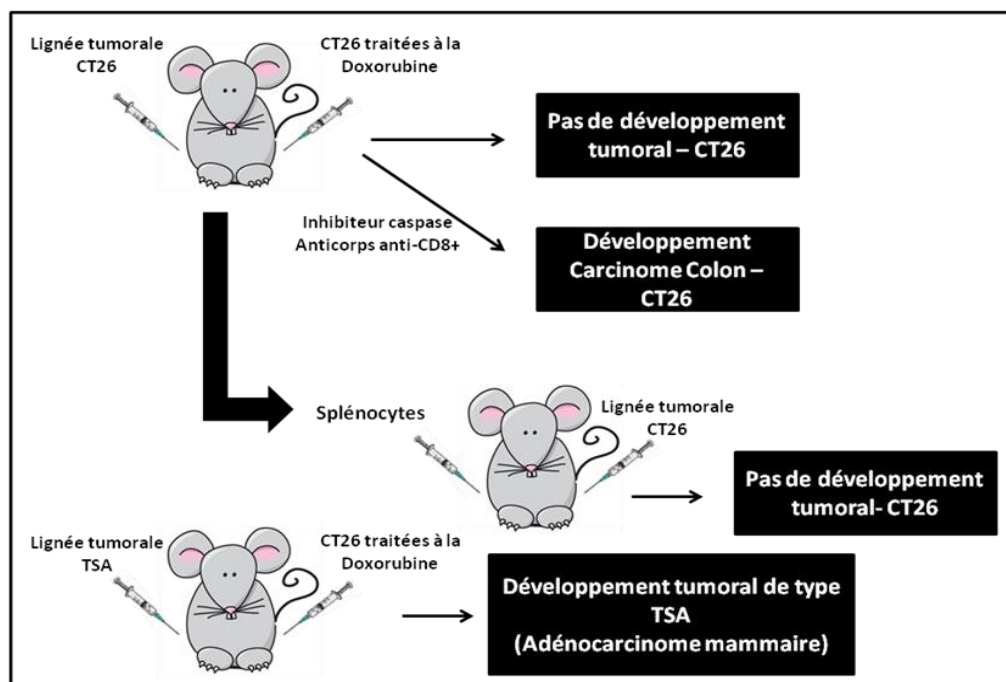


Figure 9 : Modèle de l'induction d'une réponse anti-tumorale CD8⁺ après réinjection de cellules tumorales apoptotiques induites par Doxorubine, proposé par Noelia Casares, dans l'article publié dans le journal *Journal of experimental medicine*, en 2005 (215).

Dans ces études, il est également démontré que l'obtention d'une telle réponse anti-tumorale, nécessite que le sujet traité soit immunocompétent et que la prise en charge de ces cellules apoptotiques ainsi que l'induction de cette réponse soit faites par les cellules dendritiques. L'induction de l'apoptose des cellules tumorales par irradiation gamma provoque le même type de réponse anti-tumorale immunogénique (215).

Plus tard, la même équipe montre que dans ce modèle de mort « immunogène », l'apoptose des cellules tumorales provoque l'expression ou la sécrétion d'un certain nombre de molécules dites de

danger (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs) qui sont associées au caractère immunogène de l'apoptose dans ces modèles.

Parmi ces DAMPs, on retrouve :

- La Calréticuline (CRT), une protéine chaperone, localisée dans les conditions normales dans le réticulum endoplasmique (RE) des cellules, est aussi responsable de la régulation du Ca^{2+} . Dans le contexte d'une mort immunogène, la CRT s'exprime au niveau de la membrane plasmique (216). L'externalisation de la CRT est provoquée suite à l'induction d'un stress du RE qui se traduit par la phosphorylation de la protéine eIF2 α (217). L'ecto-CRT faciliterait la phagocytose des cellules par les moDCs, par la liaison avec CD91 ou encore avec le scavenger receptor A (218, 219).
- Les protéines Hsp70 et Hsp90, sont des protéines chaperones qui dans les conditions normales se trouvent dans le RE. Dans un contexte de mort immunogène les protéines Hsp70 et -90 sont exprimées à la membrane des cellules apoptotiques, après l'apparition d'un stress du RE, comme la CRT. (220, 221). Tout comme la CRT, les protéines Hsp se lient au récepteur CD91 (218).
- L'HMGB1 (high-mobility group box 1 protein), est une protéine nucléaire relarguée dans le milieu extracellulaire, dans un contexte de mort immunogène. La protéine HMGB1 extracellulaire se lie au TLR-4 et favoriserait la prise en charge et la présentation antigénique des DCs (222). La protéine HMGB1, en fonction de son état d'oxydation ne va pas jouer le même rôle. Dans le contexte de mort immunogène, la protéine HMGB1 doit se trouver dans un état complètement réduit afin d'assurer sa fonction (223).
- L'ATP, sécrété par les cellules apoptotiques dans le contexte de mort immunogène, permet de par sa liaison au récepteur P2RX7, l'activation de l'inflammasome NLRP3, responsable de la maturation de la caspase 1, ce qui permet la sécrétion d'IL-1 β mature (224).
- L'IL-1 β , sécrétée par les DCs qui ont préalablement phagocyté des cellules apoptotiques « immunogènes », est une cytokine pro-inflammatoire qui permet notamment le « priming » des lymphocytes T CD8+, antigène spécifique (224).

Suite à ces travaux, quatre inducteurs de mort immunogène ont été décrits : des pathogènes, des traitements de chimiothérapie, des atteintes physiques (irradiation, thérapie photodynamique, ...) ou encore « nécroptotique ». La PCE pourrait dans ce contexte se rapprocher de la mort immunogène induite par irradiation. Selon les données de la littérature, les cellules tumorales irradiées expriment la CRT à leur surface ainsi que la protéine Hsp70, sécrètent de l'ATP et l'IL-1 β et relarguent la protéine HMGB1 (221).

Selon le modèle de l'équipe de L. Zitvogel, le développement d'une mort tolérogène ou immunogène dépend notamment de l'expression précoce de CRT à la surface des cellules apoptotiques (217, 225). L'importance de l'ordre spatiotemporel est ici, à prendre largement en compte. Nous discuterons de cette précocité ultérieurement dans la discussion appartenant au chapitre de l'étude in vitro des mécanismes d'action de la PCE.

Il a été montré que l'irradiation de cellules tumorales murines (carcinome du sein, des poumons et de prostate) à 100Gy provoque l'exposition de CRT à leur surface, le relargage d'HMGB1 et la sécrétion d'ATP dans le milieu extracellulaire. Cette irradiation engendre *in vitro* comme *in vivo* une modulation immunogénique : l'externalisation de la CRT et l'augmentation de l'expression de certaines molécules impliquées dans le « processing » des antigènes (MHC-I, etc...). Les cellules tumorales irradiées ayant survécu vont être plus sensibles à une lyse médiée par les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) que celles qui n'ont pas été irradiées. Lorsque l'on bloque la CRT, la lyse des cellules irradiées diminue en comparaison à celle exprimant de la CRT en surface (226).

Enfin, Bell, montre que le l'induction d'apoptose (par traitement à l'ectoposine et la staurosporine) dans deux lignées tumorales (Jurkat et U937) provoque le relargage d'HMGB1 dans le milieu extracellulaire (227).

ii. Mort immunogène et Thérapie Photo-Dynamique

La Thérapie Photo-Dynamique (PDT) est une immunothérapie qui consiste à injecter un agent photosensibilisant par exemple par voie intraveineuse ou par application locale (sous forme de crème). Cet agent s'accumule majoritairement dans les cellules tumorales. L'irradiation de la zone tumorale à la lumière (entre 400 et 850 nm : lumière visible) compatible avec le spectre d'absorption de l'agent photosensibilisant, va activer cet agent et engendrer l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont par leur activité toxique, détruire les cellules tumorales et provoquer un phénomène inflammatoire (228, 229).

Selon les données rapportées, cette thérapie est capable d'engendrer trois types de mort cellulaire différents : la nécrose, l'apoptose et l'autophagie. L'apoptose semble être la mort cellulaire majeure après un traitement par thérapie photodynamique *in vivo* (230, 231). La PDT est capable d'engendrer deux types d'action anti-tumorale : une action directe à travers la mort des cellules tumorales et indirecte par le développement d'une réponse immune anti-tumorale. La mort cellulaire induite par la PDT touche principalement les lymphocytes et là aussi, les lymphocytes activés sont plus sensibles au traitement que les autres (232), de plus il a été montré que la thérapie ne fonctionnait que chez des sujets immunocompétents.

Les cellules tumorales traitées par PDT (utilisant soit de la photofrine soit de l'hypéricine comme agent photosensibilisant), exprimaient à leur surface deux DAMPs : la protéine Hsp70 et la Calréticuline, sécrétaient de l'ATP et étaient capables d'induire le relargage d'Il-1 β par les DCs, suggérant l'apparition d'un effet anti-tumoral immunogène. Ces auteurs ont également démontré l'implication de la CRT dans la phagocytose des cellules qui l'expriment (233, 234)

L'une des caractéristiques communes entre le traitement par les anthracyclines et la PDT (Photofrine et Hypéricine) est l'apparition d'un stress du Reticulum endoplasmique (RE) (234). De plus, le traitement de cellules tumorales par PDT provoque la maturation des cellules dendritiques ayant phagocyté les cellules traitées. Chez les souris, la réinjection de cellules tumorales traitées par Hyp-PDT les protège du développement tumoral, de la même façon que le fait l'injection de cellules

tumorales traitées par anthracyclines (immunogénique). L'exposition précoce de la CRT à la surface des cellules apoptotiques serait la clé du déclenchement d'une réponse immunogène (234, 235).

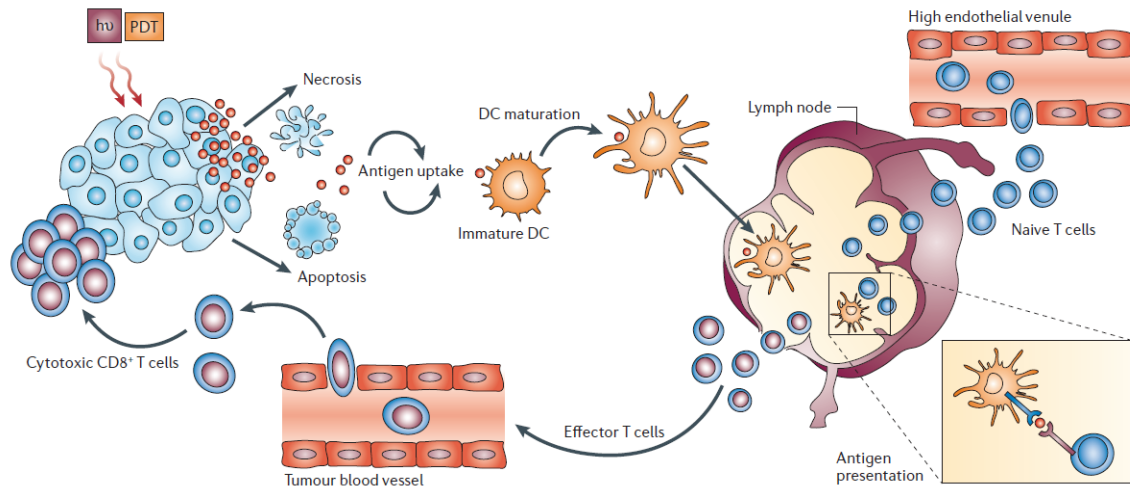


Figure 10: Mécanismes d'action décrit pour la Thérapie Photo-dynamique (PDT), par Ana P. Castano, dans l'article *Photodynamic therapy and anti-tumour immunity*, publié dans la revue *Nature reviews cancer*, en 2006. La thérapie Photo-Dynamique va provoquer l'apoptose des cellules tumorales qui vont être prises en charge par des DCs immatures. Ces DCs vont maturer et migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques où elles vont présenter les Ags dérivés des cellules tumorales apoptotiques aux T naïfs et ainsi développer une réponse anti-tumorale médiée par les LTs cytotoxiques (228).

De la même façon que la PCE, la PDT qui est aujourd'hui utilisée pour traiter certaines lésions cutanées pré-cancéreuses ou certains cancers cutanés non mélanocytaires a été proposée pour le traitement de pathologies telles que la GvHD, certaines formes cutanées de CTCL ou encore certaines pathologies autoimmunes.

La PDT possède donc de nombreuses similitudes avec la PCE comme : l'utilisation d'agent photosensibilisant, l'irradiation par lumière visible, l'apoptose induite des lymphocytes T avec une cinétique plus rapide des lymphocytes T activés, une immunomodulation, etc., ce qui laisse suggérer que la PCE pourrait elle aussi provoquer un effet immunogène sur les cellules tumorales (exemple du CTCL).

iii. Mort immunogène et PCE – Hypothèse

Cependant le scénario, tiré de quelques études cliniques de PCE chez des patients atteints de GvHD et de rejet de greffe, qui implique la génération de lymphocytes T régulateurs ainsi que la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (TGF- β et IL-10) est peu convaincant pour expliquer la réponse antitumorale observée chez les patients atteints de CTCL traités par PCE.

La théorie de la « mort immunogène », développée en 2007, par l'équipe de Laurence Zitvogel et observée dans plusieurs contextes pourrait constituer une autre base à la compréhension des mécanismes d'action de la PCE.

Différentes études de la PCE (107, 110, 236) montrent que le traitement PCE serait capable d'induire une réponse de type « immunogène ». L'ensemble de ces études sont réalisées sur des cellules issues de patients atteints de CTCL.

L'activation (PHA) *in vitro*, de lymphocytes T issus de PBMCs de patients atteints de CTCL avant et après traitement PCE, montre une augmentation de la sécrétion des cytokines de type Th1 (IFN- γ) et une diminution des Th2 (IL-4) par les lymphocytes T après le traitement. Ce changement de profil cytokinique est associé à la disparition du clone T pathogène au niveau du sang périphérique (107, 108). Plus récemment, il a également été montré que *in vitro*, le traitement PUVA réalisé sur des PBMCs préalablement activés par des molécules agonistes de TLR-4 et de TLR-7 (LPS/ R848 respectivement) provoquait la sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α par les mDCs traitées, deux molécules de type pro-inflammatoire (236). Une autre étude faite *ex vivo*, sur des monocytes de patients atteints de CTCL avant et après 6 mois de traitement PCE montre une augmentation de la sécrétion de TNF- α et d'IL-6 après traitement, en comparaison avec celle obtenue avant (110). Il a également été montré que le traitement PUVA des cellules d'une lignée cellulaire de lymphome murin (RMA) pouvait promouvoir l'expression de MHC-I (237), molécule impliquée dans la réponse effectrice de type CD8+.

Enfin, l'apoptose plus rapide après traitement PUVA des lymphocytes T activés démontrée au sein de notre laboratoire (28) pourraient s'inscrire dans cette théorie de mort immunogène. Comme le suggère D. Hannani dans son « opinion article » (238) : les lymphocytes T activés traités PUVA, apoptotiques pourraient exprimer des DAMPs comme la CRT, la protéine HMGB1 ou encore l'ATP, être pris en charge plus précocement, avant les lymphocytes T au repos par les DCs et donc pourraient servir comme « source » d'antigène pour l'élaboration d'une réponse par les cellules dendritiques. L'émission de DAMPs par les lymphocytes T apoptotiques pourrait provoquer la maturation des DCs, la présentation par les DCs des antigènes issus de ces lymphocytes T apoptotiques, aux lymphocytes T naïfs dans les ganglions et ainsi engendrer l'élaboration d'une réponse T cytotoxique (CD8+) spécifique contre les lymphocytes T « pathogènes » (Fig. 11).

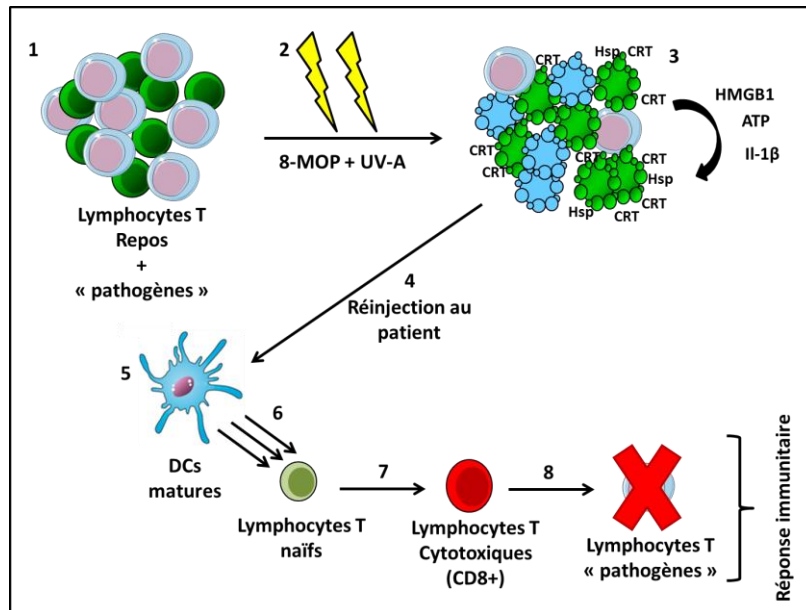


Figure 11 : Elaboration d'une réponse associée à la mort « immunogène » induite par la PCE. Les PBMCs du patient sont prélevés par cytophérèse (1), sont mis en présence de 8-MOP et irradiés aux UV-A (2), ce qui provoque l'entrée en apoptose des lymphocytes T, notamment des lymphocytes T « pathogènes ». Ces lymphocytes T en apoptose expriment à leur surface de la Calréticuline et des protéines Hsp (70 et 90), relarguent HMGB1 et sécrètent l'ATP ainsi que de l'IL-1 β , une cytokine pro-inflammatoire (3). Ces cellules apoptotiques sont réinjectées au patient (4) et prises en charge par les DCs (5). Les DCs qui phagocytent les cellules apoptotiques, mûrent notamment grâce aux DAMPs exprimés et sécrétés par les lymphocytes T apoptotiques, et vont être capables d'engendrer une réponse cytotoxique induite par la présentation des antigènes dérivés de ces cellules aux lymphocytes T naïfs (6) et provoquer leur polarisation vers un profil lymphocytes T CD8+ (7). Ces lymphocytes T cytotoxiques sont spécifiquement dirigés contre les antigènes des cellules apoptotiques, donc contre les lymphocytes T « pathogènes » (8).

Les données obtenues par le groupe de L. Zitvogel, celles obtenues par l'étude de la Thérapie Photo-dynamique, ainsi que la similitude (de protocole) entre la PCE et la PDT suggèrent que la mort immunogène pourrait expliquer les résultats cliniques observés chez des patients atteints de CTCL après traitement PCE. L'étude de l'expression et de la sécrétion des différents DAMPs par les cellules traitées PCE pourrait être une donnée importante afin d'analyser leur capacité à générer une réponse de type immunogène.

Nous allons maintenant détailler les différents mécanismes impliqués dans la prise en charge des cellules apoptotiques par les APCs et la conséquence élaboration d'une réponse T.

C. Prise en charge de cellules apoptotiques

a. *Reconnaissance des cellules apoptotiques*

Des phagocytes dits professionnels, tels que les macrophages et les cellules dendritiques (DCs) sont spécialisés dans la prise en charge de cellules apoptotiques, ce sont aussi des cellules présentatrices d'antigènes (APCs). D'autres phagocytes dits « non professionnels » (fibroblastes, cellules épithéliales) sont également capables de phagocyter des cellules apoptotiques mais uniquement dans des contextes particuliers notamment dans les tissus tels que les alvéoles pulmonaires ou encore l'épithélium intestinal où les macrophages ont du mal à pénétrer (202).

Après phagocytose de cellules apoptotiques, les APCs sont capables de présenter à leur surface des peptides antigéniques issus de ces cellules associés aux molécules du CMH ; ces complexes peuvent être alors reconnus par des lymphocytes T naïfs (239) et engendrer une réponse immune spécifique.

La prise en charge des cellules apoptotiques a été largement étudiée (240-242). L'apoptose, dans des conditions physiologiques normales, est un processus indispensable au bon développement et fonctionnement d'un organisme ainsi qu'au maintien de son homéostasie. Ce processus est généralement associé à une absence d'inflammation et/ou à une réponse immunitaire tolérogène contre les constituants du soi (243), il permet ainsi d'éviter le développement de pathologies auto-immunes. Afin de garantir le maintien de l'homéostasie, il est important que les cellules apoptotiques soient correctement et rapidement prises en charge, et éliminées « silencieusement ».

La prise en charge de cellules apoptotiques dépend du recrutement des phagocytes dû à la sécrétion de molécules « find-me signal » par les cellules apoptotiques, à l'expression de signaux « eat-me » à la surface de ces cellules apoptotiques et à leur reconnaissance par les phagocytes grâce aux récepteurs exprimés par ces phagocytes.

Parmi les signaux « find-me », on retrouve 3 types de molécules : les chimiokines (CX3CL1 (242), CXCL8, ...), les lipides (Lysophosphatidylcholine (LPC (244)) et Sphingosine-1-phosphate (S1P(240))) et les nucléotides (UTP et ATP) (245). Ces molécules relarguées par les cellules apoptotiques vont permettre le recrutement et l'activation des phagocytes grâce à des récepteurs spécifiques exprimés sur ces phagocytes.

L'expression de signaux « eat-me » tels que la phosphatidylsérine (PS) (246), la Calréticuline (241), ICAM3 ou encore la Trombospondine 1 par les cellules apoptotiques va permettre d'induire la phagocytose de ces cellules, par les phagocytes (193, 202). La phosphatidylsérine est la première molécule « eat-me » qui a été mise en évidence.

Les cellules viables expriment également des molécules « eat-me » à leur surface, en plus faible quantité que les cellules apoptotiques. La phagocytose va donc dépendre de l'équilibre entre la présence de « eat-me signal » et celles de « don't eat-me signal » tels que CD31 (247) ou encore CD47 (241, 248, 249), à la surface des cellules apoptotiques. La perte des signaux « don't eat-me » par les cellules apoptotiques fait pencher la balance en faveur des signaux « eat-me » qui favorisent ainsi leur phagocytose.

Tous les récepteurs capables de reconnaître les molécules « eat-me » ne sont pas présents sur tous les phagocytes. En fonction du lieu et de la nature de l'induction de l'apoptose, différents signaux « eat-me » sont exprimés à la membrane des cellules apoptotiques. De plus, il existe pour chaque signal « eat-me » différents récepteurs capables de les reconnaître tels que les « scavenger receptors », les récepteurs du complément, le CD14, le CD36 ou encore certaines lectines (202, 250). Certains récepteurs reconnaissent directement la molécule alors que d'autres nécessitent une molécule intermédiaire. Par exemple, dans le cas de la phosphatidylsérine, plusieurs récepteurs peuvent être mis en jeu : TIM-4 (251, 252), BAI-1 (253), Stabiline-2 (254) ou encore MerTK (récepteur de type TAM) (255), certains reconnaissent directement la PS (TIM-4, BAI-1 et Stabiline-2) et d'autres le font indirectement (MerTK).

La Calréticuline exprimée à la membrane est également un signal « eat-me ». Elle est reconnue de manière directe par les récepteurs CD91 (LRP-1) (LRP-1) (218) et « scavenger receptor A » (219) et permet à travers eux, la phagocytose des cellules apoptotiques qui l'expriment. En effet, l'étude réalisée par Verneret et al. montre que les cellules déficientes en CRT sont moins phagocytées que les cellules « contrôles » (exprimant CRT) (256). La Calréticuline peut être également reconnue de manière indirecte par sa liaison à la molécule du complément C1q. L'étude réalisée par Païdassi et al., en 2011, montre l'interaction de la CRT avec la molécule du complément C1q sur des cellules apoptotiques d'une lignée tumorales (257). Des études par FRET ont également montré l'interaction de la partie globulaire de la molécule C1q et de la CRT à la surface des cellules en apoptose précoce (256). L'implication de C1q dans la prise en charge des cellules apoptotiques a été largement démontrée puisque son inhibition entraîne le développement de pathologies auto-immunes, notamment du lupus érythémateux systémique (258, 259).

La Calréticuline peut intervenir également dans le déclenchement du phénomène de mort immunogène dans certains contextes particuliers de chimiothérapie ou radiothérapie (225) comme nous l'avons développé dans la partie « concept de mort immunogène et cancers ».

Il est important de souligner que les molécules « eat-me » ne seront à l'origine d'une endocytose que si parallèlement à leur expression la cellule présente une diminution des signaux « don't eat-me » tels que CD47 et CD31 (241).

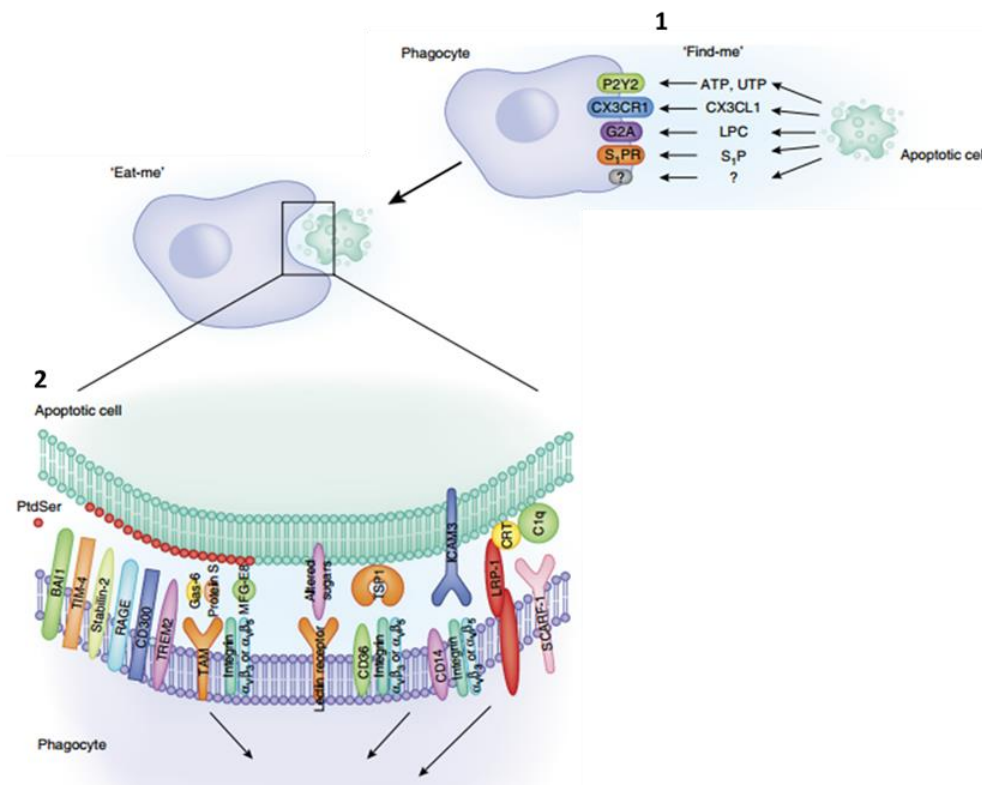


Figure 12 : Schéma regroupant les différentes molécules intervenant dans la prise en charge des cellules apoptotiques, proposé par S. Arandjelovic dans l'article « (202). Les cellules apoptotiques relarguent des molécules dites « find-me » (1) dans le but d'attirer et d'activer les phagocytes. Pour être reconnue par les phagocytes, les cellules apoptotiques doivent exprimer à leur surface, une série de molécules dites « eat-me » (2). Les récepteurs de ces molécules de « eat-me » à la surface des phagocytes vont pouvoir les reconnaître et phagocyter les cellules apoptotiques (202).

Un défaut dans la reconnaissance, la prise en charge et l'élimination des cellules apoptotiques peut entraîner l'apparition de pathologies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique (SLE) (213, 260, 261).

b. Prise en charge des cellules apoptotiques et ses conséquences, maturation des APCs ?

La plupart des travaux réalisés sur la prise en charge des cellules apoptotiques (262-264) décrit ce phénomène comme un processus immunosuppresseur, en revanche d'autres études suggèrent qu'elle pourrait être à l'origine d'une réponse plutôt immunostimulatrice (265-268). Le type de réponse immune engendrée par la prise en charge des cellules apoptotiques reste donc à ce jour très débattue, elle pourrait dépendre du contexte dans lequel elle se déroule. Ainsi, le type de cellules apoptotiques, celui des phagocytes, les différentes molécules présentées par les cellules apoptotiques, les facteurs relargués par les phagocytes et par les cellules apoptotiques ainsi que la cause de la mort cellulaire vont orienter le type de réponse (193, 269).

Dans certaines conditions d'apoptose induite par des anticorps (anti-CD3, irradiation γ et dexaméthasone), il a été observé que les lymphocytes T apoptotiques relarguaient deux cytokines anti-inflammatoires : TGF- β (270) et IL-10 (271), favorisant ainsi un microenvironnement anti-inflammatoire. La relargage de ces cytokines semble provoquer l'inhibition de la sécrétion de TNF- α par les phagocytes (270). Les cellules apoptotiques possèderaient donc un effet immunorégulateur direct au cours de leur prise en charge (193).

Il a également été montré que la co-culture de lymphocytes T apoptotiques avec des macrophages provoquait la sécrétion d'IL-10 dans le milieu extracellulaire (262). De la même façon, la prise en charge de neutrophiles apoptotiques provoque la sécrétion de TGF- β par les macrophages (263, 264). Dans les deux cas, il a été démontré que la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages provoquait l'inhibition de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β ou encore le GM-CSF (262-264). Selon toutes ces données, la prise en charge des cellules apoptotiques par les macrophages provoque un effet immunosuppresseur.

Même si les macrophages sont les APCs qui phagocytent le plus efficacement les cellules apoptotiques, les cellules dendritiques sont, elles aussi, capables de les prendre en charge (272). Lorsque cette prise en charge se fait par les cellules dendritiques, deux conséquences différentes peuvent apparaître en fonction de leur état de maturation et des voies de signalisation mises en jeu (273-275).

Il a été décrit que dans certaines conditions, la prise en charge de cellules apoptotiques (neutrophiles humains, lignées tumorales humaines, lignée de lymphome murin) par les DCs inhibe leur maturation (276-278) ce qui favorise l'induction d'une immunotolérance (275, 279)..

Par exemple, Stuart et al. montrent que la mise en présence de cellules apoptotiques (neutrophiles humains induits en apoptose par 24h d'incubation sans sérum et thymocytes murins induits en apoptose par 4-6h d'incubation avec du dexaméthasone) avec des DCs myéloïdes immatures de souris provoque la phagocytose de ces cellules apoptotiques par les DCs. En revanche cette phagocytose n'engendre pas la maturation des DCs, puisque l'expression de CD40, CD86 et CD83 à leur surface reste la même en présence ou non de cellules apoptotiques. Les auteurs observent également que la phagocytose des cellules apoptotiques inhibe la sécrétion d'IL-12 par les DCs. Dans ces conditions, ces résultats suggèrent que la prise en charge de cellules apoptotiques par des DCs immatures n'engendre pas leur maturation (276).

Sauter et al. montrent également que les DCs sont capables de phagocyter des cellules nécrotiques comme des cellules apoptotiques mais que seules les cellules nécrotiques (induites par plusieurs cycles de changement de température brusque) de lignées cellulaires (cellules de mélanome SK29, cellules d'adénocarcinome de rein 293, fibroblastes murins NIH-3T3, etc...) ont la capacité d'induire la maturation des DCs, après 48h de co-culture. La maturation des DCs est mesurée par cytométrie en flux par l'expression de CD40, CD86, CD83 et HLA. Les cellules apoptotiques (induites par irradiation UV-B) n'induisent pas la maturation des DCs (277).

D'autres études montrent que la prise en charge de cellules apoptotiques par les moDCs engendre leur maturation (266), provoque ensuite la présentation des antigènes en association avec les molécules classe I ou II du CMH et favorise le développement d'une réponse immune des lymphocytes T effecteurs (267, 274)

Par exemple, chez l'Homme, d'autres auteurs ont montré que la prise en charge de PBMCs activés (par la PHA ou des anticorps monoclonaux anti-CD3/CD28) apoptotiques, par des cellules dendritiques autologues provoquait la maturation de ces DCs ainsi que la sécrétion de TNF- α et d'IL-6, deux cytokines pro-inflammatoires. Ces DCs étaient en conséquence capables de présenter les antigènes dérivés de ces cellules apoptotiques à des lymphocytes T naïfs et d'induire leur prolifération ainsi que la production d'IFN- γ ; la prise en charge de PBMCs apoptotiques au repos par les DCs, n'engendrait pas cette réponse (265). D'autres travaux ont montré que les DCs au contact d'une quantité importante de cellules apoptotiques, pouvaient sécréter de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-10 (267).

Chez la souris, la vaccination avec des cellules tumorales apoptotiques (lignée leucémique apoptotique) « thermiquement stressées » (incubation d'1h à 42°C) provoque l'apparition d'une réponse T cytotoxique (CTLs) contre ces cellules tumorales ; réponse qui néanmoins n'apparaît pas lorsque les cellules apoptotiques réinjectées sont au repos (266, 280). L'expression de protéines de choc thermique (HSP72 et HSP60) par les cellules apoptotiques en état de stress thermique pourrait contribuer à leur prise en charge par les DCs (281), à la maturation de ces DCs (expression de CD80, CD40 et CD86 ainsi que la production d'IL-12 par les DCs) et à l'induction d'une réponse cytotoxique (266, 268).

L'étude réalisée par Gurung et al., montre que chez la souris, la réinjection de splénocytes « pathogènes » apoptotiques préalablement activés par PMA/Ionomycine ou par des anticorps anti-CD3/anti-CD28 ne provoque pas de phénomène de tolérance, contrairement à la réinjection de lymphocytes T au repos (282). Les auteurs montrent également que la mise en contact de lymphocytes T activés apoptotiques avec des DCs provoque une augmentation de l'expression de CD80 et CD86 (molécules de costimulation) et la sécrétion d'IL-12 par ces DCs, autrement dit leur maturation. Cette maturation n'est cependant pas observée lorsque les lymphocytes T apoptotiques sont au repos. Cette différence dans la maturation des DCs au contact de lymphocytes T apoptotiques ou activés repose sur l'expression d'une molécule de costimulation, le CD154 (CD40-L), par les lymphocytes T activés. De plus, la restimulation *in vitro* des splénocytes issus des souris traitées par réinjection de cellules activées apoptotiques avec l'antigène d'intérêt (OVA) provoque la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes CD4+ (lymphocytes Th1). Enfin, ils démontrent que la présence de cellules apoptotiques activées suffit à induire l'orientation de la réponse vers une réponse de type immunogène (282).

D'après ces études (265, 266, 268, 282), il semble nécessaire que les cellules apoptotiques réinjectées se trouvent dans un état activé ou stressé pour qu'elles provoquent la maturation des cellules dendritiques et l'induction d'une réponse de type immunogène.

Les cellules dendritiques au stade immature possèdent une certaine capacité endocytaire, une faible capacité de stimulation des lymphocytes T naïfs (faible expression des molécules de costimulation), sécrètent des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) et favorisent donc plutôt la tolérance. Les DCs matures, à l'inverse montrent une faible capacité endocytaire, une forte expression de CMH de classe II et de molécules de costimulation (CD40/CD86/CD80/...) et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-6, TNF- α et IL-1 β) ce qui leur confère la capacité de stimuler des lymphocytes T naïfs pour engendrer une réponse immune spécifique des antigènes présentés issus des cellules apoptotiques (283). Le stade de maturation des DCs semble être la clé pour convertir un antigène en immunogène (275).

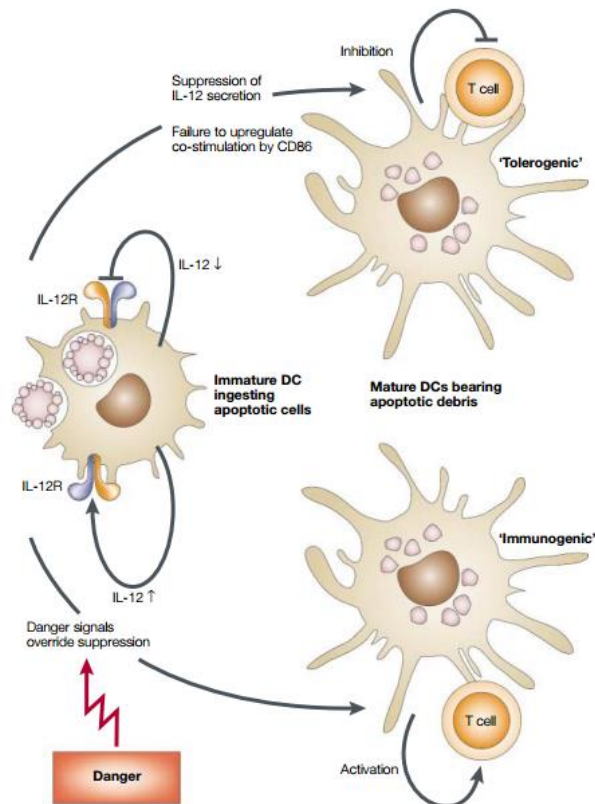


Figure 13 : Types de réponses engendrées par les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques peuvent induire deux types de réponse opposées, après capture des cellules apoptotiques : une réponse de type tolérologène ou de type immunogène. Les cellules apoptotiques sont phagocytées par des DCs immatures qui, en fonction de la présence de signaux de danger vont pouvoir inhiber ou stimuler la réponse immune (269).

L'ensemble des travaux réalisés sur la réinjection de cellules apoptotiques ainsi que sur leur prise en charge montre que lorsque cette prise en charge est faite par les macrophages, une réponse de type « tolérologène » est généralement induite avec la génération de lymphocytes T régulateurs. En revanche la prise en charge des cellules apoptotiques par les DCs est plus débattue : dans certaines conditions elle va engendrer une réponse de type « tolérologène » (non maturation des DCs, génération de lymphocytes T régulateurs) et dans d'autres (par exemple quand les cellules apoptotiques sont activées) une réponse de type « immunogène » (maturation des DCs et élaboration d'une réponse T effectrice).

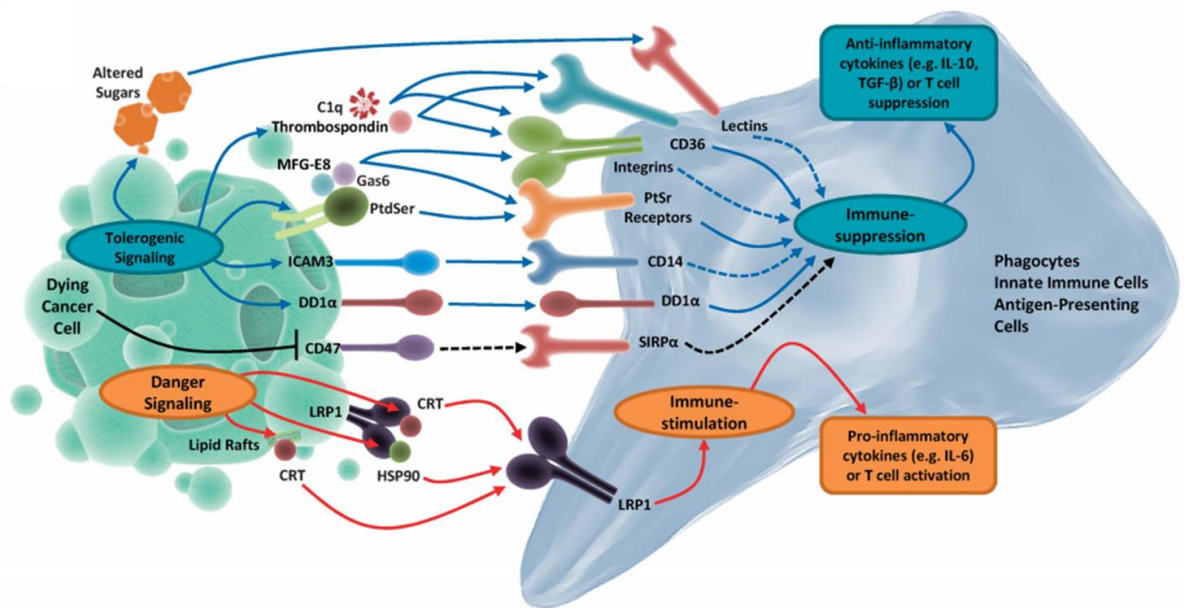


Figure 14 : Orientation de la réponse engendrée par les cellules apoptotiques. Expression de signaux « eat-me » par les cellules apoptotiques. Les cellules qui entrent en apoptose vont exprimer différentes molécules qui vont induire leur prise en charge. En fonction des molécules exprimées, ces cellules apoptotiques vont induire soit une réponse de type toléroène, soit une réponse de type immunogène (284).

La balance entre un effet toléroène ou immunogène de la prise en charge des cellules apoptotiques va dépendre de l'organe et de l'environnement de prise en charge, de la nature des phagocytes, du facteur d'induction de la mort cellulaire, de l'état de ces cellules apoptotiques et de leur stade d'apoptose.

Les cellules présentatrice d'antigène vont, comme détaillé précédemment, prendre en charge les cellules apoptotiques ; ces cellules et notamment les DCs vont apprêter et présenter les antigènes dérivés des cellules apoptotiques aux lymphocytes T naïfs et donc engendrer une réponse contre ces antigènes à travers la polarisation des lymphocytes T.

Les cellules dendritiques vont donc permettre l'orientation de la réponse vers la tolérance ou l'immunogénicité ; l'état de maturation des DCs va jouer un rôle dans l'élaboration de cette réponse (Fig. 14).

c. Elaboration d'une réponse T

Au sein de la lignée lymphoïde T, il existe deux grandes « familles », les lymphocytes T CD8+ et les lymphocytes T CD4+. Les lymphocytes T CD8+ effecteurs ou lymphocytes T cytotoxiques sont essentiels pour l'élimination des pathogènes en particulier des virus, des tumeurs et des microorganismes à développement intracellulaire. Ils possèdent un TCR capable de reconnaître des antigènes présentés par le CMH de classe I. L'engagement entre le TCR et le complexe CMH-I/peptide le contexte et l'environnement vont provoquer l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD8+ en lymphocytes T cytotoxiques. Ces lymphocytes T CD8+ possèdent également une activité anti-

tumorale puisqu'ils sont capables d'infiltrer la tumeur et de détruire les cellules tumorales par cytolysse, principalement.

Les lymphocytes T CD4⁺ sont primordiaux dans l'élaboration d'une réponse adaptative et possèdent une hétérogénéité beaucoup plus importante que celle des lymphocytes T CD8⁺ ; ils vont être impliqués dans l'activation, la régulation et l'amplification de la réponse immune de par leur action sur d'autres cellules du système immunitaire. Ils possèdent un TCR capable de reconnaître des épitopes d'antigènes présentés par le CMH de classe II.

Les cellules présentatrices d'antigène sont capables de présenter associés aux molécules du CMH-II, des antigènes à un lymphocyte T naïfs CD4⁺ et de provoquer l'orientation de la polarisation de la différenciation des lymphocytes T CD4⁺. Le type de lymphocytes T produit va dépendre entre autres de l'environnement cytokinique dans lequel se produit la présentation des antigènes par les cellules dendritiques.

Les deux premières sous-populations de lymphocytes T à avoir été décrites sont les lymphocytes Th1 et les Th2 (285, 286). La génération de lymphocytes Th1 est induite par la présence d'IL-12 dans le microenvironnement, la présence d'IL-4 quant à elle favorise le développement de Th2. Le rôle des Th1 a été montrée dans l'élaboration d'une réponse immune adaptative contre des pathogènes intracellulaires notamment à travers l'activation des macrophages et des lymphocytes T CD8⁺ médiée par leur sécrétion d'IFN- γ , alors que celle des Th2 a été décrite dans la réponse contre les parasites extracellulaires tels que les helminthes (287) et participent à l'activation des lymphocytes B. Les lymphocytes Th1 exercent leur action, notamment par leur importante sécrétion d'IFN- γ , TNF- α et d'IL-2 (288). Les lymphocytes Th2 sécrètent une grande quantité d'IL-4, d'IL-5, d'IL-13 et d'IL-10. Les sécrétions de cytokines de la population Th1 vont inhiber la différenciation des Th2, et vice versa. Comme nous l'avons vu, les lymphocytes Th1 sont également décrits dans le développement de pathologie auto-immune telle que la polyarthrite rhumatoïde.

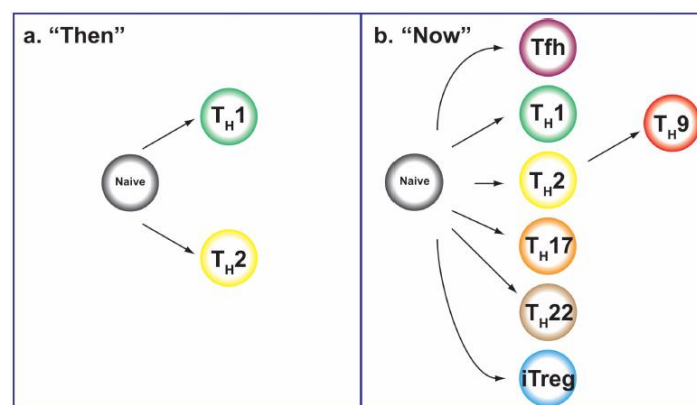


Figure 15 : Evolution dans la découverte des sous-populations de lymphocytes T. Initialement, seulement deux sous-populations T avaient été décrites, aujourd'hui il existe de nombreux sous-types parmi lesquels se trouvent les lymphocytes Th17, Treg, Th22, etc... (289).

Aujourd'hui on sait qu'en réponse aux différents types de pathogènes présentés par les cellules dendritiques (DCs), dans un milieu cytokinique lui-même produit par ces APCs, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs au contact de ces DCs peuvent se différencier en plusieurs lignées spécifiques : Th1, Th2, Th17 et Treg sont les populations majoritaires ; Th9, Th22 et Tfh les populations minoritaires (288, 290,

291) (Fig. 16). Ces différents sous-types de lymphocytes T s'identifient par l'expression de facteurs de transcription spécifique, leur profil de sécrétion de cytokines et leur fonction. En revanche, les fonctions exactes et la nature de l'ensemble des molécules déterminant la différenciation des sous-types de lymphocytes T restent pour bon nombre d'entre eux encore à élucider.

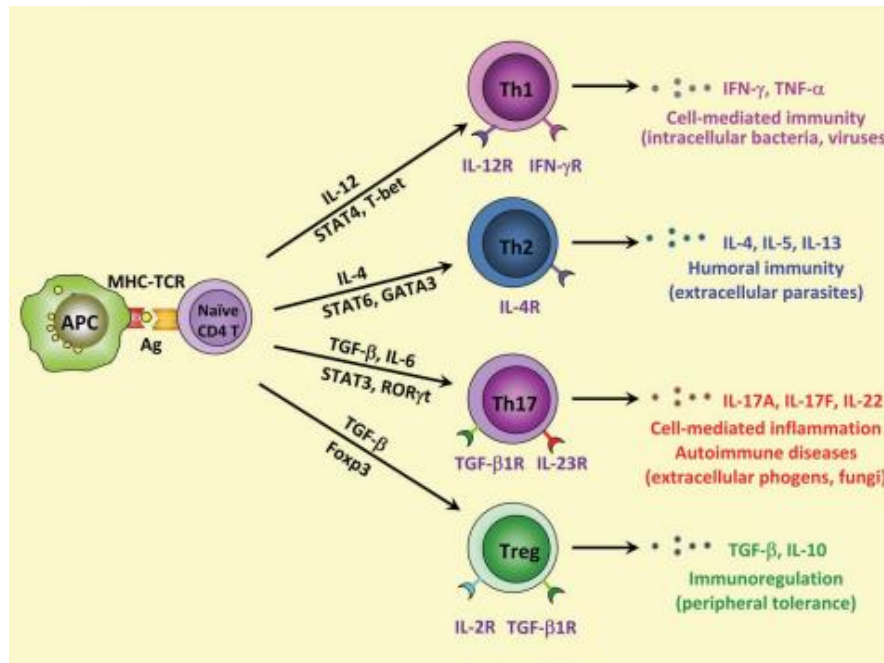


Figure 16 : Différenciation des sous-types lymphocytaires T CD4+ à partir de lymphocytes T CD4+ naïfs. Les APCs sont capables de par leur contact avec des lymphocytes T naïfs et leur sécrétion de cytokines d'engendrer la polarisation de la différenciation de ces lymphocytes T CD4+ naïfs en diverses sous-populations (288).

La différenciation de lymphocytes T CD4+ naïfs en lymphocytes T régulateurs (Treg) dépend de la présence de TGF- β dans le milieu, en revanche lorsque la cytokine IL-6 est présente en même temps que le TGF- β , la différenciation s'oriente vers la génération de lymphocytes Th17 ; ces deux sous-types possèdent néanmoins des fonctions différentes. Les lymphocytes T régulateurs ont une fonction de régulation de la réponse, comme leur nom l'indique et sont principalement impliqués dans le maintien de la tolérance (292) alors que l'implication des lymphocytes Th17, au contraire a été décrite dans la protection de l'organisme contre les pathogènes extracellulaires (bactéries et champignons). L'IL-17 joue aussi un rôle dans le développement de pathologies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde ou la sclérose en plaque (190). Les lymphocytes Th17 produisent une grande quantité de cytokines IL-17A, IL-17F, IL-22 et IL-23 (293, 294), cytokines pro-inflammatoires, alors que les Treg sécrètent de grandes quantités de TGF- β et d'IL-10 (288, 292) qui sont deux cytokines anti-inflammatoires nécessaires dans le maintien de la tolérance. Les Th17 et les Treg vont donc avoir deux rôles opposés ; la rupture de la balance Th17/Treg est d'ailleurs impliquée dans l'apparition de processus auto-immuns.

Une donnée importante à soulever dans la différenciation des lymphocytes T CD4+ est leur plasticité (289, 290) (Fig. 17). En fonction des conditions de l'environnement, certaines sous-populations peuvent « switcher » et devenir d'un autre type ; un exemple intéressant est la capacité

que possède un lymphocyte Th17 à devenir un Treg dans un microenvironnement cytokinique particulier (294, 295), et vice versa (296).

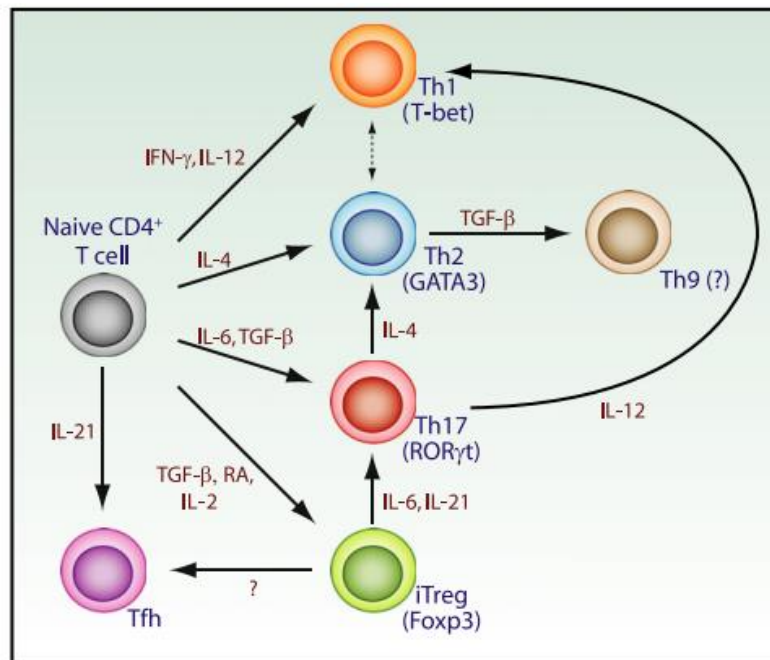


Figure 17 : Plasticité des lymphocytes T CD4+. In vitro, le milieu cytokinique dans lequel se trouvent les lymphocytes T CD4+ va permettre leur différenciation vers des sous-types lymphocytaires différents. En revanche la stabilité de certaines lignées semble être remise en question puisqu'en fonction des conditions elles peuvent « switcher » et changer de catégorie. Les lymphocytes T Th17 peuvent devenir des Th1 en présence d'IL-12 ou encore des Th2 en présence d'IL-4, les Treg peuvent devenir des Th17 en présence d'IL-6 et d'IL-21 (290).

Comme nous venons de le détailler, les cellules dendritiques jouent un rôle central et essentiel dans l'orientation des réponses immunes ; ces cellules sont capables de prendre en charge les cellules apoptotiques et en fonction de l'environnement et de leur sécrétion cytokinique d'engendrer un type de réponse ou un autre (immunogénique vs tolérogénique). Elles sont, de plus, capables de renverser une situation immunologique, en fonction du microenvironnement.

Enfin, dans cette dernière partie, nous allons nous demander quel type de mécanisme pourrait expliquer la spécificité et les caractéristiques de la réponse engendrée par la PCE.

D. Comment la PCE pourrait-elle induire une réponse spécifique des T pathogènes ?

La PCE a montré son efficacité dans un grand nombre de pathologies médiées par la présence de lymphocytes T « pathogènes ». Les données cliniques ne montrent pas d'immunosuppression généralisée chez les patients après traitement PCE, ce qui suggère que la PCE est capable d'induire une immunomodulation spécifique, dirigée contre les lymphocytes T « pathogènes », responsables du développement de pathologies. La corrélation entre la présence de lymphocytes T pathogènes et

l'effet bénéfique de la PCE démontré par French (297) ainsi que les travaux réalisés par Budde (20) qui montre la nécessité de la présence de splénocytes T « pathogènes » pour le bon fonctionnement de la PCE, nous permettent de penser que les lymphocytes T « pathogènes » pourraient être le principe actif de la PCE.

Ces données recueillies sur la PCE présentent de grandes similitudes avec une « thérapie » développée il y a quelques années : la vaccination T (T cell vaccination : TCV). La TCV est associée, comme nous le détaillerons un peu plus tard dans cette partie, à l'induction d'une réponse anti-clonotypique. L'approche expérimentale chez la souris de cette thérapie a consisté à injecter des cellules T responsables d'une pathologie, issues de souris malades, irradiées (irradiation γ), à d'autres souris syngéniques dans le but de les protéger contre la pathologie (« vaccination » de cellules T).

La vaccination T est associée à une réponse spécifique anti-clonotypique. Ce concept de réponse anti-clonotypique a été développé par Irwin Cohen dans les années 80 (298), et est défini comme une réponse immunitaire dirigée, dans des pathologies induites par la présence d'un clone T « pathogènes », contre le TCR d'une population T clonale (puisque l'ensemble des lymphocytes T clonaux possèdent le même TCR). Certaines pathologies sont médiées par un nombre restreint de clones T différents, comme par exemple la polyarthrite rhumatoïde, dans ce cas, la réponse engendrée par l'injection de T « pathogènes » irradiés reste spécifique et dirigée contre plusieurs clones T, on peut donc parler de réponse anti-oligoclonotypique (dirigée contre un nombre restreint de TCR). Ici, on s'intéresse à la réponse spécifique contre l'antigène et non à la nature de la réponse.

Une première étude de la TCV a été réalisée chez le rat dans un modèle de EAE. Cette pathologie (EAE) est causée par la présence de lymphocytes T CD4⁺ anti-MBP (protéine basique de la myéline) possédant le même réarrangement du TCR (clone T « pathogène » contre la protéine MBP). Cette étude montre que l'injection de cellules issues de rats « malades » irradiées à des rats syngéniques sains protège ces rats sains contre le développement de l'EAE (après immunisation). (299).

Chez la souris, une étude plus récente (300) dans un modèle d'arthrite (CIA) montre que l'injection de lymphocytes T irradiés issus de souris atteintes d'arthrite (CIA⁺), restimulés *in vitro* par des APCs en présence de collagène de type II et d'IL-2 pendant 21 jours, à des souris malades CIA⁺, induit la diminution des symptômes de l'arthrite, la diminution de la fréquence des populations Th1 et Th17 et de leurs cytokines respectives (IFN- γ et IL-17) (Fig. 18). Dans cette étude, il est démontré que l'injection de ces cellules T provoque l'apparition de lymphocytes T régulateurs spécifiques et la sécrétion d'IL-10 (300).

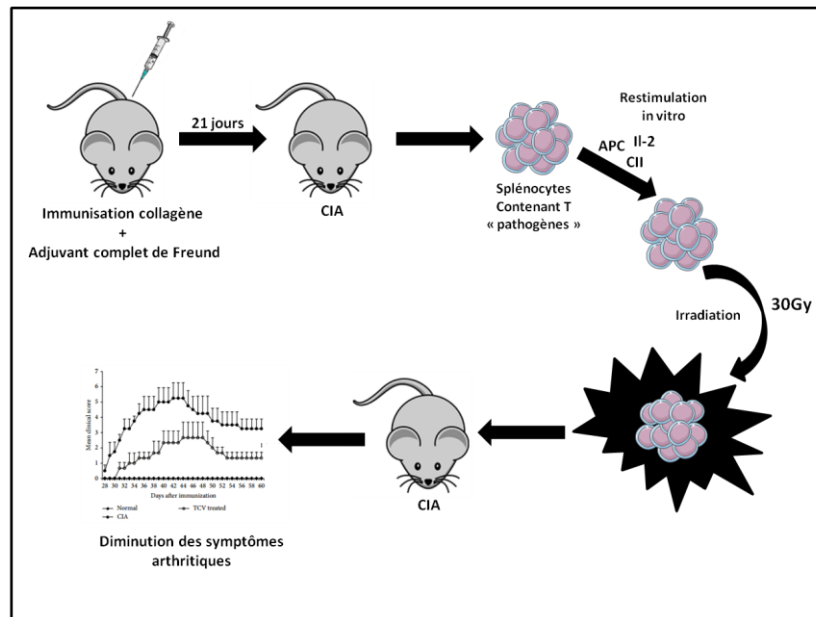


Figure 18 : Modèle de polyarthrite rhumatoïde murine, d'après Li S, *Clinical developmental immunology*. 2013 : Les splénocytes extraits d'une souris atteinte de CIA, sont restimulés *in vitro* en présence d'APCs, de collagène bovin de type II et d'IL-2 pendant 21 jours. Après 21 jours, les splénocytes sont irradiés. Lorsqu'on réinjecte ces cellules à une souris atteintes de CIA, on observe une diminution des symptômes et des populations Th1 et Th17 (300).

Ces différentes études chez l'animal montrent que l'injection de cellules T irradiées et la réponse anti-clonotypique qui en découlent ont un effet thérapeutique et préventif sur plusieurs pathologies (EAE, arthrite, rejet de greffe allogénique, etc...) ; et que cette réponse est dirigée spécifiquement contre les clones T responsables de la pathologie.

Chez l'Homme, le travail réalisé par Zhang et collab. Montre que l'injection de lymphocytes T irradiés spécifiques de la MBP (clone T « pathogène ») préalablement stimulés *in-vitro* en présence d'APCs (préincubées avec la protéine MBP), à 6 patients atteints de sclérose en plaque provoque une diminution progressive de la fréquence de lymphocytes T anti-MBP (responsables de la pathologie) après chaque traitement. Cette injection semble spécifique puisque *in vivo* elle ne provoque pas la diminution de la fréquence des lymphocytes T-anti-toxine tétanique (contrôle), on parle de réponse anti-clonotypique. *In vitro*, des lymphocytes T anticlonotypiques sont mis en évidence, dont la fonction est inhibée après inhibition des molécules de classe I du CMH, à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-molécules CMH-I, suggérant que la réponse anticlonotypique observée est médiée par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. La cible antigénique spécifique de cette réponse pourrait être un peptide issu de la partie variable du TCR puisque la réponse est dirigée spécifiquement contre les lymphocytes T anti-MBP et non contre les lymphocytes T anti-toxine tétanique (301).

Récemment, une autre analyse a été réalisée chez l'Homme par le groupe de Ivanova et collab. Dans cette étude, 42 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, principalement des femmes, sont traités par injection de lymphocytes T irradiés issus de PBMCs de patients préalablement restimulés *in vitro* et dirigés contre des antigènes du liquide synovial et du cartilage (lymphocytes T oligoclonaux). Les auteurs observent après le traitement une diminution de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes T CD8+, l'augmentation de la sécrétion d'IL-4 par les lymphocytes T CD4+

ainsi qu'une augmentation (non significative) du pourcentage de Tregs. 24 mois après le traitement, 87% des patients développent une réponse au traitement dont 40.9% se trouvent en rémission (302). La réponse anti-oligoclonotypique cette fois-ci, semble être médiée par des lymphocytes T régulateurs.

De la même façon que chez la souris, les expériences de TCV réalisées chez l'Homme montrent que la réinjection de lymphocytes T « pathogènes » irradiés induit un effet thérapeutique dans différents types de pathologies médiées par les lymphocytes T.

Bien que le type d'induction de la mort cellulaire des lymphocytes T soit différent (irradiation γ vs PUVA), une certaine similitude existe entre la vaccination T et la PCE. La vaccination T a recours à l'irradiation gamma des cellules alors que la PCE aux rayons UV-A (en présence de 8-MOP). En revanche, le principe de réinjecter des lymphocytes T « altérés » est le même, comme le montre le modèle murin d'allogreffe de peau développé par Perez en 1991.

Dans ce modèle, des souris qui subissent une greffe allogénique de peau développent un rejet au bout de 12 jours. Les splénocytes (contenant des lymphocytes T alloréactifs) de ces souris sont prélevés, mis en présence de 8-MOP, sont irradiés aux UV-A (traitement PUVA) et réinjectés par voie intraveineuse à des souris syngéniques saines. Après une greffe de peau allogénique, ces souris ne montrent pas de rejet, même 21 jours après la greffe. La réinjection de lymphocytes T pathogènes modifiés par traitement PUVA induit donc un effet protecteur contre le rejet de greffe allogénique (fig. 19) (303).

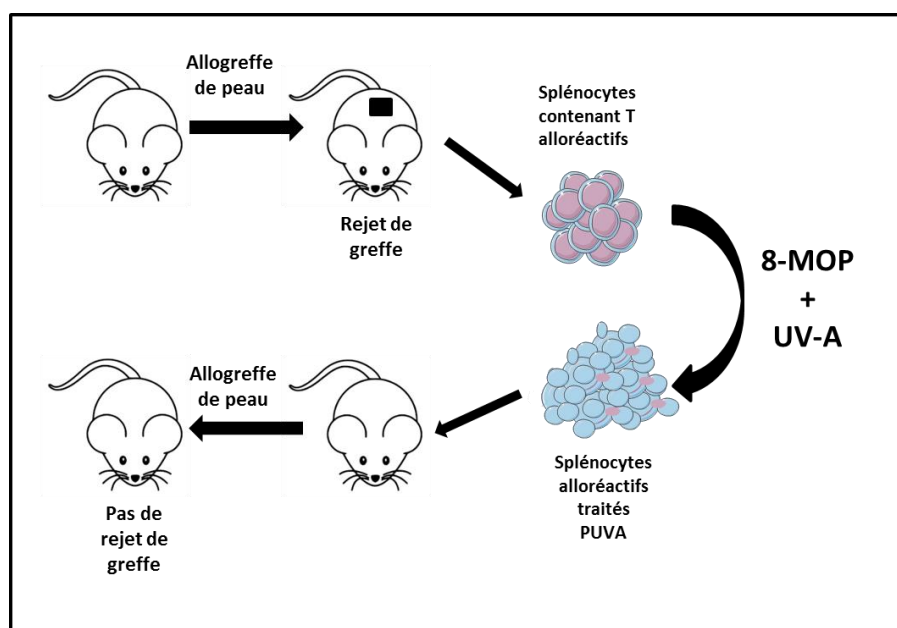


Figure 19 : Modèle d'allogreffe de peau chez la souris, de Perez et al. L'injection de splénocytes alloréactifs préalablement traités PUVA à des souris syngéniques, prévient l'apparition le rejet d'une allogreffe de peau (303).

Comme nous venons de le détailler, la vaccination T est capable d'engendrer des réponses spécifiques qui peuvent contrôler les lymphocytes T « pathogènes » par la génération de lymphocytes

T régulateurs (réponse tolérogène) ou par la génération de lymphocytes T effecteurs (réponse immunogène). Ces mécanismes pourraient expliquer la spécificité de la réponse observée dans le traitement PCE dans toutes pathologies qu'elle traite.

La PCE est utilisée dans le traitement de nombreuses pathologies médiées par la présence de lymphocytes T « pathogènes » circulants ; la PCE est capable d'induire l'apoptose des cellules traitées et notamment des lymphocytes T. Initialement, l'apoptose a été décrite comme un phénomène silencieux et/ou tolérogène. En revanche depuis quelques années, certains groupes ont démontré que dans des conditions particulières, l'apoptose peut engendrer une réponse de type « immunogène ». Une fois réinjectées, les cellules apoptotiques vont être prises en charge par les macrophages ou les cellules dendritiques. La majorité des études montre que la prise en charge des cellules apoptotiques par les macrophages provoque une réponse de type tolérogène, en revanche, le type de réponse engendrée par prise en charge de ces cellules apoptotiques par les DCs est beaucoup plus controversée. Les DCs sont des cellules sentinelles, elles jouent un rôle central dans l'induction d'une réponse : elles sont capables de capter en périphérie des antigènes, de migrer jusqu'aux ganglions et de présenter ces antigènes aux lymphocytes T naïfs présents afin d'engendrer une réponse contre les antigènes issus des cellules apoptotiques. En fonction de l'environnement dans lequel se trouve la DC au moment de la prise en charge, elle va ou non maturer et pouvoir engendrer en fonction de cet état de maturation et du microenvironnement, des réponses différentes.

E. Hypothèses émises des mécanismes d'action de la PCE

La PCE consiste donc en la réinjection de cellules apoptotiques (induites par le traitement). Plusieurs questions restent cependant sans réponses quant aux mécanismes d'action de la PCE : Quel est le principe actif de la PCE ? Quel type d'apoptose induit-elle ? Et quel type de réponse engendre-t-elle (« tolérogène » vs « immunogène ») ?

D'après ce que nous avons décrit tout au long de notre introduction, le principe actif de la PCE semble reposer sur la présence de lymphocytes T « pathogènes » dans l'échantillon traité, ce qui nous fait penser que la PCE s'assimile à une vaccination T. De plus, même si le type d'irradiation est différent entre les modèles de vaccination de cellules T et celui de la PCE (irradiation gamma vs 8-MOP + UV-A), le principe de ces modèles est similaire et consiste en l'injection de lymphocytes T « pathogènes » modifiés. Les grandes similarités entre la vaccination T et la PCE ainsi que la spécificité de la réponse engendrée par la PCE nous permettent de penser que la PCE pourrait provoquer une réponse anti-clonotypique dans les pathologies médiées par un clone T « pathogènes » telles que le CTCL ou anti-oligoclonotypique dans les pathologies médiées par des lymphocytes T oligoclonaux telles que la GvHD, la polyarthrite rhumatoïde, etc...

Cette réponse est-elle due à la génération de lymphocytes T régulateurs spécifiques (engendrée par un processus de mort « tolérogène ») ou bien à la génération de lymphocytes T effecteurs/cytotoxiques (engendrée par un phénomène de mort « immunogène ») (Fig. 20) ? L'effet bénéfique de la PCE pourrait donc mettre en jeu deux mécanismes parallèles en fonction des différents contextes pathologiques.

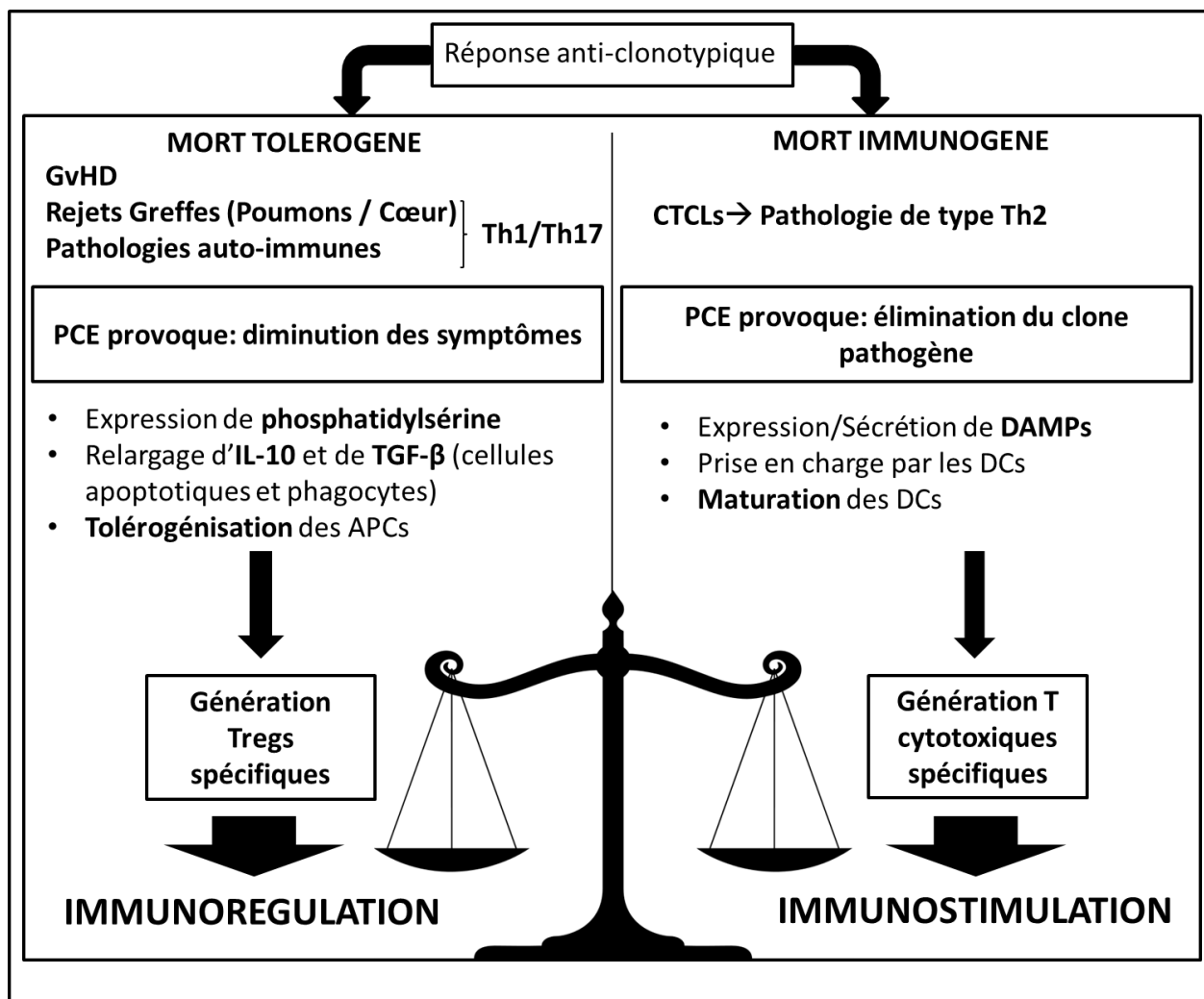


Figure 20 : Schéma récapitulatif des deux théories développées pour expliquer les mécanismes d'action de la PCE. Dans les contextes de GvHD et de pathologies autoimmunes la PCE semble induire la diminution des lymphocytes T pathogènes puisqu'une diminution des symptômes est observée après traitement. Cet effet pourrait s'expliquer par la génération de lymphocytes T régulateurs spécifiques dirigés contre les lymphocytes T responsables de la pathologie, eux même provoqués par un phénomène de mort toléroène. Dans les contextes de CTCL, la PCE induit une disparition du clone T « pathogène » responsable de la pathologie. Cette élimination complète du clone T pourrait être due à la génération de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre ce clone T engendrés par un phénomène de mort immunogène.

Pour répondre à ces questions, nous avons, au cours de ma thèse, étudié *in vitro* et *in vivo* les possibles mécanismes d'action du traitement PUVA (*in vitro*) et de la PCE (*in vivo*). *In vitro*, à partir d'un modèle de lymphocytes T alloréactifs activés, nous avons étudié le type d'apoptose induite par la PCE, l'émission de DAMPs (caractéristiques de la mort « immunogène ») par les cellules après traitement PUVA, la prise en charge des cellules traitées PUVA par les différentes APCs (phagocytose), leur capacité à les faire maturer, et également la capacité des moDCs (préincubés avec des lymphocytes T traités PUVA) à engendrer une réponse au contact de lymphocytes T naïfs (polarisation de la réponse T).

In vivo, nos travaux ont porté sur l'effet du traitement PCE dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde murine (CIA). Nous avons également étudié à partir de ce modèle si les lymphocytes T « pathogènes » sont bien le principe actif de la PCE.

Je tiens ici à rappeler que l'étude de la compréhension des mécanismes d'action de la PCE a un grand intérêt au sein de l'établissement français du sang (EFS) puisque de comprendre comment fonctionne cette thérapie permettrait dans un premier temps son optimisation afin d'améliorer le quotidien des patients et dans un deuxième temps d'élargir son application à d'autres pathologies.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I: Etudes *in vitro* des mécanismes d'action du traitement PUVA: Cellules alloréactives actives

Objectifs

Comme nous venons de le détailler dans l'introduction, deux hypothèses ont été émises afin de comprendre les mécanismes d'action de la PCE : l'hypothèse de la mort « tolérogène » et celle de la mort « immunogène ». Pour répondre à cette question nous avons développé deux modèles : un modèle *in vitro* et un autre *in vivo*.

Les objectifs de cette étude *in vitro* ont été :

- d'analyser dans un premier temps l'émission de DAMPs (caractéristiques d'une mort « immunogène »)
- d'analyser la prise en charge des lymphocytes T traités PUVA (apoptotiques) par les différentes APCs (monocytes, macrophages et cellules dendritiques)
- d'étudier la maturation de ces APCs lorsqu'elles sont mises en contact de lymphocytes T traités PUVA
- d'étudier le type de réponse engendrée par la mise en contact de lymphocytes T naïfs avec des moDCs préalablement incubées en présence de lymphocytes T traités PUVA

Pour cela, nous avons utilisé un modèle de lymphocytes T alloréactifs activés, obtenus après culture mixte lymphocytaire afin de mimer l'alloréactivité des lymphocytes T qui est retrouvé dans un contexte de GvHD.

A. Matériels et méthodes

Donneur

Les PBMCs utilisés pour l'ensemble des études ont été obtenus à partir de prélèvements sanguins, de donneurs volontaires atteints d'hémochromatose pour lesquels nous avons reçu un consentement éclairé. Les donneurs seront considérés dans cette étude comme « sains » puisqu'ils ne montrent aucune pathologie liée au système immunitaire. Les PBMCs des donneurs sont prélevés à partir d'une poche de sang, par centrifugation sur un gradient de densité (Ficoll, Eurobio) puis congelés dans un milieu RPMI complet contenant 50% de sérum fœtal bovin (Gibco, life technologies) et 20% de diméthylsulfoxyde (DMSO)(Sigma). Des typages HLA de classe I (A) et II (DQ et DR) de chaque donneur ont été réalisés par sérologie pour les HLA de classe I et biologie moléculaire pour ceux de classe II, par le service HLA de l'établissement français du sang.

Obtention des lymphocytes T activés par culture mixte lymphocytaire

Les PBMCs d'un donneur sain sont mis en co-culture avec des PBMCs irradiés (30Gy) d'un autre donneur sain allogénique se distinguant au niveau du locus des gènes de classe II du HLA (ratio 1 :1, 50 000cellules). L'incompatibilité des deux donneurs sains est vérifiée pour chaque culture mixte lymphocytaire (MLR). Les cellules sont resuspendues dans du milieu RPMI complet contenant 10% de sérum fœtal bovin (Gibco, Life technologies) et 50µM de βmercaptoethanol (Gibco, Life technologies). Elles sont cultivées dans des plaques de 96 puits à fonds ronds et prélevées au bout de 6 jours de co-culture, les cellules mortes sont ensuite éliminées par centrifugation sur un gradient de densité (Ficoll).

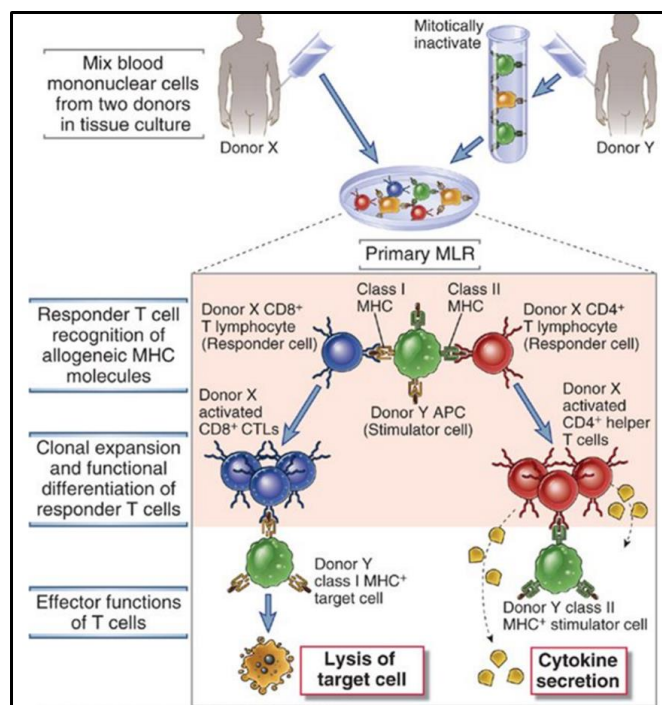


Figure 21 : Schéma des différents mécanismes impliqués dans une culture mixte lymphocytaire.

[Abbas. Cellular and molecular immunology. 7^{ème} édition]

Caractérisation des lymphocytes T alloréactifs activés

Les cellules issues de MLR sont prélevées et marquées à J3, J4, J5 et J6 avec des anticorps anti-CD3, anti-CD4, anti-HLA-DR, anti-CD69, anti-CD25, anti-CD154 (CD40L), anti-CD27, anti-CD137 (4-1BB) et anti-CD134 (OX-40). La cinétique d'expression de ces molécules est étudiée par cytométrie en flux. Les cellules alloréactives activées sont prélevées et utilisées à J6.

Traitement PUVA

Les cellules à une concentration de 1.10^6 cellules/ml dans du milieu RPMI complet contenant 10% de SVF sont mises en plaque de 24 puits, en présence de 8-méthoxypsoralène (sigma-Aldrich) (200ng/ml final) pendant 15 minutes à 37°. Ces plaques sont ensuite placées dans l'irradiateur à UV-A (Biosun, V. Lourmat) et reçoivent une dose d'UV-A (365nm) de $2\text{J}/\text{cm}^2$. Les cellules traitées PUVA et NT sont incubées à 37°C, 5% CO_2 pendant 24 ou 48h.

Cytométrie en flux

Les études réalisées par cytométrie en flux sont faites sur un FACS Canto II et analysées par le logiciel DIVA (BD biosciences).

Etude de l'apoptose par cytométrie en flux

Les PBMCs au repos et/ou activés, traités ou non PUVA sont marqués avec des anticorps anti-CD3 (BD bioscience), et avec de l'annexine V (AnnV) et du 7AAD (AnnV-FITC/7AAD kit, Beckman Coulter). Les cellules $\text{CD3}^+/\text{AnnV}^-/7\text{AAD}^-$ représentent les cellules viables. On obtient le pourcentage d'apoptose par la différence entre le total de cellules et le pourcentage de cellules viables. Le pourcentage d'apoptose comprend les cellules en apoptose précoce ($\text{AnnV}^+/7\text{AAD}^-$) et celles en apoptose tardive (7AAD^+). Les mesures d'apoptose sont réalisées à 24 et 48h post-traitement, par cytométrie en flux.

Etude de l'expression et de la sécrétion de DAMPs

Les cellules au repos, activées, traitées ou non PUVA, sont marquées avec un anticorps anti-CD3 (BD), anti-HLA-DR (BD), et avec de l'AnnV et du 7AAD (AnnV-FITC/7AAD kit, Beckman Coulter) et un anticorps anti-CRT-PE (abcam). La mesure d'expression de la Calréticuline est réalisée sur les lymphocytes T en apoptose précoce, $\text{CD3}^+/7\text{AAD}^-$ (cellules T qui ont conservé leur intégrité membranaire), par cytométrie en flux.

Le dosage de la protéine HMGB1 dans le surnageant de culture de PBMCs au repos ou activés, traités ou non PUVA après 24 et 48h d'incubation à 37°C et 5% de CO_2 se fait par ELISA (IBL International GmbH). Le dosage d'HMGB1 est réalisé à partir de surnageants de culture décongelés.

La sécrétion d'ATP est mesurée dans les surnageants de PBMCs au repos ou activés, traités ou non PUVA, à 24 et 48h, par bioluminescence (Adenosine 5' triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit, sigma-aldrich) et par HPLC. Le dosage d'ATP est fait également sur des surnageants congelés.

Purification des lymphocytes T et des monocytes

Les lymphocytes T comme les monocytes sont purifiés grâce à des kits de sélection négative immunomagnétique (Easy Sep, stem cell). La purification des lymphocytes T est réalisée selon les

recommandations du fournisseur et grâce à un cocktail contenant des complexes d'anticorps reconnaissant les antigènes CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD66b, CD123 et la glycophorine A. La purification de monocytes est réalisée grâce à un cocktail d'anticorps reconnaissant les antigènes CD2, CD3, CD16, CD19, CD20, CD56, CD66b, CD123 et la glycophorine

La purification des lymphocytes T est mesurée par marquage avec des anticorps anti-CD3, la purification des monocytes par un marquage avec des anticorps anti-CD14, par cytométrie en flux. La pureté obtenue pour les lymphocytes T est d'environ 90%, celle des monocytes est environ de 80%.

Génération de moDCs, macrophages et monocytes

Les moDCs et les macrophages sont générés à partir des monocytes purifiés d'une poche de sang, obtenus par tri magnétique négatif (Easy Sep, Stem Cell). Les moDCs sont générés à partir de la mise en culture des monocytes avec 25ng/ml d'IL-4 et 100ng/ml de GM-CSF avec un rajout d'IL-4 (25ng/ml) à J2 et J5. Les macrophages sont obtenus à partir de la mise en culture avec 100ng/ml de GM-CSF pour les macrophages. Les monocytes se différencient en moDCs ou macrophages au bout de 7 jours.

Western Blot

Les PBMCs sont traitées par PUVA et au dithiothréitol (DTT) 1 mM (Sigma-Aldrich) ou non traitées et incubées à 37°C et 5% de CO₂, pendant 1h et 4h. L'extraction des protéines a été effectuée dans un tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases 100µl/ml et de phosphatases 10µl/ml (Sigma-Aldrich), à partir de 10.10⁶ cellules par condition testée. Les protéines ont été séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% en condition dénaturante, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose (Biorad). La saturation de la membrane et les incubations avec les anticorps ont été effectuées en PBS-Tween 20 0,1%-BSA (sérum albumine bovine) 5%. L'incubation avec des anticorps primaires dirigés contre eIF2α et Phospho-eIF2α (Cell Signalling Technology) ou l'actine (Sigma-Aldrich), a été réalisée sur la nuit à 4°C. L'incubation avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin, conjugué à la peroxydase de Raifort (HRP), a été réalisée pendant 2 heures à température ambiante. L'émission de chimioluminescence induite par la réaction du luminol et du peroxyde d'hydrogène (kit Amersham ECL Prime, GE Healthcare Life Sciences), en présence de peroxydase a été détectée avec un lecteur BIO-1D (Vilber Lourmat).

Phagocytose

Les lymphocytes T sont purifiés, par sélection négative immunomagnétique (Easysep, Stemcell), traités PUVA puis incubés pendant 24h à 37°C et 5% CO₂. Les lymphocytes T repos ou activés (par MLR), traités ou non PUVA sont marqués au CFSE (Cell trace CFSE cell proliferation kit, Life technologies) puis mis en co-culture avec des moDCs, macrophages ou monocytes (APCs) autologues préalablement obtenus (ratio 1 :1, 100 000cellules). Les lymphocytes T et les différentes APCs proviennent du même donneur (système autologue).

Les APCs et les lymphocytes T autologues sont incubés de 0 à 4h, dans des tubes de polypropylène, à 37°C et 5% de CO₂. 2ml de PBS froid sont ajoutés à la fin de chaque incubation, afin d'arrêter le processus de phagocytose. Les cellules sont marquées avec des anticorps anti-CD14-APC (BD Pharmigen) (monocytes et macrophages), anti-CD209-APC (BD Pharmigen) (moDCs) et anti-CD3-BV421 (BD Biosciences) (lymphocytes T) pendant 15min à 4°C. L'étude et la mesure de la cinétique de

phagocytose se font par cytométrie en flux, sur les cellules CD14+/CFSE+/CD3- (monocytes et macrophages) et sur les cellules CD209+/CFSE+/CD3-, permettant ainsi d'éliminer les doublets. Le contrôle négatif de la phagocytose, se réalise à 4°C.

Etude de la maturation par cytométrie en flux

Les monocytes, moDCs et les macrophages sont obtenus comme vu précédemment. Les lymphocytes T sont purifiés par sélection magnétique négative (Easysep, Stem cell), traités PUVA et incubés pendant 24h avant leur mise en contact avec les APC. Les lymphocytes T traités PUVA sont incubés 24h avant d'être mise en contact avec les APCs, afin d'augmenter la quantité de DAMPs émises par les lymphocytes et d'évaluer l'implication de ces DAMPs dans la prise en charge par les APCs. Les APCs sont mises en co-culture avec des lymphocytes T activés ou au repos, traités ou non PUVA, pendant 24h, à 37°C et 5% de CO₂. Les Poly I :C (25µg/ml), R848 (1µg/ml) et LPS (1µg/ml), ligands du TLR-3, -7/8 et -4 respectivement sont utilisés comme contrôle positif de maturation des APCs. Après 48h de co-culture, les surnageants sont prélevés et congelés afin de réaliser un dosage de cytokines (IL-6, IL-8, TNF-α, IL-12p70, IL-1β et IL-10) par CBA (CBA Flex, BD biosciences). Les cellules sont marquées avec des anticorps anti-CD40 (IOtest), anti-CD80 (IOtest) et anti-HLA-DR (BD, biosciences) afin de mesurer leur maturation par cytométrie en flux. La maturation des cellules est mesurée en moyenne de fluorescence des CD40 et CD80, puis exprimée en « Fold increase » ramené à la condition « medium » qui correspond à l'expression basale de CD40 et CD80 par les différentes APCs.

Dans un test préliminaire, la maturation des moDCs en présence de lymphocytes T au repos ou activés traités ou non PUVA a été étudiée par cytométrie en flux. Les lymphocytes T sont mis en co-culture 24h après le traitement PUVA avec des moDCs autologues (ratio 1 :1, 100000 cellules) en présence de LPS (1µg/ml) pendant 48h, à 37°C et 5% CO₂. Après 48h, les moDCs sont marqués avec des anticorps anti-CD209, anti-CD40 et anti-CD80. La maturation est mesurée en MFI et exprimée en FI ramené à la condition « LPS » qui est le contrôle positif.

Prolifération et polarisation de lymphocytes T naïfs

Les moDCs sont mises en co-culture 24h avec les lymphocytes T autologues au repos ou activés (lymphocytes T préalablement purifiés grâce à un kit EasySep, Stemcell) traités ou non PUVA (24h après leur traitement) (ratio 1 :1, 5000 cellules). Au bout de 24h, des lymphocytes T naïfs (obtenus à partir de sang de cordon et enrichis par sélection négative des lymphocytes T (Easy Sep, Stem cell)), allogéniques sont ajoutés (50 000 cellules) (ratio moDCs : lymphocytes T naïfs, 1 :10), et incubés pendant 6 jours, à 37°C et 5% de CO₂. Après 6 jours de co-culture, une restimulation PMA/Ionomycine est réalisée, pendant 5h, au bout desquelles le surnageant est récupéré afin de doser, par CBA, différentes cytokines : IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, TNF-α, IFN-γ (kit Th1/Th2 CBA Flex, BD biosciences) et TGF-β (CBA Flex, BD Biosciences) (Fig. 21). Un test de prolifération par incorporation de thymidine tritiée est également réalisé à J6. La thymidine tritiée (diluée au 20^{ème} dans du RPMI complet) est ajoutée 18h avant le comptage.

B. Résultats

a. Caractérisation des cellules activées issues de MLR

Pour notre étude *in vitro*, nous avons choisi d'utiliser un modèle de lymphocytes T alloréactifs activés, obtenus par culture mixte lymphocytaire (MLR) afin de mimer les lymphocytes T alloréactifs obtenus dans un contexte de GvHD. Les lymphocytes T alloréactifs activés expriment des molécules de costimulation telles que CD134 (OX40) (304), CD154 (CD40L) (305) et CD137 (4-1BB) (306). Dans un premier temps et afin de caractériser les lymphocytes T alloréactifs activés utilisés dans ce modèle, nous avons étudié la cinétique d'expression de différentes molécules d'activation (HLA-DR, CD69, CD25 et CD27) et de costimulation (CD154, CD137 et CD134) en surface de lymphocytes T issus de MLR. Les cellules sont prélevées, marquées avec des anticorps anti-CD3, anti-CD4, anti-HLA-DR, anti-CD69, anti-CD25, anti-CD154, anti-CD137, anti-CD27 et anti-CD134 et l'expression de ces marqueurs est analysée sur les cellules CD3+/CD4+ (lymphocytes T CD4+) par cytométrie en flux à différents temps de la co-culture : J3, J4, J5 et J6 après le début de la MLR (Fig. 23).

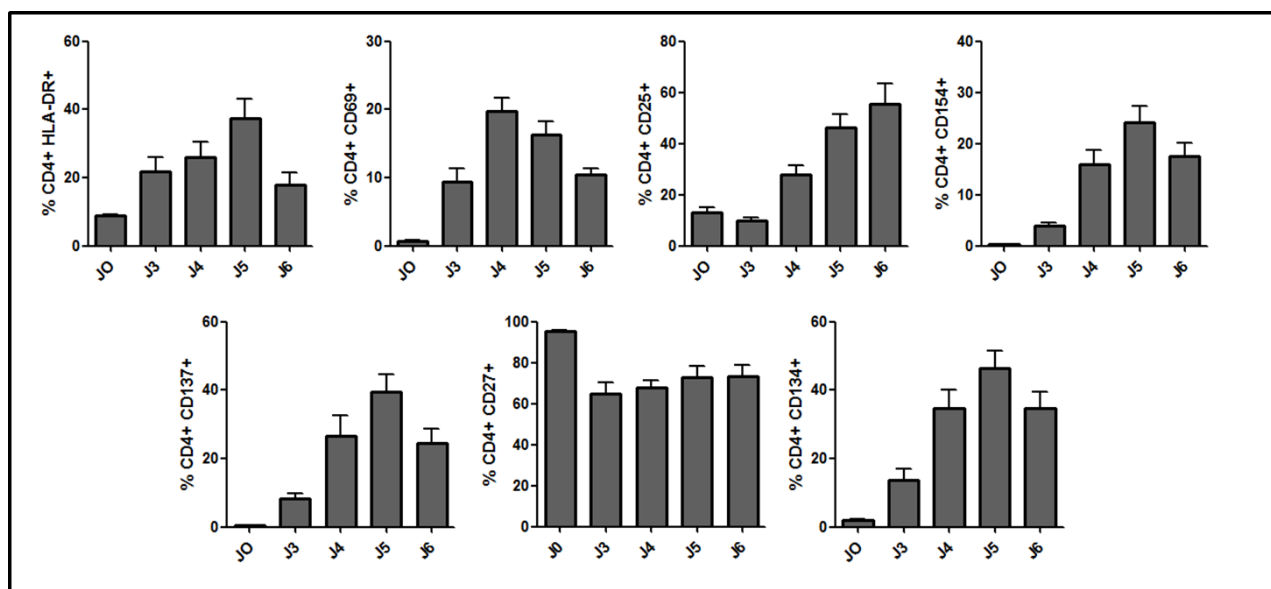


Figure 23 : Caractérisation des cellules alloréactives activées. Les PBMCs d'un donneur sain issus de la co-culture avec des PBMCs irradiés (30Gy) d'un autre donneur sain sont prélevés et marqués avec des anticorps anti-CD3, anti-CD4, anti-HLA-DR, anti-CD69, anti-CD25, anti-CD154, anti-CD137, anti-CD27 et anti-CD134, au 3^{ème}, 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} jour après leur mise en contact. La caractérisation des cellules est réalisée sur les lymphocytes T (CD3+/CD4+) par cytométrie en flux. N=10.

Le pourcentage de cellules exprimant le marqueur CD27 diminue entre le début de la co-culture (J0) et le premier point d'analyse (J3), et ne semble pas montrer de variation entre les différents points d'étude (J3, J4, J5 et J6). Les pourcentages de lymphocytes T exprimant HLA-DR, CD-154, CD-137 et CD-134 augmentent à partir du 3^{ème} jour après la mise en culture pour atteindre leur maximum au 5^{ème} jour (38%, 22%, 40% et 43% de lymphocytes T HLA-DR+, CD-154+, CD137+ et CD134+, respectivement) ; et diminue au 6^{ème} jour. Le marqueur d'activation CD69 est exprimé plus

précocement par les lymphocytes T activés que le reste des marqueurs puisque le pourcentage maximum de lymphocytes T activés exprimant cette molécule (19%) est atteint le 4^{ème} jour après le début de la MLR, en revanche, le marqueur CD25 semble lui, être exprimé plus tardivement puisque le pourcentage maximum (58%) est atteint le 6^{ème} jour après la mise en co-culture (Fig. 22).

Les lymphocytes T alloréactifs sont bien activés à J5 et J6, c'est pour cela que les lymphocytes T alloréactifs activés sont prélevés à J6 pour les différentes expériences.

b. Apoptose des lymphocytes T traités PUVA

Dans un premier temps et afin de valider l'utilisation de notre modèle de lymphocytes T alloréactifs activés, nous avons mesuré le pourcentage d'apoptose des lymphocytes T au repos, alloréactifs activés, traités ou non PUVA. Les PBMCs sont traités PUVA puis incubés pendant 24h ou 48h, à 37°C et 5% de CO₂. Après 24 et 48h, les PBMCs sont marqués avec un anticorps anti-CD3, et sont également marqués avec de l'annexine V et du 7AAD. Les cellules vivantes sont les CD3+/AnnV-/7AAD- (Fig. 24A).

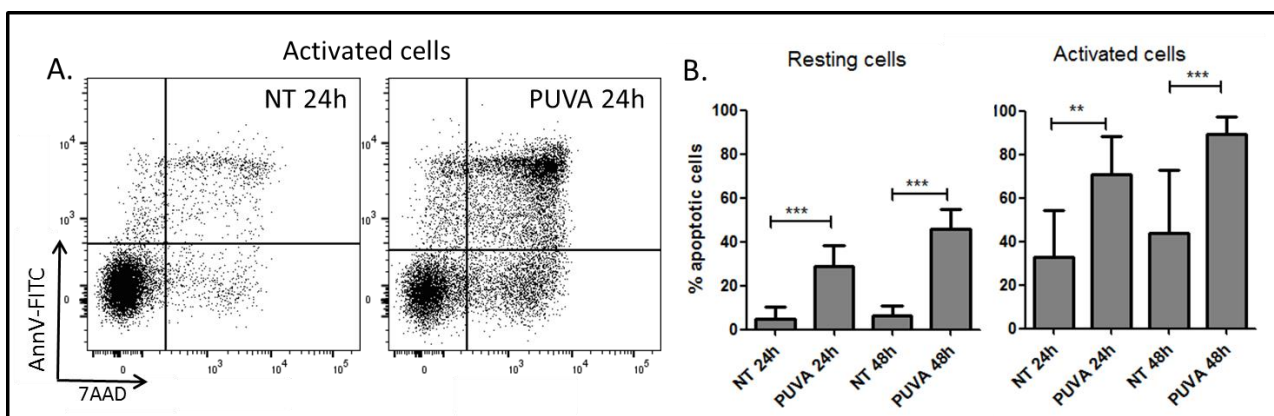


Figure 24 : Le traitement PUVA induit l'apoptose des lymphocytes T. Les PBMCs au repos ou alloréactifs activés sont traités PUVA et incubés pendant 24 et 48h. a.) Dot plot illustratif de l'apoptose à 24h, des lymphocytes T alloréactifs activés non traités et traités PUVA. B.) Histogrammes des moyennes des taux d'apoptose des lymphocytes T au repos, alloréactifs traités ou non PUVA. Les analyses statistiques ont été réalisées par ANOVA (Kruskal-Wallis), **N=16**

Suite au traitement PUVA, 29% (à 24h) et 46% (à 48h) des lymphocytes T au repos sont en apoptose, contre 4.6% à 24h et 6.3% à 48h, lorsqu'ils ne sont pas traités (Fig. 23B). Pour les lymphocytes T alloréactifs activés (Fig. 24B), à 24h, 67.6% des lymphocytes T activés PUVA sont apoptotiques, contre 27.7% des cellules non traités. A 48h, 88% des lymphocytes T alloréactifs sont apoptotiques, contre 39% en condition NT.

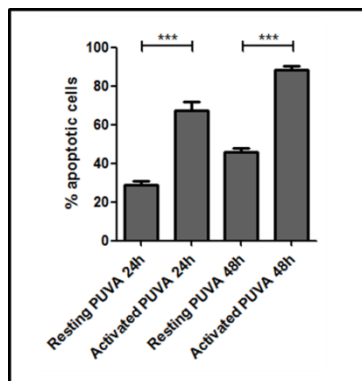


Figure 25 : Comparaison de l'apoptose des lymphocytes T au repos et activés après traitement PUVA. Les PBMCs au repos ou activés sont traités PUVA et incubés à 37°C et 5% de CO₂ pendant 24 et 48h. Les cellules sont ensuite marquées avec un anticorps anti-CD3, de l'AnnV et du 7AAD. L'histogramme représente les moyennes des taux d'apoptose des lymphocytes T au repos et activés traités PUVA. Les études statistiques ont été réalisées par t-test (Mann Whitney), **N=16**.

A 24h, le pourcentage d'apoptose des lymphocytes T alloréactifs activés après traitement PUVA (67%) est supérieur à celui des lymphocytes T lorsqu'ils sont au repos (29%) ; les pourcentages d'apoptose obtenus 48h après le traitement PUVA suivent la même tendance puisque le pourcentage d'apoptose lorsque les lymphocytes T sont activés atteint 88% contre 45% lorsqu'ils sont au repos (Fig. 25).

Le traitement PUVA induit l'apoptose des lymphocytes T ; l'apoptose est significativement plus importante lorsque les lymphocytes T sont activés (alloréactifs) ($p < 0.0001$).

c. Etude des DAMPs

Nous nous sommes intéressés à caractériser les signaux caractéristiques de la mort « immunogène », les molécules dites de danger (DAMPs). Dans ce contexte immunogénique, les cellules apoptotiques peuvent exprimer ou sécréter des DAMPs telles que la Calréticuline, la protéine HMGB1, les protéines Hsp70 et -90, l'ATP ou encore l'Il-1 β . Les DAMPs vont permettre la prise en charge des cellules apoptotiques et l'élaboration d'une réponse spécifique contre les antigènes dérivés des cellules apoptotiques. L'étude d'expression ou de sécrétion de ces molécules peut nous orienter vers le type d'apoptose induit par le traitement PUVA.

Les PBMCs sont traités PUVA et incubés pendant 24 et 48h. Les cellules sont marquées avec des anticorps anti-CD3, anti-CRT et également avec de l'Annexine V et du 7AAD. L'expression de la Calréticuline est mesurée sur les cellules CD3+ 7AAD- (les lymphocytes T ayant gardé leur intégrité membranaire), par cytométrie en flux (Fig. 26A). Le maintien de l'intégrité membranaire est ici important puisque nous nous intéressons à l'externalisation de la CRT, autrement dit son expression à la surface des cellules.

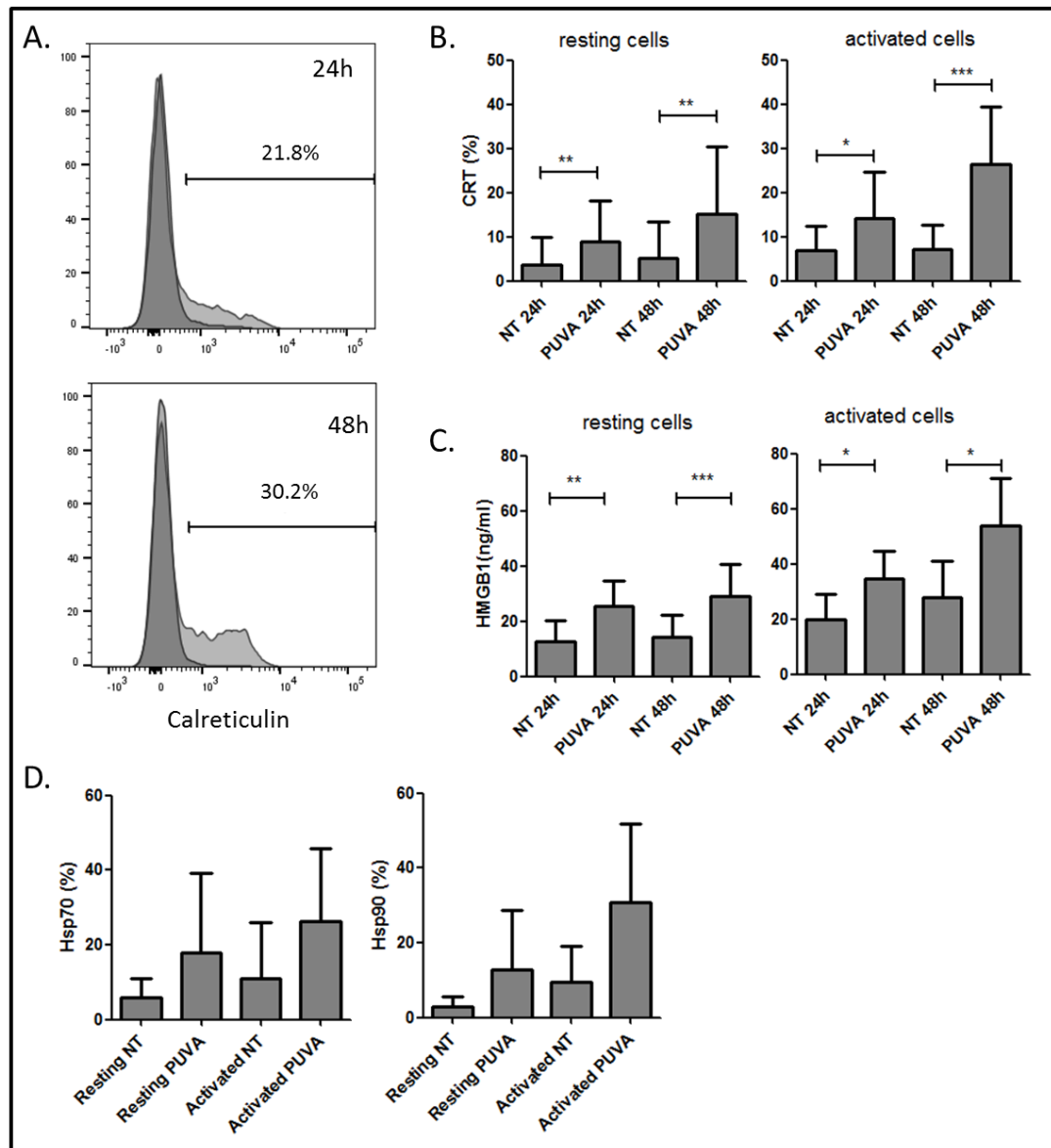


Figure 26 : Le traitement PUVA induit l'expression et la sécrétion de DAMPs. L'expression de Calréticuline est mesurée par cytométrie en flux, après marquage de PBMCs traités PUVA. Les histogrammes représentent la superposition entre le pourcentage de lymphocytes T activés NT et activés traités PUVA exprimant de la Calréticuline, à 24 et 48h (a). La mesure se fait sur les cellules CD3+/7AAD- (les lymphocytes T ayant gardé leur intégrité membranaire) (b). Le surnageant de culture de ces PBMCs sert au dosage de HMGB1 réalisé par ELISA, après 24 et 48h (c) d'incubation. Les tests statistiques sont réalisés par ANOVA, **N=18**. L'expression de Hsp70 et Hsp90 est mesurée par cytométrie en flux. Les histogrammes représentent les pourcentages de cellules exprimant Hsp70 et Hsp90, 48h après le traitement (d). La mesure se fait sur les cellules CD3+ 7AAD-. Les analyses statistiques ont été réalisées par ANOVA (Kruskal-Wallis), **N = 3**

A 24h, 9% des lymphocytes T (LTs) au repos traités expriment la Calréticuline, contre 4% des LTs en condition non traités. Lorsque les lymphocytes T sont activés, 14% d'entre eux expriment de la Calréticuline après traitement PUVA contre 7% lorsqu'ils ne le sont pas (Fig. 26B). Le traitement PUVA induit donc l'expression de calréticuline à la surface des lymphocytes T, à 24h.

L'expression de calréticuline est significativement plus importante lorsque les cellules T sont activées que lorsqu'elles sont au repos ($p < 0.0001$).

A 48h, le pourcentage de lymphocytes T au repos traités PUVA qui exprime la calréticuline (15.2%) est supérieur à celui des cellules non traitées (5.2%) (Fig. 26B). Le pourcentage de lymphocytes T activés traités PUVA exprimant calréticuline n'est pas significativement différent de celui obtenu lorsque les cellules sont au repos.

La quantité de protéine HMGB1 relarguée dans les surnageants de culture de PBMCs au repos/alloréactifs activés, traités ou non PUVA est mesurée par ELISA, 24 et 48h après le traitement. Comme le montre la figure n° 25C, la protéine HMGB1 est détectée dans les surnageants de cellules au repos à 24h (26ng/ml) et 48h (29ng/ml) après traitement PUVA. La quantité de protéine HMGB1 relarguée est supérieure dans les surnageants de culture des cellules alloréactives activées (35 et 54 ng/ml, après 24 et 48h d'incubation, respectivement).

L'étude préliminaire de l'expression des protéines Hsp (-70 et -90) par les cellules lymphocytes T traitées PUVA montre qu'à 48h, les pourcentages de lymphocytes T traités PUVA exprimant la protéine Hsp70 (18% des lymphocytes T au repos et 27% des lymphocytes T activés) sont plus importants que ceux obtenus avec les lymphocytes T non traités (5 et 10% des lymphocytes T au repos et activés, respectivement) (Fig. 26D). On observe des résultats similaires pour l'expression de Hsp90 puisque les pourcentages de lymphocytes T exprimant Hsp90 sont plus élevés lorsque les cellules sont traitées PUVA (16 et 30% des lymphocytes T au repos et activés, respectivement) que lorsqu'elles ne le sont pas (2% des lymphocytes T au repos et 10% des lymphocytes T activés). Ces résultats restent cependant préliminaires, car ils sont issus de N=4 expériences.

Dans le contexte de mort immunogène, il a également été montré que l'externalisation de la CRT était associée avec l'apparition d'un stress du réticulum endoplasmique (RE) (216, 217). Ce stress se traduit par la phosphorylation de la protéine eIF2 α . Nous avons montré que les lymphocytes T traités PUVA exprimaient de la Calréticuline à leur surface, nous avons donc étudié par Western Blot, la phosphorylation de la protéine eIF2 α à partir de PBMCs au repos, non traités, traités PUVA ou traités avec du DTT, 1h et 4h après le traitement. La membrane a ensuite été marquée avec dans un premier temps un anticorps anti-phospho-eIF2 α et ensuite avec un anticorps anti-eIF2 α total (Fig. 27A). L'histogramme 26B représente la variation des ratios entre la quantité de protéine phosphoeIF2 α et celle d'eIF2 α totale, ramené à la condition NT.

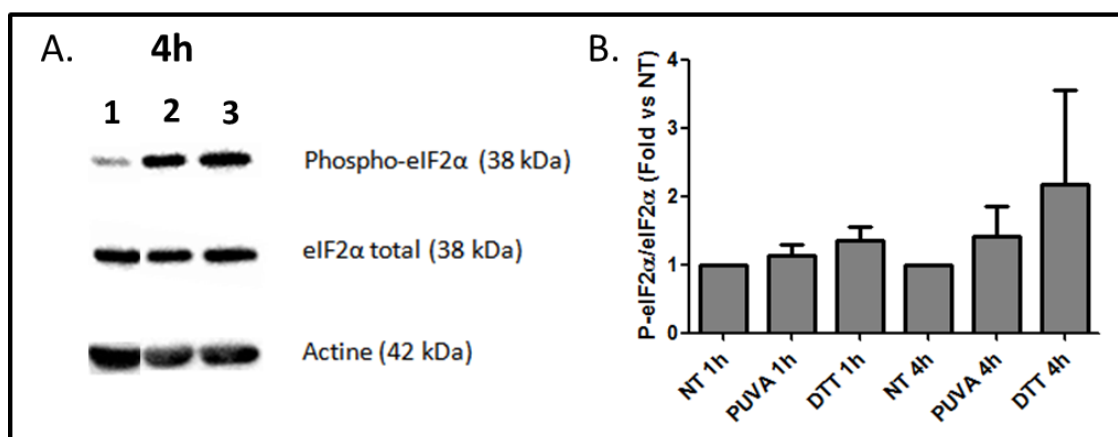


Figure 27 : Etude de la phosphorylation de la protéine eIF2α après traitement PUVA. (A) Les PBMC d'un donneur ont été traitées par PUVA (2), au dithiothréitol (DTT, contrôle positif) (3) ou non traitées (1). La phosphorylation d'eIF2α a été mesurée par Western Blot 4h après traitement. Des anticorps ciblant toutes les formes d'eIF2α (eIF2α total), seulement la forme phosphorylée d'eIF2α (Phospho-eIF2α), ou l'actine ont été utilisés. (B) l'histogramme représente les « fold increase » des moyennes des ratios obtenus entre la quantité de eIF2α phosphorylée à partir de 4 donneurs différents. Le DTT est utilisé comme condition contrôle d'un stress du réticulum endoplasmique. N=4

L'étude faite sur 4 donneurs différents montre qu'à 1h, le ratio entre la quantité de protéine phosphoeIF2α et celle d'eIF2α est légèrement supérieur lorsque les PBMCs sont traités PUVA que lorsqu'ils ne le sont pas. A 4h, cette différence entre les conditions NT et PUVA s'accroît (Fig. 27B).

Lors d'un stress du RE, d'autres molécules sont phosphorylées, telles que PERK et IREα. Nous avons également essayé de quantifier la quantité de ces protéines phosphorylées mais n'avons pas réussi puisque les anticorps utilisés ne reconnaissaient pas la protéine d'intérêt ou engendraient un bruit de fond trop important.

Enfin, pour compléter l'étude d'expression des DAMPs, nous avons également étudié la sécrétion d'ATP et d'Il-1β dans les surnageants de culture de PBMCs traités PUVA. La sécrétion d'ATP a été mesurée par réaction enzymatique et par HPLC, celle d'Il-1β par cytométrie en flux (CBA). Dans les conditions utilisées, nous n'avons pas pu montrer de sécrétion d'ATP ni d'Il-1β dans le surnageant de culture de PBMCs au repos/ alloréactifs activés, traités ou non PUVA, que ce soit à 24 comme à 48h (données non montrées). La dégradation d'ATP engendre l'apparition d'AMP ainsi que d'ADP, c'est pourquoi nous avons également quantifié l'AMP et l'ADP contenus dans les surnageants de culture de PBMCs au repos, activés, traités ou non PUVA, par HPLC. Nous n'avons pas observé d'AMP ni d'ADP, dans les conditions expérimentales utilisées.

Le traitement PUVA induit l'externalisation de la Calréticuline à la surface des lymphocytes T de façon plus importante sur les lymphocytes T activés (qui semble être en lien avec un stress du RE, comme le montre ici phosphorylation de la protéine eIF2α), le relargage d'HMGB1 dans le milieu extracellulaire et l'expression des protéines Hsp70 et -90. Le relargage d'HMGB1 est plus important lorsque les cellules sont activées, l'expression d'Hsp70, Hsp90 semble suivre la même tendance. En revanche le traitement PUVA n'induit pas dans nos conditions expérimentales, la sécrétion d'ATP ni celle d'Il-1β.

d. Prise en charge des lymphocytes T traités PUVA par les APCs

Les lymphocytes T activés externalisent la calréticuline lorsqu'ils sont traités PUVA. La Calréticuline qui est un « eat-me signal » pourrait faciliter la prise en charge des lymphocytes T apoptotiques par les différentes APCs (moDCs, macrophages et monocytes). Nous avons donc étudié dans un premier temps la phagocytose des lymphocytes T par les APCs et ensuite la capacité de ces lymphocytes T à induire la maturation des APCs qui les prennent en charge.

La théorie développée par le groupe d'Edelson suggère que les monocytes contenus dans la poche de traitement seraient résistants au traitement PUVA et capables de se différencier en moDCs et de prendre en charge les lymphocytes T traités PUVA. Dans un contexte in vitro, les travaux de D. Hannani, montrent que l'apoptose des monocytes a lieu plus tardivement (80% d'apoptose, 6 jours après le traitement) et que les monocytes ne se différencient pas spontanément en moDCs, mais seulement en présence de l'apport de cytokines exogènes ; ces résultats sont en discordance avec ceux obtenus par l'équipe d'Edelson.

Le principe de la PCE repose sur la réinjection de cellules traitées PUVA, ces cellules sont réinjectées par voie intraveineuse, autrement dit, elles vont dans un premier temps être au contact avec les monocytes se trouvant dans le flux sanguin. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés en premier lieu à la prise en charge des lymphocytes T traités PUVA par les monocytes. Cette première étude consiste à analyser la phagocytose des lymphocytes T traités PUVA par les monocytes et la maturation des monocytes engendrée par cette co-culture.

Des lymphocytes T au repos ou activés, traités ou non PUVA sont co-cultivés (24h après leur traitement) avec des monocytes autologues. Les monocytes et les lymphocytes T ont été purifiés à partir d'une poche de sang, comme indiqué dans les matériels et méthodes. La phagocytose de lymphocytes T par les monocytes a été étudiée entre 30min et 4h, par cytométrie en flux (Fig. 28A). Cette mesure de phagocytose est réalisée par la quantification des monocytes CFSE+ parmi les CD14+/CD3- afin de sélectionner les monocytes ayant phagocyté des lymphocytes T (CFSE+) tout en éliminant les doublets.

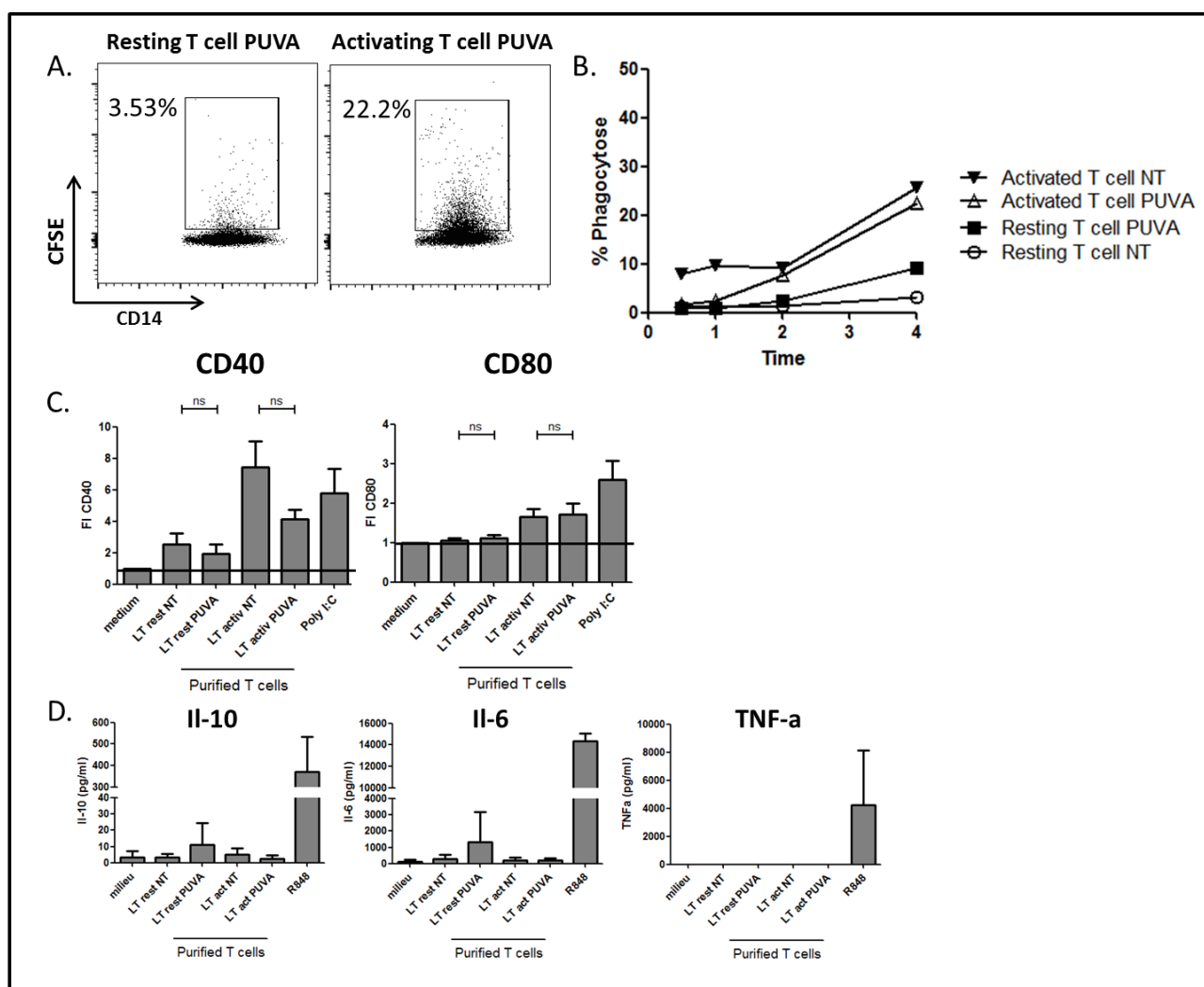


Figure 28 : Etude de la prise en charge des lymphocytes T traités PUVA par les monocytes. La phagocytose des lymphocytes T traités PUVA par monocytes est mesurée par cytométrie en flux (a). Les lymphocytes T (LTs) au repos et activés sont traités PUVA 24h avant leur mise en co-culture avec les monocytes autologues. Les lymphocytes T sont ensuite marqués au CFSE et mis en co-culture avec les monocytes. L'arrêt de la phagocytose se fait par ajout de PBS froid, à différents temps (30 minutes, 1h, 2h et 4h). Les cellules sont ensuite marquées CD14-APC (monocytes) et CD3-BV421 (LTs) (a). La cinétique de la phagocytose est mesurée par cytométrie en flux (b). Le pourcentage de phagocytose correspond à celui des cellules CFSE+ parmi les CD14+/CD3-. Les statistiques sont réalisées par T test, N=6. Les monocytes sont mis en contact de LTs au repos, traités ou non PUVA pendant 48h. Le R848, ligand du TLR-7/8 est utilisé comme contrôle positif d'activation des monocytes. Les monocytes sont ensuite marqués avec des anticorps anti-CD14 ainsi que anti-CD40 et anti-CD80. La mesure d'expression des molécules de costimulation CD40 et CD80 par les monocytes est réalisée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en Fold Increase rapporté à la condition « medium » (c). La sécrétion des cytokines par les monocytes après leur prise en charge des lymphocytes T est mesurée à 48h par CBA dans les surnageants de culture (d). Les analyses statistiques sont réalisés par T test (Mann Whitney), N=4.

La cinétique d'internalisation entre 30 min et 2h des lymphocytes T autologues par les monocytes est la même que les lymphocytes T soient au repos, activés, traités ou non PUVA. Après 4h de mise en contact entre les lymphocytes T et les monocytes, la phagocytose des lymphocytes T activés (22%) est

supérieure à celle des lymphocytes T au repos (10%) (Fig. 28B). Il n'existe cependant pas de différence entre la phagocytose des lymphocytes T activés non traités et ceux traités PUVA.

Les lames observées par microscopie (données non montrées), après passage au FACS nous ont montré qu'il n'y avait pas de vraie phagocytose mais plutôt de l'endocytose de fragments qui pourraient être des corps apoptotiques issus des lymphocytes T traités.

Les lymphocytes T traités PUVA sont mis en contact avec des monocytes autologues, pendant 48h. Après 48h de co-culture, le surnageant de culture est récupéré afin de doser la quantité de cytokines sécrétées et les cellules sont marquées afin de réaliser une analyse d'expression de CD40 et CD80, par cytométrie en flux (Fig 28C).

L'étude de l'expression de CD40 et CD80 montre que lorsque les monocytes sont au contact de lymphocytes T au repos, activés traités PUVA ou non, l'expression de CD40 augmente en comparaison de celle obtenue lorsque les monocytes sont seuls dans le milieu. L'expression de CD40 augmente considérablement lorsque les monocytes sont au contact de lymphocytes T activés non traités ; cependant cette augmentation est légèrement plus faible lorsque les lymphocytes T activés sont traités PUVA. Les monocytes au contact de lymphocytes T au repos, ne présentent pas d'augmentation de la molécule CD80 que les lymphocytes T soient traités PUVA ou pas. En revanche, lorsque les monocytes sont au contact de lymphocytes T alloréactifs traités ou non PUVA, on observe une légère augmentation de l'expression de CD80 en comparaison avec les lymphocytes T au repos (Fig. 28C). Les différences observées ne sont pas statistiquement significatives.

Les monocytes au contact de lymphocytes T autologues qu'ils soient au repos, activés, traités PUVA ou non, ne semblent pas sécréter d'IL-12p70, d'IL-1 β ni de TNF- α . Les monocytes semblent sécréter de l'IL-6 et de l'IL-10, en faible quantité, lorsqu'ils sont au contact de lymphocytes T au repos, traités PUVA. Au contact de lymphocytes T activés, traités PUVA ou au repos non traités, les monocytes ne semblent pas sécréter d'IL-10 ni d'IL-6 (Fig. 28D). Les monocytes sécrètent également une forte quantité d'IL-8 qui est la même selon les différentes conditions (données non montrées).

Cette étude montre que les monocytes sont capables d'endocyter du matériel cellulaire provenant des lymphocytes T alloréactifs activés, cependant cette endocytose est relativement faible et pas différente que les lymphocytes T alloréactifs soient traités PUVA ou non.

Il a également été montré que les cellules traités PUVA une fois réinjectées dans le sang se retrouvaient majoritairement dans les tissus, notamment au niveau de la rate (11). Nous nous sommes donc intéressés à la prise en charge des lymphocytes T traités PUVA par les moDCs et les macrophages, APCs localisées dans les tissus.

Des lymphocytes T au repos/ alloréactifs activés, traités ou non PUVA sont co-cultivés (après 24h d'incubation) avec trois types d'APCs autologues (moDCs, monocytes et macrophages). Les moDCs et les macrophages sont différenciés à partir de monocytes par leur mise en culture en présence de GM-CSF pour les macrophages et de GM-CSF + IL-4 pour les moDCs (comme décrit dans les matériels et méthodes). La phagocytose des lymphocytes T par les APCs est mesurée entre 30 min et 4h, par cytométrie en flux (Fig. 29A et 29C). Cette mesure de phagocytose est réalisée sur les moDCs CFSE+ parmi les cellules CD209+/CD3- (Fig. 29C et 29D) et sur les macrophages CFSE+ parmi les cellules

CD14+/CD3- (Fig. 29A et 29B) à partir de 30 min, afin de sélectionner les différentes APCs ayant phagocyté des lymphocytes T, en éliminant les possibles doublets.

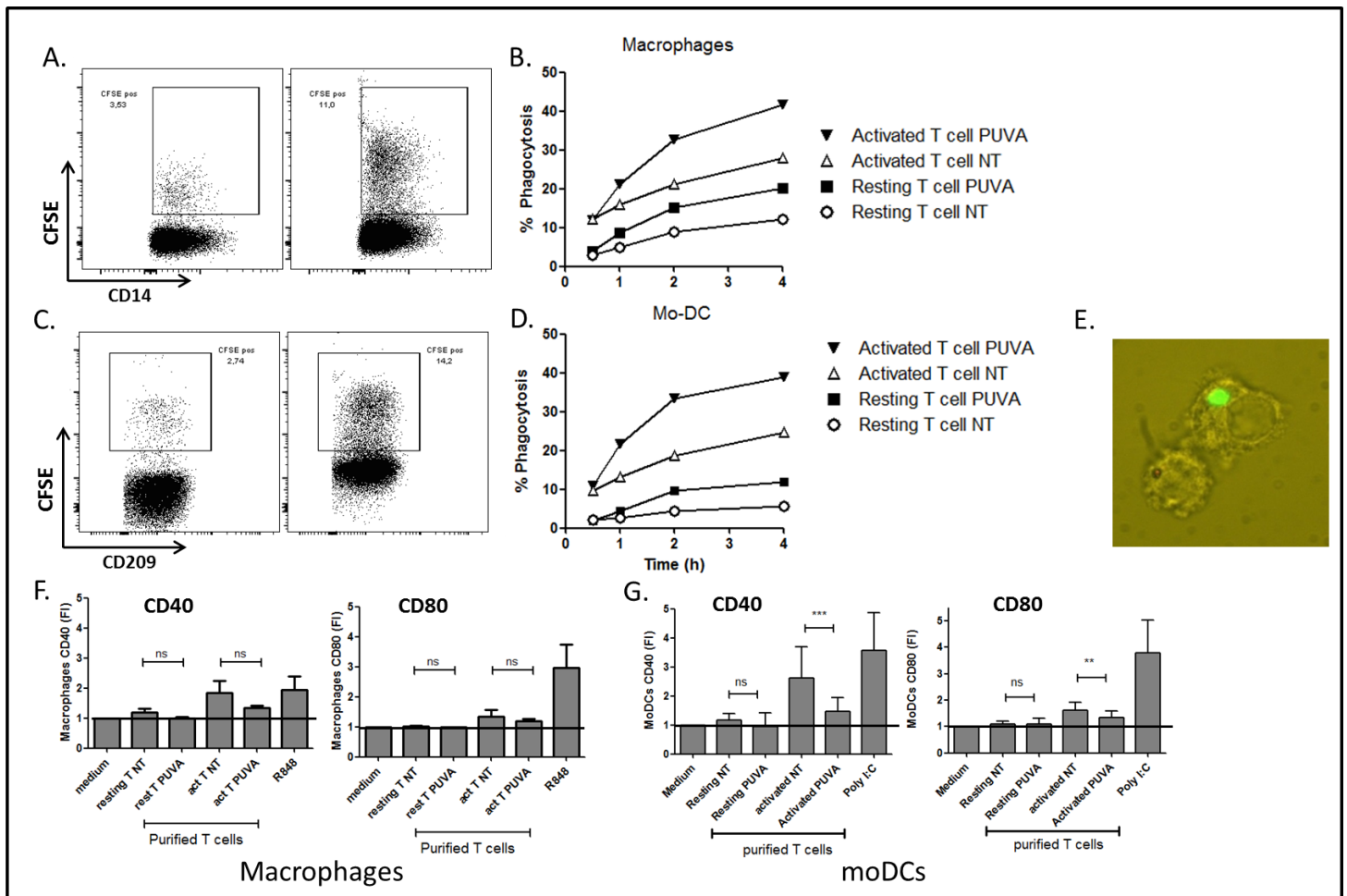


Figure 29 : Etude de la prise en charge des lymphocytes T traités PUVA par les moDCs et les macrophages. La phagocytose des lymphocytes T traités PUVA par les macrophages (A.) et les moDCs (C.) est mesurée par cytométrie en flux. Les lymphocytes T (LTs) au repos et activés sont traités PUVA 24h avant leur mise en co-culture avec les macrophages et les moDCs autologues. Les lymphocytes T sont ensuite marqués au CFSE et mis en co-culture avec les différentes APCs. L'arrêt de la phagocytose se fait par ajout de PBS froid, à différents temps (30 minutes, 1h, 2h et 4h). Les cellules sont ensuite marquées CD14-APC(macrophages) ou CD209-APC (moDCs) et CD3-BV421 (LTs). L'analyse de la phagocytose se fait par cytométrie en flux. Le pourcentage de phagocytose correspond à celui des cellules CFSE + parmi les CD14+/ CD3- pour les macrophages et CFSE+ parmi les CD209+/ CD3- pour les moDC (B et D). Les statistiques sont réalisées par T test, N=6. La phagocytose des lymphocytes T traités PUVA par les moDCs a également été observée par microscopie de fluorescence, la cellule verte est un lymphocyte T (marqués au CFSE). Pour l'étude de la maturation, les macrophages et les moDCs sont mis en contact de LTs au repos, traités ou non PUVA pendant 48h. R848 et Poly I:C sont utilisés comme contrôles positifs d'activation des macrophages et des moDCs, respectivement. Les APCs sont ensuite marquées avec des anticorps anti-CD14 (macrophages) ou anti-CD209 (moDCs) ainsi que anti-CD40 et anti-CD80. La mesure d'expression des molécules de costimulation CD40 et CD80, par les macrophages (F) et les moDCs (G) est réalisée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en Fold Increase rapporté à la condition « medium ». Les statistiques sont réalisés par T test (Mann Whitney), N=4 (macrophages) N= 9 (moDCs).

Après 4h de co-culture entre les lymphocytes T et les moDCs, 20% et 42% des macrophages ont phagocyté des lymphocytes T au repos et activés traités PUVA, respectivement, montrant ainsi que les

macrophages phagocytent avec plus d'efficacité les lymphocytes T activés traités PUVA que ceux au repos (Fig. 29B). Des résultats similaires sont obtenus lorsque les lymphocytes T sont mis en présence de moDCs autologues, puisque 12% des moDCs phagocytent des lymphocytes T au repos traités PUVA contre 39% qui phagocytent des lymphocytes T activés traités PUVA, après 4h de co-culture (Fig. 29D). Les images de phagocytose obtenues par microscopie montrent que les moDCs phagocytent des lymphocytes T (CFSE+) traités PUVA, sous forme de cellules entières et pas de corps apoptotiques comme avec les monocytes (Fig. 28^E).

Les lymphocytes T alloréactifs activés traités PUVA sont préférentiellement phagocytés par les macrophages et les moDCs ; La capacité de ces lymphocytes T à induire la maturation de ces macrophages et de ces moDCs a été analysée.

Pour l'étude de la maturation des APCs, 24h après leur traitement PUVA, les lymphocytes T sont mis en contact avec des moDCs ou des macrophages autologues, pendant 48h. Après 48h de co-culture, les cellules sont marquées avec un anticorps anti-CD209 pour les moDCs et anti-CD14 pour les macrophages ainsi qu'avec des anticorps anti-CD40 et anti-CD80 et analysées par cytométrie en flux (Fig. 29F et 29G).

Les macrophages et les moDCs au contact de lymphocytes T au repos, ne présentent pas d'augmentation de l'expression des molécules de costimulation (CD40 et CD80) que les LTs soient traités PUVA ou pas (Fig. 29F et 29G). En revanche, lorsque les macrophages et les moDC sont au contact de LTs alloréactifs traités PUVA on observe une légère augmentation de l'expression de CD40 et dans une moindre mesure de CD80, qui est cependant plus faible que celle observée lorsque les moDCs sont au contact de LTs alloréactifs non traités. Les différences observées chez les macrophages entre ces deux conditions ne sont pas significatives alors que celles observées pour les moDCs le sont (Fig. 29F et 29G).

L'analyse de l'expression de molécules de costimulation (CD40 et CD80) montre que la mise en contact de lymphocytes T alloréactifs activés avec des moDCs et des macrophages autologues n'induit pas de maturation de ces APCs.

Afin d'approfondir l'étude de la maturation des macrophages et des moDCs lorsqu'ils sont au contact de lymphocytes T au repos ou alloréactifs activés, traités ou non PUVA, nous avons mesuré la quantité de cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-12p70 et TNF- α) et de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) sécrétées dans le surnageants de culture après 48h de co-culture, par cytométrie en flux (CBA) (Fig. 30A et 30B).

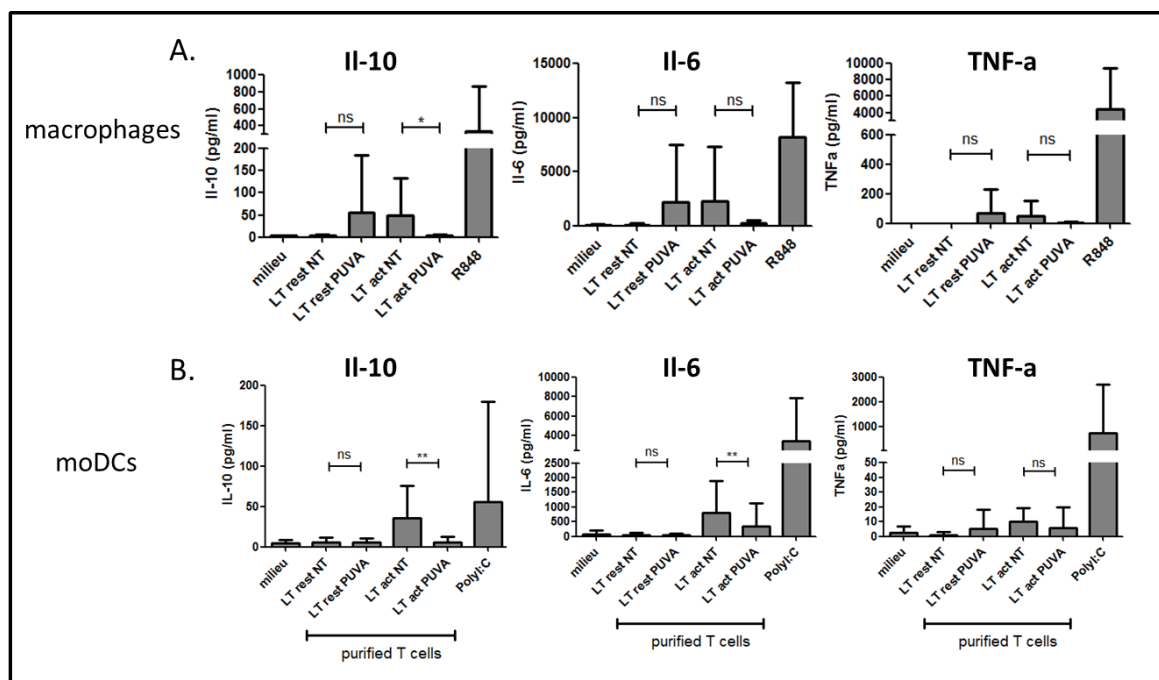


Figure 30 : Mesure des cytokines sécrétées par les moDCs et les macrophages après co-culture avec des lymphocytes T traités PUVA autologues. Les macrophages et les moDCs sont mis au contact de lymphocytes T au repos/activés, traités PUVA ou non pendant 48h. La quantité de cytokines sécrétées par les macrophages (a) et les moDCs (b) est mesurée par cytométrie en flux (CBA) à partir du surnageant de culture. Statistiques réalisées par T test (Mann Whitney), N=11 pour les moDCs et N=6 pour les macrophages

Les sécrétions des cytokines IL-12p70 et d'IL-1β par les moDCs et les macrophages n'ont pas pu être détectées dans les conditions expérimentales utilisées. La sécrétion d'IL-8 par les moDCs et les macrophages est forte et n'est pas différente selon les conditions (données non montrées).

En général, que ce soit pour les macrophages ou pour les moDCs, les quantités de cytokines détectées dans les différentes conditions sont relativement faibles, seuls les contrôles positifs (PolyI :C et R848) montrent une sécrétion élevée de cytokines par les moDCs et les macrophages. De plus, on note une certaine hétérogénéité entre les différents donneurs.

Lorsque les macrophages sont au contact de lymphocytes T au repos traités PUVA, les sécrétions d'IL-10 et d'IL-6 semblent être légèrement augmentées si on les compare à celles observées lorsque les macrophages sont au contact de lymphocytes T au repos, non traités. Les quantités d'IL-10 et d'IL-6 semblent également être supérieures lorsque les macrophages sont au contact de lymphocytes T activés non traités que lorsqu'ils sont au contact de lymphocytes T activés traités PUVA. Lorsque ces macrophages sont en contact de lymphocytes T autologues, au repos/ alloréactifs activés, traités ou non PUVA, ils ne semblent pas sécréter de TNF-α (Fig. 30A).

En ce qui concerne les moDCs, lorsqu'elles sont au contact de lymphocytes T au repos qu'ils soient traités PUVA ou non, ces moDCs ne montrent pas d'augmentation de sécrétion de cytokines en comparaison avec les moDCs seules dans le milieu (contrôle négatif). Lorsque les moDCs sont au contact de lymphocytes T alloréactifs activés la quantité d'IL-10 et d'IL-6 augmente ; cette

augmentation n'est cependant pas observée lorsque les lymphocytes T alloréactifs activés sont traités PUVA. La quantité de TNF- α sécrétée par les moDCs au contact de lymphocytes T alloréactifs activés non traités semble supérieure à celle sécrétée dans le reste des conditions, cependant cette légère différence n'est pas significative (Fig. 30B).

La mise en présence des moDCs et des macrophages avec du poly I :C et du R848 respectivement nous indique que le test a fonctionné et que les cellules étaient bien fonctionnelles.

L'étude des cytokines sécrétées par les moDCs après 48h de co-culture avec des lymphocytes T au repos/activés, traités ou non PUVA nous montre un profil cytokinique non caractéristique de celui de moDCs matures ou de celui de DCs « immature ». Au vu des résultats obtenus par les études d'expression de molécules de costimulation (CD40 et CD80) et de sécrétion de cytokines par les moDCs, les moDCs au contact de lymphocytes T alloréactifs activés traités PUVA ne présentent pas de maturation. Des données similaires sont obtenues lorsque les lymphocytes T alloréactifs activés sont au contact de macrophages autologues.

Nous avons également étudié si la maturation de moDCs engendrée par la présence de LPS pouvait être inhibée par l'addition de lymphocytes T au repos/alloréactifs activés, traités ou non PUVA. Les moDCs ont été mis en co-culture 48h avec les différents lymphocytes T, en présence de LPS. A la fin de cette co-culture, les cellules sont marquées par des anticorps anti-CD40 et anti-CD80, l'étude de la maturation est ensuite réalisée par cytométrie en flux (Fig. 31A et 31B).

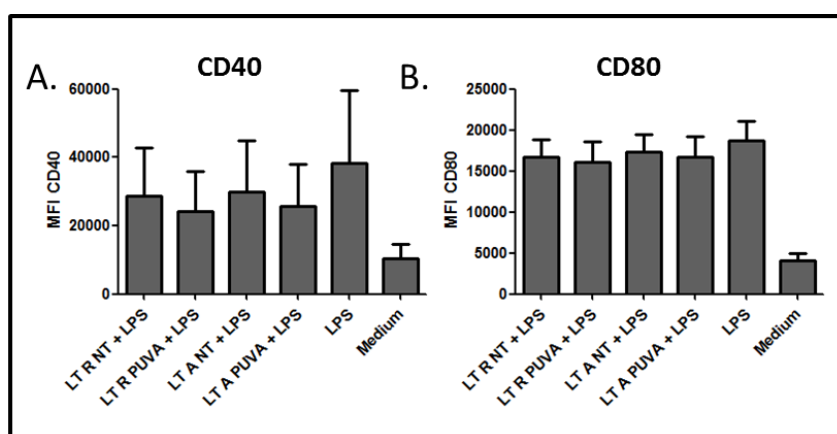


Figure 31 : Etude d'expression de molécules de costimulation par les moDCs. Les moDCs sont mises en contact de LTs au repos/alloréactifs activés, traités ou non PUVA en présence de LPS pendant 48h. Les moDCs seules dans le milieu représente le contrôle négatif (moDCs immatures). LPS est utilisé comme contrôle positif d'activation des moDCs. Les moDCs sont ensuite marquées CD209, CD40 et CD80. La mesure d'expression des molécules de costimulation CD40 (a) et CD80 (b) est réalisée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en moyenne de fluorescence (MFI). L'analyse statistique est réalisée par t-test (Mann Whitney), N=4.

Lorsque les moDCs sont au contact de lymphocytes T autologues on observe une légère diminution de l'expression de CD40 en comparaison avec le contrôle positif (LPS). Cette diminution est d'autant plus forte lorsque les moDCs sont au contact de lymphocytes T traités PUVA, qu'ils soient activés ou au repos (Fig. 31A). En revanche, aucune différence quant à l'expression de CD80 induite par le LPS

n'est observée lorsque les moDCs sont au contact de lymphocytes T qu'ils soient au repos/activés, traités ou non PUVA (Fig. 31B).

Les monocytes endocytent les corps apoptotiques issus de lymphocytes T alloréactifs activés et ne présentent pas de différence dans l'endocytose que les lymphocytes T soient traités PUVA ou pas. Les macrophages et les moDCs sont capables de phagocyter des lymphocytes T autologues, cette phagocytose augmente lorsque les lymphocytes T sont traités PUVA d'autant plus s'ils sont activés.

Les monocytes, les macrophages et les moDCs présentent un profil d'APCs « immatures » au contact de lymphocytes T activés traités PUVA.

L'ensemble des données d'expression de molécules de costimulation et du profil cytokinique des moDCs au contact de lymphocytes T alloréactifs activés suggèrent que ces lymphocytes T induisent n'induisent pas de maturation des moDCs. La seule condition où l'on observe une maturation des moDCs est lorsqu'elles sont au contact de lymphocytes T activés, non traités.

e. Polarisation des lymphocytes T naïfs au contact de moDCs

Pour la suite, nous nous sommes focalisés sur la capacité des moDCs issues d'une co-culture avec des lymphocytes T au repos/alloréactifs activés traités ou non PUVA à induire la prolifération et la polarisation de lymphocytes T naïfs allogéniques.

Comme nous l'avons vu précédemment, les lymphocytes T activés, traités PUVA semblent ne pas induire la maturation des moDCs à leur contact. Nous nous sommes intéressés à la capacité de ces moDCs ayant phagocyté les lymphocytes T à induire la réponse de lymphocytes T naïfs issus de sang de cordon (prolifération et polarisation).

Pour cela, nous avons utilisé une expérience de co-culture de moDCs avec des lymphocytes T CD4+ naïfs allogéniques. Langenkamp et al. ont montré que la mise en contact de moDCs préalablement activés (24h en présence de LPS) avec des lymphocytes T CD4+ naïfs allogéniques pendant minimum 40h, provoque la prolifération et la différenciation de ces lymphocytes T naïfs. Ces travaux montrent que la cinétique d'activation et de migration des DCs peuvent influencer la différenciation de lymphocytes T CD4+ naïfs en différents lymphocytes T effecteurs et mémoires (307).

Les moDCs sont mises en co-culture avec des lymphocytes T autologues, au repos ou activés, traités ou non PUVA, pendant 24h. Des lymphocytes T naïfs allogéniques sont ensuite ajoutés à cette co-culture pendant 6 jours (Fig. 32A). Au 6^{ème} jour, les lymphocytes T sont restimulés par PMA/Ionomycine pendant 5h ; les surnageants de culture sont ensuite prélevés afin de réaliser les dosages des cytokines Th1, Th2 et Th17 (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ et TGF- β) (Fig. 32C).

Avant d'analyser le type de réponse engendrée par la co-culture de moDCs avec des lymphocytes T naïfs allogéniques, nous avons étudié la prolifération des lymphocytes T naïfs au contact de moDCs préalablement mises en co-culture avec des lymphocytes T au repos/activés, traités ou non PUVA (Fig. 32B). La mesure de prolifération est réalisée par l'incorporation de thymidine tritiée.

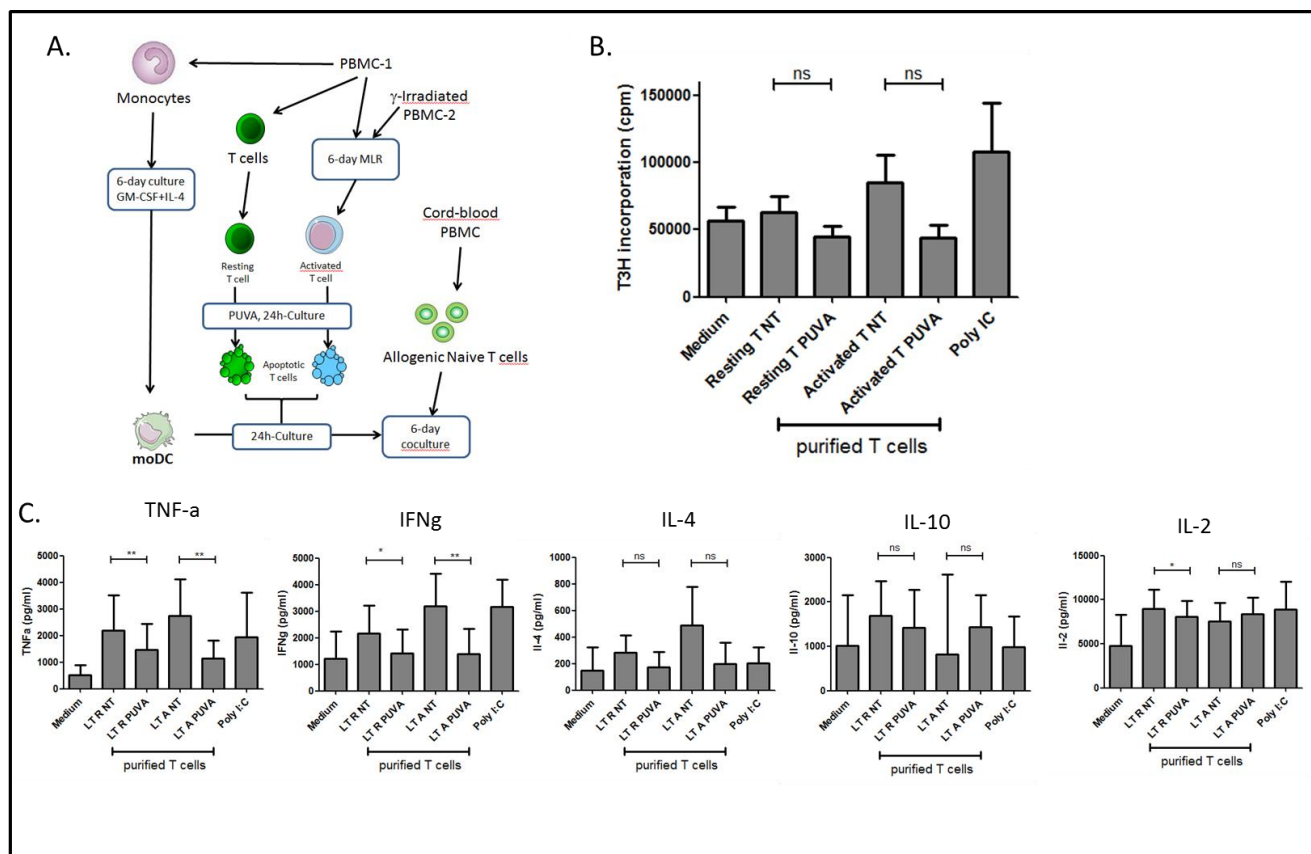


Figure 32 : Etude de la prolifération et de la polarisation des lymphocytes T naïfs au contact de moDCs préalablement activés. 24h après leur traitement PUVA, des lymphocytes T au repos ou activés, traités ou non PUVA sont mis en co-culture avec des moDCs autologues (ratio 1 :1), pendant 24h. Des lymphocytes T naïfs allogéniques sont ensuite mis en contact de ces moDCs (10 :1) pendant 6 jours (A). Après 6 jours un test de prolifération est réalisé, par incorporation de thymidine tritiée (B), N=4. Au bout de ces 6 jours de co-culture, les lymphocytes T naïfs sont également stimulés par PMA/Ionomycine, pendant 5h, au bout desquelles le surnageant est récupéré. La mesure des cytokines sécrétées se fait par cytométrie en flux (CBA flex). Les résultats représentent les concentrations de cytokines en pg/ml (C). Les tests statistiques ont été réalisés par t-test (Mann Whitney), N=8.

Les lymphocytes T naïfs sont capables de proliférer au contact de moDCs allogéniques immatures (50 000cpm), cette prolifération augmente lorsque les moDCs sont matures (poly I :C). La prolifération des lymphocytes T naïfs augmente lorsqu'ils sont au contact de moDCs issus d'une co-culture avec des lymphocytes T alloréactifs activés (80 000cpm). Cette prolifération semble néanmoins diminuer lorsque les lymphocytes T naïfs sont mis en contact avec des moDCs issus d'une co-culture avec des lymphocytes T alloréactifs traités PUVA (40 000cpm) (Fig. 32B).

Dans la littérature, il est décrit que les moDCs allogéniques (288) sont capables d'activer les lymphocytes T et de polariser la réponse immunitaire vers un profil de réponse T cytotoxique (IFN- γ) dans le cas d'une réponse de type immunogène ou un profil plutôt inhibiteur (TGF- β et IL-10) dans le cas d'une apoptose tolérogène ou encore vers un profil Th2 (IL-4).

Nous avons donc par la suite étudié le profil de réponse cytokinique des lymphocytes T naïfs co-cultivés avec des moDCs préalablement mises en contact avec des lymphocytes T au repos,

alloréactifs activés, traités ou non PUVA. La mesure des cytokines sécrétées par des lymphocytes T réactivés par PMA/Ionomycine se fait à partir du surnageant de culture, par cytométrie en flux (CBA) (Fig. 32C).

Dans les conditions expérimentales utilisées, les lymphocytes T naïfs ne semblent pas sécréter d'IL-17 et les quantités de TGF- β obtenues sont trop faibles pour être interprétables (inférieures à 10pg/ml). Les lymphocytes T naïfs sécrètent de l'IL-4, de l'IFN- γ et du TNF- α lorsqu'ils sont mis en contact avec des moDCs issus de co-culture avec des lymphocytes T alloréactifs activés non traités ; en revanche, cette sécrétion est moins importante lorsqu'ils sont au contact de moDCs préalablement incubées avec des lymphocytes T alloréactifs traités PUVA et est alors proche à celle observée avec les moDCs immatures (« medium ») (Fig. 32C).

Aucune différence de sécrétion de cytokines n'est observée quand les moDCs sont au contact de LTs au repos, traités ou non PUVA et de LTs activés traités PUVA par rapport à la condition contrôle.

Enfin, dans une étude préliminaire, nous avons étudié la polarisation des lymphocytes T naïfs au contact de moDCs préalablement incubés avec des lymphocytes T au repos, alloréactifs activés, traités ou non PUVA, par marquage intracytoplasmique des cytokines dans les lymphocytes T. Quatre cytokines ont été étudiées : l'IL-4, l'IL-10, l'IFN- γ et le TNF- α , après restimulation des lymphocytes T (comme vu préalablement) en présence d'un inhibiteur du transport protéique (Golgi Stop) (Fig. 33A et 33B).

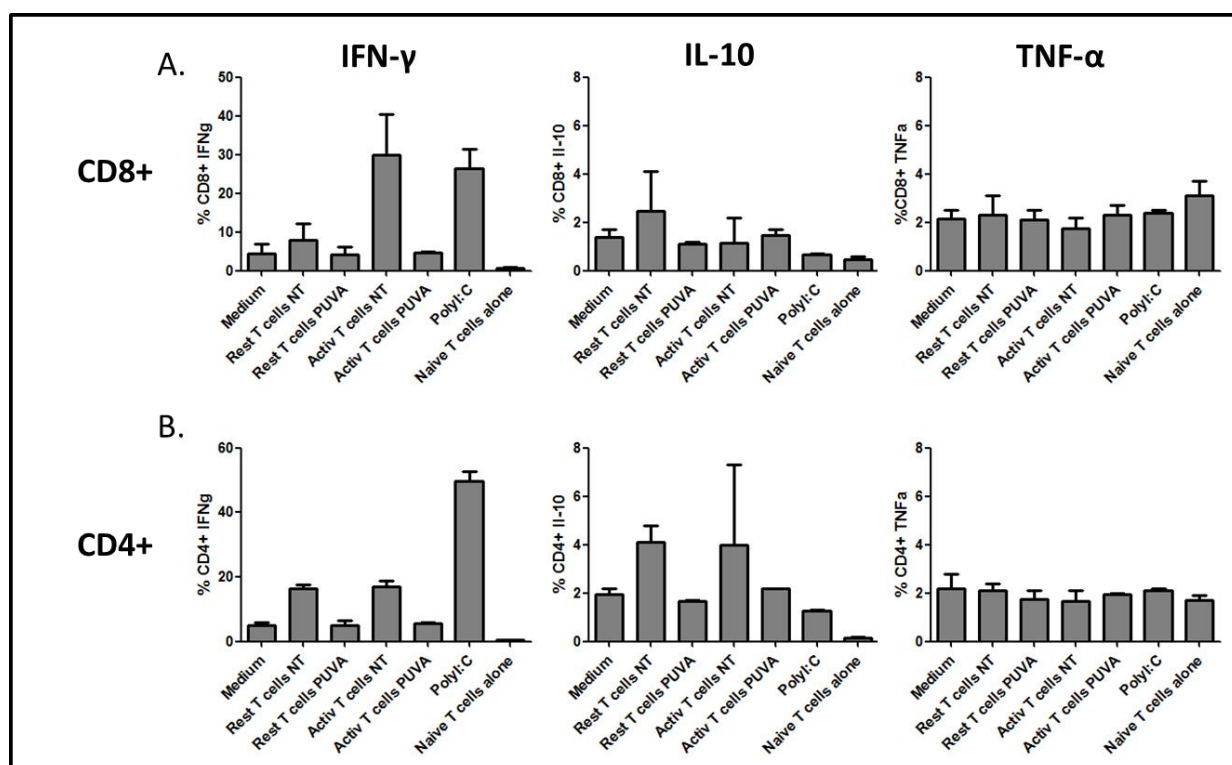


Figure 33 : Etude de polarisation de LTs naïfs au contact de moDCs allogéniques, par marquage intracytoplasmique. Les moDCs issus de 24h de co-culture avec des lymphocytes T au repos, activés, traités ou non PUVA sont mises en contact avec des lymphocytes T naïfs allogéniques. Après 6 jours, les lymphocytes T sont stimulés par PMA/Ionomycine en présence d'un inhibiteur du transport de protéines (Golgi Stop) pendant

5h. Les cellules sont ensuite marquées par des anticorps anti-CD3 et anti-CD8 puis perméabilisées pour marquage avec anti-IL-4, anti-IL-10, anti-TNF- α et anti- IFN- γ . Polyl :C est utilisé comme contrôle positif de maturation des moDCs et « medium » comme contrôle négatif de la réaction allogénique du système. N=2

Les pourcentages de lymphocytes T (CD4+ et CD8+) exprimant du TNF- α ne semblent pas varier en fonction des conditions. En revanche on observe des variations entre les différentes conditions lorsque l'on analyse l'IL-10 et l'IFN- γ . En ce qui concerne l'IL-10, la mise en contact de lymphocytes T naïfs avec des moDCs préalablement incubées avec des lymphocytes T traités PUVA (activés ou repos) ne semblent pas induire d'IL-10. En revanche, lorsque les moDCs sont préalablement incubées avec des lymphocytes T non traités, le pourcentage de cellules CD4+ et de cellules CD8+ exprimant de l'IL-10 augmente. Ces données sont cohérentes avec celles obtenues dans l'expérience précédente (Fig. 32C). Quant à l'expression d'IFN- γ , les pourcentages de lymphocytes T CD8+ qui sécrètent de l'IFN- γ sont plus importants lorsque les lymphocytes T naïfs sont mis en contact avec des moDCs issues de co-culture avec des lymphocytes T au repos ou alloréactifs non traités que lorsqu'ils sont au contact de moDCs préalablement incubées avec les lymphocytes T traités PUVA, qu'ils soient au repos ou activés (Fig. 33A). La même tendance est observée dans une moindre mesure pour les lymphocytes T CD4+ (Fig. 33B). Les données concernant l'IFN- γ coïncident également avec les données obtenues dans l'expérience précédente (Fig. 32C). Ces données restent cependant préliminaires et doivent être confirmées en augmentant le nombre d'expériences.

Au contact des lymphocytes T traités PUVA, les moDCs semblent induire une plus faible prolifération des lymphocytes T naïfs que lorsqu'ils sont au contact de moDCs préalablement incubées en présence de lymphocytes T non traités. Les lymphocytes T naïfs ne présentent pas de polarisation différente après contact avec des moDC issues de co-culture avec des lymphocytes T traités PUVA à celle observée lorsqu'ils sont au contact de moDCs « immatures ».

C. Conclusions

Le traitement PUVA induit l'apoptose des lymphocytes T, préférentiellement lorsqu'ils sont alloréactifs activés. Le traitement PUVA induit également l'externalisation de la Calréticuline, des protéines Hsp70 et -90 ainsi que le relargage de HMGB1 par les lymphocytes T traités PUVA, surtout s'ils sont activés. Les moDCs et les macrophages phagocytent préférentiellement les lymphocytes T alloréactifs activés traités PUVA. Cependant ces lymphocytes T n'entraînent pas de maturation des APCs. La seule condition où l'on observe une maturation des APCs est lorsqu'elles sont au contact de lymphocytes T alloréactifs activés non traités.

Nous n'avons pas pu observer de polarisation nette de la réponse T vers un profil Th1, Th2 ou Treg, lorsque les lymphocytes T naïfs sont au contact de moDCs issues de co-culture avec des lymphocytes T activés traités PUVA et ce profil est similaire à celui observé lors de la co-culture des lymphocytes T naïfs avec des moDCs immatures.

D. Discussion et perspectives

La PCE est utilisée en première ligne de traitement pour les formes avancées du CTCL, le syndrome de Sézary, aujourd'hui elle est utilisée dans de nombreuses pathologies, médiées par les lymphocytes T telles que la GvHD, certains rejets de greffe ou encore certaines pathologies auto-immunes. Bien que la PCE soit utilisée en routine, ses mécanismes d'action restent peu connus. Il a été démontré que le traitement PUVA entraînait l'apoptose des cellules pathogènes. Nous proposons que les conditions dans lesquelles ces cellules meurent seraient le facteur déclenchant d'une réponse spécifique de type toléroène ou immunogène à l'encontre des lymphocytes T « pathogènes ».

L'apoptose a longtemps été considérée comme un processus silencieux et toléroène, en revanche, depuis quelques années (2007), il a été montré qu'elle pouvait également enclencher une réponse de type immunogène. Les cellules apoptotiques décrites dans ce processus « immunogène » produisent différentes molécules dites de danger, les DAMPs : la calréticuline à la surface cellulaire, la protéine HMGB1 extracellulaire ainsi que l'ATP extracellulaire sont décrits comme ayant des rôles clés dans le déclenchement de ce processus. C'est pourquoi, dans cette première partie, nous avons essayé de caractériser *in vitro*, le type d'apoptose engendrée par la PCE, en étudiant notamment l'émission de DAMPs par les cellules traitées PUVA.

Nous avons choisi de développer *in vitro* un modèle de cellules alloréactives activées obtenues par culture mixte lymphocytaire (MLR) de PBMCs d'un donneur sain avec les PBMCs irradiés d'un donneur allogénique. L'obtention de cellules alloréactives activées, par culture mixte lymphocytaire permet de modéliser les réponses allogéniques des lymphocytes T immunocompétents du donneur vis-à-vis des antigènes majeurs d'histocompatibilité du receveur (HLA), dans un contexte de GvHD. Ce type de test était auparavant utilisé en routine avant chaque allogreffe de moelle osseuse pour évaluer les risques de GvHD encourus par le receveur, mais n'est plus réalisé aujourd'hui depuis les avancées techniques réalisées sur les typages HLA.

In vitro, nous avons donc étudié à partir d'un modèle de PBMCs alloréactifs activés, l'émission de signaux « immunogènes » (DAMPs : Calréticuline, Hsp, HMGB1, ATP et IL-1 β (221, 235) après traitement PUVA. Nous avons montré que les lymphocytes T traités PUVA exprimaient la Calréticuline (CRT) à leur surface, les protéines Hsp et qu'ils relarguaient la protéine HMGB1 dans le milieu extracellulaire ; l'expression de CRT et de protéines Hsp ainsi que le relargage de HMGB1 étaient d'autant plus importants que les cellules étaient activées. D'après les résultats de la littérature et dans nos conditions, les cellules traitées PUVA émettent donc une partie des signaux de type « immunogène » (DAMPs). Cependant, dans les conditions expérimentales choisies, nous n'avons pas observé de sécrétion d'ATP.

L'ATP est dans ce contexte de mort « immunogène », décrite comme DAMPs ; en revanche le produit de sa dégradation, l'ADP est connue pour être un signal toléroène (235). L'ATP extracellulaire peut être dégradée en ADP puis AMP et adénosine par les ecto-nucléases (CD39 et CD73) présentes notamment sur les lymphocytes T régulateurs. C'est pour cette raison, qu'avec la collaboration d'une équipe à Lyon, nous avons mesuré par HPLC les quantités d'AMP, ADP et d'ADP sécrétées dans le milieu extracellulaire par les PBMCs traités PUVA, mais n'avons pu montrer à ce jour de sécrétion.

L'ATP extracellulaire à travers sa liaison avec le récepteur P2RX7 entraîne l'activation de l'inflammasome NLRP3, lui-même responsable de la conversion de la cytokine pro-IL-1 β en IL-1 β . L'IL-1 β favorise l'activation des lymphocytes T CD8 $^{+}$ et oriente donc vers une réponse cytotoxique. Dans notre modèle nous n'avons observé ni la sécrétion d'ATP, ni celle d'IL-1 β dans le surnageant de culture de PBMCs après traitement PUVA. Dans un autre modèle développé par Yakut et al., le traitement PUVA de PBMCs entraîne la sécrétion d'IL-1 β par les monocytes (236). Dans ce modèle, cette sécrétion d'IL-1 β est indépendante de l'ATP, contrairement à celle observée dans un processus de mort « immunogène ». Il est intéressant de souligner que dans cette étude comme dans la nôtre, le traitement PUVA n'entraîne pas de sécrétion d'ATP.

Les lymphocytes T alloréactifs activés expriment la Calréticuline à leur surface ; la CRT étant reconnue comme un signal « eat-me », nous avons décidé d'étudier si les APCs étaient capables de phagocyter des lymphocytes T traités PUVA. Dans notre étude, nous avons montré que les moDCs et les macrophages avaient la capacité de phagocyter les lymphocytes T traités PUVA et qu'ils phagocytèrent préférentiellement les lymphocytes T activés traités PUVA ; observations qui sont en corrélation avec les résultats obtenus d'expression de Calréticuline, ce qui nous permet de penser que cette phagocytose pourrait être dépendante de la présence de Calréticuline.

Dans le contexte de la mort « immunogène », l'expression de l'ecto-CRT est définie comme un facteur précoce ; l'externalisation précoce de la CRT par rapport à la phosphatidylsérine (PS) pourrait initier le processus de mort immunogène (225, 233, 235). Dans tous les modèles de mort « immunogène » décrits dans la littérature, bien que la précocité de la CRT soit annoncée, aucun ne montre réellement cette précocité. Obeid et al, en 2007, montrent que la CRT est externalisée à partir de 15 min sur des cellules ayant gardé leur intégrité membranaire (7AAD- ou IP-) ; en revanche aucun marquage sur les cellules Annexine V négatives (avant l'apparition de la phosphatidylsérine = PS) n'est réalisé (225). La mesure de la CRT est exprimée dans cette étude, en moyenne de fluorescence (MFI), on constate que les valeurs obtenues sont basses (MFI maximum égale à 15) ; de plus, l'expression de CRT, dans leur modèle ne semble pas augmenter entre 15 min et 24h, ce qui est étonnant puisque cela voudrait dire qu'à partir de 15 min, la totalité de la CRT serait externalisée.

Notre étude montre donc pour la première fois, l'expression de calréticuline suite à un signal inducteur d'apoptose sur des cellules humaines primaires. Il semble cependant que la cinétique d'expression de calréticuline observée dans notre modèle de cellules humaines soit différente de celle observée avec des lignées murines. En effet, nous observons son apparition de manière presque simultanée à celle de la phosphatidylsérine et je pense l'on peut mettre en doute l'apparition précoce de la CRT par rapport à la PS.

L'expression de la CRT serait induite lors d'un stress du RE, mettant en jeu la phosphorylation de la protéine eIF2 α . Obeid et al. montrent en effet une augmentation de la protéine pospho-eIF2 α , après 4h de traitement aux anthracyclines, ce qui est un peu tardif pour expliquer l'externalisation de la CRT observée dès 15 minutes. Nous avons logiquement recherché à mettre en évidence la phosphorylation de la protéine eIF2 α dans les cellules traitées PUVA, et nous avons pu observer une légère augmentation de cette phosphorylation, cependant la qualité des anticorps utilisés a rendu délicate l'interprétation de ces données.

L'expression de la CRT et de PS (2 signaux « eat-me ») étant retrouvée sur les cellules traitées PUVA, nous avons donc étudié leur phagocytose par différentes cellules présentatrices d'antigènes. Les monocytes semblent plutôt endocyter des corps apoptotiques issus des cellules traitées alors que les moDCs et les macrophages phagocytent réellement les cellules apoptotiques sous forme entière. Il est cependant peu probable que les monocytes circulants soient impliqués dans la prise en charge de ces cellules apoptotiques. En effet, le flux sanguin est un lieu peu propice aux interactions cellulaires. En revanche, il est connu que les cellules réinjectées par voie intraveineuse sont retrouvées principalement dans la rate et le foie où elles pourront être en contact avec les cellules dendritiques et les macrophages tissulaires. Il est donc vraisemblable que ces APCs phagocytent les cellules apoptotiques traitées PUVA.

Il serait intéressant d'analyser l'implication et la contribution de la CRT et de la PS, dans la prise en charge des cellules traitées PUVA (apoptotiques) par les différentes APC et notamment dans la phagocytose. Il serait possible de réaliser des expériences d'inhibition à l'aide d'anticorps dirigés contre ces molécules dans le même type d'expériences que celles que nous avons mises en place (étude de la phagocytose). Garg et al. montrent dans une étude de phagocytose de cellules traitées par PDT par les moDCs, que l'inhibition de la CRT ne diminue la phagocytose que partiellement (233). Il est donc probable que la phosphatidylsérine et la CRT soient conjointement impliquées, et qu'il sera difficile de démontrer formellement le rôle de l'une ou de l'autre.

Dans ce contexte de mort « immunogène », l'émission de DAMPs par les cellules apoptotiques provoque la maturation des DCs, c'est pourquoi nous avons également étudié la maturation des moDCs et des macrophages au contact de lymphocytes T traités PUVA. La mise en contact de lymphocytes T traités PUVA avec des APCs autologues, n'entraîne pas d'augmentation de l'expression des molécules de costimulation par les APCs, ni de différence quant à leur profil cytokinique, en comparaison avec les APCs seules dans le milieu (immatures). Autrement dit, les lymphocytes T traités PUVA, malgré leur émission partielle de DAMPs n'entraînent pas, dans notre modèle, de maturation des APCs. Ce résultat est quelque peu surprenant puisque la présence de HMGB1 a été associée à la maturation des DCs (222, 235). Il semble que dans notre modèle, HMGB1 ne soit pas capable d'induire la maturation des APCs.

Il faut souligner que nous avons mesuré par ELISA, la quantité de HMGB1 totale relarguée dans le surnageant de culture. Il a été montré que l'action de la protéine HMGB1 dépendait des formes d'oxydoréductions qu'elle pouvait adopter. En effet la protéine HMGB1 dans un état complètement réduit joue le rôle d'une chimiokine, lorsqu'elle forme un pont disulfide, elle joue le rôle de cytokine pro-inflammatoire et est inactive lorsqu'elle est complètement oxydée (223). La forme totalement réduite est la forme sous-laquelle la protéine HMGB1 est considérée comme DAMPs. Il serait donc intéressant de déterminer dans notre modèle quel est l'état d'oxydoréduction de la protéine de HMGB1 lorsqu'elle est relarguée par les cellules, après traitement PUVA. Si la protéine HMGB1 relarguée après traitement PUVA est dans un état complètement oxydé, cela pourrait expliquer pourquoi sa présence dans notre modèle n'engendre pas la maturation des APCs. Dans certains cas d'échappement immunologique de cancer, la protéine HMGB1 peut s'unir aux récepteurs TIM-3 et engendrer un effet immunosuppresseur plutôt qu'immunostimulateur [Chiba. Nat Immunol. 2012 trouvé dans O. Kepp. Oncoimmunology. 2014]. L'effet de la protéine HMGB1 va donc dépendre du contexte dans lequel elle se trouve et donc induire ou non la maturation des APCs.

Une autre explication de l'absence de maturation des APCs, pourrait être le temps d'incubation des lymphocytes T après le traitement PUVA. En effet, dans notre modèle, nous avons mis en contact les lymphocytes alloréactifs activés traités PUVA avec des moDCs autologues, 24h après leur traitement. Il est important ici de prendre en compte qu'à 24h, les lymphocytes T traités sont majoritairement en apoptose et pourraient avoir perdu leurs propriétés activatrices (molécules de costimulation), même si elles ont « gagné » des signaux « immunogènes ». Comme nous l'avons montré précédemment, les lymphocytes T alloréactifs activés non traités sont capables de faire maturer les APCs. Une étude réalisée par Gurung et al., en 2009, montre que la mise en contact de lymphocytes T activés apoptotiques avec des cellules dendritiques autologues provoque la maturation de ces DCs [Gurung. 2009]. Dans des expériences préliminaires, au sein de notre laboratoire, il a été montré que si des lymphocytes T activés (OKT3 : anticorps anti-CD3) traités PUVA sont instantanément mis en co-culture avec des moDCs autologues, ils font maturer ces APCs. Des expériences similaires avec des lymphocytes T alloréactifs activés obtenus par MLR pourraient être réalisées, afin d'analyser leur capacité à induire la maturation des APCs. Si une maturation est effectivement observée dans ce contexte, elle sera probablement due à l'expression de molécules de costimulation, plutôt qu'aux DAMPs.

Nous n'avons pas observé de différence dans la sécrétion de cytokines des moDCs au contact de lymphocytes T traités PUVA.

En lien avec cette absence de maturation, nous n'avons pas non plus observé de polarisation nette de la réponse T vers un profil Th1, Th2 ou Treg, lorsque les moDCs préalablement mises au contact de lymphocytes T alloréactifs activés traités PUVA sont mises en co-culture avec des lymphocytes T CD4+ naïfs répondeurs allogéniques. Le profil cytokinique obtenu de cette co-culture est similaire à celui obtenu lors de la co-culture des lymphocytes T naïfs avec des moDCs immatures. Il serait intéressant de continuer à étudier la capacité des moDCs (préalablement mises en présence de lymphocytes T traités PUVA) à polariser les lymphocytes T naïfs par l'étude des cytokines intracytoplasmiques exprimées dans les lymphocytes T, puisque cela permettrait d'avoir une évaluation plus précise des sous-populations lymphocytaires engendrées (lymphocytes T régulateurs, Th1, Th17, etc...).

Afin d'avoir une indication de l'immunogénicité des cellules apoptotiques traitées PUVA, il serait fondamental de développer *in vivo* un modèle similaire à celui utilisé par l'équipe de L. Zitvogel ; dans lequel les cellules tumorales traitées PUVA sont injectées en sous-cutané dans le flanc d'une souris. Quelques jours plus tard, les souris sont injectées sur l'autre flanc avec des cellules tumorales vivantes, identiques à celle traitées par PUVA. Deux expériences similaires ont été réalisées chez la souris, il y a une vingtaine d'années, par Perez et Cheng [Perez. Basic mechanisms of physiologic... 1994 et Cheng TY. Photochem photobiol. 1996]. Dans ces modèles, la vaccination de souris avec des cellules tumorales traitées PUVA pendant 4 semaines avant l'injection de cellules tumorales entraîne la protection de ces souris contre le développement de tumeur (20% des souris ne développent pas de tumeur dans la première étude et 66% dans la deuxième). La PCE pourrait donc être considérée comme capable, dans des contextes tumoraux, d'engendrer une vaccination anti-tumorale et donc être à l'origine d'une réponse « immunogène ».

Nous avons soumis auprès de l'animalerie un projet pour tester cette immunogénicité, dans lequel des souris C57BL/6 devaient recevoir une injection sous-cutanée de cellules de mélanome (B16-OVA) ou de sarcome (MCA-205-OVA) préalablement traitées PUVA dans un de leur flanc et une semaine plus tard (temps que l'immunité se mette en place) une autre injection dans l'autre flanc avec des cellules B16 ou MCA-205 (Fig. 34). Néanmoins, la réalisation de cette étude n'a pu être mise en place dans les délais impartis pour ce travail de thèse.

Dans le modèle que nous proposons, il s'agirait d'approfondir la caractérisation de la réponse, grâce à l'expression de l'antigène OVA par les cellules tumorales. De cette façon nous pourrions suivre la réponse spécifique liée à OVA, à l'aide de dextramers spécifique de OVA. Nous pourrions alors caractériser la réponse et identifier le type de lymphocytes T impliqués (lymphocytes T CD4+, lymphocytes T CD8+, lymphocytes T régulateurs, etc...).

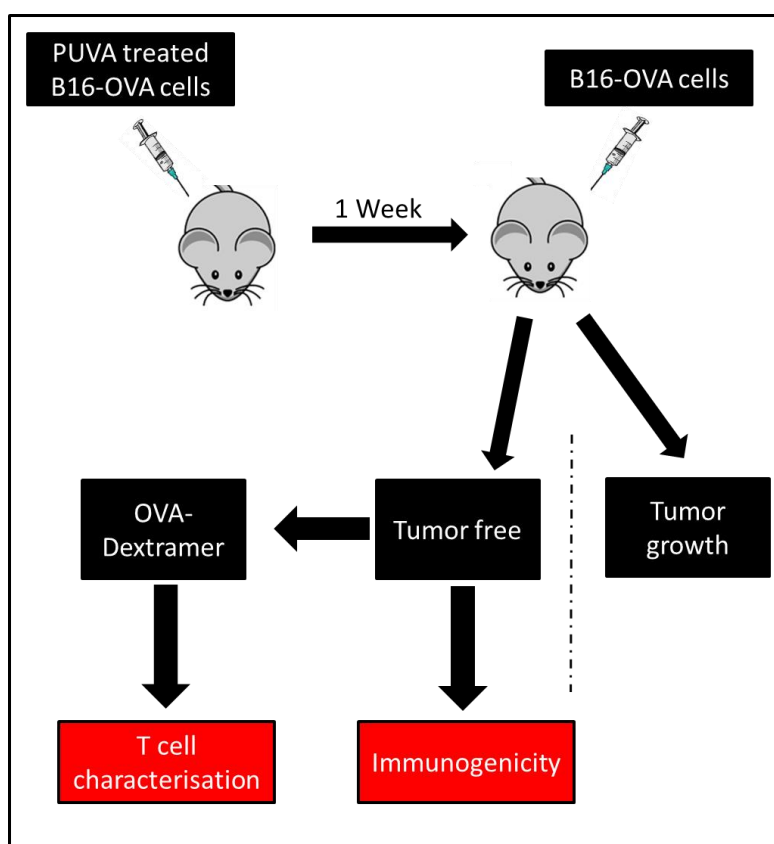


Figure 34 : Schéma du protocole expérimental d'étude de l'immunogénicité induite par le traitement PCE.

Les différents DAMPs décrits par le groupe de Laurence Zitvogel, dans le modèle de mort immunogène (CRT, HMGB1, ATP, Hsp et IL-1 β), ont été démontrés comme « immunogènes » dans un contexte murin de chimiothérapie. Ce même groupe a montré quelques pistes chez l'homme, la démonstration en est faite de manière indirecte. En effet, dans une de leur étude, les patients atteints de cancer, traités par chimiothérapie aux anthracyclines, porteur d'une mutation au niveau du TLR-4, montrent une réponse moins importante que celle obtenue après traitement chez des patients ne portant pas cette mutation (222) ; les auteurs concluent à partir de cette observation sur l'importance du relargage de la protéine HMGB1 dans l'effet anti-tumoral du traitement de par sa liaison avec le TLR-4. Néanmoins, une mutation du TLR4 (récepteur immunitaire), même si elle n'a jamais été montrée comme associée au développement de pathologies, pourrait à elle seule engendrer des anomalies

dans le développement global d'une réponse immune, dans ce cas évoqué. Il est important de rappeler que le récepteur principal d'HMGB1 est le récepteur RAGE et non le TLR4. Le TLR-4 reconnaît aussi d'autres DAMPs tel que le Sérum amyloïde A (308).

D'autres groupes ont travaillé sur ce sujet, notamment Garg et al., dans un modèle de thérapie photodynamique où les cellules utilisées sont soit issues de la souris, soit d'une lignée tumorale humaine. La majorité des données obtenues concernant la mort immunogène ont été récoltées chez la souris, on peut donc se poser la question de la transposition de ces DAMPs dans le développement d'une réponse immunogène chez l'Homme. Cette réponse pourrait chez l'Homme, être induite par d'autres DAMPs et passer par des mécanismes différents que ceux observés chez la souris. Peu de travaux faits chez l'Homme ont été publiés ; les travaux de Gameiro en 2013 (226) montrent l'émission de DAMPs par des cellules issues de lignées cellulaires tumorales humaines après traitement aux anthracyclines. Dans cette étude, les dosages de CRT, HMGB1 et ATP sont réalisés à 72h après le traitement à partir de cellules qui se trouveraient en apoptose tardive. En revanche, les caractéristiques décrites dans le contexte de mort immunogène, chez la souris, sont retrouvées sur les cellules en apoptose précoce, notamment la CRT (15min après le traitement). Il a également été montré que la sécrétion d'ATP débutait 16h après traitement (224) et le relargage de HMGB1, après 24h (222). Nos résultats ainsi que ceux obtenus par Gameiro et al. nous suggèrent que chez l'Homme, la cinétique d'émission des DAMPs pourrait être différente à celle observée chez la souris. Il est aussi possible que les DAMPs décrites chez la souris ne soient pas les mêmes que celles produites chez l'Homme.

Nous nous sommes dès le début de ma thèse peut-être trop focalisés sur la démonstration d'une mort « immunogène » induite par le traitement PUVA, sans prendre en compte tout de suite l'ensemble des facteurs qui auraient pu nous permettre de prendre en compte un phénomène tolérogène. Nous avons tout de même étudié la sécrétion de cytokines lors de la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs au contact des moDCs, notamment celle d'IL-10 et de TGF- β , mais n'avons pas pu mettre en évidence ces sécrétions et donc l'implication des lymphocytes T régulateurs.

Dans nos conditions, *in vitro*, l'étude des mécanismes d'action de la PCE reste cependant très réductrice délicate *in vitro*. Lors de l'élaboration d'une réponse immune, beaucoup de facteurs rentrent en ligne de compte, le microenvironnement dans lequel va avoir lieu cette réponse est très important puisqu'il va favoriser le développement d'un type de réponse ou d'un autre (anti-inflammatoire, pro-inflammatoire, ...). Le type de réponse engendrée par la prise en charge de cellules apoptotiques varie en fonction du lieu de prise en charge, du type de phagocyte, du microenvironnement présent, du type d'induction de l'apoptose, etc... Il est difficile de mimer *in vitro* l'ensemble des facteurs qui vont être présents dans ce microenvironnement et donc dans l'induction d'une réponse. Aujourd'hui, le modèle *in vitro* que nous avons choisi ne nous permet pas de conclure quant au type de réponse engendrée par le traitement PUVA. Afin de pallier aux limites imposées par le modèle *in vitro*, nous avons développé, en parallèle et en collaboration avec l'équipe de Sylvain Perruche, un modèle d'étude *in vivo*, de polyarthrite rhumatoïde murine (CIA).

Chapitre II: Etudes des mécanismes d'action du traitement PCE in vivo: Modèle de polyrathrite rhumatoïde murine

Objectifs

Dans cette deuxième partie, nous avons étudié les mécanismes d'action de la PCE sur un modèle *in vivo* de polyarthrite rhumatoïde. Le modèle de polyarthrite rhumatoïde murin (CIA) a été choisi car la pathologie est causée par la présence de lymphocytes T « pathogènes », et comme nous l'avons vu, la PCE est efficace contre certaines pathologies médiées par des lymphocytes T « pathogènes », notamment contre la polyarthrite rhumatoïde. Le faible volume sanguin d'une souris ne nous permet pas de réaliser le traitement par aphérèse, il sera réalisé à partir de cellules spléniques de souris « donneuses » qui seront réinjectées par voie intraveineuse aux souris d'intérêts.

Cette étude *in vivo* a pour but :

- de palier les limites rencontrées *in vitro* dans l'étude des mécanismes d'action de la PCE.
- d'étudier l'effet du traitement sur la polyarthrite rhumatoïde murine,
- d'étudier la nature des cellules réinjectées impliquées dans l'effet thérapeutique de la PCE sur la CIA

A. Matériels et méthodes

Animaux et induction de l'arthrite

Le protocole utilisé a été validé par le comité d'éthique de la plateforme de haute technologie animale (PHTA) de Grenoble, les souris sont hébergées par 6 dans des cages pendant toute la durée de l'expérience.

Les souris sont des mâles de la souche DBA/1 (JANVIER) reçues à l'animalerie, âgées de 5 à 6 semaines. Ces souris (âgées de 6 à 8 semaines) sont immunisées par une injection, en sous-cutané, à la base de la queue d'une émulsion de collagène bovin de type II (200µg ; MD bioscience) et d'adjuvant complet de Freund (200µg de Mycobacterium Tuberculosis, sigma + adjuvant de Freund incomplet, sigma), une semaine après leur arrivée (100µl de collagène (4mg/ml d'acide acétique) + Adjuvant (50µl de chaque côté de la queue). Les symptômes de l'arthrite commencent à se développer à partir du 21^{ème} jour post-immunisation.

Certaines expérimentations ont été réalisées dans l'animalerie de l'UMR1098 de Besançon, dans l'équipe de Sylvain Perruche.

« Scoring » de l'arthrite

Les symptômes de l'arthrite se mesurent au niveau des pattes des souris et un score est établi, pouvant aller de 0 à 16 par souris (score maximum par patte : 4) :

- 0 = normal
- 1 = érythème ou inflammation sur un ou plusieurs doigts
- 2 = érythème et inflammation modérée de la cheville au tarse
- 3 = érythème et inflammation sévère de la cheville au métatarse
- 4 = érythème complet et inflammation sévère de la cheville, du pied et des doigts induisant une déformation et/ou une ankylose.

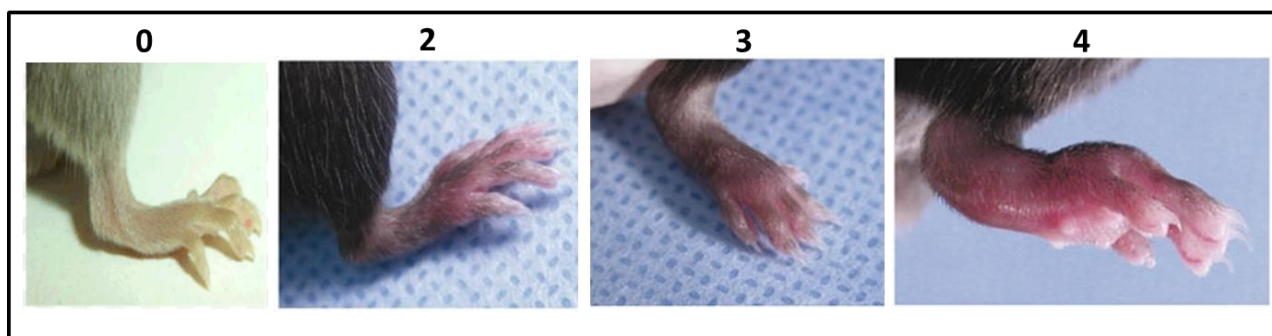


Figure 35 : Evaluation du score arthritique chez des souris atteintes de Collagen Induced Arthritis (CIA). Réalisé à partir du protocole publié par Brand et al. (182).

Préparation des splénocytes et réinjection IV

Les rates des souris donneuses sont prélevées et dilacérées à l'aide d'un scalpel. Les globules rouges sont lysés pendant 1 minute (RBC, eBiosciences). Les cellules sont ensuite resuspendues à une concentration de 1.10^6 cellules/ml, pour le traitement PUVA qui consiste à ajouter 200ng /ml final de 8-MOP (sigma), à incuber les cellules pendant 15 minutes à 37°C et à irradier les cellules aux UV-A ($2J/cm^2$) (Biosun, V. Lourmat). La quantité de 8-MOP utilisée et l'irradiation reçue par les cellules sont les mêmes que chez l'homme.

Dans les expériences concernant la réinjection de lymphocytes T traités PUVA, les lymphocytes T issus de rate de souris arthritiques ont été préalablement purifiés grâce à un kit de sélection négative immunomagnétique (Easy Sep, Stem cell) et traités PUVA comme expliqué antérieurement.

Les cellules sont ensuite lavées en PBS puis réinjectées (10.10^6 cellules pour la réinjection de splénocytes et 2.10^6 cellules pour celle de lymphocytes T, dans 200µl de PBS) par voie intraveineuse, dans la veine caudale des souris traitées. Au total, 3 ou 4 traitements sont réalisés (1 traitement tous les 2 jours). Les fréquences d'injection ont été définies en fonction du rythme de traitement chez l'homme (approximativement tous les 2 jours). Le nombre de cellules réinjectées aux souris a aussi été déterminé proportionnellement à celui des cellules réinjectées chez l'homme lors d'un traitement PCE ; lors d'un traitement PCE, environ 7.10^9 leucocytes sont prélevés par aphérèse, traités PCE et réinjectés (136), c'est pourquoi chez la souris nous avons décidé de traiter 10^6 splénocytes. Les souris non traitées (NT) ne reçoivent aucune injection. Les lymphocytes T sont enrichis par sélection négative (EasySep, Stem Cell).

Immunomonitoring post-traitement

Les rates et ganglions inguinaux et axillaires sont prélevés après euthanasie des souris par dislocation cervicale (3 à 4 jours après le dernier traitement). Après lyse des globules rouges (RBC, eBiosciences), les cellules sont marquées extracellulairement avec des anticorps anti-CD3-PE, -CD4-BV421, -CD8-V500 (Ebiosciences) puis après fixation et perméabilisation (kit BD cytofix/cytosperm plus), intracellulairement avec des anticorps anti- IFN γ -FITC (Biolegend) et anti-IL-17-APC (Ebiosciences). D'autres populations de cellules sont analysées à partir de différents marqueurs, CD11b/CD19 et B220 pour les lymphocytes B et monocytes, CD11c/siglecH/mPDCA pour les cellules dendritiques, CD4/CD73/CD39/CD25 et FoxP3 (eBiosciences) (après perméabilisation par le kit eBiosciences) pour les Treg ou encore CD4/CD8/CD3 et NK1.1 pour les lymphocytes T et les cellules « natural Killer ». Les cellules sont passées au FACS Canto II, cytomètre en flux et les analyses sont réalisées avec les logiciels DIVA et FlowJo (BD biosciences).

Un prélèvement retrobulbaire du sang est réalisé pour chaque souris. Le sang prélevé est centrifugé à 800g pendant 20 min afin d'obtenir le sérum de ces souris et pouvoir réaliser un dosage de cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ et TNF- α) sur ce sérum. Les cytokines sécrétées dans le sérum, sont dosées par cytométrie en flux (CBA). Le premier point de gamme de la technique est à 20 pg/ml, cependant les limites de détection théorique de ce kit de CBA sont <1pg/ml pour toutes les cytokines, sauf pour l'IL-6 (1,4 pg/ml) et IL-10 (16,8 pg/ml).

B. Résultats

Afin de valider le modèle de polyarthrite rhumatoïde murine (CIA) pour l'étude des mécanismes d'action de la PCE, les souris arthritiques sont traitées par injection intraveineuse de splénocytes issus de souris arthritiques, traités PUVA, environ 30 jours après leur immunisation. Le score est évalué chaque jour à la même heure, pendant toute la durée de l'expérience.

La quantité de PBMCs et de cellules T pathogènes contenues dans le sang d'une souris étant trop faible, la réalisation du traitement PCE « classique » est impossible. C'est pour cette raison que le traitement PUVA chez les souris est réalisé à partir des splénocytes.

a. Apoptose des splénocytes traités PUVA

Comme nous l'avons montré précédemment, le traitement PUVA induit l'apoptose des cellules et notamment des lymphocytes T. Nous avons donc dans un premier temps étudié l'effet du traitement PUVA sur l'apoptose des splénocytes de souris « saines » et « arthritiques ». Les splénocytes « sains » ou « arthritiques » prélevés sont traités PUVA puis incubés pendant 24h, ils sont ensuite marqués avec des anticorps anti-CD3 et avec de l'AnnV et du 7AAD, à 2h, 5h et 24h après le traitement. L'étude de l'apoptose est réalisée par cytométrie en flux, sur les cellules CD3+ 7AAD- (Fig. 36).

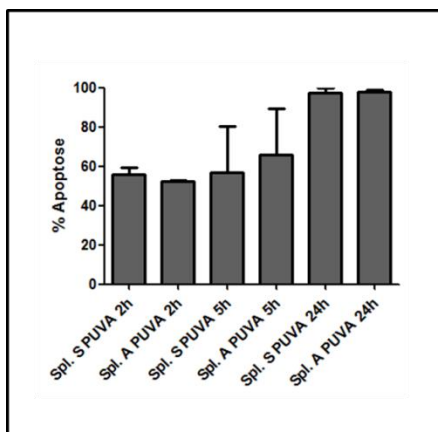


Figure 36 : Etude d'apoptose des lymphocytes murins après traitement PUVA. Les splénocytes prélevés sur des souris saines ou arthritiques « donneuses » sont traités PUVA et incubés à 37°C, 5% CO₂, pendant 24h. Les splénocytes sont marqués par un anticorps anti-CD3 ainsi qu'avec de l'Annexine V et du 7AAD, à 2, 5 et 24h. Les cellules vivantes sont les cellules CD3+/AnnV-/7AAD- et sont étudiées par cytométrie en flux. Ce graphique est représentatif d'une expérience (3 injections).

Les lymphocytes T « arthritiques » traités PUVA montrent un pourcentage d'apoptose de 45% à 2h, 65% à 5h et de 100% à 24h (Fig. 36). Les lymphocytes T murins entrent donc en apoptose après traitement PUVA et se trouvent en voie d'apoptose lorsqu'ils sont injectés (moins d'une heure après le traitement).

b. Etude de l'effet thérapeutique de la PCE et des cellules impliquées

Pour évaluer l'effet thérapeutique de la PCE sur la CIA et déterminer si les cellules traitées doivent provenir de souris porteuses de la maladie pour le bon fonctionnement du traitement (comme l'a montré Budde dans un modèle murin de GvHD [Budde. Plos One. 2014]) nous avons décidé de créer deux groupes d'études différents : un groupe de souris injectées avec des splénocytes issus de souris

saines (« Spl S. PUVA »), traités PUVA et un autre groupe de souris injectées avec des splénocytes issus de souris arthritiques, traités PUVA (« Spl A. PUVA »). Deux autres groupes de souris arthritiques sont utilisés comme contrôle : les souris non traitées (« NT ») et les souris « Spl. A NT » injectées avec des splénocytes issus de souris arthritiques, non traités. La figure n°37 présente un graphique issue d'une expérience représentative de l'ensemble des expériences.

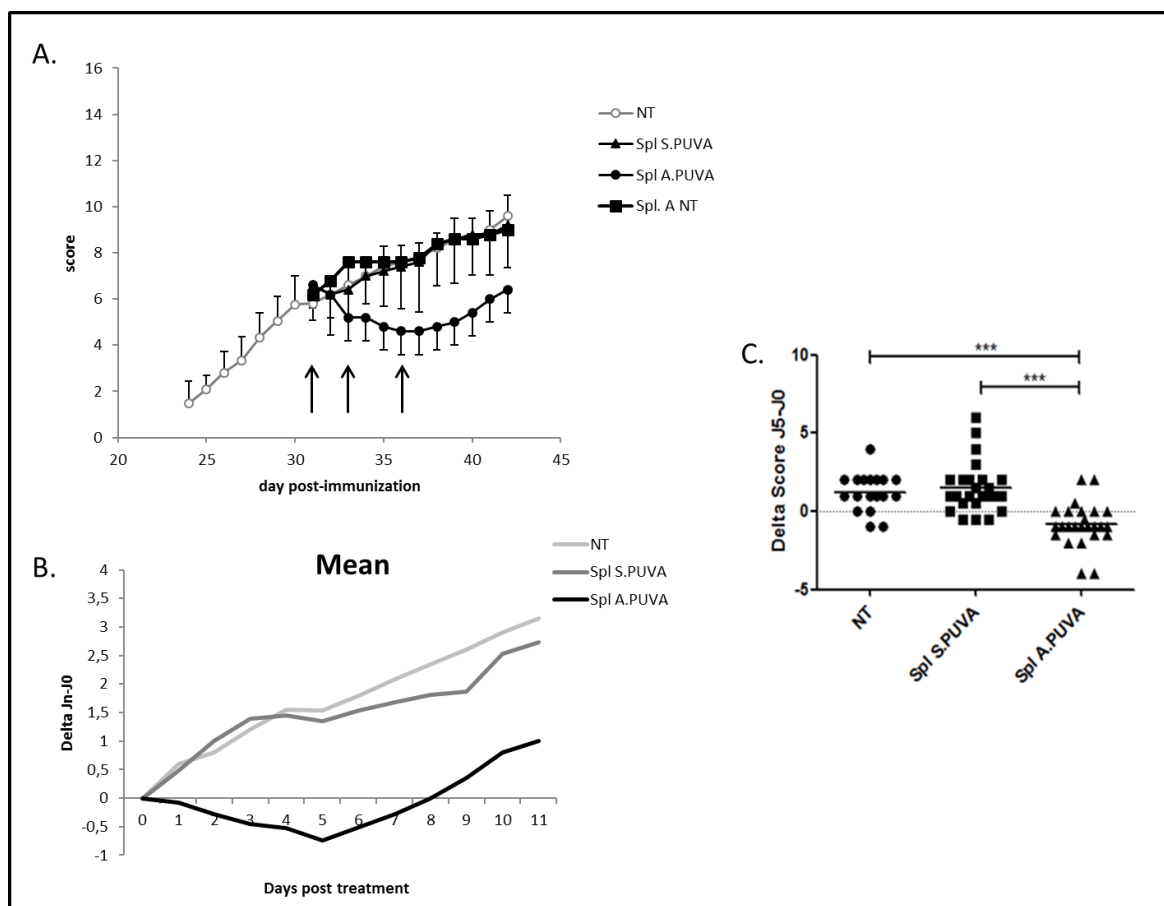


Figure 37: Le traitement PUVA induit une baisse des symptômes arthritiques. Les souris arthritiques sont traitées par injection de splénocytes issus de souris saines, traités PUVA (Spl S. PUVA) ou des splénocytes issus de souris arthritiques, traités PUVA (Spl A. PUVA). Le groupe NT représente le groupe contrôle constitué de souris arthritiques non traitées et le groupe Spl. A NT, le groupe de souris arthritiques injectées avec des splénocytes issus de souris arthritiques, non traités. Les injections ont lieu à J31, J 33 et J36 post immunisation (symbolisées par des flèches). Les courbes représentent la moyenne du score d'arthrite des 5 souris constituant le groupe. Graphique représentant une expérience (A). La différence des scores entre Jn et J0 est calculée pour chacun des individus de chaque groupe : NT, Spl S. PUVA et Spl A. PUVA. Une valeur négative représente une amélioration des symptômes alors qu'une valeur positive représente la progression de la pathologie (B). La différence de score entre J5 et J0 est également représentée (C) et analysée par Test Anova (Kruskal Wallis) ($p < 0.0001$), pour l'ensemble des expériences, $N = 27$ souris par groupe.

L'évaluation des scores au cours du traitement montre une augmentation des symptômes cliniques des souris des groupes « NT », « Spl. A NT » et « Spl S. PUVA ». Le score de l'arthrite des souris lorsqu'elles sont traitées avec des splénocytes arthritiques PUVA (« Spl A. PUVA ») diminue en comparaison de celui observé chez les souris NT ou traitées avec des splénocytes sains (Fig. 37A). Par exemple, 4 jours après le premier traitement le score des souris « Spl. A PUVA » est de 5, alors que les

scores des souris « NT » et « Spl. S PUVA » s'élèvent à 7 (Fig. 37A). Pour suivre les recommandations du comité d'éthique d'expérimentation animale, nous n'avons plus inclus dans les expériences suivantes le groupe « Spl. A NT ».

Pour évaluer la régression ou l'évolution des symptômes dans les différentes expériences, nous avons examiné les différentes données de score, en comptant le score chaque jour (Jn) à celui relevé le jour de la première injection à J0 (Fig. 37B). Une valeur négative représente une amélioration des symptômes alors que la progression de la pathologie se traduit par une valeur positive.

Un jour après la première injection, les souris traitées par des splénocytes issus de souris arthritiques, traités PUVA, montrent une amélioration des symptômes jusqu'au 5^{ème} jour post-injection. A partir du 5^{ème} jour, la pathologie reprend ensuite sa progression pour retrouver son score initial au 8^{ème} jour. Les souris « NT » et « Spl. S PUVA » présentent une progression constante de leur pathologie. La pathologie des souris traitées (« Spl. A. PUVA ») recommence sa progression à partir du 5^{ème} jour, les souris « spl. A PUVA » présentent une progression similaire à celle des souris « NT » et « Spl. S PUVA » jusqu'à la fin du traitement ; le score reste cependant inférieur (Fig. 37B).

Une étude statistique est réalisée sur les différences de score entre Jn et J0, afin d'évaluer la significativité des réponses au traitement entre chaque groupe de souris. La Figure n°36C, illustre la différence de score entre J5 et J0 de chaque groupe et montre qu'il existe une différence significative entre les souris Spl. A. PUVA et les deux autres groupes. La figure 37C représente la différence entre J5 et J0, la même étude a été réalisée chaque jour et montre que les différences entre les souris « Spl. A. PUVA » et les deux autres groupes sont significatives tout au long de l'étude (entre J1 et J9) (Données non montrées).

A la fin du traitement, les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale, le sang, la rate et les ganglions axillaires ainsi que inguinaux sont prélevés. Pour analyser les différents sous-types lymphocytaires (Th1, Th17 et Treg) contenus dans la rate et les ganglions, les splénocytes et les cellules ganglionnaires sont prélevés et restimulés par PMA/Ionomycine en présence d'un inhibiteur de transport protéique, pendant 6h. L'analyse des sous-population de lymphocytes T est réalisée par cytométrie en flux (Fig. 38A).

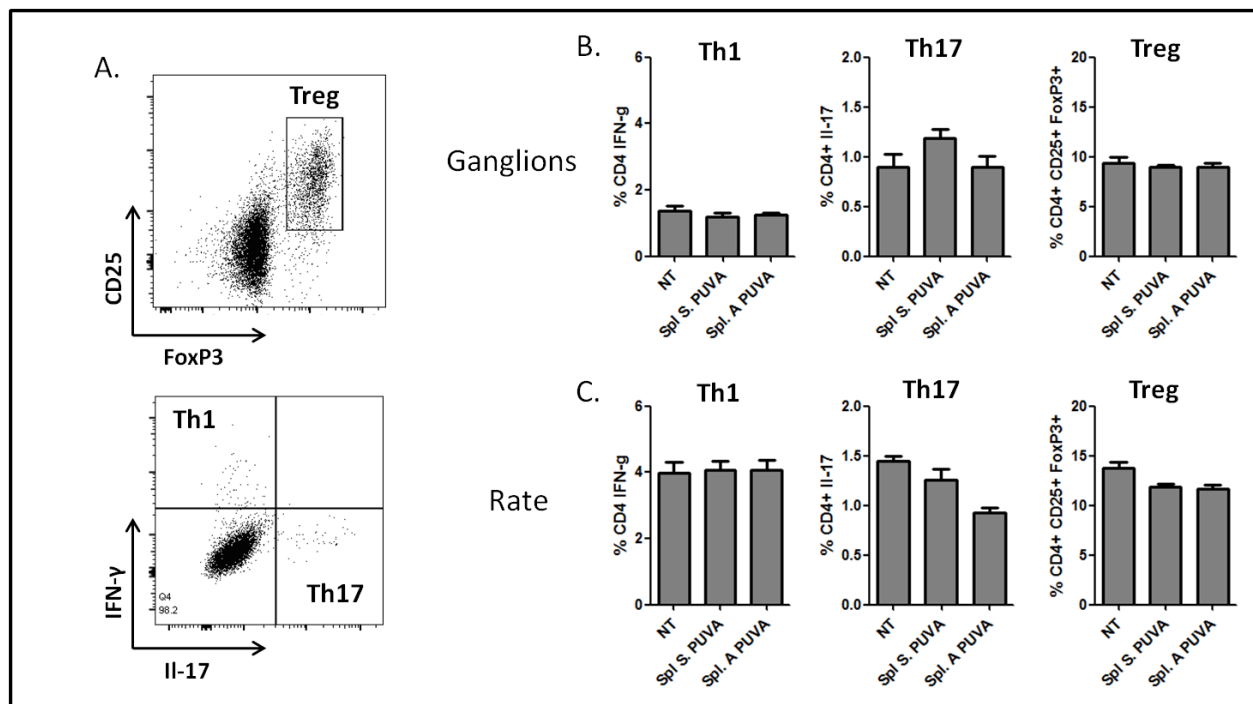


Figure 38 : Etude des sous-populations de lymphocytes T de la rate et des ganglions après réinjection de splénocytes traités PUVA. A la fin de l'expérience les splénocytes et cellules ganglionnaires de chaque souris sont récupérés et restimulés par PMA/Ionomycine en présence de Golgi Stop, pendant 6h. Les cellules sont ensuite marquées extracellulairement par des anticorps anti-CD3, -CD4 et -CD25 ainsi que intracellulairement après fixation et perméabilisation de la membrane avec des anticorps anti-IFN-γ, -IL-17 et -FoxP3. Les cellules CD3+/CD4+/IFN-γ+ sont les lymphocytes T Th1, les CD3+/CD4+/IL-17+ sont les lymphocytes T Th17 et les CD3+/CD4+/CD25^{high} sont les lymphocytes T régulateurs (Treg). Les statistiques sont réalisées par ANOVA (Kruskal-Wallis), N=5 dans chaque groupe.

Au niveau des ganglions, les pourcentages de lymphocytes Th1, Th17 et Treg ne varient pas entre les différents groupes d'étude (souris « NT », « Spl. S PUVA » et « Spl. A PUVA ») (Fig. 38B). Au niveau de la rate, aucune différence quant aux pourcentages de lymphocytes Th1 et Treg n'est observée. En revanche, on observe une diminution du pourcentage de lymphocytes Th17 dans le groupe de souris « Spl. A PUVA » par rapport aux souris « NT » et « Spl. S PUVA » (Fig. 38C). Les différences observées ne sont cependant pas statistiquement significatives.

Nous avons également étudié les proportions des sous-populations des leucocytes de la rate (pDC, cDC, lymphocytes B et lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés), après euthanasie des souris et afin d'analyser l'effet du traitement PCE sur ces différentes sous-populations. Cette étude est réalisée par cytométrie en flux (Fig. 39).

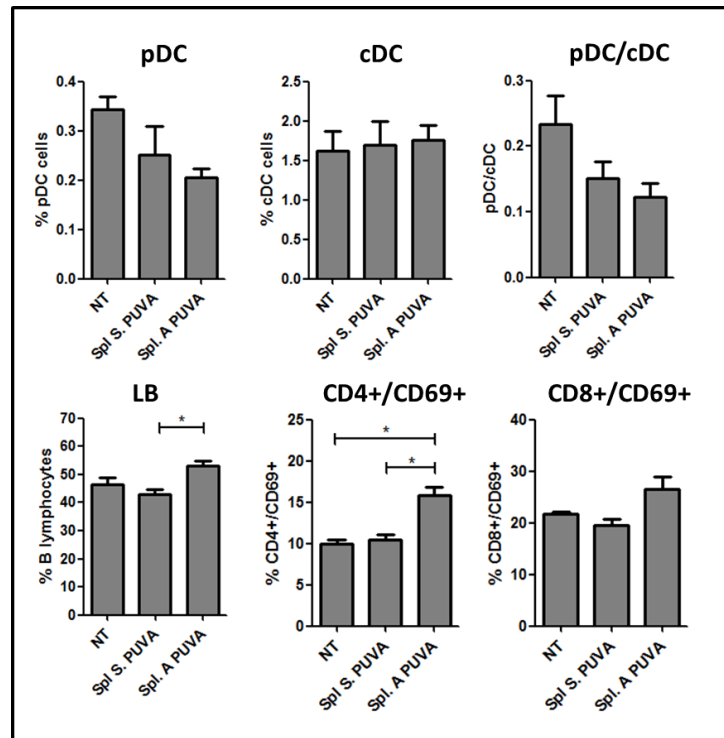


Figure 39 : étude des sous-populations leucocytaires de la rate après traitement. A la fin du traitement les splénocytes sont prélevés et marqués avec des anticorps anti-CD4, -CD8, -CD69, -CD11c, -CD19, -B220, -sigle cH et anti -mPDCA. Les cellules CD19-/CD11c^{intermédiaire}/Sigle cH+/mPDCA+ sont les pDCs, les CD19-/CD11c^{high}B220- sont les mDCs, les CD19+/B220+ les lymphocytes B, les CD4+/CD69+ sont les lymphocytes T CD4+ activés et les CD8+/CD69+ sont les lymphocytes T CD8+ activés. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules et les statistiques sont réalisées par ANOVA (Kruskal-Wallis), N=5.

Les souris « Spl. A PUVA » présentent une diminution du pourcentage de pDCs par rapport aux deux autres groupes ; cette diminution n'est cependant pas significative. Ces souris montrent également une augmentation du pourcentage de lymphocytes B, significative avec le groupe de souris « Spl. S PUVA » mais non significative avec le groupe de souris non traitées. Enfin les souris traitées par réinjection de splénocytes issus de souris arthritiques, traités PUVA montrent une augmentation significative de lymphocytes T CD4+ activés par rapport aux deux autres groupes étudiés (Fig. 39). Il n'existe pas de modification du ratio CD4/CD8 entre les différents groupes (données non montrées).

Afin de compléter l'étude des effets induits par la PCE sur la CIA, une étude des différentes cytokines présentes dans le sérum des souris (IL-4, IL-6, IL-2, IL-10, IFN- γ , TNF- α et IL-17) a été réalisée par cytométrie en flux (Fig. 40).

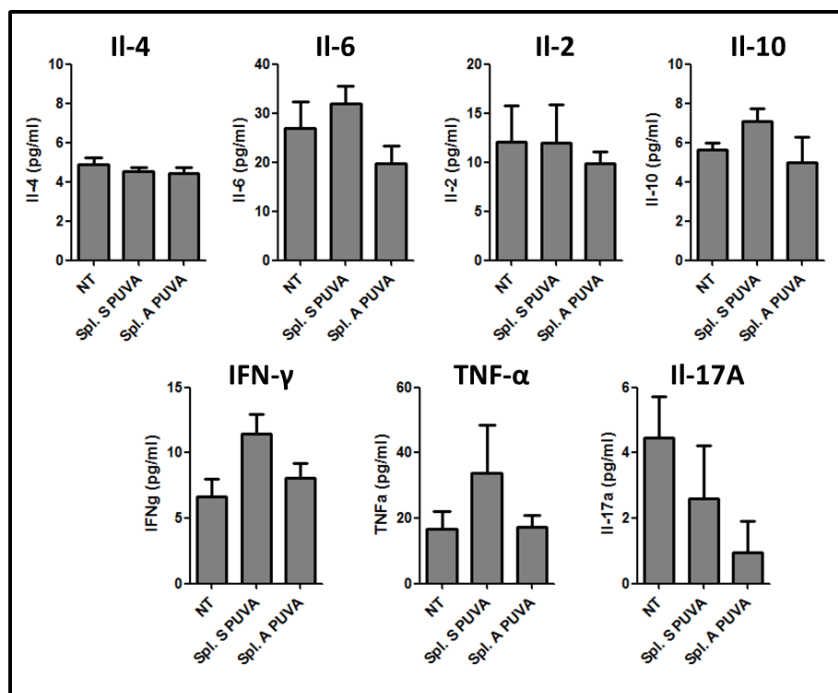


Figure 40 : Etude des cytokines circulantes du sérum. Le sang de chaque souris est prélevé par la veine oculaire. Les différentes cytokines sont quantifiées à partir du sérum de chacune des souris. L'analyse est réalisée par cytométrie en flux (CBA). Les statistiques sont réalisées par ANOVA (Kruskal-Wallis). N=5 dans chaque groupe.

Les dosages d'IL-4, d'IL-10 et de TNF-α ne semblent pas montrer de différence entre les différents groupes d'étude. On observe une diminution d'IFN-γ dans le sérum prélevé chez les souris « Spl. A PUVA » en comparaison des sérums issus des souris du groupe « Spl. S PUVA », la quantité d'IFN-γ reste cependant légèrement supérieure à celle obtenue dans les sérums des souris « NT ». On observe également, une légère diminution de la sécrétion d'IL-6, d'IL-2 et d'IL-17 chez les souris « Spl. A PUVA », en comparaison avec les souris « NT » et « Spl. S PUVA » (Fig. 40). Dans cette étude, les valeurs de cytokines sécrétées sont très basses, mais restent cependant dans les limites de détection de la technique (se référer aux matériels et méthodes).

Le traitement PCE possède un effet thérapeutique dans la CIA et il est nécessaire que les splénocytes proviennent d'une souris malade (arthritique) pour l'obtention de cet effet. La réinjection de splénocytes « pathogènes » traités PUVA semble induire au niveau de la rate, une diminution des lymphocytes T Th17 et des pDCs, une augmentation des lymphocytes T CD8+ activés ainsi qu'une augmentation significative des lymphocytes B, des lymphocytes T CD4+ activés, en comparaison à la réinjection de splénocytes « sains » traités PUVA.

c. Nature des cellules responsables de l'effet thérapeutique de la PCE sur la CIA

Comme nous venons de le voir, le traitement PUVA a un effet thérapeutique sur le développement de l'arthrite, on s'intéresse donc aux cellules responsables de cet effet. Pour cela, les produits cellulaires réinjectés vont être déplétés de différents types de cellules.

L'équipe de French a montré que dans le cadre de la GvHD murine, la présence de lymphocytes T « pathogènes » dans l'échantillon de cellules traitées serait primordiale quant à l'efficacité de la PCE [Réf French, 2002], on s'intéresse donc tout d'abord à la réinjection de cellules T arthritiques traitées PUVA, chez des souris atteintes d'arthrite.

Les lymphocytes T ont été purifiés à partir de splénocytes issus de souris arthritiques. Leur pureté a été vérifiée par cytométrie en flux. Les cellules purifiées sont marquées avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD11b+. Après purification, on retrouve en moyenne un enrichissement de 89.9% de lymphocytes T (Données non montrées).

La CIA est causée par la présence de lymphocytes T « pathogènes », or dans l'expérience précédente nous avons montré que les cellules traitées PUVA devaient provenir d'une souris malade pour que l'effet thérapeutique se produise. Aussi nous voulons dans l'expérience suivante voir si la réinjection de lymphocytes T « pathogènes » traités PUVA suffit à l'obtention de l'effet thérapeutique observé de la PCE sur la CIA. Pour cela, les souris arthritiques sont traitées 4 fois par injection de 2.10^6 lymphocytes T issus de souris arthritiques, traités PUVA. Le nombre de lymphocytes T réinjectés a été défini selon la proportion de lymphocytes T contenus dans une rate (~20%). Le groupe contrôle (NT) atteint de CIA n'est pas traité. Nous avons également réalisé un groupe identique à celui de l'expérience précédente où les souris sont traitées par la réinjection de splénocytes issus de souris arthritiques, traités PUVA. L'évaluation du score est réalisée tout au long du traitement (Fig. 41A et 41B), le graphique 41A est représentatif de deux expériences réalisées.

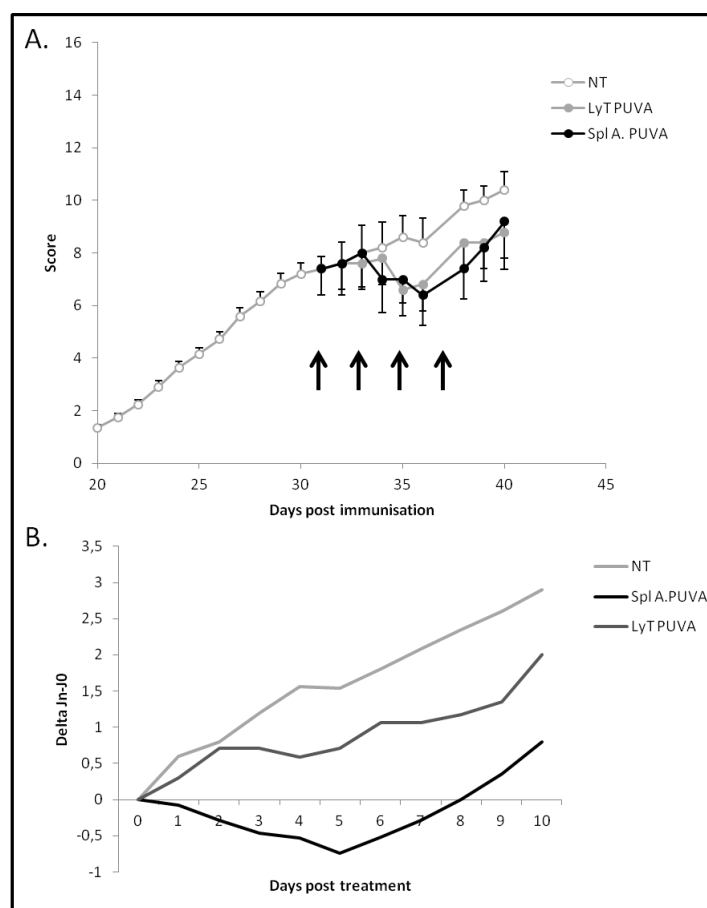


Figure 41 : Etude des cellules impliquées dans l'effet thérapeutique de l'arthrite murine. Les souris sont traitées par injections de différents types cellulaires traités PUVA (NT : Non traités, Spl A. PUVA : splénocytes arthritiques traités PUVA et LyT PUVA : lymphocytes T arthritiques traités PUVA). Les différents groupes sont composés de 5 souris traitées. Graphique représentatif d'une seule expérience (A). La différence des scores entre Jn et J0 est calculée pour chacun des groupes : NT, Spl A. PUVA et LyT PUVA. Une valeur négative représente une amélioration des symptômes alors qu'une valeur positive, représente la progression de la pathologie (B). Ces résultats rassemblent les données de 3 expériences de réinjection de lymphocytes T traités PUVA, N=15 souris LyT A PUVA.

Le score arthritique de souris traitées avec l'ensemble des splénocytes et lymphocytes T arthritiques traités PUVA diminue si on le compare au score obtenu chez les souris non traitées (fig. 41A).

Pour évaluer la régression ou l'évolution des symptômes dans les différentes expériences, nous avons examiné les différentes données de score, en comptant le score chaque jour (Jn) à celui relevé le jour de la première injection à J0 (Fig. 41B). Une valeur négative représente une amélioration des symptômes alors que la progression de la pathologie se traduit par une valeur positive. L'injection de lymphocytes T arthritiques traités PUVA (souris « LyT PUVA ») ne semble pas engendrer la régression des symptômes de l'arthrite, cependant la progression de la pathologie semble être ralentie par rapport à celle des souris non traitées (« NT »).

Afin d'analyser l'effet du traitement PCE sur les sous-population de lymphocytes T de la rate et des ganglions, les cellules sont prélevées après euthanasie des souris, restimulées par PMA/Ionomycine pendant 6h en présence d'un inhibiteur de transport protéique. Les cellules sont ensuite marquées avec des anticorps anti-CD3, anti-CD4, et anti-CD25, fixées, perméabilisées et marquées intracellulairement par des anticorps anti-IFN- γ , anti-IL-17 et anti-FoxP3 (Fig. 42A et 42B).

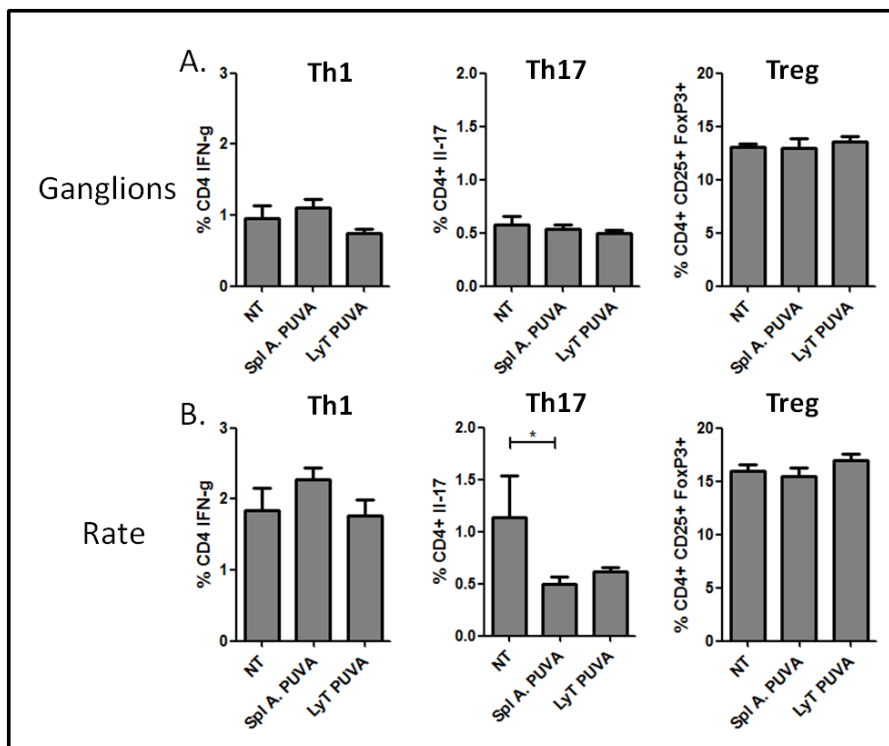


Figure 42: Etude des sous-populations de lymphocytes T de la rate et des ganglions après réinjection de lymphocytes T traités PUVA. A la fin du traitement les splénocytes et cellules ganglionnaires de chaque souris sont prélevées et restimulées par PMA/Ionomycine en présence de Golgi Stop, pendant 6h. Les cellules sont ensuite marquées extracellulairement par des anticorps anti-CD3, -CD4 et -CD25 ainsi que intracellulairement après fixation et perméabilisation de la membrane avec des anticorps anti-IFN- γ , -IL-17 et -FoxP3. Les cellules CD3+/CD4+/IFN- γ + sont les lymphocytes T Th1, les CD3+/CD4+/IL-17+ sont les lymphocytes T Th17 et les CD3+/CD4+/CD25^{high} sont les lymphocytes T régulateurs (Treg). Les statistiques sont réalisées par test ANOVA (Kruskal-Wallis), N=5 dans chaque groupe.

Au niveau des ganglions, aucune différence dans les trois sous-populations de lymphocytes T n'est observée entre les différents groupes d'étude (Fig. 42A), comme dans les expériences précédemment exposées.

Au niveau de la rate, les pourcentages de lymphocytes Th1 et lymphocytes T régulateurs ne sont pas différents entre les trois groupes étudiés (Fig. 42B). Cependant, les souris traitées par réinjection de lymphocytes T « arthritiques » traités PUVA (« LyT PUVA ») montrent au niveau de la rate, une diminution du pourcentage de lymphocytes Th17 en comparaison avec les souris non traitées (« NT »), similaire à celle obtenue après réinjection de splénocytes « arthritiques » traités PUVA (« Spl. A PUVA »).

Enfin, nous avons étudié la répartition des sous populations de cellules spléniques des souris traitées après la réinjection de splénocytes et de lymphocytes T issus de souris arthritiques, traités PUVA. Comme nous l'avons observé dans la figure 33, la réinjection de splénocytes « arthritiques » traités PUVA entraîne une augmentation du pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ activés, cette augmentation est observée dans une moindre mesure lorsque les souris sont traitées par réinjection de lymphocytes T « arthritiques » traités PUVA (Fig. 43). En revanche, l'augmentation du pourcentage de lymphocytes B chez les souris traitées avec des splénocytes « arthritiques » traités PUVA (« spl. A PUVA ») n'est plus observée dans cette expérience. Au contraire, les pourcentages de lymphocytes T CD8⁺ activés semblent légèrement diminuer dans les deux conditions étudiées (« Spl. A PUVA » et « LyT PUVA »). Aucune autre différence dans les autres sous-populations étudiées n'est observée entre les différents groupes d'étude. Dans cette expérience, les pDCs n'ont pu être analysées pour des raisons techniques.

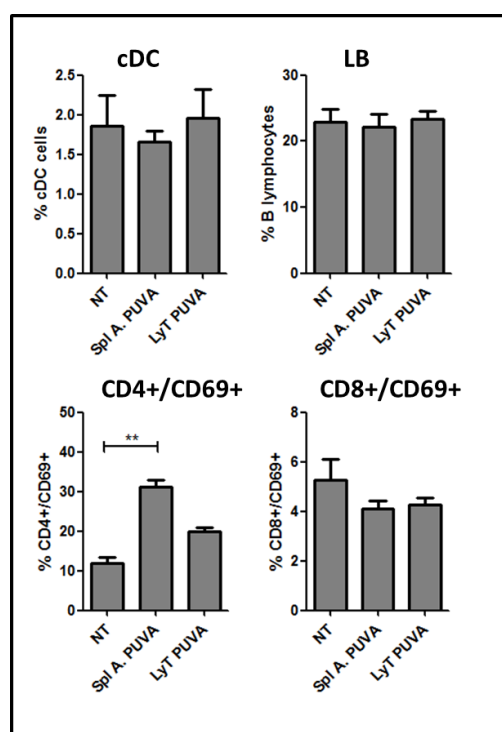


Figure 43 : étude des sous-populations de la rate après traitement. A la fin du traitement les splénocytes sont prélevés et marqués avec des anticorps anti-CD4, -CD8, -CD69, -CD11c, -CD19, -B220, -sigle c et anti -mPDCA. Les cellules CD19-/CD11c^{high}B220- sont les mDCs, les CD19+/B220+ les lymphocytes B, les CD4⁺/CD69⁺ sont les lymphocytes T CD4⁺ activés et les CD8⁺/CD69⁺ sont les lymphocytes T CD8⁺ activés. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules et les statistiques sont réalisées par ANOVA (Kruskal-Wallis), N=5.

Les cytokines sécrétées dans le sérum des différentes souris ont également été mesurées par cytométrie en flux, cependant les quantités de cytokines obtenues sont très faibles (<5 pg.ml) et ne montrent pas de différences entre les différents groupes de souris (Données non montrées).

La réinjection de lymphocytes T traités PUVA provoque une diminution des symptômes arthritiques et également du pourcentage de lymphocytes T Th17, similaires à celles obtenues après la réinjection de splénocytes issus de souris arthritiques, traités PUVA. Les lymphocytes T pourraient donc être à l'origine de l'effet de la PCE ; autrement dit, le principe actif de la PCE.

C. Conclusions

Seule l'injection de splénocytes issus de souris arthritiques (pathogènes) traités PUVA à des souris arthritiques entraîne une diminution des symptômes de la pathologie, reflétée par une diminution de l'inflammation au niveau des pattes et du pourcentage de lymphocytes T Th17 (lymphocytes responsables de la pathologie) au niveau de la rate. La présence de splénocytes provenant d'un animal porteur de la pathologie dans l'échantillon traité est nécessaire au bon fonctionnement du traitement. De plus l'injection de lymphocytes T « pathogènes » (issus de souris arthritiques) traités PUVA semble être suffisant à l'obtention de l'effet thérapeutique observé après traitement PUVA.

D. Discussion et perspectives

Le modèle murin de la polyarthrite rhumatoïde a été utilisé dans notre étude car la pathologie est principalement médiée par la présence de lymphocytes T CD4+, notamment les lymphocytes Th17. La PCE étant connue pour le traitement de pathologies médiées par la présence de lymphocytes T « pathogènes », nous avons choisi ce modèle pour dans un premier temps étudier l'effet de la PCE dans cette pathologie puis dans un deuxième temps pour étudier quelles sont les cellules responsables de l'effet thérapeutique.

Ce modèle a été mis en place dans un premier temps en collaboration avec l'équipe de Sylvain Perruche, à Besançon qui maîtrise le modèle choisi. Dans la conception des expériences, nous avons voulu nous placer au plus près de la pratique clinique en soignant une pathologie déjà établie, en adaptant les quantités de cellules et en suivant le protocole de traitement chez l'Homme (injection tous les 2 jours). A Besançon, 5 expériences ont été réalisées où j'ai acquis le savoir-faire nécessaire à la réalisation des protocoles expérimentaux. Il nous est apparu plus simple de transférer le modèle localement, sur la plateforme de haute technologie animale (PHTA) de Grenoble. Nous avons reproduit le modèle à l'identique et 6 expériences ont été réalisées. Nous avons rencontré des difficultés à reproduire la cinétique de développement. Dans les expériences réalisées à Grenoble, nous avons observé que certains animaux ne développaient pas la pathologie et que ceux qui la développaient le faisaient plus tardivement et avec des symptômes moins importants. Une hypothèse pourrait reposer sur des différences de l'environnement des animaleries, en effet il a été montré que le microbiote jouait un rôle important dans l'homéostasie immune et dans le développement de l'autoimmunité et que parfois, les variations d'une seule espèce bactérienne dans l'intestin des souris peuvent avoir un impact majeur sur le développement des réponses immunes et des pathologies (309).

Nous avons montré *in vivo*, que la réinjection de splénocytes traités PUVA était capable de ralentir le développement de l'arthrite, dès la première injection. Nous observons une différence de score entre les souris traitées et non traitées, d'environ 2 points à partir du 3^{ème} jour après la première injection. L'intensité de cet effet thérapeutique est similaire à celle observée dans d'autres études [Bonnefoy et Li.]. Cependant lorsque le traitement est terminé, nous constatons une reprise de l'évolution des symptômes (comme observé par Bonnefoy et al.) qui pourrait s'expliquer par la persistance de l'antigène au site d'injection. Nous montrons aussi qu'il est nécessaire que les splénocytes réinjectés proviennent de souris malades puisqu'il n'y a pas d'effet de la réinjection de splénocytes issus de souris saines. Dans la littérature, nous pouvons remarquer que l'injection de cellules apoptotiques provenant d'animaux sains suffit pour provoquer un effet thérapeutique, en particulier dans des modèles de CIA, d'EAE et de GvHD (194, 200, 204, 205). Dans la plupart de ces travaux, l'apoptose est induite par irradiation γ ou X. Nos résultats montrent que l'injection de cellules issues de souris saines traitées PUVA n'est pas efficace, et qu'il est nécessaire que ces cellules proviennent d'animaux malades. Ceci suggère que les mécanismes mis en jeu dans la PCE pourraient être différents de ceux impliqués dans l'efficacité thérapeutique de la réinjection de cellules apoptotiques observée dans ces modèles.

Cet effet thérapeutique se traduit par une diminution de l'inflammation au niveau des pattes des souris traitées et pourrait être directement relié à la diminution de lymphocytes Th17 et de la quantité d'IL-17 circulante observées, comme il a été montré dans les travaux de Li (300). Cependant nous n'observons pas de diminution des lymphocytes Th1 après traitement. Dans les travaux de Bonnefoy et al., l'effet thérapeutique est associé à l'augmentation des lymphocytes T régulateurs. Le rôle des lymphocytes T régulateurs dans le contrôle de l'arthrite est largement documenté et représente un levier thérapeutique (310). Dans notre étude nous n'avons pas observé d'augmentation de lymphocytes T régulateurs, ce qui suggère que le mécanisme impliqué dans l'effet thérapeutique de la PCE ne soit pas lié à ces lymphocytes. Dans la pratique clinique chez l'Homme, un certain nombre de travaux décrit une augmentation du pourcentage de lymphocytes T régulateurs après traitement PCE, cependant comme nous l'avons décrit dans l'introduction l'analyse détaillée de ces articles montre que ces augmentations ne sont pas visibles sur la totalité des patients et seulement de manière ponctuelle. Nous observons, comme Bonnefoy et al. une diminution du pourcentage de pDCs dans la rate des souris traitées, il serait intéressant de comprendre comment ces cellules peuvent intervenir.

Des données observées en clinique et dans un modèle animal montrent que la présence de lymphocytes T « pathogènes » dans l'échantillon traité PUVA est nécessaire au bon fonctionnement du traitement (20, 297). Nos données montrent que la réinjection de lymphocytes T « pathogènes » traités PUVA est suffisante à l'obtention de l'effet thérapeutique de la PCE, puisque la réinjection de lymphocytes T issus de souris arthritiques (« pathogènes ») traités PUVA induit une diminution des symptômes. Les lymphocytes T « pathogènes » pourraient donc être le principe actif de la PCE.

Pour confirmer que les lymphocytes T pouvaient être le principe actif de la PCE, nous avons également voulu étudier l'effet de la réinjection de splénocytes déplétés en lymphocytes T (élimination des cellules CD4⁺ et CD8⁺) ; les résultats obtenus dans deux expériences réalisées montrent des effets opposés puisque dans la première, la réinjection n'a pas engendré d'effet thérapeutique, alors que

dans la deuxième leur réinjection entraîne une diminution des symptômes (données non montrées). Il serait, nécessaire d'approfondir cette question par la répétition de ces expériences. De plus, il est important de préciser, qu'en déplétant les CD4+, nous déplaçons également les cellules dendritiques plasmacytoïdes ainsi que les monocytes, qui peuvent avoir leur importance dans le développement d'une réponse.

Il serait aussi intéressant d'étudier la spécificité de la réponse induite par la PCE. Pour cela, une expérience possible serait de restimuler ex vivo les lymphocytes T issus de la rate de souris traitées PCE, avec du collagène ou un autre antigène et de mesurer la prolifération des cellules au bout de 4 ou 5 jours de culture. Si dans les souris traitées, il y a une diminution de la réponse au collagène et pas de modification de la réponse aux autres antigènes, cela pourra signifier que cette réponse est spécifique (200).

La déplétion de sous-populations cellulaires au sein des souris traitées pourrait permettre de définir quelles sont les cellules impliquées dans la prise en charge des cellules traitées PUVA réinjectées, ainsi que celles responsables de la réponse induite. Pour cela des déplétions cellulaires spécifiques pourraient être réalisées et ainsi permettre d'étudier l'implication des lymphocytes T régulateurs et des différentes APCs. Il serait également intéressant de transférer les splénocytes de souris traitées (contenant potentiellement les lymphocytes T anti-T anti-collagène) afin d'étudier si le transfert de ces cellules permet de transférer l'effet thérapeutique. Ceci permettrait de mettre en évidence l'implication de lymphocytes T dans l'effet thérapeutique de la PCE. La réinjection de certains sous-types de lymphocytes T pourrait nous permettre de déterminer plus précisément quel est celui impliqué dans la réponse induite par la PCE.

En conclusion de ces travaux, l'arthrite est un bon modèle pour étudier les mécanismes d'action de la PCE cependant il est délicat à mettre en place et à maîtriser. Les données que nous avons obtenues suggèrent que la présence de lymphocytes T « pathogènes » est un élément essentiel à l'effet thérapeutique observé. Le mécanisme impliqué ne semble pas mettre en jeu les lymphocytes T régulateurs et il est nécessaire d'approfondir cette étude pour comprendre les modes d'action impliqués dans la diminution du pourcentage de lymphocytes Th17.

CONCLUSIONS

Au cours de ma thèse, nous nous sommes fixé comme objectif de comprendre les mécanismes d'action de la PCE. Dans un premier temps nous avons voulu, *in vitro*, caractériser l'apoptose engendrée par le traitement PUVA et étudier la prise en charge des cellules apoptotiques. Nous nous sommes ensuite intéressés, *in vivo*, à l'effet de la PCE sur la polyarthrite murine et à la caractérisation des cellules impliquées dans cet effet.

Nous avons montré *in vitro* que les lymphocytes T après traitement PUVA émettaient certaines des molécules caractéristiques de la mort « immunogène » (DAMPs), l'émission de ces molécules est d'autant plus lorsque les lymphocytes T sont activés. Malgré la présence de DAMPs, les lymphocytes T traités PUVA n'engendrent pas de maturation des APCs, et n'orientent pas non plus la polarisation de la réponse T vers un profil clair Th1, Th2 ou Treg. Il ne semble donc pas que la PCE mette en jeu un mécanisme basé sur la mort « immunogène ».

In vivo, dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde, nous avons montré l'efficacité de la PCE dans le traitement de cette pathologie. Nous démontrons que les cellules apoptotiques réinjectées doivent provenir de souris malades et que les lymphocytes T pourraient être le principe actif de la PCE. Ce modèle est donc valide pour l'étude approfondie des mécanismes d'action de la PCE.

Selon moi, il serait nécessaire de mettre en place un immunomonitoring phénotypique et fonctionnel associé à une étude clinique dans les différents contextes pathologiques afin de réellement conclure sur les effets immunologiques de la PCE. Cette étude permettrait aussi d'identifier quels sont les biomarqueurs et les mécanismes responsables de l'immunomodulation observée après traitement. La PCE étant utilisée dans la plupart des pathologies, en deuxième ou troisième ligne de traitement, son étude chez les patients reste compliquée. L'hétérogénéité existante au sein des patients traités par PCE et de leur stade pathologique rend ces études d'autant plus complexes. Certains auteurs ont déjà tenté de réaliser de telles d'études (96, 163, 164), il ne s'agit pas ici de refaire ce qui a déjà été fait, mais au contraire de les approfondir puisqu'aujourd'hui de nouveaux types cellulaires ont été découverts (Tr1, Th17, etc..) et que de gros progrès ont été faits sur la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des différents types cellulaires existants. Enfin, il serait intéressant de déterminer le profil cytokinique du sérum chez les patients, tout au long de leur traitement.

Malgré toutes ces incertitudes concernant les mécanismes d'action de la PCE, cette thérapie présente une efficacité largement démontrée et le spectre de ses applications pourrait être élargi, en particulier dans le domaine de l'autoimmunité.

BIBLIOGRAPHIE

1. F. Heshmati, Extracorporeal photochemotherapy: a historical perspective. *Transfus Apher Sci* **28**, 25-34 (2003).
2. H. FAHMY Ir, The isolation and properties of ammoidin, ammidin and majudin, and their effect in the treatment of leukoderma. *Q J Pharma Pharmacol* **21**, 499-503 (1948).
3. Parrish JA, Tanenbaum L, Pathak MA., Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *N engl J Med* **291**, 1207-1211 (1974).
4. Edelson RL, Gasparro F, et al. , Treatment of cutaneous T cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. *N engl J Med*, (1987).
5. Knobler, P. Calzavara-Pinton, H. Greinix, P. Jaksch, L. Laroche, J. Ludvigsson, P. Quaglino, W. Reinisch, J. Scarisbrick, T. Schwarz, P. Wolf, P. Arenberger, C. Assaf, M. Bagot, M. Barr, A. Bohbot, L. Bruckner-Tuderman, B. Dreno, A. Enk, L. French, R. Gniadecki, H. Gollnick, M. Hertl, C. Jantschitsch, A. Jung, U. Just, C.-D. Klemke, U. Lippert, T. Luger, E. Papadavid, H. Pehamberger,, Guidelines on the Use of Extracorporeal Photopheresis. *JEADV* **28**, (2014).
6. L. Geskin, ECP versus PUVA for the Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Skin Therapy Letter*, (2007).
7. Robert Knobler, Daniel R. Couriel, James L. M. Ferrara, Lars E. French, MD, h Peter Jaksch, Walter Reinisch, Alain H. Rook, Thomas Schwarz, and Hildegard Greinix., Extracorporeal photopheresis: Past, present and future. *J Am Acad Dermatol* **61**, 652-665 (2009).
8. Ward. DM., Extracorporeal photopheresis: how, when, and why. *Journal of clinical apheresis* **26**, 276-285 (2011).
9. H. A. d. S. (HAS), Photochimiothérapie extracorporelle- Rapport d'évaluation technologique. (2010).
10. H. Dalil, photochimiothérapie extracorporelle ou l'immunothérapie par cellules modifiées par photochimie. *La revue de médecine interne*, (2010).
11. Ulrike Just, Robert Knobler, Gabriele Klosner, Erika Ivancic-Brandenberger, Hildegard Greinix, Alexander Becherer and Franz Trautinger, Leucocyte scintigraphy with ¹¹¹In-oxine for assessment of cell trafficking after extracorporeal photopheresis. *Exp Dermatol* **21**, 443-447 (2012).
12. Greinix H, Kalhs P, Fischer G, Rosenmayr A, Keil F, Hönigsmann H, Knobler RM., Extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a pilot study. *Blood* **96**, 2426-2431 (2000).
13. Greinix HT, Rabitsch W, Gmeinhart B, Guevara-Pineda C, Kalhs P, Krutmann J, Hönigsmann H, Ciovica M, Knobler RM., Successful use of extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe acute and chronic graft-versus-host disease. *Blood* **92**, 3098-3104 (1998).
14. Flowers *et al.*, A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood* **112**, 2667-2674 (2008).
15. Legitimo A, Di Stefano R, Bencivelli W, Calleri A, Mosca F, Evaluation of the immunomodulatory mechanisms of photochemotherapy in transplantation. *Transplantation Proceedings* **33**, 2266-2268 (2001).

16. Barr ML, Eisen HJ, Roberts RF, Livi U, Dall'Amico R, Dorent R, Rogers JG, Radovancević B, Taylor DO, Jeevanandam V, Marboe CC., Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac transplantation. Photopheresis Transplantation Study Group. *New England Journal of Medicine* **339**, 1744-1751 (1998).
17. Maccherini M, Laghi Pasini F, Lisi G, Tanganelli P, D'Ascenzo G, Mondillo S, Carone E, Oricchio L, Baraldi C, Capecchi PL, Lazzerini PE, Toscano T, Barretta A, Giunti G, Schuerfeld K, Fimiani M, Papalia U., Photopheresis immunomodulation after heart transplantation. *transplantation Proceedings* **33**, 1591-1594 (2001).
18. Jill Adamski, Tina Ipe, Laura Cooling, Adamski, transfus apher sci, 2015. *Transfusion and Apheresis Science* **52**, 171-182 (2015).
19. Kuzmina Z, Pavletic SZ., Extracorporeal photopheresis as a therapy for autoimmune diseases. *J Clin Apher* **30**, 224-237 (2015).
20. Holger Budde, Laura Salinas Tejedor, Gerald Wulf, Holger M. Reichardt, Joachim Riggert, Tobias J. Legler, Modified Extracorporeal Photopheresis with Cells from a Healthy Donor for Acute Graft-versus-Host Disease in a Mouse Model. *PloS one* **9**, (2014).
21. Joseph Schwartz, Anand Padmanabhan, Rasheed A. Balogun, Meghan Delaney, Michael L. Linenberger, Zbigniew M. Szczepiorkowski, Mark E. Williams, Yanyun Wu, and Beth H. Shaz, Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice—Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Sixth Special Issue. *J Clin Apher* **28**, 145–284 (2013).
22. Bethea D, Syed S, Seltzer G, Tiano J, Rischko C, Gillespie L, Brown D, Gasparro FP., Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *Journal of dermatological science* **19**, 78-88 (1999).
23. Francis P.Gasparro, Gerard A.Olack, Edward J.Gunther and Peter M.Glazer, Site-specific targeting of psoralen photoadducts with a triple helix-forming oligonucleotide: characterization of psoralen monoadduct and crosslink formation. *Nucleic Acids Research* **22**, 2845-2852 (1994).
24. Enomoto *et al.*, Extracorporeal photochemotherapy (photopheresis) induces apoptosis in lymphocytes: a possible mechanism of action of PUVA therapy. *Photochem Photobiol* **65**, 177-180 (1997).
25. J. Bladon, P. C. Taylor, Extracorporeal photopheresis induces apoptosis in the lymphocytes of cutaneous T-cell lymphoma and graft-versus-host disease patients. *Br J Haematol* **107**, 707-711 (1999).
26. Gerber A, Rasch J, Struy H, Ansorge S, Gollnick H., Investigation of annexin V binding to lymphocytes after extracorporeal photoimmunotherapy as an early marker of apoptosis. *Dermatology* **201**, 111-117 (2000).
27. Yoo, A. H. Rook, R. Elenitsas, F. P. Gasparro, B. R. Vowels, Apoptosis induction of ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell Lymphoma: relevance to mechanism of therapeutic action. *J Invest Dermatol* **107**, 235-242 (1996).
28. Hannani D, Gabert F, Laurin D, Deméocq F, Chaperot L, Kanold J, Plumas J., Photochemotherapy induces a faster apoptosis of alloreactive activated T cells than of nonalloreactive resting T cells in graft versus host disease. *Transplantation* **90**, 1232-1238 (2010).
29. Z. Zarebska, E. Waszkowska, S. Caffieri, F. Dall'Acqua, PUVA (psoralen + UVA) photochemotherapy: processes triggered in the cells. *Farmaco* **55**, 515-520 (2000).

30. Beijersbergen van Henegouwen GM1, Schoonderwoerd SA, Dall'Acqua F., A method for the determination of PUVA-induced in vivo irreversible binding of 8-methoxypsoralen (8-MOP) to epidermal lipids, proteins and DNA/RNA. *J Photochem Photobiol B* **3**, 631-635 (1989).
31. Schmitt IM, Gasparro FP., Psoralen-protein photochemistry--a forgotten field. *J Photochem Photobiol B* **27**, 101-107 (1995).
32. Zarebska Z, Cell membrane, a target for PUVA therapy. *J Photochem Photobiol B* **23**, 101-109 (1994).
33. Holtick U, Marshall SR, Scheid C, von Bergwelt-Baildon M, Dickinson AM., In vitro PUVA treatment preferentially induces apoptosis in alloactivated T cells. *Transplantation* **94**, 31-34 (2012).
34. Durazzo TS, Filler R, Hayday A, Girardi M, Edelson RL, Induction of monocyte-to-dendritic cell maturation by extracorporeal photochemotherapy: initiation via direct platelet signalin. *transfusion and Apheresis Science* **50**, 370-378 (2014).
35. Edelson RL, Mechanistic insights into extracorporeal photochemotherapy: Efficient induction of monocyte-to-dendritic cell maturation. *Transfus Apher Sci* **50**, 322-329 (2014).
36. Hannani D, Laurin D, Sall M, Molens JP, Hequet O, Chaperot L, Plumas J., Photochemotherapy induces the apoptosis of monocytes without impairing their function. *Transplantation* **89**, 492-499 (2010).
37. V. Rao, S. Jørstad, T. Moen, 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. *Scandinavian Journal of Immunology* **68**, 645-651 (2008).
38. CL. Berger, D. Hanlon, D. Kanada, M. Girardi, R. L. Edelson, Transimmunization, a novel approach for tumor immunotherapy. *Transfus Apher Sci* **26**, 205-216 (2002).
39. M. Girardi, J. Schechner, E. Glusac, C. Berger, R. Edelson, Transimmunization and the evolution of extracorporeal photochemotherapy. *Transfus Apher Sci* **26**, 181-190 (2002).
40. F. Heshmati, Updating ECP action mechanisms. *Transfus Apher Sci* **50**, 330-339 (2014).
41. F. Heshmati, Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy. *Transfus Apher Sci* **29**, 61-70 (2003).
42. Franz Trautinger, Rein Willemze, Ketty Peris, Rudolph Stadler, Liliane Laroche, Michel D'Incan, Annamari Ranki, Nicola Pimpinelli, Pablo Ortiz-Romero, Reinhard Dummer, Teresa Estrach, Sean Whittaker, EORTC consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Se'zary syndrome. *European Journal of Cancer* **42**, 1014-1030 (2006).
43. Wolfe JT, Singh AH, Rook AH., Review of immunomodulation by photopheresis: treatment of cutaneous T-cell lymphoma, autoimmune disease, and allograft rejection. *Artificial organs* **18**, 888-897 (1994).
44. Bagherani, BR. , An overview of cutaneous Tcell lymphomas. *F1000 Research reviews* **5**, (2016).
45. Rein Willemze, Gu'nter Burg, Lorenzo Cerroni, Emilio Berti, Steven H. Swerdlow, Elisabeth Ralfkiaer, Sergio Chimenti, Jose L. Diaz-Perez, Florent Grange, Nancy Lee Harris, Werner Kempf, Helmut Kerl, Michael Kurrer, Robert Knobler,, C. S. Nicola Pimpinelli, Marco Santucci, Wolfram Sterry, Maarten H. Vermeer, Janine Wechsler, Sean Whittaker, Meijer, WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* **105**, 3768-3785 (2005).

46. Miles Prince, and Richard T. Hoppe, How I treat mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Blood* **114**, 4337-4353 (2009).
47. ST. Hwang, J. E. Janik, E. S. Jaffe, W. H. Wilson, Mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Lancet* **371**, 945-957 (2008).
48. Edelson. RL, Karyotype studies of cutaneous T cell lymphoma: Evidence for clonal origin. *The journal of investigative dermatology*, (1979).
49. Clotilde M. Jackow, Vicki Hearne, Arisa T. Asano, James M. Musser, Madeleine Duvic, Association of Erythrodermic Cutaneous T-Cell Lymphoma, SuperantigenPositive Staphylococcus aureus, and Oligoclonal T-Cell Receptor Vb Gene Expansion. *Blood* **89**, 32-40 (1997).
50. Todd Abrams, Eric C. Vonderheid, Association between Sézary T Cell-activating Factor, Chlamydia pneumoniae, and Cutaneous T Cell Lymphoma. *Ann N Y Acad Sci*, (2001).
51. Zucker-Franklin, Pancake BA , The role of human T-cell lymphotropic viruses (HTLV-I and II) in cutaneous T-cell lymphomas. *Semin Dermatol*, (1994).
52. Michael Girardi, Cutaneous T-Cell Lymphoma: Pathogenesis and Treatment. *Oncology*, (2000).
53. Edelson. RL, Cutaneous T cell lymphoma: The helping hand of dendritic cells. *Annals NY academy of sciences*, (2001).
54. F. B. Klemke , Franz B, Kleinmann EV, Oberle N, Poenitz N, Sykora J, Banham AH, Roncador G, Kuhn A, Goerdts S, Krammer PH, Suri-Payer E., Paucity of FOXP3+ cells in skin and peripheral blood distinguishes Sézary syndrome from other cutaneous T-cell lymphomas. *Leukemia* **20**, 1123-1229 (2006).
55. Edelson RL, Gasparro F, et al., Photopheresis: a new therapeutic concept. *Yale J Biol Med* **62**, 565-577 (1989).
56. Arun Alfred, Fiona Dignan, Khaled El-Ghariani, James Griffin, Andrew R. Gennery, Denise Bonney, Emma Das-Gupta, Sarah Lawson, Ram K. Malladi, Kenneth W. Douglas, Tracey Maher, Julie Guest, Laura Hartlett, Andrew J. Fisher, Fiona Hild and Julia J. Scarisbrick, The role of extracorporeal photopheresis in the management of cutaneous T-cell lymphoma, graft-versus-host disease and organ transplant rejection: a consensus statement update from the UK Photopheresis Society. *British Journal of haematology*, (2017).
57. Scarisbrick, U. Holtick, Y. Makar, K. Douglas, G. Berlin, – E. Juvonen and S. Marshall, U.K. consensus statement on the use of extracorporeal photopheresis for treatment of cutaneous T-cell lymphoma and chronic graft-versus-host disease. *British journal of haematology* **158**, 659–678 (2008).
58. Heald PW, 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* **62**, 629-638 (1989).
59. Armus S, Cahill C, Berger C, Crater D, Scarborough D, Klainer A, Bisaccia E., Photopheresis for the treatment of cutaneous T cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* **23**, 898-902 (1990).
60. Nagatani T, Kim S, Baba N, Osawa J, Sugiyama A, Komatsu H, Ichiyama S, Takahashi Y, Miyamoto H, et al., Treatment of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) with extracorporeal photochemotherapy--preliminary report. *J Dermatol* **17**, 737-745 (1990).
61. Zic J, Salhany KE, Parker RA, Wilson D, Stricklin GP, Greer J, King LE Jr., Extracorporeal photopheresis for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* **27**, 729-736 (1992).

62. Koh H, Meola Y, Lim H, Extracorporeal photopheresis for the treatment of 34 patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* **102**, 567 (1994).
63. Prinz B, Hölzle E, Plewig G., Extracorporeal photopheresis for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma--the Düsseldorf and Munich experience. *Arch Dermatol Res* **287**, 621-626 (1995).
64. Duvic M, Lemak NA., Photopheresis therapy for cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* **35**, 573-579 (1996).
65. Gottlieb SL, Fox FE, DeNardo BJ, Macey WH, Bromley PG, Lessin SR, Rook AH., 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* **35**, 946-957 (1996).
66. Owsianowski M, Ramaker J, Orfanos CE, Gollnick H., [Therapeutic experiences with extracorporeal photopheresis. Technical procedure, follow-up and clinical outcome in 31 skin diseases]. *Hautarzt*. **47**, 114-123 (1996).
67. Stevens S, Oberhelman-Brag L et al. , Circulating CD4+ CD7- lymphocyte burden, CD4+/CD8 ratio and rapidity of response are predictors of outcome in the treatment of CTCL with extracorporeal photochemotherapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **12**, 36 (1996).
68. Zic JA, Greer JP, Kinney MC, Shyr Y, Wilson DC, King LE Jr., Long-term follow-up of patients with cutaneous T-cell lymphoma treated with extracorporeal photochemotherapy. *J Am Acad Dermatol* **35**, 935-945 (1996).
69. Alexander Konstantinow, Treatment of cutaneous T-cell lymphoma with extracorporeal photochemotherapy. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **9**, 111-117 (1997).
70. Miracco C, De Aloe G, D'Ascenzo G, Mazzatenta C, De Santi MM, Fimiani M., Extracorporeal photochemotherapy induces apoptosis of infiltrating lymphoid cells in patients with mycosis fungoides in early stages. A quantitative histological study. *Br J Dermatol* **137**, 549-557 (1997).
71. Dippel E, Goerdt S, Orfanos CE., Extracorporeal photopheresis and interferon-alpha in advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Lancet* **350**, 32-33 (1997).
72. Russell-Jones R, Spittle M, Whittaker S., Extracorporeal photopheresis in Sézary syndrome. *Lancet* **350**, 886 (1997).
73. Vonderheid EC, Lessin SR, Polansky M, Abrams JT, Bigler RD, Wasik MA, Use of serum soluble interleukin-2 receptor levels to monitor the progression of cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* **38**, 207-220 (1998).
74. Zouboulis CC, Doepfmer S, Dippel E, Orfanos CE., Extracorporeal photopheresis of cutaneous T-cell lymphoma is associated with reduction of peripheral CD4+ T lymphocytes. *Dermatology* **196**, 305-308 (1998).
75. Jiang SB, Kim M, Lim HW., Extracorporeal photochemotherapy for cutaneous T-cell lymphoma: a 9.7-year experience. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **15**, 161-165 (1999).
76. Bisaccia E, 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* **43**, 263-271 (2000).
77. Crovetti G, Berti E, Guizzardi M, Fossati S, De Filippo C, Bertani E., Photopheresis in cutaneous T-cell lymphoma: five-year experience. *Int J Artif Organs* **23**, 55-62 (2000).

78. Wollina U, Kaatz M, Looks A, Stuhler A, Lange D., Survival of patients with cutaneous T-cell lymphoma after treatment with extracorporeal photochemotherapy. *Oncol Rep* **7**, 1197-1201 (2000).
79. Evans AV, Scarisbrick JJ, Fraser-Andrews EA, Chinn S, Dean A, Watkins P, Whittaker SJ, Russell-Jones R., Extracorporeal photopheresis in Sézary syndrome: hematologic parameters as predictors of response. *Blood* **98**, 1298-1301 (2001).
80. Wollina U, Kaatz M, Looks A, Stuhler A, Lange D., Survival of patients with cutaneous T cell lymphoma after treatment with extracorporeal photochemotherapy: a retrospective single-center analysis. *Ann N Y Acad Sci* **941**, 217-219 (2001).
81. Bouwhuis SA, McEvoy MT, Gibson LE, Habermann TM, Witzig TE, Pittelkow MR., Treatment of late-stage Sézary syndrome with 2-Chlorodeoxyadenosine. *Int J Dermatol* **41**, 352-356 (2002).
82. Knobler E, Cocco C, Miller B, Mackay J., Extracorporeal photochemotherapy--the Columbia Presbyterian experience. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **18**, 232-237 (2002).
83. Suchin KR, Gottlieb SL, Wolfe JT, DeNardo BJ, Macey WH, Bromley PG, Vittorio CC, Rook AH., Treatment of cutaneous T-cell lymphoma with combined immunomodulatory therapy: a 14-year experience at a single institution. *Arch Dermatol* **138**, 1054-1060 (2002).
84. Quaglino P, Rossotto GL, Savoia P, Bernengo MG, Treatment of advanced mycosis fungoides/Sézary syndrome with fludarabine and potential adjunctive benefit to subsequent extracorporeal photochemotherapy. *Br J Dermatol* **150**, 327-336 (2004).
85. De Misa RF, Azaña JM, Belmar P, Díez E, Ledo A., Photopheresis does not improve survival in Sézary syndrome patients with bone marrow involvement. *J Am Acad Dermatol* **53**, 171-172 (2005).
86. Rao V, Aarhaug M, Dai HY, Jørstad S, Moen T., Extracorporeal photochemotherapy in patients with cutaneous T-cell lymphoma: is clinical response predictable? *J Eur Acad Dermatol Venereol* **20**, 1100-1107 (2006).
87. Gasová Z, Dolezalová L, Marinov I, Vitek A., Extracorporeal photochemotherapy (ECP) in treatment of patients with c-GVHD and CTCL. *Transfus Apher Sci* **36**, 149-158 (2007).
88. Tsirigotis P, Papageorgiou S, Kapsimali V, Giannopoulou V, Kaitsa I, Girkas K, Papageorgiou E, Stavrianeas N, Economopoulos T, Dervenoulas J., Extracorporeal photopheresis in combination with bexarotene in the treatment of mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Br J Dermatol* **156**, 1379-1381 (2007).
89. Arulogun S, Gambell P, Lade S, Ryan G, Eaton E, McCormack C., Extracorporeal photopheresis for the treatment of Sézary syndrome using a novel treatment protocol. *J Am Acad Dermatol* **59**, 589-595 (2008).
90. Booken N, Utikal J, Felcht M, Goerdt S, Klemke CD., Combination therapy with extracorporeal photopheresis, interferon-alpha, PUVA and topical corticosteroids in the management of Sézary syndrome. *J Dtsch Dermatol Ges* **8**, 428-438 (2010).
91. McGirt LY, Hess A, Vonderheid EC., Predictors of response to extracorporeal photopheresis in advanced mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **26**, 182-191 (2010).
92. Raphael BA, Suchin KR, Morrissey KA, Vittorio CC, Kim EJ, Gardner JM, Evans KG, Introcaso CE, Samimi SS, Gelfand JM, Rook AH., High clinical response rate of

- Sezary syndrome to immunomodulatory therapies: prognostic markers of response. *Arch Dermatol* **147**, 1410-1415 (2011).
93. Talpur R, Geskin L, Baron E, Pugliese S, Eubank K, Zic JA, Miller DR, Tharp M, Bohjanen K, Duvic M., Multicenter photopheresis intervention trial in early-stage mycosis fungoides. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **11**, 119-127 (2011).
 94. Siakantaris MP1, Stavroyianni N, Argyropoulos KV, Girkas K, Pappa V, Chondropoulos S, Papadavid E, Sakellari I, Anagnostopoulos A, Antoniou C, Dervenoulas J., Management of cutaneous T-Cell lymphoma patients with extracorporeal photopheresis. The Hellenic experience. *Transfus Apher Sci* **46**, 189-193 (2012).
 95. Knobler R1, Querfeld C, Straus D, Horwitz S, Zain J, Foss F, Kuzel T, Campbell K, Geskin L., Long-term follow-up and survival of cutaneous T-cell lymphoma patients treated with extracorporeal photopheresis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **28**, 250-257 (2012).
 96. Shiue LH, Lewis DE, Wei C, Ni X, Duvic M., The effect of extracorporeal photopheresis alone or in combination therapy on circulating CD4(+) Foxp3(+) CD25(-) T cells in patients with leukemic cutaneous T-cell lymphoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **31**, 184-194 (2015).
 97. Quaglino P, Fierro MT, Savoia P, Marra E, Fava P, Bernengo MG., Extracorporeal photopheresis for the treatment of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: a single center clinical experience with long-term follow-up data and a brief overview of the literature. *Int J Dermatol* **52**, 1308-1318 (2013).
 98. E. Atilla , S.C. Bozdag, M.K. Yuksel, S.K. Toprak, P. Topcuoglu, B.N. Akay, H. Sanli, H. Akan, T. Demirer, M. Beksac, O. Arslan, M. Ozcan, G. Gurman, O. Ilhan, Extracorporeal photochemotherapy in mycosis fungoides. *Transfusion clinique et biologique*, (2017).
 99. Maria Atta , Panagiotis Tsirigotis, The role of extracorporeal photopheresis in the treatment of cutaneous T-cell lymphomas. *Transfusion and Apheresis Science* **46**, 195-202 (2012).
 100. Zic J, The treatment of cutaneous T-cell lymphoma with photopheresis. *Dermatologic therapy* **16**, 337-346 (2003).
 101. Vowels BR, Vonderheid EC, Rook AH., Aberrant cytokine production by Sezary syndrome patients: cytokine secretion pattern resembles murine Th2 cells. *J Invest Dermatol* **99**, 90-94 (1992).
 102. Vowels BR, Cassin M, Jaworsky C, Benoit B, Wolfe JT, Rook AH., Th2 cytokine mRNA expression in skin in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* **103**, 669-673 (1994).
 103. Rook AH, Cassin M, Vonderheid EC, Vowels BR, Wolfe JT, Wolf SF, Singh A, Trinchieri G, Lessin SR., IL-12 reverses cytokine and immune abnormalities in Sezary syndrome. *J Immunol* **54**, 1491-1498 (1995).
 104. Rook AH, Wolfe JT, Vowels BR, Sood SS, Niu Z, Lessin SR, Fox FE., Pathogenesis of cutaneous T-cell lymphoma: implications for the use of recombinant cytokines and photopheresis. *Clin Exp Immunol* **107**, 16-20 (1997).
 105. Saed G, Naidu Y, Nickoloff BJ., Mycosis fungoides exhibits a Th1-type cell-mediated cytokine profile whereas Sezary syndrome expresses a Th2-type profile. *J Invest Dermatol* **103**, 29-33 (1994).
 106. Seo N, Matsumoto K, Furukawa F, Takigawa M., Tumour-specific cytotoxic T lymphocyte activity in Th2-type Sézary syndrome: its enhancement by interferon-

- gamma (IFN-gamma) and IL-12 and fluctuations in association with disease activity. *Clin Exp Immunol* **112**, 403-409 (1998).
107. Yoo EK, Lessin SR, Rook AH., Complete molecular remission during biologic response modifier therapy for Sézary syndrome is associated with enhanced helper T type 1 cytokine production and natural killer cell activity. *J Am Acad Dermatol* **45**, 208-216 (2001).
 108. DI RENZO, L. ANDREASSI A. AUTERI, M. FIMIANI, Extracorporeal photochemotherapy restores Th1/Th2 imbalance in patients with early stage cutaneous T-cell lymphoma. *Immunology* **92**, 99-103 (1997).
 109. Y. Tokura *et al.*, Treatment of T lymphocytes with 8-methoxypsoralen plus ultraviolet A induces transient but biologically active Th1-skewing cytokine production. *J Invest Dermatol* **113**, 202-208 (1999).
 110. Vowels, M. Boufal, M. H. Walsh, L. J. Rook, A. H., Extracorporeal photochemotherapy induces the production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes: implications for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* **98**, 686-692 (1992).
 111. Hildegard T. Greinix, Ulrike Just, Robert Knobler, Extracorporeal photopheresis in acute and chronic graft-versus-host disease. *Transfus Apher Sci* **50**, 349-357 (2014).
 112. Koyama M, Alloantigen presentation and graft-versus-host disease: fuel for the fire. *Blood* **127**, 2963-2970 (2016).
 113. T. Toubai, GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? *Best practice and research clinical haematology* **21**, 101-117 (2008).
 114. Madan H. Jagasia, George Stricklin, Brian Engelhardt, Adetola Kassim, Sheri Dixon, Heidi Chen, Wichai Chinratanalab, Stacey Goodman, John P. Greer, and Friedrich Schuening, Classic and Overlap Chronic Graft-versus-Host Disease (cGVHD) Is Associated with Superior Outcome after Extracorporeal Photopheresis (ECP). *Biol Blood Marrow Transplant* **19**, 1288-1295 (2015).
 115. James W. Hart, Elizabeth J. Shpall and Amin M. Alousi, Extracorporeal photopheresis in the treatment of graft-versus-host disease: evidence and opinion. *Therapeutic advances hematology* **4**, 320-334 (2013).
 116. Claudio Anasetti, Stephanie J. Lee, Edmund K. Waller, Daniel J. Weisdorf, John R. Wingard, Corey S. Cutler, Peter Westervelt, Ann Woolfrey, Stephen Couban, Gerhard Ehninger, Laura Johnston, Richard T. Maziarz, Michael A. Pulsipher, David L. Porter, Shin Mineishi, John M. McCarty, Shakila P. Khan, Paolo Anderlini, William I. Bensinger, Susan F. Leitman, Scott D. Rowley, Christopher Bredeson, Shelly L. Carter, Mary M. Horowitz, and Dennis L. Confer, Peripheral-Blood Stem Cells versus Bone Marrow from Unrelated Donors. *N engl J Med* **367**, (2012).
 117. S-E Lee, J-H Kim, J-H Yoon, S-H Shin, S-A Yahng, K-S Eom, Y-J Kim, H-J Kim, S Lee, C-K Min, S-G Cho, D-W Kim, J-W Lee, W-S Min and C-W Park, Risk and prognostic factors for acute GVHD based on NIH consensus criteria. *Bone Marrow Transplantation* **48**, 587-592 (2012).
 118. Mary E. D. Flowers, 2 Yoshihiro Inamoto, 1 Paul A. Carpenter, 1,3 Stephanie J. Lee, 1,2 Hans-Peter Kiem, 1,2 Effie W. Petersdorf, 1,2 Shalini E. Pereira, 1 Richard A. Nash, 1,2 Marco Mielcarek, 1,2 Matthew L. Fero, 1,2 Edus H. Warren, 1,2 Jean E. Sanders, 1,3 Rainer F. Storb, 1,2 Frederick R. Appelbaum, 1,2 Barry E. Storer, 1,4 and Paul J. Martin, Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood* **117**, 3214-3219 (2011).

119. Aleksandr Lazaryan, Todd DeFor, Claudio G. Brunstein, Margaret L. MacMillan, Nelli Bejanyan, Shernan Holtan, Bruce R. Blazar, John E. Wagner, and Mukta Arora., Risk factors for acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation with umbilical cord blood and matched related donors. *Biol Blood Marrow Transplant* **21**, 134-140 (2016).
120. Billingham, The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* **62**, 21-78 (1966).
121. Hill GR, The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **95**, 2754-2759 (2000).
122. Ferrara JL, Teshima T., The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int J hematology* **78**, 181-187 (2003).
123. Daniel Couriel, Richard Champlin, Krishna Komanduri, Acute Graft-versus-Host Disease: Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Cancer* **101**, 1936–1946. (2004).
124. LM Ball and RM Egeler, Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone marrow transplantation* **41**, 58-64 (2008).
125. SAMAH NASSEREDDINE, EHAB ELBAHESH and IMAD TABBARA, Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. *Anticancer research* **37**, 1547-1555 (2017).
126. Mistrik M, Sopko L, Masakova L, Roziakova L, Martinka J, Batorova A, Graft-versus-host disease management. *Bratisl Med J* **117**, 388-396 (2016).
127. J. L. Ferrara, J. E. Levine, P. Reddy, E. Holler, Graft-versus-host disease. *Lancet*, (2009).
128. G. V. Stephanie J. Lee, 2 Mary E.D. Flowers, Chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* **9**, 215-233 (2003).
129. L. E. French *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* **30**, 509-515 (2002).
130. Van den Brink, Ellen; Ferrara, James L. M.; Burakoff, Steven J, Graft-versus-host-disease associated thymic damage results in the apparance of T cell clones with anti-host reactivity. *Transplantation* **69**, 446-450 (2000).
131. Weinberg K, Wagner JE, Agura E, Hill BJ, Smogorzewska M, Koup RA, Betts MR, Collins RH, Douek DC, Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *blood* **97**, 1458-1466 (2001).
132. Owsianowski M1, Siegert W, Schwerdtfeger R, Orfanos CE, Successful treatment of chronic graft-versus-host disease with extracorporeal photopheresis. *Bone Marrow Transplant* **14**, (1994).
133. L. Salvaneschi *et al.*, Extracorporeal photochemotherapy for treatment of acute and chronic GVHD in childhood. *Transfusion* **41**, 1299-1305 (2001).
134. R. Dall'Amico, L. Murer, Extracorporeal photochemotherapy: a new therapeutic approach for allograft rejection. *Transfus Apher Sci* **26**, 197-204 (2002).
135. Messina C, Lanino E, Uderzo C, Zacchello G, Cesaro S, Pillon M, Perotti C, Del Fante C, Faraci M, Rivabella L, Calore E, De Stefano P, Zecca M, Giorgiani G, Brugiolo A, Balduzzi A, Dini G, Zanesco L, Dall'Amico R., Extracorporeal photochemotherapy for paediatric patients with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* **122**, 118-127 (2003).

136. F. Garban *et al.*, Extracorporeal chemophototherapy for the treatment of graft-versus-host disease: hematologic consequences of short-term, intensive courses. *Haematologica* **90**, 1096-1101 (2005).
137. H. T. Greinix *et al.*, Assessing the potential role of photopheresis in hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* **38**, 265-273 (2006).
138. Kanold J, Halle P, Paillard C, Marabelle A, Rapatel C, Evrard B, Berger C, Stephan JL, Galambrun C, Piguet C, D'Incan M, Bordigoni P, Deméocq F., Photopheresis in pediatric graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation: clinical practice guidelines based on field experience and review of the literature. *Transfusion* **47**, 2276-2289 (2007).
139. E. Calore *et al.*, Extracorporeal photochemotherapy may improve outcome in children with acute GVHD. *Bone Marrow Transplant*, (2008).
140. González-Vicent M, Pérez A, Lassaletta A, Sevilla J, Díaz MA., Extracorporeal photochemotherapy for steroid-refractory graft-versus-host disease in low-weight pediatric patients. Immunomodulatory effects and clinical outcome. *Haematologica* **93**, 1278-1280 (2008).
141. P. Perfetti *et al.*, Extracorporeal photopheresis for the treatment of steroid refractory acute GVHD. *Bone Marrow Transplant* **42**, 609-617 (2008).
142. Perotti C, Tinelli C, Viarengo G, Scudeller L, Zecca M, Locatelli F, Salvaneschi L., Extracorporeal photochemotherapy in graft-versus-host disease: a longitudinal study on factors influencing the response and survival in pediatric patients. *Transfusion* **50**, 1359-1369 (2010).
143. Rossetti F, Crovetto G, Messina C, Montini G, Dini G, Locatelli F, Argioli F, Miniero R, Zacchello G., Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* **supl. 2**, 175-181 (1996).
144. Dall'Amico R, Zulian F, Montini G, Murer L, Andreetta B, Messina C, Baraldi E, Montesco MC, Dini G, Locatelli F, Argioli F, Zacchello G., Photopheresis in paediatric patients with drug-resistant chronic graft-versus-host disease. *Br J Haematol* **97**, 848-854 (1997).
145. Halle P, D'Incan M, Bordigoni P, Piguet C, De Lumley L, Stephan JL, Berger M, Rapatel C, Deméocq F, Kanold J., Successful extracorporeal photochemotherapy for chronic graft-versus-host disease in pediatric patients. *J Hematother Stem Cell Res* **11**, 501-512 (2002).
146. Perseghin P, 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* **17**, 65-71 (2002).
147. Apisarnthanarax N, Körbling M, Couriel D, Gajewski J, Giralt S, Khouri I, Hosing C, Champlin R, Duvic M, Anderlini P., 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* **31**, 459-465 (2003).
148. Seaton ED, Kanfer E, Apperley JF, Russell-Jones R., Influence of extracorporeal photopheresis on clinical and laboratory parameters in chronic graft-versus-host disease and analysis of predictors of response. *Blood* **102**, 1217-1223 (2003).
149. Foss FM, Chin K, Sprague K, Grodman H, Klein A, Chan G, Stiffler K, Miller KB., 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* **35**, 1187-1193 (2005).
150. Rubegni P, Sbano P, Cevenini G, Carcagnì MR, D'Ascenzo G, De Aloe G, Guidi S, Guglielmelli P, Marotta G, Lauria F, Bosi A, Fimiani M., Role of extracorporeal photochemotherapy in patients with refractory chronic graft-versus-host disease. *Br J Haematol* **130**, 271-275 (2005).
 151. R. Couriel *et al.*, Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of steroid-resistant chronic GVHD. *Blood* **107**, 3074-3080 (2006).
 152. Duzovali O, Intensive extracorporeal photochemotherapy in pediatric patients with chronic graft-versus-host disease (cGVHD). *Pediatr Blood Cancer*. **48**, 218-221 (2007).
 153. Rubegni, G. Cevenini, M.G. Perarf, G. Marotta, M. Risulo, M.R. Carcagni, G. D'Ascenzo, G. De Aloe and M. Fimia, CD4+CD25+ Lymphocyte subsets in chronic versus host disease patients undergoing extracorporeal photochemotherapy. *Int J Immunopathol Pharmacol* **20**, 801-807 (2007).
 154. P. Perseghin *et al.*, Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of chronic graft-versus-host disease: trend for a possible cell dose-related effect? *Ther Apher Dial* **11**, 85-93 (2007).
 155. Greinix HT, Elmaagacli AH, Hillen U, Grigg A, Knobler R, Parenti D, Reddy V, Theunissen K, Michallet M, Flowers ME; UVADEX Chronic GVHD Study Group., Progressive improvement in cutaneous and extracutaneous chronic graft-versus-host disease after a 24-week course of extracorporeal photopheresis--results of a crossover randomized study. *Biol Blood Marrow Transplant* **17**, 1775-1782 (2011).
 156. Dignan FL, Cox M, Cavenagh J, Oakervee H, Apperley JF, Fielding AK, Pagliuca A, Mufti G, Raj K, Marks DI, Amrolia P, Peniket A, Medd P, Potter MN, Shaw BE, Scarisbrick JJ., Efficacy of bimonthly extracorporeal photopheresis in refractory chronic mucocutaneous GVHD. *Bone Marrow Transplant* **47**, 824-830 (2012).
 157. Hongming Zhang, Jian Cheng, Nan Jin, Baoan Chen, Systematic review and meta-analysis of prospective studies for ECP treatment in patients with steroid-refractory acute GVHD. *Patient preference and adherence*, 105-111 (2015).
 158. S. R. Marshall, Technology insight: ECP for the treatment of GvHD--can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? *Nat Clin Pract Oncol* **3**, 302-314 (2006).
 159. Schmitt S, Karakhanova S, Näher H, Mahnke K, Enk AH., Extracorporeal photopheresis augments function of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells by triggering adenosine production. *Transplantation* **88**, 411-416 (2009).
 160. Biagi, I. Leoni, V. Gaipa, G. Rossi, V. Bugarin, C. Renoldi, G. Parma, M. Balduzzi, A. Perseghin, P. Biondi, A., 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* **84**, 31-39 (2007).
 161. L. I. Craciun *et al.*, Increased production of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist after extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* **74**, 995-1000 (2002).
 162. Di Biaso I, Bugarin C, Gaipa G, Dander E, Balduzzi A, Parma M, D'Amico G, Perseghin P, Biondi A, Biagi E., Regulatory T cells and extracorporeal photochemotherapy: correlation with clinical response and decreased frequency of proinflammatory T cells. *Transplantation* **87**, 1422-1425 (2009).

163. Alcindor T, Miller KB, Roberts TF, Sprague K, Schenkein DP, Foss FM., Immunomodulatory effects of extracorporeal photochemotherapy in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood* **98**, 1622-1625 (2001).
164. Gorgun, K. B. Miller, F. M. Foss, Immunologic mechanisms of extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease. *Blood* **100**, 941-947 (2002).
165. Dzionek A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J., BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* **165**, 6037-6046 (2000).
166. E. Gatz et al., Extracorporeal photopheresis reverses experimental graft-versus-host disease through regulatory T cells. *Blood* **112**, 1515-1521 (2008).
167. Christian M. Capitini, Shannon M. Larabee, Sarah Herby, Nicole M. Nasholm and Terry J. Fry., Extracorporeal photopheresis attenuates murine GVHD via bone marrow-derived IL-10 and preserves responses to dendritic cell vaccination. *Biol Blood Marrow Transplant* **17**, 790-799 (2011).
168. Van Boekel MA, van den Hoogen FH, van Venrooij WJ., Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Research* **4**, 87-93 (2002).
169. H. Todd JA, Bell JI, Chao N, Fronek Z, Jacob CO, McDermott M, Sinha AA, Timmerman L, Steinman L, et al., A molecular basis for MHC class II--associated autoimmunity. *Science* **240**, 1003-1009 (1988).
170. Somaiya Mateen , Shagufta Moin, Abdul Qayyum Khan, Swaleha Zubair, Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* **455**, 161-171 (2016).
171. Iain B. McInnes, The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N engl J Med* **365**, 2205-2219 (2011).
172. G. SL, The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr rheumatol rep* **11**, 365-370 (2009).
173. Sarkar S, Brucks M, Endres J, Fox DA, Zhou X, Alnaimat F, Whitaker B, Wheeler JC, Jones BH, Bommireddy SR., Interleukin (IL)-17A, F and AF in inflammation: a study in collagen-induced arthritis and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* **177**, 652-661 (2014).
174. Petrovic-Rackov L, Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF-alpha measurement in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* **25**, 448-452 (2006).
175. Edwards JC, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T., Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N engl J Med* **350**, 2572-2581 (2004).
176. STEPHEN E. MALAWISTA, AND, R. L. EDELSON, Photopheresis for Rheumatoid Arthritis. *Ann N Y Acad Sci*, (1991).
177. John A Zic, Georges P Stricklin, Lloyd E King Jr, The north american experience with photopheresis. *Therapeutic apheresis* **3**, 50-62 (1999).
178. Molochkov VA, Molochkov AV, Karzanov OV, Iakubovskaia ES, Fedulkina VA., [Clinical and immunological aspects of extracorporeal photochemotherapy for psoriasis and psoriatic arthritis]. *Ter Arkh* **84**, 64-74 (2012).
179. Vahlquist C, Ernerudh J, Berlin G, Skogh T, Vahlquist A., Treatment of psoriatic arthritis with extracorporeal photochemotherapy and conventional psoralen-ultraviolet A irradiation. *Arthritis Rheum* **39**, 1519-1523 (1996).
180. Kannan K, Kimpel D., Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology* **12**, 167-181 (2005).

181. Jansson L, Enhancement of collagen-induced arthritis in female mice by estrogen receptor blockage. *Arthritis Rheum* **4**, 2168-2175 (2001).
182. Brand DD, Rosloniec EF., Collagen-induced arthritis. *Nature protocol* **2**, 1269-1275 (2007).
183. Myers LK, Stuart JM, Terato K, David CS, Kang AH., T cell epitopes of type II collagen that regulate murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* **151**, 500-505 (1993).
184. Cho YG, Min SY, Kim HY., Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmunity rev* **7**, 65-70 (2007).
185. Lee, M. L.Jhun, J. Y.Min, S. Y.Ju, J. H.Yoon, C. H.Min, J. K.Park, S. H.Kim, H. Y.Cho, Y. G., Antigen-specific expansion of TCR Vbeta3+ CD4+ T cells in the early stage of collagen-induced arthritis and its arthritogenic role in DBA/1J mice. *J Clin Immunol* **26**, 204-212 (2006).
186. Leung BP, Esfandiari E, Wei XQ, Liew FY., Combined effects of IL-12 and IL-18 on the induction of collagen-induced arthritis. *J Immunol* **164**, 6495-6502 (2000).
187. Thornton S, Boivin GP, Ma Y, Hirsch R., Association of the course of collagen-induced arthritis with distinct patterns of cytokine and chemokine messenger RNA expression. *Arthrit Rheum* **42**, 1109-1118 (1999).
188. Van de Loo FA, van Lent PL, Arntz OJ, van den Berg WB., Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthrit Rheum* **38**, 164-172 (1995).
189. Joosten LA, van de Loo FA, van den Berg WB., Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. *Arthritis Rheum* **39**, 797-809 (1996).
190. Min-Jung Park, Hye-Joa Oh, Jung-Yeon Lim, Bo-Young Yoon, Ho-Youn Kim, Mi-La Cho and Seok-Goo Cho, IL-17-deficient allogeneic bone marrow transplantation prevents the induction of collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *Experimental and molecular medicine* **44**, 694-705 (2012).
191. Nakae S, Sudo K, Iwakura Y., Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* **171**, 6173-6177 (2003).
192. C. Q. Chu, Z. Song, L. Mayton, B. Wu, P. H. Wooley, IFNgamma deficient C57BL/6 (H-2b) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor Vbeta6 and Vbeta8 in arthritic joints. *Ann Rheum Dis* **62**, 983-990 (2003).
193. S. P, Prospects of apoptotic cell-based therapies for transplantation and inflammatory diseases. *Immunotherapy* **10**, 1055-1073 (2013).
194. F. Kleinclaus *et al.*, Intravenous apoptotic spleen cell infusion induces a TGF-beta-dependent regulatory T-cell expansion. *Cell Death Differ* **13**, 41-52 (2006).
195. A. Maeda *et al.*, Intravenous infusion of syngeneic apoptotic cells by photopheresis induces antigen-specific regulatory T cells. *J Immunol* **174**, 5968-5976 (2005).
196. Miyake Y, Kaise H, Uemura M, Nakayama M, Tanaka M., Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *J Clin Invest* **117**, 2268-2278 (2007).
197. A. Maeda *et al.*, 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* **181**, 5956-5962 (2008).
198. P. Sylvain, Apoptotic cell-mediated suppression of streptococcal cell wall-induced arthritis is associated with alteration of macrophage function and local regulatory

- T-cell increase: A potential cell-based therapy. *Arthritis research and therapy*, (2009).
199. Notley CA, Wright GP, Ehrenstein MR., Natural IgM is required for suppression of inflammatory arthritis by apoptotic cells. *J Immunol* **186**, 4967-4972 (2011).
 200. B. Francis, Apoptotic cell infusion treats ongoing collagen-induced arthritis, even in the presence of methotrexate, and is synergic with anti-TNF therapy. *Arthritis research and therapy*, (2016).
 201. Griffith TS, Cell death in the maintenance and abrogation of tolerance: the five Ws of dying cells. *Immunity* **35**, 456-466 (2011).
 202. K. S. Ravichandran, Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nature immunology* **16**, 607-617 (2015).
 203. McGaha TL, Ravishankar B, van Rooijen N, Karlsson MC., Marginal zone macrophages suppress innate and adaptive immunity to apoptotic cells in the spleen. *Blood* **117**, 5403-5414 (2011).
 204. P. Sylvain, CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nature Medicine*, (2008).
 205. Bittencourt MC, Contassot E, Fresnay S, Baron MH, Angonin R, Aubin F, Hervé P, Tiberghien P, Saas P., Intravenous injection of apoptotic leukocytes enhances bone marrow engraftment across major histocompatibility barriers. *Blood* **98**, 224-230 (2001).
 206. Sun E, Chen J, Roberts AI, Wang X, Chen Z, Shi Y., Allograft tolerance induced by donor apoptotic lymphocytes requires phagocytosis in the recipient. *Cell death differ* **11**, 1258-1264 (2004).
 207. F. Meloni *et al.*, Peripheral CD4(+)CD25(+) TREG Cell Counts and the Response to Extracorporeal Photopheresis in Lung Transplant Recipients. *Transplant Proc* **39**, 213-217 (2007).
 208. A. P. Lamioni, F. Isacchi, G. Giorda, E. Di Cesare, S. Landolfo, A. Cenci, F. Bottazzo, G. F. Carsetti, R., The immunological effects of extracorporeal photopheresis unraveled: induction of tolerogenic dendritic cells in vitro and regulatory T cells in vivo. *Transplantation* **79**, 846-850 (2005).
 209. A. Legitimo *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).
 210. Di Renzo M, De Aloe G, Pasqui AL, Rubegni P, Ghezzi A, Auteri A, Fimiani M., Extracorporeal photopheresis affects co-stimulatory molecule expression and interleukin-10 production by dendritic cells in graft-versus-host disease patients. *Clin Exp Immunol* **151**, 407-413 (2008).
 211. R. Spisek, Z. Gasova, J. Bartunkova, Maturation state of dendritic cells during the extracorporeal photopheresis and its relevance for the treatment of chronic graft-versus-host disease. *Transfusion* **46**, 55-65 (2006).
 212. Goussetis E, Tsirigotis P., Update on the mechanism of action and on clinical efficacy of extracorporeal photopheresis in the treatment of acute and chronic graft versus host disease in children. *Transfus Apher Sci* **46**, 203-209 (2012).
 213. Saas P, Perruche S., Concise review: Apoptotic cell-based therapies-rationale, preclinical results and future clinical developments. *Stem Cells* **34**, 1464-1473 (2016).
 214. T. Morelli, A. W., Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* **7**, 610-621 (2007).

215. C. N, Caspase-dependent immunogenicity of Doxorubin-induced tumor cell death. *J Exp Med*, (2005).
216. O. M, Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature Medicine*, (2007).
217. Panaretakis T, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund AC, Chapman DC, Durchschlag M, Joza N, Pierron G, van Endert P, Yuan J, Zitvogel L, Madeo F, Williams DB, Kroemer G, Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO journal* **28**, 578-590 (2009).
218. Sreyashi Basu, Thirumalai Ramalingam, and Pramod K. Srivastava, CD91 Is a Common Receptor for Heat Shock Proteins gp96, hsp90, hsp70, and Calreticulin. *Immunity* **14**, 303–313 (2001).
219. Berwin B, Rice S, Gass C, Pizzo SV, Post SR, Nicchitta CV., Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *EMBO journal* **22**, 6127-6136 (2003).
220. Fucikova J, Fialova A, Brtnicky T, Rob L, Bartunkova J, Spísek R., Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer research* **71**, 4821-4833 (2011).
221. G. Lorenzo, Immunogenic cell death in cancer and infectious diseases. *Nature reviews immunology*, (2016).
222. A. L, The interaction between HMGB1 and TLR-4 dictates the outcome of anti-cancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunological reviews*, (2007).
223. Ladoire S, Vetizou M, Locher C, Aymeric L, Apetoh L, Kepp O, Kroemer G, Ghiringhelli F, Zitvogel L., Cell-death-associated molecular patterns as determinants of cancer immunogenicity. *Antioxid Redox Signal.* **20**, 1098-1116 (2014).
224. Ghiringhelli. F et al, Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces Il-1beta-dependent adaptative immunity. *Nature Medicine*, (2009).
225. M. Obeid *et al.*, Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* **13**, 54-61 (2007).
226. Gameiro, radiation-induced immunogenic modulation of tumor enhances antigen processing and calreticulin exposure, resulting in enhanced T-cell killing. *Oncotarget*, (2013).
227. Bell CW, Reich CF 3rd, Pisetsky DS., The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**, 1318-1325 (2006).
228. Castano AP, Hamblin MR., Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* **6**, 535-545 (2006).
229. Niedre M, Wilson BC., Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo. *photochem photobiol* **75**, 382-391 (2002).
230. Chen Y, Li Y, Zhong J, Ji J, Shen P., Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. *Cancer sci* **99**, 2019-2027 (2008).
231. Garg AD, Golab J, Agostinis P., Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. *Apoptosis* **15**, 1050-1071 (2010).
232. Jiang H, North JR, Richter AM, Hunt DW., Selective action of the photosensitizer QLT0074 on activated human T lymphocytes. *Photochem photobiol* **76**, 224-231 (2002).

233. Agostinis, Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin. *cancer immunol immunother* **61**, 215–221 (2012).
234. Abhishek, D Garg, om Verfaillie, Agnieszka Kaczmarek, Gabriela B Ferreira, Thierry Marysael, Noemi Rubio, Malgorzata Firczuk, Chantal Mathieu, Anton JM Roebroek, Wim Annaert, Jakub Golab, Peter de Witte, Peter Vandenabeele and Patrizia Agostinis, A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO journal* **31**, 1062–1079 (2012).
235. Z. Laurence, Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* (2010).
236. Y. E, Extracorporeal photopheresis promotes Il-1beta production. *The journal of immunology*, (2015).
237. A. C. Moor *et al.*, Treatment with 8-MOP and UVA enhances MHC class I synthesis in RMA cells: preliminary results. *J Photochem Photobiol B* **29**, 193-198 (1995).
238. Hannani. et al., Extracorporeal photopheresis: tolerogenic or immunogenic cell death. *Frontiers in immunology*, (2015).
239. Adrian E. Morelli, Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. *Immunological reviews* **196**, 125–146 (2003).
240. David R. Gude, Steven W. Paugh, Poulami Mitra, JiaDe Yu, Rachael Griffiths, Suzanne E. Barbour, Sheldon Milstien, and Sarah Spiegel, Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a “come-and-get-me” signal. *FASEB journal* **22**, 2629–2638 (2008).
241. Gardai SJ, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM., Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* **123**, 321-334 (2005).
242. Lucy A. Truman, Marta Pasikowska, John D. Pound, Sarah J. Wilkinson, Ingrid E. Dumitriu, Lynsey Melville, Lauren A. Melrose, Carol Anne Ogden, Robert Nibbs, Gerard Graham, Christophe Combadiere, and Christopher D. Gregory, CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood* **112**, 5026-5036 (2008).
243. M. AE, The Immune Regulatory Effect of Apoptotic Cells and Exosomes on Dendritic Cells: Its Impact on Transplantation. *Am J transplant* **6**, 254–261 (2006).
244. Lauber K, Kröber SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S., Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* **113**, 713-730 (2003).
245. Elliott MR, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS., Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* **461**, 282-286 (2009).
246. Fadok VA, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM., Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**, 2207-2216 (1992).
247. Brown S, Ross E, Shaw K, Buckley CD, Savill J., Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* **418**, 200-203 (2002).
248. Chao MP, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh AA, Gentles AJ, Volkmer J, Weiskopf K, Willingham SB, Raveh T, Park CY, Majeti R, Weissman IL., Calreticulin is the

- dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Science Translational Medicine* **2**, (2010).
249. A. N. B. a. T. K. v. d. Berg, The Interaction Between Signal Regulatory Protein Alpha (SIRP α) and CD47: Structure, Function, and Therapeutic Target. *Annu Rev Immunol* **32**, 25-50 (2014).
 250. K. S. Ravichandran, Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* **35**, 445-455 (2011).
 251. Miyanishi M, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S, Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* **450**, 435-439 (2007).
 252. Freeman GJ, Umetsu DT, DeKruyff RH., TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* **231**, 172-189 (2010).
 253. Park D, Elliott MR, Lu M, Haney LB, Ma Z, Klibanov AL, Mandell JW, Ravichandran KS., BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* **450**, 430-434 (2007).
 254. Park SY, Kim HJ, Lee SJ, Kim SY, Lee BH, Kwon TH, Park RW, Kim IS., Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ* **15**, 192-201 (2008).
 255. Scott RS, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, Earp HS, Matsushima GK., Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* **411**, 207-211 (2001).
 256. Verneret M, Osman R, Awad R, Grichine A, Kleman JP, Frachet P., Relative contribution of c1q and apoptotic cell-surface calreticulin to macrophage phagocytosis. *J Innate Immunity* **6**, 426-434 (2014).
 257. Païdassi H, Verneret M, Gaboriaud C, Houen G, Duus K, Ling WL, Arlaud GJ, Frachet P., Investigations on the C1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition. *J Mol Biol* **408**, 77-90 (2011).
 258. Manderson AP, Walport MJ., The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* **22**, 431-456 (2004).
 259. Lintner KE, Yang Y, Spencer CH, Hauptmann G, Hebert LA, Atkinson JP, Yu CY., Early Components of the Complement Classical Activation Pathway in Human Systemic Autoimmune Diseases. *Front Immunol*, 7-36 (2016).
 260. Nagata S, Kawane K., Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* **140**, 619-630 (2010).
 261. U. S. Gaipil *et al.*, Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* **4**, 189-194 (2005).
 262. R. E. Voll *et al.*, Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**, 350-351 (1997).
 263. Fadok VA, 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* **101**, 890-898 (1998).
 264. McDonald PP, Bratton D, Henson PM., Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol* **63**, 6164-6172 (1999).
 265. U. Johansson, L. Walther-Jallow, A. Smed-Sorensen, A. L. Spetz, Triggering of dendritic cell responses after exposure to activated, but not resting, apoptotic PBMCs. *J Immunol* **179**, 1711-1720 (2007).

266. Hanping Feng, Michael W. Graner, and Emmanuel Katsanis, Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. *Blood* **101**, 4108-4115 (2002).
267. Rovere P, Bondanza A, Crosti MC, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Rugarli C, Manfredi AA, Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol* **161**, 4467-4471 (1998).
268. M. L. Albert, B. Sauter, N. Bhardwaj, Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**, 86-89 (1998).
269. J. Savill, I. Dransfield, C. Gregory, C. Haslett, A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* **2**, 965-975 (2002).
270. Chen W, Jin W, Wahl SM., TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* **14**, 715-725 (2001).
271. Yakun Gao, Hui Zhang, Thomas S. Griffith, and Thomas A. Ferguson, Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J Exp Med* **188**, 887-896 (1998).
272. Rubartelli A, Zocchi MR., The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur J Immunol* **27**, 1893-1900 (1997).
273. Ching Y. Voss, Max J. Coppes, and Morris A. Blajchman, Extending the Horizon for Cell-Based Immunotherapy by Understanding the Mechanisms of Action of Photopheresis. *Transfusion medicine reviews* **24**, 22-32 (2010).
274. Ronchetti, P. Iezzi, G. Galati, G. Heltai, S. Protti, M. P. Garancini, M. P. Manfredi, A. A. Rugarli, C. Bellone, M., Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J Immunol* **163**, 130-136 (1999).
275. R. M. Steinman, S. Turley, I. Mellman, K. Inaba, The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* **191**, 411-416 (2000).
276. Stuart LM, Simpson C, Lamb J, Savill J, Lacy-Hulbert A., Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol* **168**, 1627-1635 (2002).
277. Sauter B, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N., Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* **191**, 423-434 (2000).
278. Albert ML, Darnell RB., Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* **2**, 1010-1017 (2001).
279. G. Liu, C. Wu, Y. Wu, Y. Zhao, Phagocytosis of apoptotic cells and immune regulation. *Scand J Immunol* **64**, 1-9 (2006).
280. Scheffer SR, Korangy F, Schlote K, Pabst R, Jaffee EM, Manns MP, Greten TF., Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo. *Int J Cancer* **103**, 205-211 (2003).
281. Hanping Feng, Luke Whitesell, and Emmanuel Katsanis, Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity. *Blood* **97**, 3505-3512 (2001).
282. Gurung P, Ferguson TA, Griffith TS., Activation-induced CD154 expression abrogates tolerance induced by apoptotic cells. *J Immunol* **183**, 6114-6123 (2009).
283. Lutz MB, Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* **23**, 445-449 (2002).
284. G. AD, Immunogenic versus tolerogenic phagocytosis during anti-cancer therapy: Mechanisms and clinical translation. *Cell death and differentiation*, (2016).

285. Mosmann, H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, R. L. Coffman, Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348-2357 (1986).
286. Mosmann, R. L. Coffman, TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**, 145-173 (1989).
287. K. M. Murphy, S. L. Reiner, The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 933-944 (2002).
288. S. Leung *et al.*, The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol Immunol* **7**, 182-189 (2010).
289. K. Hirahara *et al.*, Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: implications for immune-mediated disease. *J Allergy Clin Immunol* **131**, 1276-1287 (2013).
290. L. Zhou, M. M. Chong, D. R. Littman, Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity* **30**, 646-655 (2009).
291. I. Raphael, S. Nalawade, T. N. Eagar, T. G. Forsthuber, T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* **74**, 5-17 (2015).
292. W. Chen *et al.*, Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* **198**, 1875-1886 (2003).
293. C. T. Weaver, R. D. Hatton, P. R. Mangan, L. E. Harrington, IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* **25**, 821-852 (2007).
294. C. Dong, TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* **8**, 337-348 (2008).
295. M. Kleinewietfeld, D. A. Hafler, The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol* **25**, 305-312 (2013).
296. S. Sakaguchi, D. A. Vignali, A. Y. Rudensky, R. E. Niec, H. Waldmann, The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* **13**, 461-467 (2013).
297. L. E. French *et al.*, Identification of clonal T cells in the blood of patients with systemic sclerosis: positive correlation with response to photopheresis. *Arch Dermatol* **137**, 1309-1313 (2001).
298. C. IR., Regulation of autoimmune disease physiological and therapeutic. *Immunol rev* **94**, 5-21 (1986).
299. B. nun, Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature*, (1981).
300. X. N. Shan Li, Yebin Xi, Shaohua Deng, Chengzhen Li, Qing Zhao, and Guangjie Chen, T Cell Vaccination Inhibits Th1/Th17/Tfh Frequencies and Production of Autoantibodies in Collagen-Induced Arthritis. *Clin Dev immunol*, (2013).
301. Jingwu Zhang, Piet Stinissen, David Hafler, Jef Raus, MHC-Restricted Depletion of Human Myelin Basic Protein-Reactive T Cells by T Cell Vaccination. *Science*, (1993).
302. Ivanova I, Mamaev S, Shishkov A, Seledtsov V., Immune responses induced by T-cell vaccination in patients with rheumatoid arthritis. *Human Vac immunother* **10**, 1221-1227 (2014).
303. Maritza Perez, Yasuhiro Yamane, Lori John, Carole L. Berger and Richard L. Edelson, Inhibition of Antiskin Allograft Immunity Induced by Infusions with Photoinactivated Effector T Lymphocytes (PET Cells). Is In Vivo Cell Transferrable? *Ann N Y Acad Sci*, (1991).

304. Wehler TC, Brandt B, Britten CM, Gröne M, Todorova M, Link I, Khan SA, Meyer RG, Huber C, Hartwig UF, Herr W., Targeting the activation-induced antigen CD137 can selectively deplete alloreactive T cells from antileukemic and antitumor donor T-cell lines. *Blood* **109**, 365-373 (2007).
305. J. Briones, S. Novelli, J. Sierra, T-cell costimulatory molecules in acute-graft-versus host disease: therapeutic implications. *Bone Marrow Res* **2011**, 976793 (2011).
306. X. Ge, J. Brown, M. Sykes, V. A. Boussiotis, CD134-allodepletion allows selective elimination of alloreactive human T cells without loss of virus-specific and leukemia-specific effectors. *Biol Blood Marrow Transplant* **14**, 518-530 (2008).
307. A. Langenkamp, M. Messi, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* **1**, 311-316 (2000).
308. R. D. Sandri S, Gomes E, Monteiro HP, Russo M, Campa A, Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *J Leukoc Biol* **83**, 1174-1180 (2008).
309. H. J. Wu, E. Wu, The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut microbes* **3**, 4-14 (2012).
310. J. H. Esensten, D. Wofsy, J. A. Bluestone, Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* **5**, 560-565 (2009).
311. K. Shäkel et al., 6-sulfo LacNac, a novel carbohydrate Modification of PSGL-1, defines an inflammatory Type of Human Dendritic cells. *Immunity* **17**, 290-297 (2002).
312. Gerner M, Hölig K, Wehner R, Zhao S, Schäkel K, Bachmann MP, Rieber EP, Bornhäuser M, Schmitz M. Extracorporeal photopheresis efficiently impairs the proinflammatory capacity of human 6-sulfo LacNac dendritic cells. *Transplantation* **87**, 1134-1139 (2009).
313. Rieber N, Wecker I, Neri D, Fuchs K, Schäfer I, Brand A, Pfeiffer M, Lang P, Bethge W, Amon O, Handgretinger R, Hartl D. Extracorporeal photopheresis increases neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in patients with GvHD. *Bone Marrow Transplant* **49**, 545-552 (2014).
314. Kushwah R, Hu J. Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell Bioscience*, (2011).
315. Levings MK, Roncarolo MG. Phenotypic and functional differences between human CD4+CD25+ and type 1 regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **293**, 303-326 (2005).
316. El-Asady R, et al. TGF- β -dependent CD103 expression by CD8(+) T cells promotes selective destruction oh the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease. *J Exp Med* **201**, (2005).

Résumés

La photochimiothérapie extracorporelle (PCE) est une immunothérapie autologue, basée sur la réinjection de cellules photochimiquement modifiées. La PCE a démontré son efficacité dans le traitement des formes avancées du CTCL, dans la GvHD ainsi que dans d'autres pathologies médiées par la présence de lymphocytes T pathogènes (rejets de greffes d'organes, pathologies auto-immunes), sans provoquer d'immunossuppression généralisée. Bien qu'utilisée depuis de nombreuses années, les mécanismes d'action de la PCE restent peu connus. L'objectif de ma thèse était de les étudier et de mettre en place un modèle chez la souris pour permettre une optimisation des protocoles cliniques. Deux hypothèses ont été testées pour expliquer l'efficacité de la PCE : la mort « tolérrogène » où l'effet obtenu serait lié à la génération de lymphocytes T régulateurs et la mort « immunogène » où l'effet pourrait s'expliquer par la génération de lymphocytes T cytotoxiques.

L'utilisation de cellules mononucléées humaines obtenues chez des donneurs sains nous a permis de générer des lymphocytes T alloréactifs activés et de montrer que les lymphocytes T traités PUVA émettaient une partie des molécules dites de danger (DAMPs), décrites comme immunogènes, telles que la Calréticuline ou encore le HMGB1. Ces cellules sont phagocytées par les macrophages et les moDCs, mais ne sont pas capables d'induire leur maturation, ce qui n'engendre donc pas de stimulation du système immunitaire.

L'utilisation d'un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde (CIA) nous a permis de montrer l'efficacité de la PCE dans le traitement de cette pathologie. De plus, nos résultats montrent que l'efficacité du traitement repose sur la présence de lymphocytes T issus de souris « arthritique » dans l'échantillon traité.

En conclusion, les mécanismes d'action de la PCE ne semblent pas être associés au concept de mort immunogène. Le modèle de polyarthrite rhumatoïde induite par le collagène chez la souris permettra de poursuivre l'étude des mécanismes d'action et d'optimisation de la PCE.

Mots clés : Immunothérapie, Immunomodulation, CTCL, GvHD, polyarthrite rhumatoïde murine induite par le collagène.

Extracorporeal photopheresis (ECP) is an autologous immunotherapy based on the reinfusion of photochemical modified mononuclear cells. ECP efficacy is demonstrated in treatment of CTCL, in GvHD and in others T-cell mediated diseases (organ transplant rejection and auto-immune diseases). ECP does not generate generalized immunosuppression. Although it has been used for years, mechanisms of action of ECP are not totally understood. The objective of my thesis was to study these mechanisms of action and set up a murine model to allow an optimization of the clinical protocols. Two hypotheses have been tested to explain the effectiveness of ECP: "Tolerogenic" cell death where the effect would be related to the generation of regulatory T lymphocytes and "immunogenic" death where the effect could be explained by the generation of cytotoxic T lymphocytes.

The use of human mononuclear cells obtained from healthy donors enabled us to generate activated alloreactive T cells and to show that the PUVA-treated T-cells emitted a part of the danger molecules (DAMPs), described as immunogenic, such as Calreticulin or HMGB1. These cells are phagocytosed by macrophages and moDCs but do not induce their maturation, which does not therefore generate any stimulation of the immune system.

The use of a murine model of rheumatoid arthritis (CIA) allowed us to show the effectiveness of PCE in the treatment of this pathology. Moreover, our results show that the effectiveness of the treatment is based on the presence of T lymphocytes derived from "arthritic" mice in the treated sample.

In conclusion, the mechanisms of action of PCE do not seem to be associated with the concept of immunogenic death. The model of collagen-induced rheumatoid arthritis in mice will allow further study of the mechanisms of action and optimization of PCE.

Keywords: Immunotherapy, Immunomodulation, CTCL, GvHD, collagen induced arthritis.