

2m11.3468.7

Université de Montréal

Traitement photodynamique de la maladie du greffon
contre l'hôte chronique dans un modèle murin

Par

Pierre Fokam

Département de Médecine

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences biomédicales

Décembre, 2005

© Pierre Fokam, 2005



W
4
U58
2007
v.028

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Traitement photodynamique de la maladie du greffon
contre l'hôte chronique dans un modèle murin**

présenté par :

Pierre Fokam

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Sandra Cohen

Président-rapporteur

Dr. Denis-Claude Roy

Directeur de recherche

Dr. Michel Duval

Membre du jury

Résumé

La maladie du greffon contre de l'hôte chronique (GVHDc) est la principale cause de morbidité et de mortalité après une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Des thérapies immunosuppressives sont utilisées pour traiter la GVHDc, mais elles sont souvent inefficaces. Dans le but d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'agent photosensible 4,5-dibromorhodamine méthyl ester (TH9402) contre la GVHDc, nous avons utilisé un modèle murin de GVHDc. IL consiste en l'injection de splénocytes de souris B10.D2 (H2^d) à des souris BALB/c (H2^d) irradiées (600 cGy). Ces souris démontrent une perte de poids significative ($p < 0.05$) comparativement à celles ayant reçu des splénocytes syngéniques, une infiltration lymphoïde des follicules pileux, des canaux biliaires et une hyperplasie folliculaire sur le plan de la rate. Il y a aussi production d'auto-anticorps anti-ADN. Nous avons ensuite évalué le potentiel d'une approche photodynamique (PDT) à traiter la GVHDc. Lorsque exposés à la PDT, les lymphocytes T, B et NK provenant de souris ayant une GVHDc sont sélectivement éliminés, au contraire de ceux provenant des souris syngéniques. Les souris avec GVHDc et recevant des splénocytes traités à la PDT, à partir des jours 15 ou 55 post greffe, montrent une stabilisation significative de leur poids. Au contraire, celles recevant des cellules non traitées à la PDT présentent une perte de poids. La survie dans le groupe traité à la PDT est améliorée. De plus, l'évaluation post-traitement des auto-anticorps anti-ADN révèle une production à la baisse dans le groupe traité à la PDT. Au contraire, dans les groupes qui ont reçu des cellules non exposées à la PDT ou aucune cellule, le taux d'auto-anticorps présente un profil à la hausse en comparaison du taux avant traitement. L'évaluation du répertoire V bêta ($V\beta$), par spectratyping, dans le groupe de souris injectées avec des splénocytes traités à la PDT, suggère une amélioration de la reconstitution immunologique. En conclusion, nos résultats suggèrent qu'un traitement photodynamique associé au TH9402 pourrait avoir une activité anti-GVHD et potentiellement améliorer le devenir clinique des sujets présentant une GVHD chronique.

Mots clés : maladie du greffon contre l'hôte chronique, greffe de cellules souches hématopoïétiques, thérapie photodynamique, 4,5-dibromorhodamine méthyl ester (TH9402)

Abstract

Chronic graft versus host disease (cGVHD) is the main cause of morbidity and mortality after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. Immunosuppressive therapies can be used to treat patients with cGVHD, but they are often ineffective. With the aim of estimating the therapeutic potential of the photosensitive agent 4, 5-dibromorhodamine methyl ester (TH9402) against cGVHD, we have developed a mouse model of cGVHD. It consists on the injection of spleen cells from B10.D2 (H2^d) mouse, in irradiated (600 cGy) BALB/C (H2^d) mice. These mice demonstrate a significant loss of weight ($p < 0.05$) compared with those having received syngeneic spleen cells. Lymphoid infiltration of hairy follicles and bile ducts, and follicular hyperplasia at the level of the spleen. There is also production of anti-DNA auto-antibody. We then estimated the therapeutic potential of a photodynamic approach (PDT). When treated with PDT, T and B the lymphocytes as well as NK cells resulting from mouse having cGVHD are selectively eliminated, unlike those resulting from syngeneic mice. When these spleen cells are injected into mice with cGVHD, those receiving PDT treated spleen cells at days 15 or 55 post transplant show a significant stabilization of their weight. On the contrary, those receiving cells not treated with PDT, present a loss of weight. Survival in the PDT treated group is improved. Furthermore, the post-treatment evaluation of anti-DNA auto-antibody reveals a decline in production in the PDT treated group. On the contrary, groups that received either cells not exposed to PDT or no cells showed an increase in the production. The evaluation of the V beta repertoire, as measured by spectratyping, suggests an improvement of the immunologic reconstitution in the group of mice injected with splenocytes treated with the PDT. In conclusion, our results suggest that a photodynamic treatment associated to the TH9402 could have anti-GVHD activity and potentially improve the clinical future of subjects presenting chronic GVHD.

Key words: chronic graft versus host disease, hematopoietic stem cells transplantation, photodynamic therapy, 4,5-dibromorhodamine methyl ester (TH9402)

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	xi
Liste des figures.....	xii
Listes des sigles et abréviations.....	xiv
Dédicace	xvi
Remerciements	xvii
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
1. Introduction	2
1.1. Les greffes de cellules souches hématopoïétiques.....	2
1.1.1. La greffe de cellules souches autologues	2
1.1.2. La greffe de cellules souches allogéniques	4
1.1.3. Les complications liées aux greffes de CSHs	4
1.1.3.1. Complications dues au conditionnement	4
1.1.3.2. Complications dues aux infections.....	5
1.1.3.3. La rechute.....	5
1.2. La maladie du greffon contre l'hôte.....	6
1.2.1. Conditions de survenue de la GVHD.....	7
1.2.2. La GVHD aiguë	8
1.3. La GVHD chronique.....	9

1.3.1.	Pathogenèse de la GVHD chronique.....	9
1.3.2.	Pathophysiologie de la GVHD chronique.....	10
1.3.2.1.	Les lymphocytes T et la GVHD chronique.....	11
1.3.2.2.	Rôle du thymus	12
1.3.2.3.	Rôle des cytokines.....	12
1.3.2.4.	L'auto-immunité et la GVHD chronique	13
1.3.2.5.	Impact de la Cyclosporine A.....	14
1.3.3.	Incidence et facteurs de risques.....	14
1.3.4.	Manifestations cliniques de la GVHD chronique	16
1.3.4.1.	Classification de la GVHD chronique.....	16
1.3.4.2.	L'atteinte cutanée	16
1.3.4.3.	L'atteinte buccale	17
1.3.4.4.	L'atteinte hépatique.....	18
1.3.4.5.	L'atteinte digestive.....	19
1.3.4.6.	Autres manifestations de la GVHD chronique.....	19
1.3.5.	Prévention et traitement de la GVHD chronique	20
1.3.5.1.	Prévention de la GVHD chronique	20
1.3.5.1.1.	Déplétion des cellules T	21
1.3.5.1.2.	Inactivation des cellules présentatrices d'antigènes.....	22
1.3.5.2.	Traitement de la GVHD chronique : considérations générales.....	22
1.3.6.	Nouvelles approches thérapeutiques de la GVHDc	26
1.3.6.1.	Les lymphocytes T CD4 ⁺ CD25 ⁺ régulateurs	26
1.3.6.2.	Les Tregs peuvent-ils contrôler la GVHDc ?.....	27
1.3.6.3.	Avantages et inconvénients de l'usage des Tregs	28
1.4.	La thérapie photodynamique.....	29
1.4.1.	La thérapie photodynamique : un peu d'histoire !	29
1.4.2.	Mécanismes d'action physicochimique de la PDT	30
1.4.3.	Les agents photosensibles	35
1.4.3.1.	Les agents photosensibles de première génération	35

1.4.3.2.	Les agents photosensibles de seconde génération.....	36
1.4.3.3.	Propriétés du photosensibilisateur idéal.....	39
1.4.4.	Les modes de mort cellulaire induite par la PDT.....	40
1.4.4.1.	Apoptose et nécrose après la PDT	40
1.4.4.2.	L'effet de voisinage ("bystander").....	41
1.4.4.3.	Les dommages à l'ADN.....	41
1.4.5.	La PDT avec le 4,5-dibromorhodamine methyl ester	42
1.4.6.	Avantages et inconvénients de l'utilisation du TH9402 pour la PDT	46
1.5.	Problématique de recherche et importance du projet.....	48
1.6.	Hypothèse de travail	49
1.7.	Objectifs	50
1.7.1.	Objectif principal	50
1.7.2.	Objectifs spécifiques	50
	CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	51
2.	Matériel et Méthodes	52
2.1.	Souris.....	52
2.2.	Groupes expérimentaux	52
2.2.1.	Phase d'induction de la GVHDc.....	52
2.2.2.	Phase de traitement de la GVHDc	53
2.3.	Irradiation des souris receveuses.....	53
2.4.	Préparations des splénocytes.....	56
2.5.	Induction et suivi de la GVHDc.....	57
2.5.1.	Test Elisa quantitatif	58

2.5.2.	Coloration à l'hématoxyline-phloxine-éosine.....	59
2.5.3.	Analyses immunophénotypiques (Cytométrie en flux).....	60
2.5.4.	Effet de la GVHDc sur la production des lymphocytes CD4+CD25+	60
2.5.5.	Effet de la PDT sur les population lymphoïdes	61
2.5.6.	Traitement photodynamique des cellules.....	62
2.5.7.	Extraction d'ARN messager	63
2.5.8.	Synthèse d'ADN complémentaire.....	64
2.5.9.	Amplification par PCR.....	64
2.5.10.	Analyse spectrotypique (spectratyping).....	65
CHAPITRE III : RÉSULTATS.....		68
3.	Résultats.....	69
3.1.	Induction de la GVHDc.....	69
3.1.1.	Évaluation du poids des souris post greffe.....	69
3.1.2.	Évaluation clinique de la GVHDc.....	70
3.1.3.	Évaluation histologique de la GVHDc.....	73
3.1.4.	Cinétique de production d'anticorps anti-ADNdb	76
3.1.5.	Association entre les cellules CD4+CD25+ et la GVHDc	78
3.1.6.	Évaluation de la survie dans le groupe syngénique et GVHDc	80
3.2.	Traitement de la GVHDc.....	82
3.2.1.	Effet de la PDT sur les populations lymphoïdes.....	82
3.2.2.	Élimination spécifique des cellules activées par la PDT	84
3.2.2.1.	Effet de la PDT sur les CD4+CD25+ et CD4+CD25-	84
3.2.2.2.	Effet de la PDT sur les CD8+CD25+ et CD8+CD25-	86
3.2.2.3.	Effet de la PDT sur les lymphocytes B.....	88
3.2.2.4.	Effet de la PDT sur les cellules NK	90
3.2.3.	Effet de la PDT sur les lymphocytes T régulateurs.....	92

3.2.4.	Traitement des souris GVHDc par injection de splénocytes traités ou non à la PDT	94
3.2.4.1.	Effet du traitement sur le poids et la survie des souris.....	94
3.2.4.2.	Effet de la PDT sur le taux d'anticorps anti-ADNdb	100
3.3.	Analyse de la reconstitution immunologique.....	102
CHAPITRE IV : DISCUSSION		107
4.	Discussion.....	108
4.1.	Le model expérimental est-il représentatif de la pathologie telle que observée chez l'humain ?.....	108
4.2.	Nature du greffon injecté aux souris GVHDc	113
4.2.1.	La PDT élimine sélectivement les lymphocytes T alloréactifs.....	113
4.2.2.	Les cellules T vivantes après la PDT pourraient être des lymphocytes T régulateurs	114
4.2.3.	Élimination totale des lymphocytes B : avantage ou inconvénient pour le traitement ?.....	116
4.2.4.	Élimination partielle des cellules NK : avantage ou inconvénient pour le traitement ?.....	119
4.3.	Traitement de la GVHDc par injection de splénocytes	120
4.3.1.	L'injection des splénocytes traités à la PDT améliore le devenir clinique des souris GVHDc : Effet sur le poids et la survie.....	120
4.3.2.	L'injection des splénocytes traités à la PDT améliore le devenir clinique des souris GVHDc : Effet sur les auto-anticorps.....	122
4.3.3.	Mécanismes immunobiologiques de la thérapie photodynamique	123
4.3.4.	Mécanismes immunobiologiques de la thérapie photodynamique : importance de l'apoptose	124
4.3.5.	La réponse vaccinale T comme mécanisme immunobiologique de la thérapie photodynamique ?	126

4.3.6. La réponse vaccinale T comme mécanisme immunobiologique de la PDT : importance de la dose d'injection	127
4.3.7. Mécanisme immunobiologique de la thérapie photodynamique : impact des lymphocytes T régulateurs	129
4.4. Le traitement de la GVHDc par injection de splénocytes traités à la PDT améliore-t-il la reconstitution immunologique ?	130
Conclusions et Perspectives	132
Références	134

Liste des tableaux

Tableau I : Affections malignes et non malignes pouvant être indiquées pour une greffe de CSHs	3
Tableau II : Composition de la réaction de PCR utilisant la Taq ADN Polymérase et la solution Q	66
Tableau III : Séquences des oligo-nucléotides des régions variables V bêta et constante C bêta	67
Tableau IV : Récapitulatif des observations faites sur les coupes histologiques des souris GVHdc	75

Liste des figures

Figure 1 :	Principes photochimiques et photophysiques de la thérapie photodynamique	31
Figure 2 :	Mécanisme de type I impliqué dans la thérapie photodynamique.....	33
Figure 3 :	Mécanisme de type II impliqué dans la thérapie photodynamique	34
Figure 4 :	Structure moléculaire du 4,5-dibromorhodamine methyl ester	43
Figure 5 :	Représentation graphique des différents groupes expérimentaux au cours de la phase d'induction de la maladie du greffon contre l'hôte chronique.	54
Figure 6 :	Représentation graphique des différents groupes expérimentaux au cours de la phase de traitement de la maladie du greffon contre l'hôte chronique.....	55
Figure 7 :	Pourcentage du poids initial des souris injectées avec des splénocytes allogéniques et autologues.....	71
Figure 8 :	Évaluation clinique de la GVHDc.....	72
Figure 9 :	Coupes histologiques comparatives de la peau et du foie de souris syngéniques et GVHDc.....	74
Figure 10 :	Cinétique de production d'anticorps anti-ADNdb dans les souris GVHDc et syngéniques.	77
Figure 11 :	Pourcentage des cellules CD4+CD25+ après greffe de splénocytes chez les souris du groupe syngénique et GVHDc.....	79
Figure 12 :	Courbe de survie des souris dans les groupes GVHDc et syngénique après greffe de splénocytes	81
Figure 13 :	Effet de la PDT sur les splénocytes totaux provenant des souris syngéniques et GVHDc.....	83
Figure 14 :	Mécanisme de la mort cellulaire, induite par la PDT, sur les populations CD4+CD25+ et CD4+CD25-.....	85
Figure 15 :	Mécanisme de la mort cellulaire, induite par la PDT, sur les populations CD8+CD25+ et CD8+CD25-.....	87

Figure 16 : Mécanisme de la mort cellulaire, induite par la PDT, sur les lymphocytes B.....	89
Figure 17 : Mécanisme de la mort cellulaire induite par la PDT, sur les cellules NK.....	91
Figure 18 : Effet de la PDT sur les cellules ayant une fonction anti-proliférative.....	93
Figure 19 : Effet de l'injection des splénocytes traités ou non à la PDT sur le poids des souris GVHDc traitées à partir du jour 55 post greffe	95
Figure 20 : Effet de la PDT sur la survie des souris GVHDc et syngéniques traitées à partir du jour 55 post greffe.	97
Figure 21 : Effet de l'injection des splénocytes traités ou non à la PDT sur le poids des souris GVHDc traitées à partir du jour 15 post greffe	99
Figure 22 : Effet de la PDT sur la survie des souris GVHDc et syngéniques traitées à partir du jour 15 post greffe.	101
Figure 23 : Taux d'anticorps anti-ADNdb avant et après traitement.....	103
Figure 24 : Analyse phénotypique du répertoire V bêta de souris traitées à la PDT	105
Figure 25 : Pourcentage d'expression du répertoire V bêta sur les cellules CD4+ de souris normales et atteintes de GVHD	106

Listes des sigles et abréviations

8-MOP : 8-Methoxypsoralen

ADNdb : Acide desoxyribonucleique double brin

APC : Cellule présentatrice d'antigène

CFSE : Succinimidyl ester diacétate de carboxy fluoresceine ("Carboxy-fluoresceine diacetate succinimidyl ester")

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMH I : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CSA : Cyclosporine A

CSH : Cellule souche hématopoïétique

CTL : Lymphocytes T cytotoxiques ("Cytotoxic T lymphocytes")

ELISA : ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay")

GCSH : Greffe de cellules souches hématopoïétiques

GVHD : Maladie du greffon contre l'hôte ("Graft-Versus-Host-Disease")

GVHDa : Maladie du greffon contre l'hôte aiguë

GVHDc : Maladie du greffon contre l'hôte chronique

GVL : Greffon versus leucémie ("Graft versus Leukemia")

HLA : Antigènes leucocytaires humains ("Human Leukocyte Antigen")

IL-1 : Interleukine-1

IL-2 : Interleukine-2

IL-4 : Interleukine-4

IL-10 : Interleukine-10

INF- γ : Interféron gamma

IT : Immunotoxine

MDR : ("Multi-drug resistance")

miHA : Antigène mineur d'histocompatibilité

MLR : Réaction mixte lymphocytaire ("Mixed Lymphocyte Culture")

NK : Cellules tueuses naturelles ("Natural Killer")

PDT : Thérapie photodynamique ("Photodynamic Therapy")

PEC : Photophérèse extracorporelle

Pgp : Glycoprotéine P

PUVA : P (Psoralène) + UVA (rayons ultraviolets de type A)

Tconv : Lymphocyte T conventionnel

TCR : Récepteur des lymphocytes T ("T cell Receptor")

TGF- β : Facteur de croissance transformant bêta ("Transforming Growth Factor beta")

Th1 : Lymphocyte T "helper-1"

Th2 : Lymphocyte T "helper-2"

TH9402 : 4,5-dibromorhodamine méthyl ester

TNF- α : Facteur de nécrose de tumeur alpha ("Tumor Necrosis Factor alpha")

Treg : Lymphocyte T régulateur

UV : Rayons ultraviolets

UVA : Rayons ultraviolets de type A

UVB : Rayons ultraviolets de type B

UVC : Rayons ultraviolets de type C

Dédicace

*À mon feu père, André Nokam,
qui croyait en la richesse de l'éducation et m'a toujours encouragé dans ma quête
perpétuelle du savoir. Cher père, toi qui n'as jamais douté de ma volonté et des mes
capacités à poursuivre des études supérieures, retrouve, ici, le fruit des efforts que tu n'as
jamais cessé de consentir afin que ton fils, que tu appelais déjà Professeur, puisse avancer
dans sa recherche de l'excellence.*

*À mes défuntes sœurs, Désirée Noëlle Kapchie et Virginie Kengne,
dont le départ aura constitué un des moments les plus pénibles de mon existence.
Le souvenir que j'ai gardé et garde de vous, chères sœurs, aura constitué une source
supplémentaire de motivation dans l'accomplissement de ce travail dont vous auriez été
fières. Vous resterez à jamais gravées dans ma mémoire.*

*À ma mère, Victorine Njuikom, qui a été profondément marquée par
les tristes événements de la vie. Je voudrais ici saluer ton courage et te rendre
hommage pour tous les efforts consentis depuis ma naissance. Chère mère, toi, pauvre
ménagère regarde le chemin parcouru par ton fils. Puisse ce mémoire sécher tes larmes et
conforter ta foi en Dieu, qui seul donne la vie et la reprend.*

Remerciements

Je voudrais, ici, témoigner ma reconnaissance au Dr Denis-Claude Roy, pour l'opportunité qu'il m'a offerte, afin que je puisse poursuivre mes études dans son laboratoire de recherche. Au delà de ses qualités intellectuelles et professionnelles indéniables, qu'il me soit permis de souligner, dans ces lignes, ses immenses qualités humaines, qui ont fait que durant ces années passées à ses côtés, il aura été pour moi, plus qu'un Directeur de recherche.

À tous les membres du laboratoire dont j'ai bénéficié de la disponibilité tout au long de mes travaux, je voudrais vous dire combien j'ai été heureux d'être en votre compagnie. Aussi, ne saurais-je oublier le soutien moral dont vous avez fait montre à mon égard, à la suite des tristes évènements qui m'ont marqué au cours de ces dernières années.

Ma reconnaissance va aussi au Dr Caroline Meunier, dont l'aide et l'expertise auront été d'un grand apport dans l'interprétation des coupes histologiques. Un grand merci à madame Josée Tessier pour le support technique, notamment dans l'analyse de la reconstitution immunologique par spectratyping.

À ma famille qui aura été là tout au long de ce cheminement, merci de votre patience et de vos multiples encouragements. Une reconnaissance particulière à monsieur Emmanuel Tokam qui a joué un rôle important dans la poursuite de mes études universitaires.

Finalement, je voudrais souligner le soutien logistique de la compagnie Celmed BioSciences dans l'établissement de ce travail.

«Dieu seul, auteur de toute chose, connaît parfaitement toute chose; l'homme n'atteint de certaines choses qu'une certaine connaissance : il y a des inconnues et même des inconnaissables dont nous n'avons nulle idée, et dans les choses connaissables, nous ne connaissons pas tout, ou si nous connaissons tout, nous ne pouvons même pas savoir que nous en connaissons tout ! Nos idées ne sont donc pas mesure absolue de l'être, mais mesure de notre science».

Roger Lefèvre

La Métaphysique de Descartes

Presses Universitaires de France, 2^e édition, 1966

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1. Introduction

1.1. Les greffes de cellules souches hématopoïétiques

Les greffes de cellules hématopoïétiques (GCSHs) sont utilisées en clinique pour le traitement de plusieurs affections malignes et non malignes (Tableau1). Il serait judicieux de mentionner qu'il est de plus en plus commode d'utiliser le terme de greffe de cellules souches hématopoïétiques en remplacement de celui de greffe de moelle osseuse. En effet, cela s'explique par le fait que, bon nombre de centres utilisent les cellules hématopoïétiques (CSHs) du sang périphérique ou de cordon, pour procéder au remplacement de la moelle chez les malades atteints de pathologies telles que les leucémies, les aplasies médullaires sévères, la maladie de Hodgkin, les lymphomes non Hodgkinien pour ne citer que celles-là.¹ Les greffes de CSHs reposent sur la destruction de la moelle osseuse du receveur appelé hôte. La moelle osseuse de l'hôte est par la suite remplacée par celle du donneur (greffon). La transplantation de CSHs peut être de nature autologue, syngénique ou allogénique dépendamment si le patient (receveur), un autre individu génétiquement identique ou non, est à l'origine des CSHs du greffon.^{2,3}

1.1.1. La greffe de cellules souches autologues

La greffe de CSHs autologues ou autogreffe, dans son principe, compte sur une restauration hématopoïétique où le receveur est son propre donneur. Elle consiste au prélèvement d'une certaine quantité de moelle osseuse du malade à un moment de l'évolution de sa maladie où celle-ci est riche en cellules saines. Le greffon ainsi prélevé peut être ou non purgé afin d'éliminer le maximum de cellules malignes. Le greffon est congelé afin d'être réinfusé plus tard au patient.

Tableau I : Affections malignes et non malignes pouvant être indiquées pour une greffe de CSHs

Maladies
Leucémie
Leucémie lymphoïde et myéloïde aiguë et chronique
Désordres lymphoprolifératifs
Myélome
Lymphome Hodgkinien et non-Hodgkinien
Tumeurs solides
Cancer du sein
Tumeurs germinales
Neuroblastome
Le sarcome d'Ewing
Tumeurs ovariennes
Sarcomes des tissus mous
Maladies non malignes
Anémie aplastique et anémie de Fanconi
Thalassémie majeure
Anémie avec cellules en faucille sévère
Porphyrie érythroïdique congénitale
Déficience immunitaire combinée sévère
Immunodéficiences de cellules T
Syndrome de Wiskott-Aldrich
Déficience du CD40 ligand (syndrome d'hyperimmunoglobuline M)
Maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde, lupus systémique érythémateux, sclérose en plaques...)
Déficience d'adhésion leucocytaire
Maladie granulomateuse chronique
Neutropénie congénitale sévère
Thrombasthénie de Glanzmann
Troubles de métabolisme (le syndrome d'Hurler, leucodystrophies, la maladie de Gaucher...)

N.B. : La liste ci-dessus est non exhaustive et inspirée de la publication de **Erich Vargas-Díez et al.**⁴

1.1.2. La greffe de cellules souches allogéniques

La greffe de CSHs allogéniques ou allogreffe est différente dans son principe puisque, le receveur et le donneur sont deux personnes différentes. Elle consiste à prélever les CSHs d'un donneur, apparenté ou non, compatible sur le plan des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou HLA ("Human Leucocyte Antigen"). Suivant ce principe, l'allogreffe peut être réalisée entre deux jumeaux monozygotes. On parlera alors de greffe syngénique. Dans le cas de deux frères ou sœurs de la même fratrie, on parlera de greffe géno-identique. Finalement, dans le cas de deux personnes non apparentées, on parlera d'une greffe phéno-identique.

1.1.3. Les complications liées aux greffes de CSHs

Les greffes conventionnelles de CSHs sont précédées par l'usage de grandes quantités d'agents cytotoxiques avec ou sans irradiation complète du patient. Ce traitement a généralement pour but l'élimination des cellules cancéreuses ainsi que la suppression de la réponse immune du patient dans l'optique d'éviter tout rejet du greffon.^{4,5} Cet état immunosuppresseur dans lequel se trouve le malade n'est pas sans conséquence pour ce dernier. En effet, que ce soit dans le cas d'une greffe de type autologue, syngénique ou allogénique, la greffe de CSHs est une procédure complexe sujette à plusieurs complications. Ces dernières peuvent être classées dans les catégories suivantes : complications dues au conditionnement de l'hôte, infections, la rechute ou **la maladie du greffon contre l'hôte**.

1.1.3.1. Complications dues au conditionnement

Il est clairement établi que la radiothérapie et la chimiothérapie sont à l'origine des complications durant la phase de conditionnement.⁶⁻¹⁰ Elles peuvent être de nature pulmonaire (fonction respiratoire, volume pulmonaire, capacité de diffusion du

monoxyde de carbone), thyroïdienne (hypothyroïdisme, thyroïdite), oculaire¹¹ (cataracte, syndrome sec) ou hépatique¹² (maladie veino-occlusive).

1.1.3.2. Complications dues aux infections

Le risque d'infection, dû aux différents pathogènes, varie avec le stade clinique au moment de la procédure de transplantation ainsi que les facteurs intrinsèques liés au receveur tel que la neutropénie. Dans la phase suivant immédiatement la transplantation, les infections bactériennes et fongiques sont les plus communes. Les virus du groupe herpès, représentent le risque majeur d'infection virale à ce stade. Dans la phase médiane suivant la transplantation (environ 100 jours), la plupart des infections sont dues à des organismes opportunistes qui étaient latents (virus herpes, adénovirus, papovavirus, pneumocystis carinii, toxoplasma gondii, etc). La phase avancée de la transplantation est sujette à des infections bactériennes touchant les voies respiratoires supérieures. Les infections fongiques sont aussi observées.^{6,13}

1.1.3.3. La rechute

La rechute peut intervenir même lorsque les indications de greffe ont été bien respectées. Les facteurs de gravité de la pathologie en cause peuvent expliquer la rechute observée chez le patient (certaines anomalies chromosomiques associées aux leucémies). Il est à mentionner que la rechute survient plus fréquemment chez des patients n'ayant pas eu de réaction du greffon contre l'hôte et très fréquemment lors de greffes où les lymphocytes T sont déplétés (les lymphocytes T sont enlevés du greffon). Par ailleurs, la rechute peut survenir si le greffon de CSHs contient des cellules malignes en nombre suffisant.

Une autre complication liée aux GCSHs est la maladie du greffon contre l'hôte. De toutes les complications, elle est celle qui représente un frein considérable au succès des greffes. Une étude plus détaillée de cette pathologie s'impose car elle occupe une place importante dans notre étude.

1.2. La maladie du greffon contre l'hôte

La principale complication des greffes de CSHs allogéniques est la maladie du greffon contre l'hôte ("Graft-Versus-Host-Disease" ou GVHD).¹⁴⁻¹⁹ La GVHD est une situation clinique correspondant à une activation (attaque) des cellules du donneur (greffon) contre les cellules de l'hôte.²⁰ Elle survient chez la plupart des sujets traités par des greffes allogéniques de cellules souches hématopoïétiques. La GVHD est d'autant plus importante que la compatibilité HLA est discordante entre le donneur et le receveur. C'est le cas des greffes HLA incompatibles et des greffes HLA identiques mais non apparentées. La GVHD peut aussi apparaître lorsqu'un patient immunodéprimé est transfusé avec des produits sanguins non irradiés.²¹ Dans de rares cas, elle peut être aussi observée chez un nouveau né présentant un déficit immunitaire sévère et ayant subi un transfert trans-placentaire des cellules T de la mère.²² La maladie du greffon contre l'hôte a été occasionnellement décrite chez les patients ayant reçu des greffes d'organes solides (petit intestin, foie...)²³

La pathophysiologie de la GVHD est complexe et n'est pas parfaitement connue. En effet, elle implique une immunité cellulaire et humorale, et des phénomènes inflammatoires. Par ailleurs, de nombreuses interactions entre ces différents types de réactions sont observées. Il est à noter que la GVHD n'est pas une réponse anormale du système immunitaire. Au contraire, les lymphocytes injectés ont un comportement approprié à l'environnement anormal dans lequel ils se trouvent. Ceci se justifie par le fait que, les lymphocytes T contenus dans le greffon sont injectés dans un environnement altéré par la maladie sous-jacente, les infections et le conditionnement (radiothérapie et chimiothérapie), responsables de phénomènes inflammatoires sur le plan des endothéliums et des épithéliums.²⁴

1.2.1. Conditions de survenue de la GVHD

Les conditions de survenue de la maladie du greffon contre l'hôte ont été établies, en 1966, par Billingham.²⁵

- Le greffon doit contenir des cellules immunocompétentes : de nos jours, il est clairement démontré que les lymphocytes matures contenus dans la moelle osseuse du donneur en sont les médiateurs.²⁶ Pour preuve, la déplétion du greffon en lymphocytes T prévient efficacement la GVHD. De plus, la sévérité de la GVHD présente une corrélation en ce qui a trait à la quantité et à la nature des lymphocytes T présents dans le greffon. Finalement, la cyclosporine A qui inhibe l'activation des cellules T a une action prophylactique sur la GVHD.
- Le receveur doit exprimer les antigènes tissulaires (majeurs ou mineurs) que ne possède pas le donneur. En effet, les antigènes HLA ont un rôle dans l'activation des cellules T.
- Comme autre prérequis, l'hôte doit être incapable de développer une réponse efficace pour détruire les cellules du greffon. Cet état immunodéprimé de l'hôte est essentiellement dû à la phase de conditionnement.

Il a été rapporté que la maladie du greffon contre l'hôte pouvait être observée dans le cas de greffes de CSHs autologues ou syngéniques.²⁷⁻³⁰ La GVHD, dans ces deux situations, est médiée par les cellules autoréactives ayant échappé à la sélection négative après la greffe. L'observation des signes cliniques de la GVHD chez les patients ayant subi des greffes autologues ou syngéniques a suggéré l'inclusion, comme autre critère, dans le postulat de Billingham, de la reconnaissance inappropriée des antigènes de l'hôte, par les cellules T immunocompétentes du greffon.²⁰

L'ensemble de ce processus dans lequel interviennent les lymphocytes T, les cellules NK (Natural killer), les macrophages, les cytokines et les conséquences cliniques qui y font suite, constitue la réaction de la maladie du greffon contre l'hôte.

En clinique, la GVHD est traditionnellement divisée en GVHD aiguë et chronique selon le temps de développement (avant ou après le jour 100 suivant la greffe), la pathophysiologie et les différentes présentations cliniques.

1.2.2. La GVHD aiguë

La maladie du greffon contre l'hôte aiguë (GVHDA) se développe théoriquement suivant une phase dite afférente et une autre dite efférente. Ces deux phases peuvent être divisées essentiellement en trois étapes. Au cours de l'étape 1, le régime de conditionnement (irradiation et/ou chimiothérapie) aboutit au dommage tissulaire de l'hôte (muqueuse intestinale, foie...). Il s'ensuit une sécrétion de cytokines inflammatoires tels : interleukine 1(IL-1), le facteur de nécrose de tumeurs alpha (TNF- α ; "Tumor Necrosis Factor"). La conséquence des actions de ces cytokines est l'augmentation de l'expression des antigènes du CMH, suivie de l'augmentation de la reconnaissance des antigènes majeurs ou mineurs de l'hôte par les cellules T alloréactives du donneur. L'activation des cellules T du donneur, dans l'étape 2, est caractérisée par la prolifération des cellules T helper 1 (Th1) et la sécrétion de l'IL-2 et de l'interféron gamma (INF- γ). Ces cytokines induisent une expansion substantielle des cellules T, une réponse des lymphocytes T cytotoxiques (CTL pour "Cytotoxic T Lymphocytes"), des cellules NK et stimulent les phagocytes à produire l'IL-1 et le TNF- α . L'étape 3 ou phase effectrice est caractérisée par les dommages tissulaires des organes cibles que sont la peau (érythème), le foie (cholestase), le tube digestif (diarrhée suite à une atteinte de l'intestin grêle).³¹ L'incidence et la sévérité de la GVHD aiguë ont diminué grâce à une meilleure connaissance de la compatibilité HLA et de l'utilisation des traitements immunosuppresseurs.

La maladie du greffon contre l'hôte chronique constitue l'objet principal de notre étude. Pour ce faire, nous accorderons une attention particulière à sa pathogenèse, sa pathophysiologie, ses manifestations cliniques, sa prévention ainsi qu'à son traitement.

1.3. La GVHD chronique

La maladie du greffon contre l'hôte chronique (GVHDc) apparaît, par définition, à partir du jour 100 suivant la greffe. Cependant, dans certains cas, elle peut se manifester deux années ou plus après la transplantation.³² La GVHD chronique affecte environ 50% des patients qui survivent à la transplantation et peut être létale pour 20% à 40% de ces derniers, cela en dépit de traitements intensifs.^{33,34} Cette forte incidence fait que la GVHDc est devenue la complication centrale des patients greffés survivant au-delà du centième jour. La GVHDc peut être précédée d'une GVHD aiguë, guérie, il s'agit de la forme dite quiescente. Dans le cas où la GVHD chronique fait suite à une GVHD aiguë évolutive, on parlera de la forme progressive. Finalement, dans certains cas, la GVHD chronique peut être le premier signe de la maladie du greffon contre l'hôte, c'est la forme dite de novo.^{35,36} La GVHDc représente une manifestation clinique pouvant affecter la peau, le foie, les muqueuses, le tube digestif, les poumons, etc. Biologiquement, il peut y avoir production d'auto-anticorps.

1.3.1. Pathogenèse de la GVHD chronique

La greffe allogénique de CSHs requiert l'ablation du système lymphohématopoïétique du patient par radiothérapie ou chimiothérapie. Ce système est par la suite remplacé par les CSHs saines et les lymphocytes du donneur qui peuvent être apparentés ou non. Quoique le donneur et le receveur soient généralement compatibles sur le plan des antigènes majeurs d'histocompatibilité, il subsiste cependant des différences sur le plan des antigènes mineurs d'histocompatibilité (miHA). Cette incompatibilité sur le plan des antigènes mineurs, conduit à l'activation des lymphocytes T correspondants du donneur. Ces lymphocytes T activés, la dérégulation de la production de diverses cytokines et le recrutement additionnel de cellules effectrices, causent des dommages à une variété de tissus et peut aboutir à la GVHD chronique.²⁰ Bien que le mécanisme décrit ci-dessus soit proche du mode de déclenchement de la GVHD aiguë, il est acquis que dans les deux cas, GVHD aiguë et GVHD chronique,

l'élément déclencheur demeure l'alloréactivité des lymphocytes T du donneur. La pathogenèse de la GVHDc reste donc mal comprise à ce jour. Suggérée par la similarité clinique de la GVHDc avec de nombreuses maladies auto-immunes tels le syndrome de Sjögren et la sclérose systémique progressive,³⁷ une hypothèse postule que la GVHD chronique serait médiée par les lymphocytes T auto-immuns.^{38,39} Il s'agit des cellules T du donneur qui reconnaissent des antigènes partagés par le donneur et le receveur et qui persistent à cause du mauvais fonctionnement du mécanisme de délétion et de régulation. Ces cellules causent des dommages à la suite d'une infiltration directe et amènent la dérégulation des plusieurs cytokines.⁴⁰ La GVHD chronique est associée à un état prononcé d'immunodéficience⁴¹ dû à une production biaisée de cellules T et B, à une fonction altérée des lymphocytes T, à la mauvaise production d'anticorps, le tout aggravé par la médication immunosuppressive utilisée pour son traitement. Ceci nous amène à explorer plus en détail, la pathophysiologie de la GVHD chronique.

1.3.2. Pathophysiologie de la GVHD chronique

Plusieurs modèles animaux de GVHD chronique existent.⁴²⁻⁴⁸ Toutefois, le coût et le temps pour leur établissement ont freiné l'investigation des bases immunobiologiques de la pathophysiologie de la GVHDc. En effet, la pathophysiologie de la GVHD chronique n'est pas bien comprise à ce jour. Ceci peut s'expliquer en partie par le déclenchement tardif de la maladie. De plus, le fait que les patients retournent fréquemment dans leur communauté, alors que pendant ce temps la GVHD chronique se développe, constitue un handicap dans l'étude clinique de la maladie. Néanmoins, plusieurs facteurs sont évoqués pour tenter d'expliquer la pathophysiologie de la GVHDc. En effet, dans les deux formes de GVHD, il y a activation, expansion des lymphocytes T alloréactifs, production des cytokines et maturation en cellules effectrices.⁴⁹

1.3.2.1. Les lymphocytes T et la GVHD chronique

Il a longtemps été admis que les lymphocytes T jouent un rôle important dans la GVHD.²⁶ Au début, on a espéré qu'un seul sous-ensemble de cellules T puisse agir comme le médiateur de la GVHD. Si cela avait été le cas, cette sous-population responsable de la GVHD aurait pu être éliminée spécifiquement, pendant que les sous-ensembles responsables de détruire le cancer du malade auraient été épargnés. Malheureusement cela n'est pas le cas. Les études précédentes de GVHD induites contre les antigènes majeurs ou mineurs, dans les souris, ont démontré que les cellules T CD4 et T CD8 peuvent agir comme médiateurs de la GVHD. De ce fait, l'alloréactivité forme la base de la pathogenèse de la GVHDc. En effet, que ce soit dans la GVHD aiguë ou dans la GVHD chronique, les cellules T matures contenues dans le greffon du donneur, jouent un rôle majeur dans la pathologie de la maladie du greffon contre l'hôte. Pour preuve, la suppression des lymphocytes T du greffon réduit de plus de 50% le risque de développement d'une GVHDc après une greffe HLA identique.⁵⁰ Les lymphocytes T impliqués dans la GVHD aiguë sont spécifiques d'alloantigènes, ceux impliqués dans la GVHD chronique reconnaissent des antigènes publics du CMH de classe II. Ces lymphocytes T produisent des cytokines de type T Helper 2 (Th2) (IL-4 et IL-10) et peuvent stimuler la production de collagène par les fibroblastes.⁵¹ Le phénotype exact et l'origine des cellules alloréactives demeurent ambigus.⁵² Cependant, les modèles animaux de GVHDc montrent que les clones de cellules T qui dérivent de la GVHDc sont les lymphocytes T CD4+, avec implication des cellules Th2,⁵³ alors que chez l'humain, les T CD4+ alloréactifs ont une polarité Th1 et Th2.⁵⁴⁻⁵⁶ L'activation clonale ou non des cellules T va donc contribuer à la génération des fonctions effectrices qui incluent la sécrétion des cytokines, les activités cytolytiques et la production d'anticorps. On suspecte les cellules T CD4+ post thymiques de jouer un rôle important dans la pathogenèse de la GVHD chronique.⁵⁷ Par ailleurs, la dose de lymphocytes T infusés dans le cadre d'une incompatibilité HLA aux niveaux des antigènes mineurs, peut déterminer si le patient va développer une GVHDa ou une GVHDc. En effet, des doses

élevées de cellules T vont favoriser une GVHDa alors que des petites doses vont plutôt initier une GVHDc.³⁹

1.3.2.2. Rôle du thymus

Le thymus joue un rôle critique dans la prévention de l'auto-immunité en générant les cellules T qui ne répondent pas aux antigènes du soi. Cependant, la fonction thymique diminue avec l'âge et ceci est encore plus marqué chez les patients ayant subi une greffe de CSHs. Cette dernière situation peut s'expliquer par l'effet combiné de la chimiothérapie, de la radiothérapie et de la GVHD aiguë.⁵⁸ La baisse de la fonction thymique résulterait donc en une diminution de la sélection négative ou favoriserait la génération de lymphocytes T extra-thymiques. La conséquence de ces facteurs serait l'augmentation de la fréquence des lymphocytes T périphériques autoréactifs.^{59,60} Des études suggèrent que la pathophysiologie de la GVHDc serait le résultat de lymphocytes T autoréactifs ayant échappé à la sélection négative dans le thymus.⁶¹ Le désordre observé sur le plan de l'apoptose thymique et l'échec de l'élimination de la majorité des cellules autoréactives provoqueraient un déséquilibre de l'homéostasie lymphocytaire et la perte de la tolérance au soi. Il s'ensuit une expansion des cellules T et de leurs fonctions effectrices, résultant en une auto-immunité dont les conséquences sur les organes seront dévastatrices pour le patient.³⁸

1.3.2.3. Rôle des cytokines

Les désordres auto-immuns résultent d'une interaction complexe entre les lymphocytes T et B, et les cellules NK, les cellules dendritiques agissant comme cellules présentatrices d'antigènes (APCs). Plusieurs cytokines et chimiokines induisent la migration et l'expansion des lymphocytes autoréactifs. Ces lymphocytes vont reconnaître des antigènes HLA de classe II dits publics.²⁰ Il s'ensuit une production d'IL-4 mais aussi d'IL-1, d'IL-10 et d'IFN- γ de la part de ces cellules T. Les taux de

TNF- α sont également augmentés. L'IL-4 va favoriser la production d'auto-anticorps. En association avec l'INF- γ , elle va stimuler la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène alors que l'IL-10 inhibe la production d'anticorps dirigés contre les antigènes environnementaux. La cytokine TGF- β ("Transforming Growth Factor") est l'une des cytokines critiques qui stimule la synthèse de collagène.⁶² Les études réalisées par Zhang et al. ont démontré que le TGF- β 1 jouait un rôle important dans la fibrose cutanée observée dans un modèle murin de GVHD sclérodermique. En association avec le TGF- β 1, les chimiokines MCP-1 et RANTES joueraient un rôle dans la pathologie de la GVHDc en attirant les monocytes-macrophages et les cellules T dans la peau, tout en affectant la synthèse des collagènes de type I et III, favorisant la progression vers le stade de fibrose.⁴⁰ Globalement, la GVHD chronique est donc plutôt considérée comme un désordre immunologique de type Th2.^{19,49,63}

1.3.2.4. L'auto-immunité et la GVHD chronique

La GVHDc se présente comme une maladie auto-immune.^{64,65} Dans la GVHDc, l'auto-immunité spécifique aux organes se développe car les cellules autoréactives Th2 peuvent initier une réponse aux antigènes du soi. Cette réponse va déclencher une hyperréactivité des lymphocytes B avec production d'auto-anticorps qui vont endommager les organes tels la peau, le foie, les glandes lacrymales ou les muqueuses.^{33,66} Spécifiquement, les cellules T CD4+ qui reconnaissent les antigènes du soi présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) de l'hôte, vont aider les cellules B de l'hôte à synthétiser et produire les auto-anticorps contre divers antigènes tissulaires du receveur. Plusieurs types d'anticorps anti-tissus ont été décrits : anticorps anti-noyaux, anti-muscles lisses, anti-mitochondries, anti-ADN double brin, anti-thyroïdiens et, plus rarement, anti-récepteurs de l'acétylcholine.⁶⁷⁻⁷³ L'importance clinique de ces auto-anticorps n'est toutefois pas encore claire. Le rôle de l'alloréactivité versus l'autoréactivité dans la pathogenèse de la GVHDc reste un sujet de débat dans la littérature. En effet, certaines études suggèrent que la GVHDc serait médiée par les lymphocytes T CD4+ autoréactifs, stimulés par les antigènes autologues de classe II

avec production des cytokines tels l'IL-4 et l'IFN- γ .⁷⁴⁻⁷⁶ Cependant, les lymphocytes T alloréactifs contre les antigènes mineurs ont été détectés dans les modèles murins et chez l'humain.^{77,78} L'importance de l'autoréactivité est appuyée par les manifestations cliniques de la GVHDc qui sont proches de plusieurs maladies auto-immunes. L'anémie hémolytique auto-immune est associée à la GVHD dont elle est parfois la première manifestation. Avec le purpura thrombopénique immunologique post greffe, ils constituent les manifestations classiques, d'une véritable auto-immunité, au cours de la GVHDc.^{5,79}

1.3.2.5. Impact de la Cyclosporine A

La cyclosporine A (CSA) est un immunosuppresseur ayant une action sélective sur les lymphocytes. Elle empêcherait l'apparition de lymphocytes T autoréactifs mais aussi autorégulateurs dans certains modèles animaux. À la suite à l'arrêt de la CSA, il y a apparition de cellules autoréactives qui vont provoquer la GVHD chronique. L'apparition de la GVHDc est favorisée, dans ce cas, par les lésions thymiques dues au conditionnement et à la GVHD aiguë. Par ailleurs, l'administration de CSA provoque une diminution du nombre de thymocytes ainsi que la disparition des cellules dendritiques. Il s'ensuit une réduction de la sélection positive due à la diminution du nombre de thymocytes simples positifs (CD4 ou CD8). La perte des cellules dendritiques, quant à elle, va accroître le nombre de lymphocytes double positifs (CD4 et CD8) dans les organes lymphoïdes périphériques ainsi que celui des lymphocytes CD4 autoréactifs.⁸⁰ Signalons cependant que la CSA toute seule ne peut induire la GVHD chronique.

1.3.3. Incidence et facteurs de risques

La GVHD chronique se manifeste chez environ 30% à 50% des patients ayant reçu une greffe HLA compatible et environ 60% à 70% des patients ayant reçu une

greffe d'un donneur non apparenté vont développer la maladie.⁸¹⁻⁸⁵ Le spectre de déclenchement présente un patron d'environ 19% de GVHD chronique de type progressif, 69% de type quiescent et finalement environ 12% de type de novo.⁸⁵ Les facteurs qui accroissent la probabilité de développer une GVHDc incluent : l'âge du receveur et du donneur. En effet, la GVHD chronique est observée chez environ 13% des patients âgés de 10 ans ou moins et chez 46% d'entre eux ayant plus de 20 ans.⁸⁶ Comme autres facteurs de risques, mentionnons un haut degré d'incompatibilité sur le plan des antigènes HLA, le recours à un donneur apparenté versus un donneur non apparenté et un historique d'infection au virus du groupe herpès de la part du donneur ou du receveur.^{82,87,88} Un donneur de sexe féminin représente aussi un facteur de risque associé à la GVHD chronique. Il a été démontré que la présence d'anticorps produits contre les antigènes mineurs, codés par le chromosome Y, serait impliquée dans la pathogenèse de la GVHD chronique. En effet, une corrélation entre de tels anticorps et la GVHD chronique a été clairement établie.^{89,90} L'utilisation de cellules souches du sang périphérique, en lieu et place de la moelle osseuse, ainsi que l'infusion des lymphocytes T du donneur dans le but de prévenir la rechute due aux cellules malignes résiduelles, représentent un risque de développer la GVHD chronique chez les patients.⁹¹ Le risque de GVHD chronique, associé à l'utilisation des CSHs du sang périphérique (50%-90% des greffes HLA compatibles⁹²⁻⁹⁴), comparativement à la moelle osseuse, peut s'expliquer par les différences qualitatives entre les deux types de greffons. Notamment une richesse accrue en lymphocytes lors des prélèvements périphériques.⁹⁵ À l'opposé, il semble que l'utilisation de sang de cordon comme source de CSHs soit associé à un risque diminué de GVHD chronique.⁹⁶ Les raisons liées à cette observation ne sont pas encore bien comprises. Une faible quantité de lymphocyte T alloréactifs et d'autres cellules présentes dans le sang de cordon, le jeune âge du receveur et l'utilisation des stéroïdes pourraient expliquer cette observation. Un nombre élevé de cellules CD34+ dans le greffon représente aussi un risque dans le développement d'une GVHD chronique.⁹⁷ L'expression du marqueur CD25 (chaîne α du récepteur de l'IL-2) sur les lymphocytes CD4+ et CD8+ du donneur s'est révélée être un risque pour le développement d'une GVHD chronique chez l'humain.⁹⁸ Une

allogreffe à conditionnement atténué semble conduire à un risque accru de GVHD chronique et/ou à des formes plus sévères.⁹⁹ Finalement et non la moindre, l'expérience d'une GVHD aiguë constitue le facteur de risque le plus important pour le développement d'une GVHD chronique.^{4,39,64,100}

1.3.4. Manifestations cliniques de la GVHD chronique

1.3.4.1. Classification de la GVHD chronique

La GVHD chronique peut être classée en se référant, au type de déclenchement de la maladie, tel que décrit par Sullivan et al. (progressif, quiescent, de novo).³⁶ Une autre approche consiste à classer la GVHD chronique suivant l'étendue de la maladie.¹⁰¹ Les sujets atteints de GVHD chronique ont, suivant ce mode de classification, une GVHD chronique dite limitée ou étendue. Dans la forme limitée, il y a des atteintes localisées de la peau avec ou sans dysfonctionnement des fonctions hépatiques. La forme étendue, quant à elle, est considérée comme étant une atteinte cutanée généralisée ou localisée en association avec des atteintes oculaires, hépatiques présentant une histologie anormale du foie (hépatite chronique progressive, cirrhose, etc) et d'autres organes cibles. Les malades peuvent être classés finalement en fonction de leur tableau histologique. Ils peuvent donc être décrits comme ayant une forme lichénoïde ou sclérodermique.

La GVHD chronique présente par conséquent une symptomatologie complexe pouvant toucher plusieurs organes. Elle affecte généralement la peau, les muqueuses orales, les yeux, les glandes salivaires. Le tractus respiratoire, gastro-intestinal et le foie sont aussi affectés.³³

1.3.4.2. L'atteinte cutanée

La GVHDc cutanée peut être différenciée en une phase dite lichénoïde se manifestant tôt et une dite sclérodermique tardive. Les deux types de lésions cutanées

peuvent se développer spontanément ou à la suite des radiations ultra violet (UV), ou encore à la suite d'un traumatisme physique.⁵² Spécifiquement, l'atteinte muqueuse ressemble à un lichen plan idiopathique, ne présentant pas un modèle de distribution typique. Les lésions évoluent par poussées, en plaques érythémato-squameuses puis se sclérosent et se pigmentent avec un liseré inflammatoire périphérique ("*lilac ring*").

Il existe également des plaques d'alopecie et des télangiectasies. L'ensemble évoque la sclérodermie malgré l'absence d'atteinte péribuccale et de phénomène de Raynaud.⁵ La GVHD sclérodermique peut impliquer le derme. La peau est épaisse, serrée et fragile avec une capacité de guérison affaiblie suite à une blessure. Le changement de pigmentation, hypo ou hyper pigmentation peut se produire. Dans les cas sévères, la peau peut se boursoufler (ampoules) suite à un drainage lymphatique insuffisant ou ulcérer suite à un traumatisme mineur. Puisque la sclérose affecte histologiquement le derme, la perte de cheveux et la destruction des glandes sudoripares sont communes. Les individus ont un risque d'hyperthermie conséquent à moins que leur environnement ne soit contrôlé. De ce fait, le débridement étendu des tissus devrait être évité. Malheureusement, les greffes de peau échouent souvent à la suite d'une infection ou au mauvais fonctionnement des capillaires et des lymphatiques. Les ongles peuvent être affectés par la GVHD chronique. Dans ce cas, les ongles développent des arêtes verticales et sont très fragiles. De plus, les problèmes d'ongles peuvent persister même après que les changements de peau aient été résolus. La perte de cheveux, dans les secteurs de la peau affectée, peut également persister après traitement, bien que le rétablissement des cheveux soit fréquemment un signe de guérison de la GVHD. Les cheveux fragiles précèdent souvent l'alopecie. Le grisonnement prématuré des cheveux, des sourcils et des cils peut se produire avec la GVHDc, même chez les enfants.

1.3.4.3. L'atteinte buccale

La GVHD orale commence d'habitude avec une xérostomie, fréquemment avec une sensibilité à la nourriture surtout aux nourritures épicées ou acides. La xérostomie précoce apparaît après la radiothérapie puis s'améliore progressivement à compter du 3^e

mois. Dans le cadre de la GVHD chronique, cette xérostomie s'accompagne d'une xérophtalmie (ophtalmie sèche) qui se développe à partir du 5^e mois et suit l'évolution de la sclérose cutanée. La maladie plus avancée peut causer une odynophagie en raison de l'extension des dommages. Dans la maladie peu sévère, un examen physique révèle un érythème avec des plaques blanches qui peuvent être confondues avec des infections herpétiques, pendant que des changements lichénoïdes extensifs sont observés dans la maladie avancée.¹⁰² Les pseudomembranes de grands ulcères persistants peuvent être trouvés n'importe où dans la bouche, y compris la langue et le palais, mais souvent le long des lignes de la bouche. Les dysfonctionnements salivaires majeurs ou mineurs peuvent survenir.¹⁰³ Les infections locales peuvent causer des changements dans les symptômes sans causer des modifications dans le devenir physique. Les infections secondaires avec les virus (herpès et le virus du papillome humain) et les champignons sont presque universelles et exigent d'habitude, chez les malades, un traitement aussi long que leur maladie orale persiste.

1.3.4.4. L'atteinte hépatique

Les tests de fonctionnalité du foie révèlent, d'une manière prédominante, des anomalies de type cholestatique. Comme dans la GVHD aiguë, les canaux biliaires sont la cible de la GVHD chronique dans 80 % des cas. Le tableau clinique est celui d'un ictère fluctuant, avec perte de poids, une cytolyse hépatique d'intensité variable et une cholestase. L'atteinte hépatique peut mimer une cirrhose primitive. Histologiquement, la cholestase sur le plan des hépatocytes péricentrolobulaires prédomine et est associée à des lésions des canaux biliaires avec parfois leur destruction complète. Il y a aussi la destruction des hépatocytes au contact des lymphocytes. Par ailleurs, le degré d'hyperbilirubinémie présente une corrélation significative avec l'issue clinique des patients souffrant d'une GVHD chronique que chez les malades avec une GVHD aiguë.³⁶ Les biopsies de foie sont d'un grand apport quand vient le moment d'établir un diagnostic précis. Cela est spécialement important chez les patients ne présentant pas d'autre

symptôme de GVHD chronique, d'autant plus que les infections et la toxicité des médicaments peuvent mimer les effets de la GVHD chronique.

1.3.4.5. L'atteinte digestive

L'atteinte digestive est rare au cours de la GVHD chronique. Cependant, elle peut entraîner des troubles de la motricité de l'œsophage, surtout dans sa partie supérieure, avec une inflammation diffuse source de dysphagie, de reflux, de douleur et la perte de poids insidieuse.¹⁰⁴ Des études manométriques démontrent une clairance insuffisante des acides et les anomalies motrices s'étendent de l'apéristalsie aux contractions de haute amplitude. Les conclusions radiographiques présentent la formation d'un réseau en toile et l'effilochement de structures dans l'œsophage moyen et supérieur.¹⁰⁵ Fait important, il a été possible de distinguer l'atteinte œsophagienne de la GVHD chronique de celle de la sclérose systémique progressive naturelle dans un examen codé des fibres de nerf provenant du matériel d'autopsie.¹⁰⁴ En effet, chez les patients GVHD chronique, les fibres nerveuses et les taches argentées du plexus myentérique étaient d'apparence normale chez ces derniers par opposition aux résultats chez les malades avec sclérodermie.

1.3.4.6. Autres manifestations de la GVHD chronique

La GVHD chronique s'accompagne de l'apparition d'auto-anticorps dans 10 à 60 % des cas : anticorps antinucléaires, anticorps anti-ADN et anti-muscle lisse, plus récemment anticorps anti-cytosquelette et anti-nucléolaires. Ces auto-anticorps sont le plus souvent isolés et sans signification pathologique. L'atteinte pulmonaire grave présente un tableau de bronchiolite oblitérante avec pneumopathie obstructive, résistante aux broncho-dilatateurs, qui assombrit le pronostic vital. L'atteinte oculaire, parfois asymptomatique et dépistée par le test de Schirmer, prend la forme d'un syndrome sec avec kérato-conjonctivite sèche (KCS). Les symptômes ophtalmiques de KCS incluent,

la brûlure, l'irritation, la photophobie et la douleur. Une cause plus commune d'acuité visuelle réduite est le développement de cataractes suivant les GCSHs.¹⁰⁶ Heureusement, la chirurgie de cataracte peut être exécutée de façon sécuritaire même en présence de sicca oculaire. Contrairement à la sclérodermie, la fibrose est inconstante et n'atteint pas la musculature. Des neuropathies périphériques, polymyosites, voire myasthénies, sont possibles. Les arthropathies sont secondaires aux rétractions tendineuses et à l'amyotrophie d'origine mixte, spécifique à la GVHD, et cortisonique. Les vaginites et restrictions vaginales ont été notées chez les femmes avec GVHD chronique,¹⁰⁷ de même que des effusions stériles récurrentes ont été aussi rapportées chez les malades avec GVHD chronique.¹⁰⁸ Dans l'état actuel des connaissances, les altérations de fonctions rénales et de la moelle osseuse chez les patients avec GVHD chronique, vivant à long terme, sont moins faciles à attribuer à la GVHD chronique.¹⁰⁹ Dans une étude, la GVHD chronique a été associée avec une pauvre croissance des cellules souches hématopoïétiques.¹¹⁰ Dans d'autres rapports, la thrombocytopénie et l'anémie ont été décrites.^{111,112} L'hypogammaglobulinémie et les inhibiteurs du facteur VIII ont été aussi notés chez les malades développant une GVHD chronique.^{113,114} Le traitement de la GVHD chronique avec les corticoïdes à long terme augmente le risque de formation de cataractes, de nécrose avasculaire et d'ostéoporose.^{113,115} Chez les enfants, la perte de poids et l'arrêt de la croissance ("runting") sont observés pendant le stade actif de la GVHD chronique. Toutefois, ces anomalies de croissance et de développement s'améliorent quand l'état du patient s'améliore et que la thérapie aux corticostéroïdes est retirée.

1.3.5. Prévention et traitement de la GVHD chronique

1.3.5.1. Prévention de la GVHD chronique

Comme il a été mentionné plus haut, l'expérience d'une GVHD aiguë, constitue le plus gros risque pouvant mener au développement d'une GVHD chronique. Autrement dit, l'utilisation de stratégies visant à prévenir la GVHD aiguë pourrait

contribuer à diminuer le risque de GVHDc. Malheureusement, les efforts consentis pour baisser le taux de GVHD aiguë ne se sont pas toujours traduits en une baisse de l'incidence de la GVHDc.⁹¹ Il existe toutefois deux exceptions majeures à ce constat : la déplétion des cellules T dans le greffon du donneur et l'utilisation de cellules souches de sang de cordon.^{2,116}

1.3.5.1.1. Déplétion des cellules T

Les premières expériences, utilisant des souris, ont clairement démontré que l'élimination des cellules de T du greffon avant la transplantation était un moyen efficace d'empêcher la GVHD.^{117,118} Fondées sur ces conclusions, plusieurs méthodes d'élimination des cellules T, y compris l'usage d'immunotoxines (IT) ont été développées. Des investigations ont rapporté que certaines IT, y compris les IT anti-CD3 dirigées contre un composant du récepteur de cellule T (TCR), pourraient tuer les cellules T humaines sans effet nuisible sur les cellules souches contenues dans le greffon du donneur.¹¹⁹ Plusieurs études cliniques ont suivi et ont démontré que les IT anticellules T pouvaient éliminer environ 2 à 3 logs de cellules T, résultant en une inhibition de la GVHD. Cependant, les problèmes ont tôt fait de subvenir. Un problème était l'élimination incomplète de cellules T avec pour résultante la GVHD. L'effet anti-GVHD avantageux observé à la suite de la déplétion des cellules T du donneur est souvent aussi accompagné d'un risque augmenté de rejet de greffe du donneur.¹²⁰ Un troisième problème représentant une restriction majeure est que ces cellules T du donneur peuvent jouer un rôle important afin de monter une réponse cytotoxique contre les cellules cancéreuses de l'hôte.¹²¹ Ce phénomène est connu sous le nom d'effet greffon contre leucémie (GVL pour "Graft-Versus-Leukemia").¹²² Il est certain, de nos jours, que l'enlèvement de cellules T du donneur retarde le rétablissement immunologique et compromet la réponse GVL. Il a été montré que le taux de rechute leucémique est plus élevé chez les malades recevant des transplantations HLA identiques utilisant des greffons déplétés des cellules T du donneur en comparaison de ceux ayant reçu une greffe sans déplétion des cellules T.¹²³

1.3.5.1.2. Inactivation des cellules présentatrices d'antigènes

Une autre approche utilisée pour prévenir la GVHD consiste à inactiver les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) du receveur.¹²⁴ En effet, la réponse des cellules T est initiée à partir des APCs. Dans les GCSHs allogéniques, il y a présence à la fois des APCs du donneur et du receveur. Les APCs du receveur seraient essentielles à l'induction de la GVHD, d'autant que les peptides présentés aux T CD8+ par les molécules du CMH I sont dérivés de gènes d'origine endogènes.¹²⁵ Signalons, toutefois, que des études récentes ont démontré que les APCs du donneur peuvent aussi avoir un rôle dans la pathologie de la GVHD, ceci par le phénomène de présentation croisée. Fait intéressant, ces APCs du donneur n'auraient aucune implication dans l'effet GVL. Par conséquent, la déplétion des APCs du donneur pourrait aussi être utilisée en général comme approche préventive de la GVHD.¹²⁶

Les approches pharmacologiques utilisées pour prévenir la GVHDc comptent sur l'utilisation prolongée de la cyclosporine, l'addition des immunoglobulines ou de la thalidomide, malheureusement avec un succès limité.^{2,127} Cependant, l'utilisation de doses décroissantes de globuline anti-thymocyte, au moment de la phase préparatoire du receveur, semble montrer un effet positif en ce qui a trait à la prévention de la GVHDc sans incidence sur la prise du greffon.¹²⁸

1.3.5.2. Traitement de la GVHD chronique : considérations générales

Plusieurs points devraient être pris en considération lorsque vient le moment de traiter la GVHD chronique. En effet, les succès les plus notables, à la suite du traitement des patients atteints de la GVHD chronique semblent être observés quand une approche systématique au diagnostic est entreprise par une équipe multidisciplinaire dont les membres partagent un intérêt pour ce désordre complexe. En plus, des médecins et des infirmières expérimentés en GCSHs, les membres d'équipe devraient inclure des

dermatologues, ophtalmologues, dentistes, diététiciens, thérapeutes et professionnels physiciens ainsi que des ouvriers sociaux. Les pathologistes avec l'expertise dans les manifestations histologiques de la GVHDc seraient aussi d'une importance cruciale. Puisque la GVHD chronique peut affecter pratiquement n'importe quel organe, les conseillers dans des secteurs spécialisés tels que la médecine de réadaptation, la gastroentérologie, la médecine pulmonaire, la neurologie et les maladies infectieuses, peuvent être des ressources d'une valeur inestimable à l'équipe traitante étant donné que ces derniers sont très souvent en contact avec des patients atteints de GVHD chronique. En effet, même si le patient ne peut pas retourner au centre de greffe, cette équipe devrait pouvoir l'aider dans des approches de gestion.¹²⁹

1.3.5.2.1. Traitement systémique primaire

Les corticostéroïdes ont longtemps constitué le soutien thérapeutique de la GVHD chronique lorsque celle-ci a été décrite pour la première fois. Avant l'utilisation de la cyclosporine, des agents multiples, utilisés en faible dose comme la cyclophosphamide, procarbazine, la globuline anti-thymocyte et l'azathioprine ont été évalués en combinaison avec la prednisone dans une tentative d'améliorer la réponse. Aucune de ces combinaisons n'a amélioré la réponse ou la mortalité. Au contraire, l'addition de cyclosporine orale (6 mg/kg toutes les 12 h, tous les deux jours) chez les patients avec GVHD et thrombocytopenie (représentant une maladie à haut risque) a semblé améliorer la survie.⁶⁴ Cependant, les infections demeurent une cause fréquente de morbidité et ont contribué à la mortalité liée à la greffe chez les patients atteints de GVHD chronique à haut risque. La valeur de traitement initial avec cyclosporine + prednisone dans la GVHD chronique à risque standard (plaquettes sanguines > 100,000 / μ L) a été comparée à prednisone administrée seule.¹³⁰ Bien que la combinaison puisse réduire la toxicité liée aux stéroïdes, il n'y avait aucun effet avantageux sur la rechute et sur la survie. À ce jour, l'on ne saurait parler d'une thérapie standard de la GVHDc. Toutefois, les cliniciens utilisent préférentiellement, en première ligne, la cyclosporine A (10 mg/kg/jour) et la prednisone (1 mg/kg/jour) pour le traitement de la GVHD

chronique. En effet, la cyclosporine et la prednisone semblent augmenter la survie chez les patients à un haut risque avec une thrombocytopénie ou une atteinte cutanée extensive.¹³¹

1.3.5.2.2. Traitements secondaires

Approches pharmacologiques

En cas de résistance à ces agents, des thérapies de seconde ligne sont utilisées. Comme il n'existe aucune approche éprouvée pour les patients réfractaires à la thérapie, le meilleur choix semble être leur inclusion dans des études cliniques. En effet, il y a eu plusieurs études de phase I et II chez les patients ayant rechuté et présentant une GVHDc réfractaire. De tels patients ont été inclus dans l'étude de Seattle¹³¹ évaluant la combinaison de la cyclosporine A (CSA) et de la prednisone, prise de manière alternative, et celle de Baltimore sur la thalidomide.¹³² Vogelsang et al. et d'autres ont observé que la réponse des patients à haut risque de GVHDc, lorsque soumis à la thalidomide, était de l'ordre de 20 à 30%.^{132,133} Malheureusement, certains effets secondaires, particulièrement la sédation et la constipation, sont intolérables pour beaucoup de patients.¹³⁴ De plus, la thalidomide ne devrait pas être considérée pour des patients présentant des neuropathies préexistantes.¹²⁹

D'autres approches potentielles incluent l'azathioprine, tacrolimus, le mycophénolate et la photophérèse. L'azathioprine est parfois employée chez les patients réfractaires aux stéroïdes, mais il est probablement mieux de l'éviter en raison de son effet myélo-suppressif.¹³⁵ L'utilisation du tacrolimus (FK506) chez les patients résistants aux stéroïdes a été rapportée par Tzakis et al.¹³⁶ Le traitement de la forme lichénoïde de la GVHDc par le mycophénolate a montré une rémission complète chez plus de 70% des cas. Le traitement secondaire de la GVHD chronique cutanée avec l'halofuginone (un inhibiteur de collagène) et l'étrétinate (un rétinoïde synthétique) a montré un certain bénéfice clinique.¹³⁷⁻¹³⁹ Une activité apparente dans la GVHD chronique réfractaire aux stéroïdes a aussi été rapportée avec le daclizumab (un

anticorps monoclonal anti-IL-2) et l'etanercept (une protéine de fusion entre le récepteur au TNF et le domaine Fc d'une immunoglobuline humaine).^{140,141}

Approches non pharmacologiques

Une autre modalité explorée est l'utilisation de la photophérèse extracorporelle.¹⁴²⁻¹⁴⁶ La photophérèse extracorporelle (PEC) est une technique de thérapie cellulaire qui consiste à réinjecter chez le patient des cellules mononucléées autologues prélevées par cytophérèse et irradiées avec une lumière UVA en présence d'une molécule photoactivable. La PEC repose sur l'interaction d'un photosensibilisateur exogène, le 8-méthoxypsoralène (8-MOP) avec le rayonnement ultraviolet A dont l'activité biologique n'est observée que lorsqu'il est associé à un photosensibilisateur. Les deux paramètres susceptibles de moduler l'activité thérapeutique sont donc la dose d'UVA délivrée aux cellules et la concentration de psoralène. La PEC pourrait inhiber la réponse des clones T anti-donneur chez le receveur et ainsi diminuer de façon spécifique le rejet de greffe sans les effets secondaires des drogues immunosuppressives ou, au contraire, inhiber les clones T du donneur dans la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) après greffe de cellules souches hématopoïétiques. Les données expérimentales obtenues chez la souris supportent cette hypothèse et montrent que la PEC a une efficacité potentielle en transplantation. Notamment dans la prévention du rejet de greffe d'organe, dans la prévention du rejet de greffe de peau ou dans le traitement de la GVHD.^{147,148} Chez l'homme, la PEC a été utilisée dans le traitement du rejet de greffe de cœur, de poumon, de rein et dans le traitement de la GVHD. L'ensemble des résultats indique qu'elle est une méthode non toxique et permettant d'induire un état de tolérance spécifique vis-à-vis du greffon, sans aggraver le déficit immunitaire causé par l'utilisation des immunosuppresseurs. Les données concernant plus de 260 patients atteints de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) et traités par photophérèse extracorporelle (PEC) ont été rapportées.^{142-146,148-150} Dans un premier temps, la PEC a été évaluée en « dernière ligne » dans le traitement de la GVHD chronique résistante. Elle est aujourd'hui utilisée

de plus en plus tôt dans le traitement de la GVHD chronique et aiguë, voire dans la prévention de la GVHD.

Effets secondaires de la photophérese extracorporelle

Les effets secondaires de la PEC sont peu fréquents. En effet, la PEC n'induit pas de modification significative du nombre des lymphocytes ou des polynucléaires. Les fonctions des polynucléaires ne sont pas altérées. Toutefois, de rares cas d'anémie ont été décrits ainsi que des cas de carcinome cutané. Par ailleurs, on sait maintenant que la puvathérapie augmente l'incidence des cancers génitaux qui apparaissent de nombreuses années après l'exposition.¹⁵¹ Un des effets secondaires de la puvathérapie est la survenue de picotements ou de douleurs cutanées. Ces manifestations, parfois insupportables, surviennent après les premières semaines de traitement et peuvent persister plusieurs semaines après l'arrêt de la photothérapie.^{152,153} En effet, de fortes démangeaisons et des douleurs cutanées après une puvathérapie ont été décrites pour la première fois en 1979¹⁵⁴ et représentent l'un des effets secondaires les plus désagréables à court terme. Ces complications surviennent dans 5 à 18 % des cas et peuvent varier en intensité. Les démangeaisons et les douleurs cutanées peuvent être insensibles aux thérapies et sont parfois si intenses qu'elles empêchent le patient de dormir. Même après l'arrêt de la puvathérapie, les troubles peuvent encore persister pendant des semaines, voire des mois.

1.3.6. Nouvelles approches thérapeutiques de la GVHDc

1.3.6.1. Les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ régulateurs

Récemment, une sous population particulière de cellules T CD4⁺ qui exprime constitutivement la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25) et qui constitue 5% à 10% de tous les lymphocytes T CD4⁺, tant chez les souris que chez l'humain, a été identifiée pour son rôle crucial dans le contrôle du processus de l'auto-immunité.^{155,156}

En effet, il a été démontré, dans des modèles murins différents, que la déficience de ces cellules régulatrices CD4+CD25+ (Tregs), occasionnait l'apparition de multiples maladies auto-immunes (thyroïdite, gastrite, oophorite et diabète auto-immun).

Une propriété particulièrement importante de ces Tregs est leur capacité à induire la suppression *in vitro* de l'activité des lymphocytes T CD4+ ou T CD8+ dits conventionnels.¹⁵⁷ L'effet suppresseur nécessite leur activation via leur récepteur. Ainsi les propriétés immunosuppressives des Tregs justifient leur utilisation pour la mise sur pied d'une approche de thérapie cellulaire de la GVHD.

1.3.6.2. Les Tregs peuvent-ils contrôler la GVHDc ?

Des rapports récents ont montré que les Tregs jouaient un rôle majeur dans l'induction de la tolérance aux greffes allogéniques.¹⁵⁸⁻¹⁶¹ De plus, il a été démontré que les Tregs pouvaient être utilisés dans des stratégies visant à contrôler la GVHD après une GCSHs allogéniques tout en permettant une reconstitution immunitaire importante et le maintien d'un effet GVL.^{162,163} Cohen et al.¹⁶⁴ ont observé que les cellules T régulatrices, naturellement présentes dans l'inoculum, retardaient l'apparition de la GVHD. En effet, l'administration au moment de la greffe d'un grand nombre de lymphocytes Tregs frais, syngéniques au donneur, permettait de prévenir ou de retarder considérablement la mort par GVHD. Cet effet thérapeutique était également obtenu après transfert de Tregs cultivés pendant plusieurs semaines en présence d'IL-2 et de cellules présentatrices d'antigènes syngéniques au receveur. Les cellules ainsi obtenues, spécifiques des alloantigènes du receveur, régulaient la GVHD de manière spécifique. L'effet spécifique pouvant s'expliquer par le fait que les cellules Tregs cultivées et spécifiques des alloantigènes d'un individu « A » ont un effet thérapeutique lorsqu'elles sont injectées à l'individu de type « A » mais pas chez un receveur de type « B ». Il semblerait donc que les Tregs inhibent de façon spécifique les lymphocytes T conventionnels alloréactifs (Tconv) impliqués dans la GVHD sans empêcher les autres Tconv non-alloréactifs de proliférer au sein de l'organisme receveur.

1.3.6.3. Avantages et inconvénients de l'usage des Tregs

Un fait non négligeable est que les Tregs présentent de grandes similitudes tant chez l'homme que chez la souris. En effet, plusieurs travaux ont mis en évidence l'existence de Tregs chez l'homme qui expriment aussi à leur surface les molécules CD4, CD25 et CD62L (ligand de CD62) permettant de les distinguer de lymphocytes T CD4+ conventionnels activés.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Il est possible de les prélever à partir du sang, ce qui les rend facilement accessibles. De plus, le gène Foxp3 récemment décrit pour son expression exclusive par les Tregs semble avoir une activité similaire chez l'homme et la souris.¹⁶⁸ Cette grande similitude des propriétés des Tregs, observée chez la souris et l'homme, est un point très important d'autant plus que l'objectif à terme est de développer une approche thérapeutique applicable à l'homme.

Toutefois, une limitation majeure pour l'utilisation clinique des Tregs, en vue d'empêcher la GVHD, est la difficulté d'obtenir un nombre suffisant de ces cellules relativement rares d'un unique donneur. Cette insuffisance pourrait potentiellement être résolue par la culture de cellules. En effet, il a été démontré que l'expansion in vitro des Tregs était possible à la suite d'une stimulation in vitro avec des splénocytes allogéniques irradiés en présence d'IL-2. L'administration des Tregs obtenues dans ces conditions, au moment de la greffe, était capable de retarder voire empêcher le développement de la GVHD.¹⁶⁴ L'enjeu, aujourd'hui, est donc de générer des Tregs en grande quantité tout en respectant les conditions de bonnes pratiques de fabrication.

Une nouvelle approche utilisée pour le traitement de la GVHDc est la thérapie photodynamique (PDT). En effet, l'évaluation de la PDT dans la prévention et le traitement de la GVHD est d'actualité. Comme la PDT constitue la pierre angulaire de notre projet, il est plus que nécessaire que nous y accordions une attention particulière.

1.4. La thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique (PDT) est une approche thérapeutique prometteuse utilisée dans le traitement de certains types de cancer et de certaines maladies non oncologiques.¹⁶⁹ La PDT associe la lumière visible, de longueur d'onde spécifique, à l'oxygène et à un médicament sensible à la lumière afin de détruire différents types de cellules.

1.4.1. La thérapie photodynamique : un peu d'histoire !

L'utilisation de la lumière comme un agent thérapeutique est une réalité qui peut être retracée jusqu'à l'antiquité. Elle a été utilisée en Egypte antique, en Inde et en Chine pour traiter des maladies de peau, comme le psoriasis, le vitiligo et le cancer, aussi bien que le rachitisme et même la psychose. Les Grecs antiques ont employé l'exposition au soleil comme approche thérapeutique et les bains de soleil étaient, par ailleurs, un passe-temps populaire.^{170,171} Cependant, ce n'est que récemment que les effets thérapeutiques de la lumière ont été largement utilisés en médecine. Au courant du XVIII^e et XIX^e siècle en France, la lumière du soleil a été utilisée dans le traitement de conditions diverses, incluant la tuberculose, le rachitisme, le scorbut, le rhumatisme, la paralysie, l'oedème et la fatigue musculaire. La photothérapie nouvelle fut développée par le médecin danois Niels Finsen qui, à la fin du dernier siècle, a décrit le traitement réussi de la variole en utilisant la lumière rouge qui a empêché la suppuration des pustules. Il a alors continué à utiliser la lumière ultraviolet pour traiter la tuberculose cutanée, ce qui lui a valu un Prix Nobel en 1903.¹⁷²

Le concept de mort cellulaire induite par l'interaction de la lumière et des produits chimiques a été rapporté il y a au moins 100 ans. En effet, Oscar Raab, étudiant en médecine travaillant avec le Professeur Herman von Tappeiner à Munich, au cours d'une étude sur les effets de l'acridine, a découvert que la combinaison d'acridine rouge et de lumière avait un effet mortel sur l'*Infusoria*, une espèce de paramécie.¹⁷³

L'expérience avait été exécutée pendant un orage quand les conditions d'éclairage ambiantes étaient peu communes. Il a démontré que cet effet était moins marqué lorsque l'acridine ou la lumière étaient utilisés seuls, ou que l'acridine était exposée à la lumière et ensuite ajoutée aux paramécies. Raab avait donc découvert la propriété optique de la fluorescence et avait conclu que ce n'était pas la lumière, mais plutôt un certain produit de la fluorescence qui induisait la toxicité *in vitro*. Il a postulé que cet effet était causé par le transfert d'énergie de la lumière au composé chimique.¹⁷²

Finalement, le premier rapport faisant état de l'administration parentérale d'un agent photosensible chez l'humain remonte à 1900 par Prime, un neurologue français, qui a utilisé l'éosine oralement dans le traitement de l'épilepsie. Il a, cependant, découvert l'induction de dermatite dans les secteurs de la peau exposés au soleil. Cette découverte a alors mené à la première application médicale d'une interaction entre un composé fluorescent et la lumière. Von Tappeiner et un dermatologue nommé Jesionek ont utilisé une combinaison d'éosine et de lumière blanche pour traiter des tumeurs de peau. Ensemble avec Jodlbauer, von Tappeiner a continué à démontrer la nécessité de l'oxygène dans des réactions de photosensibilisation. En 1907, ils ont présenté le terme "l'action photodynamique" pour décrire ce phénomène.

1.4.2. Mécanismes d'action physicochimique de la PDT

La PDT requiert l'association d'un agent photosensible avec un activateur qui est la lumière et un co-activateur qui n'est autre que l'oxygène. Un photosensibilisateur est une molécule qui possède généralement un groupement chromophore. Fait important, seul le photosensibilisateur est inactif (en absence de lumière), mais, par absorption de lumière, il passe à un état excité. Une fois excité, il peut réagir avec les molécules environnantes. De manière plus détaillée, les principes photochimiques et photophysiques de la PDT (Figure 1) se présentent comme suit. En présence de lumière de longueur d'onde appropriée, l'agent photosensible est excité et passe donc de l'état inactif (S_0) au premier état excité (S_1), suivi par la conversion à l'état de triplet (T_1). La durée de vie plus longue de l'état de triplet permet l'interaction de l'agent photosensible

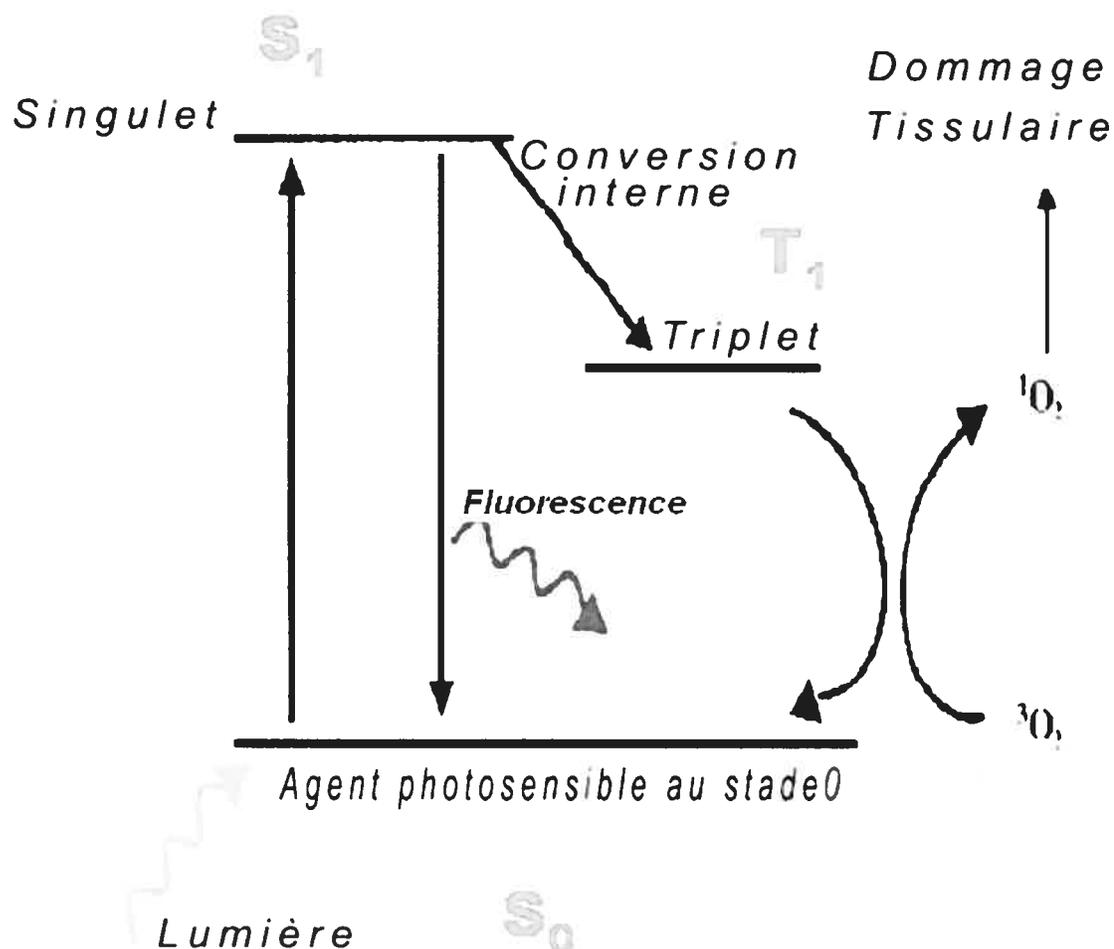


Figure 1 : Principes photochimiques et photophysiques de la thérapie photodynamique

Le photosensibilisateur passe de l'état fondamental (S_0) à son premier état excité (S_1), oxygène singulet, lorsque soumis à la lumière d'une longueur d'onde appropriée. Cet état singulet possède une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, pas assez durable pour interagir avec les molécules biologiques de son environnement. L'état singulet excité peut dissiper son énergie par une émission radiative (fluorescence), une extinction non-radiative (conversion interne), une réaction photochimique impliquant l'état singulet ou par système d'inversion de spin qui conduit à un état d'énergie moindre, métastable : c'est l'état triplet (T_1). Ce processus d'inversion de spin est important pour dissiper l'énergie de l'état singulet excité. Le retour de l'état triplet à l'état d'énergie fondamental peut ensuite se faire par conversion interne phosphorescente ou réaction photochimique impliquant l'état triplet. La durée de vie des espèces à l'état triplet est généralement de l'ordre de la microseconde ou milliseconde. Cela donne le temps nécessaire au photosensibilisateur excité de réagir avec les molécules environnantes.

excité avec les molécules environnantes et il est généralement admis que la génération de l'espèce cytotoxique produite pendant la PDT se fait pendant cet état. L'état de triplet excité peut réagir de deux façons définies, soit les mécanismes de type I et type II.

Un mécanisme de type I (Figure 2) implique l'abstraction d'un atome d'hydrogène ou une réaction de transfert d'électron entre l'état excité du photosensibilisateur et un substrat qui peut être biologique, un solvant ou un autre agent photosensible et la libération des radicaux libres et des ions. Les radicaux libres sont généralement très réactifs et peuvent aisément interagir avec l'oxygène moléculaire pour produire des oxygènes réactifs comme des anions super oxydes ou des radicaux hydroxyles. Ces réactions produisent des dégâts oxydatifs qui peuvent, finalement, s'exprimer comme des lésions biologiques.

Au contraire, un mécanisme de type II (Figure 3) résulte d'un transfert d'énergie entre l'état triplet excité de la molécule photosensible et l'oxygène moléculaire non actif, produisant le premier état excité d'oxygène singulet. Ce singulet d'oxygène est extrêmement réactif et peut interagir avec un grand nombre de substrats biologiques induisant des dommages oxydatifs et finalement la mort cellulaire.

Il est généralement admis que le processus de type II prédomine pendant la PDT et que le singulet d'oxygène est l'agent cytotoxique primaire responsable des effets biologiques observés.¹⁷⁴ Le mécanisme de type I devient plus important lorsque les concentrations d'oxygène sont basses ou dans des environnements plus polaires.¹⁷⁵ Cependant, ces deux types de mécanismes mènent aux dégâts oxydatifs semblables.

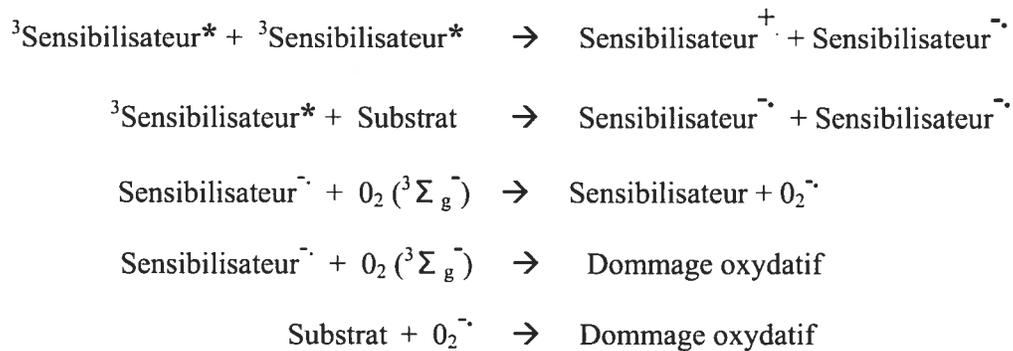


Figure 2 : Mécanisme de type I impliqué dans la thérapie photodynamique

Le mécanisme de type I implique une abstraction de l'hydrogène ou une réaction entraînant un transfert d'électron entre l'état excité du photosensibilisateur et le substrat produisant des radicaux libres et des ions radicalaires. Ces espèces radicalaires sont généralement plus réactives et réagissent rapidement avec les molécules d'oxygène pour générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme les anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et les radicaux hydroxyles. Certaines réactions peuvent provoquer des dommages irréversibles. Les dommages générés par ces espèces oxydées mènent éventuellement à des lésions biologiques observées en PDT.

Abréviations : $\text{O}_2 ({}^3\Sigma_g^-)$, oxygène au stade fondamental (stade 0), (*), état excité, (·) radicaux libres.

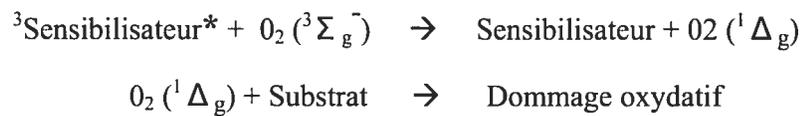


Figure 3 : Mécanisme de type II impliqué dans la thérapie photodynamique

Le mécanisme de type II, entraîne un transfert d'énergie de l'état triplet excité du photosensibilisateur à une molécule d'oxygène, provoquant la production de l'état singulet excité de l'oxygène.

Abréviations : $\text{O}_2({}^3\Sigma_g^-)$, oxygène au stade fondamental (stade 0), $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$, oxygène singulet

1.4.3. Les agents photosensibles

Les agents photosensibles sont des composés ayant la capacité d'absorber la lumière d'une longueur d'ondes spécifique et la transformer en énergie utile. Dans le cas de PDT, cela implique la production d'agents cytotoxiques mortels. Il y a des centaines d'agents naturels et synthétiques qui peuvent fonctionner comme photosensibilisateurs pour la PDT, allant des dérivés végétaux aux composés synthétiques complexes. La caractéristique clef de n'importe quel agent photosensible est sa capacité à s'accumuler préférentiellement dans le tissu malade et de produire par la suite des agents cytotoxiques pour induire l'effet biologique désiré. De nos jours, il existe plusieurs agents photosensibles développés au cours du temps et appartenant à diverses générations.

1.4.3.1. Les agents photosensibles de première génération

Les agents photosensibles de première génération sont les dérivées de l'hématoporphyrine telle la Photofrine[®].¹⁷⁶ Les dérivées de l'hématoporphyrine sont actuellement les agents photosensibles les plus utilisés. La Photofrine[®], commercialisée par la firme QLT PhotoTherapeutics (Vancouver, Canada), est présentement utilisée en clinique dans plusieurs pays, dont le Canada, pour le traitement des phases précoces et avancées des cancers du poumon, de l'œsophage, de l'estomac et de la vessie, ainsi que du cancer cervical et la dysplasie cervicale.¹⁷⁷

En dépit leurs succès apparents, les dérivées de l'hématoporphyrine ont deux inconvénients majeurs. Tout d'abord, ces composés sont aisément absorbés et conservés par le tissu cutané jusqu'à environ dix semaines post-injection. Cela cause une photosensibilité marquée de la peau qui exige que le patient évite la lumière du soleil; c'est un inconvénient très important, particulièrement pour des patients ayant un cancer très avancé. Ensuite, la Photofrine[®] a un certain nombre de pics d'absorption entre 400 et 650 nm, or sa bande absorbante la plus faible, soit 630 nm, est utilisée le plus souvent

pour exciter le photosensibilisateur car la pénétration du tissu par la lumière augmente avec la longueur d'onde.

Bien que de tels inconvénients, n'aient pas arrêté l'utilisation de la Photofrine[®], comme outil utile contre le cancer et d'autres conditions, la recherche de nouveaux agents photosensibilisateurs était plus que nécessaire.

1.4.3.2. Les agents photosensibles de seconde génération

Un certain nombre de photosensibilisateurs de deuxième génération ont été développés pour surmonter les défauts de la Photofrine[®]. En effet, les agents photosensibles de seconde génération, pour être efficaces, se devaient de contourner les deux inconvénients majeurs de la Photofrine[®]. Dès lors, beaucoup d'agents plus récents ont deux propriétés fortement désirables. La longueur d'onde d'absorbance a été changée de 630 nm, absorbance faible de la Photofrine[®], à une absorbance beaucoup plus grande aux alentours de 660-800 nm. Cela est important puisque la lumière de courte longueur d'onde est aisément dispersée par les tissus et pénètre faiblement, tandis que la lumière près de l'infrarouge peut pénétrer dans des tissus d'une épaisseur supérieure à 1 cm. Une autre considération importante réside dans le fait que les agents plus récents sont aisément éliminés de la circulation et de la peau; par conséquent, l'isolement des patients, loin de la lumière brillante, n'est nécessaire que pour une courte période de temps après l'administration du médicament.¹⁷³ Parmi les agents de seconde génération, on peut citer entre autres : le bleu de méthylène, l'acide 5-aminolaevulinique, la verteporfine, tin etiopurpurine, la temoporfine, les texaphyrines, les phthalocyanines, le N-aspartyle chlorine, les porphycenes, les rhodamines.¹⁷⁸ Nous présenterons, dans les lignes suivantes. les propriétés et les applications de quelques uns de ces photosensibilisateurs.

Le bleu de méthylène est actuellement l'un des rares photosensibilisateurs utilisé en clinique en dehors des dérivés de l'hématoporphyrine. En effet, le bleu de méthylène est utilisé par la Croix-Rouge suisse et allemande pour la décontamination d'unités de plasma fraîchement congelées.^{179,180} Ce photosensibilisateur inactive efficacement des

virus extracellulaires enveloppés¹⁸⁰ et est utilisé en clinique comme traitement de la méthémoglobinémie, démontrant ainsi sa faible toxicité chez l'humain.¹⁸¹ Le bleu de méthylène peut aussi être utilisé dans le diagnostic clinique d'une variété de maladies et comme un marqueur de tumeur dans la chirurgie. Cependant, son utilisation comme photosensibilisateur *in vivo* est limitée par sa réduction ubiquitaire par les enzymes cellulaires; de plus, sa forme non colorée est photodynamiquement inactive.

La verteporfine, dérivée monoacide de la benzoporphyrine, est un photosensibilisateur ayant une absorbance beaucoup plus forte à une longueur d'onde de 690 nm où la pénétration du tissu par la lumière est de 50 % plus grande que celle de la Photofrine[®] à 630 nm. De plus, la verteporfine est rapidement absorbée par le tissu tumoral et est rapidement éliminée du corps pour que la photosensibilité de la peau ne dure que quelques jours.¹⁸² La verteporfine est en expérimentation clinique pour le traitement de la dégénération maculaire relative à l'âge (AMD). L'AMD est la cause principale de cécité chez les personnes âgées de 50 ans et plus et implique la croissance rapide de vaisseaux sanguins aberrants sous la rétine centrale. Ces vaisseaux anormaux causent des lésions cicatricielles et une perte accélérée de l'acuité visuelle. Il n'y a aucun protocole de traitement adéquat pour 80-90 % de ces patients. Comme la PDT est connue pour induire un arrêt vasculaire, les composés comme la verteporfine sont idéaux pour traiter cette condition. La verteporfine est aussi évaluée dans différentes phases d'expérimentation clinique pour le traitement du cancer de la peau non mélanomateux, du psoriasis, de l'arthrite rhumatoïde, de la sclérose en plaques et de l'oesophage de Barrett ainsi que comme un agent pour réaliser la purge de moelle osseuse.¹⁸³

La tin-ethyl-etiopurpurine, (Purlytine[™]) est une purpurine et un produit de dégradation de la chlorophylle. Le médicament est synthétique et pur, mais présente une faible stabilité dans l'eau. L'agent actuel est à l'origine d'une réaction allergique aux oeufs. Ainsi, les patients ayant une allergie aux oeufs ne peuvent pas être traités avec cet agent. Le médicament est actif à 660 nm et devrait permettre une bonne thérapie en profondeur. Par ailleurs, il est relativement efficace pour de courtes durées de traitements. En général, 1.2 mg/kg sont infusés et la thérapie terminée en 24 heures, permettant ainsi une planification fluide.

L'expérience clinique montre que le médicament est efficace dans le traitement des lésions tumorales cutanées, des métastases de la paroi thoracique et du sarcome de Kaposi.¹⁷²

La rhodamine, en raison de son incorporation spécifique dans les mitochondries et de son utilisation connue comme sonde fluorescente, représentait une option intéressante pour devenir des agents photosensibilisateurs. De plus, la rhodamine-123 est une molécule potentiellement intéressante à cause de son assimilation préférentielle dans des cellules cancéreuses. Fait important, cette famille de molécules ne s'accumule pas dans les cellules souches hématopoïétiques normales et démontre une faible toxicité et une élimination rapide, deux caractéristiques extrêmement favorables pour la PDT. Cependant, étant donné son haut rendement quantique de fluorescence qui se traduit en conséquence, par une faible formation de triplet d'oxygène, l'utilité de la rhodamine-123, dans sa forme native, est tout à fait limitée comme photosensibilisateur car très peu photo toxique.^{184,185} Ce problème a été résolu en ajoutant de lourds atomes comme le brome ou le chlore à la molécule de base.¹⁸⁶ L'addition de ces atomes au chromophore augmente le croisement inter système de l'état singulet à l'état de triplet en augmentant le spin orbital, permettant ainsi des changements, autrement interdits, de l'état de spin ($S_1 \rightarrow T_1$). L'addition d'halogènes au chromophore change aussi l'absorption maximale vers la fin du spectre rouge.

1.4.3.3. Propriétés du photosensibilisateur idéal

Bien que l'on ne puisse considérer aucun photosensibilisateur idéal pour chaque application possible, les agents photosensibles idéaux devraient avoir les principales propriétés suivantes.

Ils devraient être efficaces et, dans ce contexte, être capables d'induire la mort des cellules cibles. Ils devraient absorber la lumière dans les longueurs d'ondes rouges ou dans le rouge lointain afin de favoriser la pénétration tissulaire. Des bandes absorptions aux longueurs d'ondes plus courtes ont moins de pénétration dans le tissu et sont plus susceptibles de mener à la photosensibilité de la peau (la puissance de la lumière solaire baisse à $\lambda > 600$ nm). Des bandes absorbantes à de hautes longueurs d'ondes (> 800 nm) signifient que les photons n'auront pas l'énergie suffisante pour l'état de triplet du photosensibilisateur afin de transférer l'énergie à la molécule d'oxygène d'état S_0 et de l'exciter à l'état d'oxygène singulet. Ils devraient avoir relativement de hautes bandes absorbance pour réduire au minimum la dose du photosensibilisateur afin d'obtenir l'effet désiré. La synthèse du photosensibilisateur devrait aussi être relativement facile et le matériel de départ aisément disponible dans l'optique d'une production à grande échelle. L'agent photosensible devrait être un composé pur avec une composition constante et une durée de vie stable et être idéalement soluble dans l'eau ou soluble dans un solvant aqueux inoffensif. Ils ne devraient pas s'agréger à l'excès dans les environnements biologiques car cela réduirait leur efficacité photochimique. Aussi, devraient-ils avoir de bas niveaux de toxicité tant chez les humains que chez les animaux d'expérimentation et présenter une faible incidence de toxicité (hypotension ou réaction allergique). Finalement, l'élimination pharmacocinétique du corps du patient devrait être rapide (moins d'un jour) pour éviter la nécessité de la protection post-traitement de l'exposition à la lumière et la photosensibilité prolongée de la peau.^{172,187}

1.4.4. Les modes de mort cellulaire induite par la PDT

Les cellules peuvent subir au moins deux types distincts de mort cellulaire. La nécrose, une forme violente et rapide causée par des dégâts physiques ou chimiques, est généralement considérée comme un processus non programmé. Elle est caractérisée par la destruction des organelles, l'apparition d'un noyau pycnotique, la désintégration cytoplasmique et progressive de la membrane cytoplasmique. Dans la nécrose, la décomposition est principalement obtenue par médiation de l'activité protéolytique. Un type différent de mort cellulaire dite programmée a été nommé apoptose. Celle-ci exige l'activation transcriptionnelle de gènes spécifiques incluant l'activation d'endo-nucléases, la dégradation de l'ADN et l'activation des caspases.

1.4.4.1. Apoptose et nécrose après la PDT

À cause de l'intérêt intense impliquant des mécanismes de mort de cellule, les études dans le champ de la PDT ont évalué la présence d'apoptose et la nécrose tant *in vitro* que *in vivo*. Agarwal fut le premier à annoncer l'apoptose après la PDT dans les cellules lymphomateuses de la souris L5178Y. En effet, en présence d'un agent photosensible (chloroaluminium phthalocyanine), il a observé une induction rapide de l'apoptose à la suite de l'activation de la phospholipase C.¹⁸⁸ Les facteurs cruciaux, dans la détermination du type de mort cellulaire, par apoptose ou nécrose, après PDT, sont : le type de cellule, la localisation souscellulaire du photosensibilisateur et la dose. En général, on croit que les doses inférieures de PDT mènent à plus d'apoptose, tandis que des doses plus fortes mènent, proportionnellement, à plus de nécrose.¹⁸⁹ En effet, Nagata et al, en utilisant le photosensibilisateur amphiphilique ATX-S10 (Na) et des cellules malignes de mélanome humain, ont démontré que des doses faibles ont mené à moins de 70 % de cytotoxicité induite principalement par apoptose. Au contraire, la plupart des cellules étaient nécrotiques avec des doses induisant 99 % de cytotoxicité.¹⁹⁰ Finalement, une fonction commune du programme d'apoptose amorcé par la PDT est la

sortie rapide de cytochrome C dans les mitochondries vers le cytosol, suivi par l'activation de l'apoptosome et de la procaspase 3.

1.4.4.2. L'effet de voisinage ("bystander")

Un mécanisme différent de mort de cellule a été décrit par Dahle et al.¹⁹¹ En effet, il a montré que pendant la PDT *in vitro* quelques cellules meurent sous l'effet direct, mais d'autres cellules adjacentes subissent les dégâts de cellules mortes qui sont propagées par une chaîne de cellules adjacentes. Ce processus est nommé l'effet de voisinage ("bystander"). Le traitement de cellules MDCK II avec le photosensibilisateur lipophile 3-hydroxyphenyl et la lumière est réputé pour inciter une réponse apoptotique rapide dans une grande fraction des cellules. En outre, la distribution de cellules apoptotiques dans les microcolonies de huit cellules différait de la distribution binomiale attendue. Il y avait une surabondance des microcolonies qui avaient répondu au traitement comme une entité unique, dans laquelle toutes les cellules étaient mortes ou aucune d'entre elles ne l'était. Cela indiquait que les cellules ne sont pas inactivées indépendamment, mais que l'effet de proximité était impliqué dans la mort cellulaire. Cette observation indique que la communication entre des cellules contenues dans une colonie joue un rôle dans l'induction de l'apoptose par la PDT. Par ailleurs, l'effet de proximité était plus important pour des cellules mourant par la nécrose que pour des cellules mourant par apoptose.

1.4.4.3. Les dommages à l'ADN

La lumière du soleil provoque des dégâts sur le plan de l'ADN par deux mécanismes. L'ADN absorbe directement la lumière de type UVC et la gamme d'UVB du spectre (jusqu'à 320 nm). L'absorption provoque alors des photoproduits caractéristiques, particulièrement la formation de dimères de pyrimidine. On a montré des dégâts à l'ADN dans plusieurs études avec PDT *in vitro*.¹⁹² Cependant, ces dégâts

n'ont pas été directement liés à des effets mortels. La PDT peut causer des dégâts oxydatifs aux bases de l'ADN, des cassures des brins et des liaisons croisées. Le potentiel mutagénique varie entre les types de cellules reflétant probablement des différences de leur capacité de réparation ou des mécanismes de surveillance de dégâts. Les réactions de radicaux libres sont potentiellement impliquées dans le processus de carcinogenèse chimiquement induit. En effet, l'oxygène singulet peut être aisément produit à l'intérieur des cellules et réagit efficacement avec l'ADN, causant des cassures des simples brins. Sa réaction préférentielle avec la guanine dans l'ADN mène principalement à la délétion d'un G dans la séquence d'ADN.

1.4.5. La PDT avec le 4,5-dibromorhodamine methyl ester

Le 4,5-dibromorhodamine methyl ester (TH9402 ; Celmed Biosciences, Montréal, Canada) est un dérivé de la rhodamine -123. L'agent photosensible TH9402 (Figure 4) a été développé par un groupe de chimistes de l'Université de Montréal (Montréal, Canada) et présente des propriétés photophysiques favorables (efficacité, stabilité et une faible toxicité). Lorsque des cellules tumorales étaient mises en présence du TH9402, cet agent photosensible s'accumulait maximalement après 40 minutes d'incubation. De plus, les études faites dans notre laboratoire ont démontré que les cellules cancéreuses renaient plus de TH9402 que les cellules normales.¹⁹³

Notre laboratoire a développé une approche basée sur l'utilisation du TH9402 pour éliminer, de manière sélective, les cellules T alloréactives contenues dans le greffon du donneur et responsables de la GVHD. En effet, Guimond et al, ont démontré que cette stratégie élimine de façon spécifique les cellules T du donneur qui reconnaissent les cellules du receveur par un mécanisme impliquant la glycoprotéine P (Pgp).¹⁹⁴ La Pgp se retrouve à la surface de certaines cellules, dont les cellules souches normales et certains lymphocytes. La Pgp, un produit du gène de résistance aux médicaments-1(MDR1), pompe ainsi certains médicaments de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur.

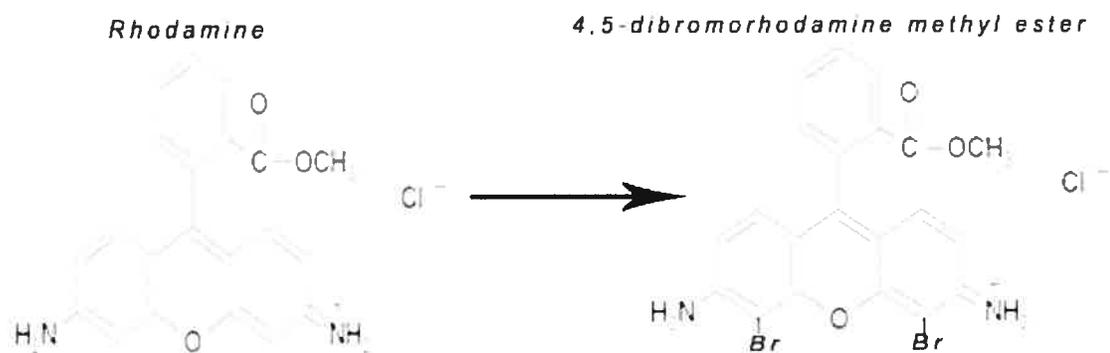


Figure 4 : Structure moléculaire du 4,5-dibromorhodamine methyl ester

L'agent photosensible 4,5-dibromorhodamine methyl ester (TH9402) est un dérivé de la rhodamine auquel on a ajouté des molécules de brome en position 4 et 5. Inerte en absence de lumière, le TH9402 n'exerce son activité qu'en présence de lumière visible (514 nm).

Fait intéressant, certaines études ont démontré que la Pgp semblait inactivée à la surface des cellules T activées.¹⁹⁵ Or le TH9402 s'apparente à la rhodamine qui est connue pour être transportée activement à l'extérieur des cellules par la Pgp.

Il s'ensuit que l'agent photosensible peut entrer à l'intérieur des cellules T, alors qu'il est rapidement éliminé des cellules T au repos, il demeure à l'intérieur des cellules activées car la pompe Pgp est inactivée par l'activation cellulaire. Cette accumulation différentielle est donc à l'origine de l'élimination sélective des cellules activées lorsqu'elles sont soumises à la PDT. Les travaux de Guimond et al.¹⁹⁴ ont identifié ce mécanisme et permis de tirer avantage des propriétés de la Pgp afin d'éliminer grâce à la PDT au TH9402 les cellules T alloréactives. Ainsi, la sensibilité des cellules T prolifératives au TH9402 a été démontrée en utilisant la lignée cellulaire T lymphoblastique CEM. Les conditions de traitement au cours de cette étude étaient de 40 minutes d'incubation, 10 μM TH9402, 90 minutes d'extrusion et 5 J/cm^2 d'exposition à la lumière. Lorsque comparées aux cellules non traitées, plus de 99.97 % des cellules T CEM malignes étaient déplétées. Par ailleurs, la PDT au TH9402 a permis de bloquer la capacité proliférative de cellules mononucléées du sang (PBMC) normales activées à la phytohemagglutinine (PHA) ou soumises à une réaction mixte lymphocytaire (MLR). Dans ces conditions, les contrôles de cellules non traitées à la PDT/TH9402 et stimulées à la PHA demeuraient capables de proliférer dans une MLR. De plus, lorsque les cellules d'un donneur étaient exposées aux cellules d'un receveur donné, afin d'induire une reconnaissance immune et leur activation, puis exposées à la PDT, les cellules du donneur perdaient leur capacité de proliférer en réponse à une exposition aux cellules du receveur. Au contraire, ces cellules étaient capables de répondre aux cellules d'un autre individu auxquelles elles n'avaient pas été exposées. Ces travaux ont donc démontré la capacité de la PDT à éliminer spécifiquement les cellules activées contre des antigènes du receveur.

Au cours de ces mêmes travaux et de façon intéressante, la PDT n'a pas affecté la réponse de ces cellules T au repos, une découverte confirmant le niveau élevé de sensibilité à la PDT des cellules activées comparativement aux cellules T au repos. En effet, la spécificité de la PDT pour les lymphocytes T activés a aussi été évaluée en mesurant l'expression de la chaîne inductible du récepteur de l'IL-2 (CD25) sur les populations des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ traitées ou non à la PDT/TH9402. En effet, après 4 jours de MLR, les cellules étaient exposées à la PDT/TH9402 ou au milieu de culture uniquement. L'analyse immunophénotypique exécutée après une culture de 3 jours, dans un milieu de culture contenant l'IL-2, a révélé qu'au moins 98 % des cellules CD8⁺CD25⁺ et 96 % des cellules CD4⁺CD25⁺ étaient éliminés par PDT. Au contraire, la plupart des cellules T non activées (CD25⁻) ont été épargnées, confirmant ainsi la sélectivité de la PDT pour les lymphocytes activés. De plus, la majorité des cellules T CD25⁻ étaient négatives pour l'iode de propidium, une découverte qui indiquait la conservation de l'intégrité de ces cellules T. Finalement, au cours de ces études, la Pgp a été clairement identifiée comme le modulateur principal de la concentration cellulaire et de la cytotoxicité photodynamique du TH9402.

À ce jour, l'utilisation du TH9402 permet la purge de cellules cancéreuses et de cellules T alloréactives dans la prévention de la GVHD. En effet, il a été démontré que les rhodamines pouvaient être des photosensibilisateurs très efficaces contre des cellules malignes *in vitro*. Plusieurs études pré-cliniques ont examiné la capacité des dérivés bromés de la rhodamine à purger les cellules leucémiques de la moelle osseuse ou des cellules souches du sang périphérique pour fin d'utilisation dans la transplantation autologue.^{186,193} Les expérimentations cliniques de phase I ont commencé à utiliser cet analogue bromé de la rhodamine, le TH9402, pour le traitement de leucémie myéloïde chronique en utilisant ce procédé de thérapie photodynamique.¹⁹⁶ Il en est ressorti que la thérapie photodynamique utilisée *ex vivo* pour purger les cellules leucémiques dans les GCSHs autologues détruisait les cellules malades en épargnant les cellules saines. Cela étant un préalable important pour un tel protocole de traitement.

Des études *in vivo* utilisant le TH9402 ont été menées dans notre laboratoire et ont démontré que la PDT éliminait rapidement les cellules B, préservait les cellules T au

repos ainsi que leur capacité de prolifération et prévenait la GVHD.¹⁹⁷ L'équipe de Chen et al, dans un modèle de transplantation murin CMH incompatible a aussi démontré que, lorsque les souris receveuses étaient inoculées avec des cellules BCL1 leucémiques/lymphomateuses et subissaient une irradiation mortelle, l'infusion de moelle osseuse purgée en cellules T, aboutissait à une rechute. L'addition de cellules T activées, non traitées et provenant d'une MLR produisait une GVHD mortelle. Mais l'administration de cellules traitées à la PDT contrôlait la récurrence de cellules BCL1 sans causer la GVHD.¹⁹⁸ Ainsi, la PDT associée au TH9402 semble empêcher la GVHD tout en préservant l'activité GVL in vivo.

1.4.6. Avantages et inconvénients de l'utilisation du TH9402 pour la PDT

Le haut niveau d'efficacité et de sélectivité de l'agent photosensible TH9402 pour les cellules activées représente une des raisons principales de choisir le TH9402 pour l'élimination des cellules T alloréactives. La déplétion des cellules T alloréactives par PDT est réalisée en utilisant une stratégie qui repose sur les propriétés biologiques de la cellule, dont l'inhibition de la Pgp durant la phase ex vivo d'activation envers les cellules stimulatrices de l'hôte. En termes d'équipement, la PDT/TH9402 exige un dispositif d'éclairage qui est un instrument qui peut s'accommoder facilement dans la plupart des laboratoires de thérapie cellulaire. Cet instrument est entièrement automatisé et l'émission précise de la lumière est assurée par un contrôle continu pendant chaque cycle. La stabilité du dispositif d'éclairage a été confirmée et le calibrage externe est seulement exigé tous les ans. Au contraire de la plupart des photosensibilisateurs, pour lesquels le spectre d'absorption nécessite l'irradiation par une source d'ultraviolets, le TH9402 utilisé dans notre procédure de PDT exige seulement la lumière visible (vers 514 nm) qui est non-mutagénique. La qualité du greffon déplété en cellules alloréactives peut être contrôlée après chaque manipulation. Comme les cellules traitées à la PDT sont éliminées en quelques jours, des stratégies impliquant de courtes périodes de culture cellulaire doivent être utilisées afin de déterminer le degré final d'élimination cellulaire,

retardant ainsi la détermination de la nature des produits cellulaires générés de quelques heures. Il est clair que l'utilisation d'anticorps monoclonaux combinés avec des billes immunomagnétiques ou au tri en cytométrie en flux offre l'avantage d'une visualisation immédiate des cellules éliminées. L'utilisation des anticorps monoclonaux semble aussi plus rassurante étant donné que la structure ciblée est clairement définie. Par exemple, l'antigène CD25 est habituellement ciblé pour éliminer les lymphocytes T du donneur, qui présentent une alloréactivité contre les cellules du receveur. Cet antigène est exprimée lorsque les cellules T deviennent activées. Cependant, il y a différents problèmes associés au ciblage des cellules T par rapport au statut d'activation de leurs antigènes de surface, comme la variabilité de leur profil d'expression dans le temps. De plus, certains antigènes de surface présents sur les cellules T activées sont partagés par d'autres sous-ensembles de cellules T comme le CD25, qui est exprimé par les cellules T régulatrices qu'il serait préférable d'épargner. La PDT avec le TH9402 est un processus qui est extrêmement flexible. En variant les différents paramètres de traitement (la concentration, les conditions d'incubation, le temps d'extrusion et l'intensité lumineuse), il est possible de moduler l'effet sur des populations cellulaires ciblées. Le fait que les paramètres de la PDT peuvent être changés pour éliminer des populations cellulaires, par des chemins distincts impliquant principalement l'apoptose ou la nécrose, représente aussi une occasion intéressante d'examiner diverses approches immuno-thérapeutiques et d'induction de la tolérance.

Le succès effectif de la PDT exige cependant un contrôle strict des paramètres de traitement (conditions d'incubation, la période d'extrusion de l'agent photosensible, l'exposition à la lumière, etc.). Fait important, la même stratégie pourrait être utilisée tant pour l'élimination des cellules T alloréactives que pour celle des cellules cancéreuses, limitant ainsi le nombre d'instruments qui exigent une validation et un contrôle de qualité continu.¹⁹⁹

1.5. Problématique de recherche et importance du projet

Comme il a été mentionné plus haut, la maladie du greffon contre l'hôte constitue la principale complication qui fait suite après une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Par ailleurs, dans sa forme chronique, l'incidence de la GVHD n'a cessé de s'accroître du fait d'un haut degré d'incompatibilité sur le plan des antigènes HLA, entre le donneur et le receveur, du recours à un donneur apparenté versus un donneur non apparenté, de l'utilisation d'un donneur de sexe féminin, de l'utilisation de cellules souches du sang périphérique en lieu et place de la moelle osseuse. Face à cette incidence de plus en plus croissante, plusieurs stratégies de traitements ont été évaluées à ce jour. On peut mentionner l'utilisation de la cyclosporine, de la prednisone et du mycophénolate. Toutefois, malgré ces multiples traitements actuels de la GVHDc, cette maladie représente une cause de morbidité et de mortalité importante et constitue de ce fait un frein au traitement de plusieurs affections malignes. Il était donc plus que nécessaire d'évaluer de nouvelles modalités thérapeutiques. Parmi celles-ci, la photophérèse extracorporelle a été évaluée en association avec des agents photosensibles tel le 8-méthoxy psoralen (8-MOP) couplé aux UVA (PUVA). Cette approche, bien que prometteuse, présente l'inconvénient de l'utilisation des rayons ultraviolets potentiellement mutagènes. La thérapie photodynamique (PDT), qui est une nouvelle approche utilisée dans le traitement de certains cancers, constitue une avenue intéressante. En effet, la PDT, contrairement à la thérapie PUVA, utilise la lumière visible qui a l'avantage considérable de diminuer le risque mutagénique dû aux UVA. Cependant, la PDT a longtemps été confrontée au problème de l'utilisation d'agents photosensibles peu cytotoxiques. Le 4,5-dibromorhodamine methyl ester (TH9402) est un agent photosensible de seconde génération dont la capacité à s'accumuler sélectivement, dans les cellules activées et alloréactives, a été démontrée. Les travaux effectués dans notre laboratoire et dirigés par le Dr Denis-Claude Roy ont permis de démontrer que la PDT associée au TH9402,

éliminait les cellules activées et alloréactives. Cette observation a permis de constater qu'une telle approche, pouvait mener au traitement *ex vivo* des greffons de cellules souches hématopoïétiques ou des infusions des lymphocytes du donneur afin de prévenir la GVHD dans le contexte d'une transplantation allogénique. D'autres travaux effectués dans notre laboratoire, et ceux d'autres équipes, ont permis de démontrer que la PDT associée au TH9402 pouvait prévenir la GVHD aiguë. Fort de ces observations, nous avons voulu évaluer le potentiel thérapeutique du TH9402, dans le traitement de la GVHD chronique dans un modèle murin. Ce qui, à notre connaissance, représente la première étude du genre.

1.6. Hypothèse de travail

Les cellules T alloréactives, originant du greffon du donneur, sont les principaux médiateurs de la GVHDc. Comme il a été mentionné plus haut, le TH9402 s'accumule dans les cellules activées et alloréactives provoquant leur élimination sélective. Or il a été démontré que la transfusion de cellules T alloréactives générées par activation au cours d'une réaction mixte lymphocytaire (MLR) *in vitro*, puis traitées à la PDT/TH9402, a été capable de prévenir la GVHD aiguë dans un modèle murin.¹⁹⁷⁻²⁰⁰ Cet effet préventif pourrait s'expliquer par le transfert adoptif de cellules T immunosuppressives présentes dans la MLR, la déplétion des cellules T alloréactives par PDT ou par la génération *in vivo* de cellules T immunosuppressives actives (réponse anti-idiotypique de type "vaccine like") qui mènerait à la suppression de la GVHDa. Nous proposons donc que la PDT avec le TH9402 peut non seulement prévenir le développement de la maladie du greffon contre l'hôte, mais aussi peut être utilisée pour la traiter.

1.7. Objectifs

1.7.1. Objectif principal

Le but principal de ce projet de recherche est d'évaluer la capacité du TH9402 à traiter la GVHD chronique dans un modèle murin. Cette évaluation du traitement de la GVHDc expérimentale repose sur l'injection de cellules T alloréactives activées *in vivo*, dans un contexte de GVHD chronique, et traitées à la PDT/TH9402. De façon semblable à la PEC, nous émettons l'hypothèse que l'injection de cellules dont on a éliminé la composante activée permet d'induire une tolérance immune.

1.7.2. Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques de ce projet de recherche consistent, dans un premier temps, à reproduire la maladie du greffon contre l'hôte chronique dans un modèle murin. Cet objectif est d'autant plus important que nous devons nous assurer d'être en présence d'une GVHDc afin de prétendre la traiter. Dans un second temps, comme le traitement de la GVHDc passe par l'injection des lymphocytes T alloréactifs traités à la PDT, il est important de savoir en quoi consiste l'effet du traitement que nous administrons aux cellules. Pour ce faire, nous avons opté d'évaluer l'effet de la PDT sur les différentes populations lymphoïdes. Finalement, afin de juger de l'efficacité du traitement à long terme, l'évaluation de la reconstitution immunologique dans les différents groupes de souris constitue un indicateur de l'efficacité du traitement.

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2. Matériel et Méthodes

2.1. Souris

Deux souches de souris ont été utilisées tout au long de notre étude. Les souris femelles, B10.D2- $H2^d$ $H2-T18^c$ $Hc^l/nSnJ$ (B10.D2) et BALB/cJ- $H2^d$ (Balb/c) ont été acquises des Laboratoires Jackson (Maine, USA). Les souris étaient hébergées dans l'animalerie du centre de recherche Guy-Bernier de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont (Montréal, Canada), dans un espace environnemental contrôlé (température, humidité, ventilation, éclairage) et recevaient une diète stérile suivant les normes exigées par le comité canadien pour la protection des animaux. Toutes les souris étaient âgées de 7 à 10 semaines au moment de leur utilisation.

2.2. Groupes expérimentaux

Tout au long de nos travaux, les groupes expérimentaux suivants ont été constitués en fonction du stade expérimental concerné (Figures 5 et 6).

2.2.1. Phase d'induction de la GVHDc

Groupe syngénique. Le groupe syngénique consistait en l'injection des splénocytes des souris femelles Balb/c à d'autres souris femelles Balb/c.

Groupe GVHDc. Le groupe GVHDc consistait en l'injection des splénocytes des souris femelles B10.D2 à des souris femelles Balb/c.

Groupe contrôle d'asepsie. Le groupe contrôle d'asepsie consistait en l'injection des splénocytes des souris femelles B10.D2 à d'autres souris femelles B10.D2.

2.2.2. Phase de traitement de la GVHDc

Groupe cellules syngéniques + PDT. Le groupe cellules syngéniques + PDT correspond aux souris syngéniques recevant des injections de splénocytes traités à la PDT. Ces splénocytes provenaient d'autres souris syngéniques.

Groupe cellules + PDT. Le groupe cellules + PDT correspond aux souris avec GVHDc et recevant des injections de splénocytes traités à la PDT. Les splénocytes provenaient d'autres souris malades (GVHDc).

Groupe cellules - PDT. Le groupe cellules - PDT, correspond aux souris avec GVHDc et recevant des injections de splénocytes non traités à la PDT. Les splénocytes provenaient d'autres souris malades (GVHDc).

Groupe non traité. Le groupe non traité, correspond aux souris avec GVHDc et ne recevant aucune injection de splénocytes. Ces souris ne reçoivent donc aucun traitement.

Le décompte des splénocytes, destinés à être injectés aux souris du groupe cellules +PDT, était effectué avant la PDT. Ce greffon post PDT contenait des cellules mortes aussi bien que des cellules vivantes.

2.3. Irradiation des souris receveuses

Les souris devant subir la greffe de splénocytes ont reçu une irradiation corporelle totale, à une dose non létale de 600 cGy, à l'aide d'un appareil ayant une source de ^{60}Co .

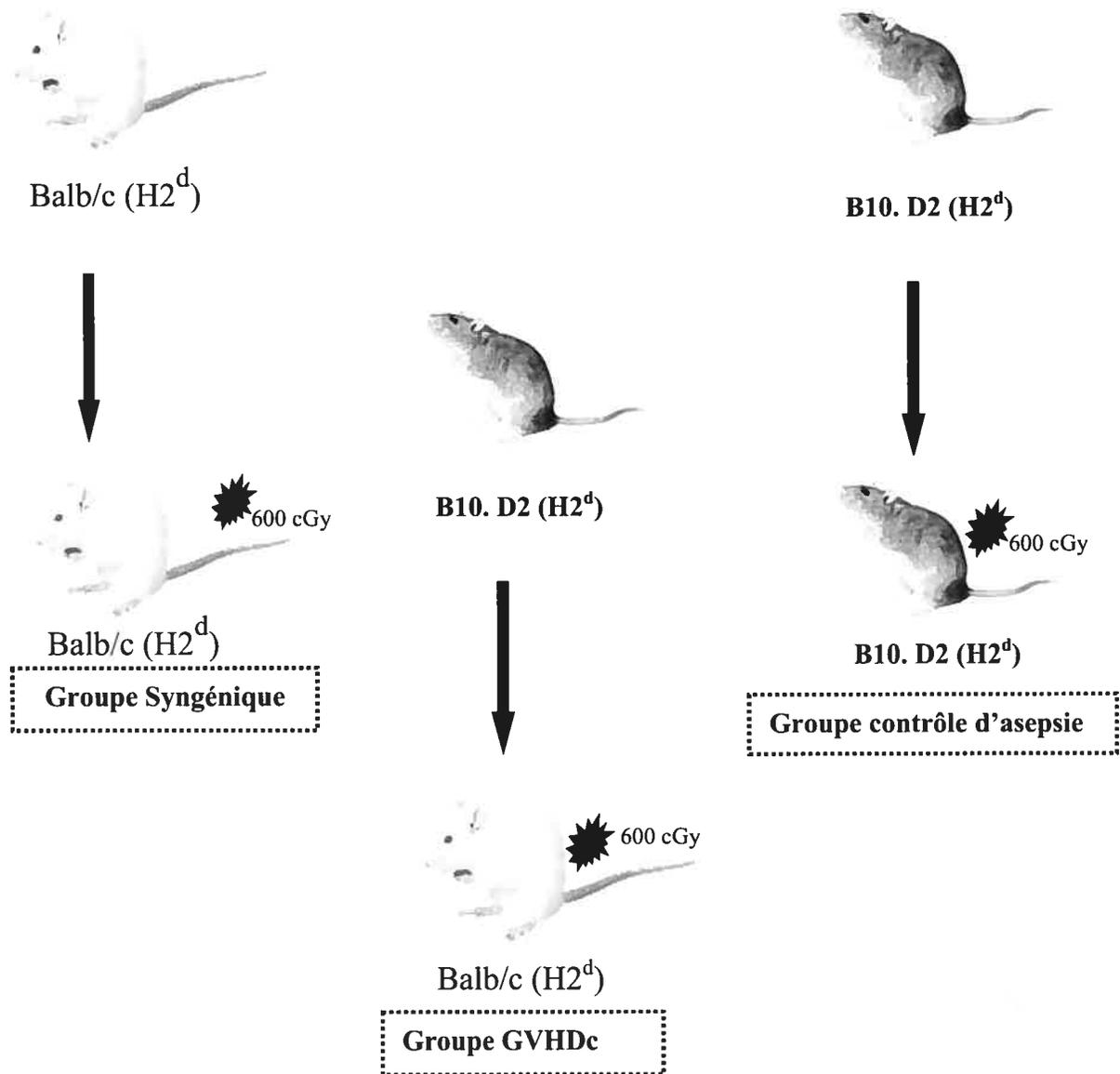


Figure 5 : Représentation graphique des différents groupes expérimentaux au cours de la phase d'induction de la maladie du greffon contre l'hôte chronique.

Le groupe syngénique consistait en l'injection des splénocytes des souris femelles Balb/c dans les souris femelles Balb/c. Le groupe GVHDc consistait en l'injection des splénocytes des souris femelles B10.D2 dans les souris femelles Balb/c. Finalement, le groupe contrôle d'asepsie consistait en l'injection des splénocytes des souris femelles B10.D2 dans les souris femelles B10.D2. Toutes les souris recevant le greffon étaient irradiées (600 cGy).

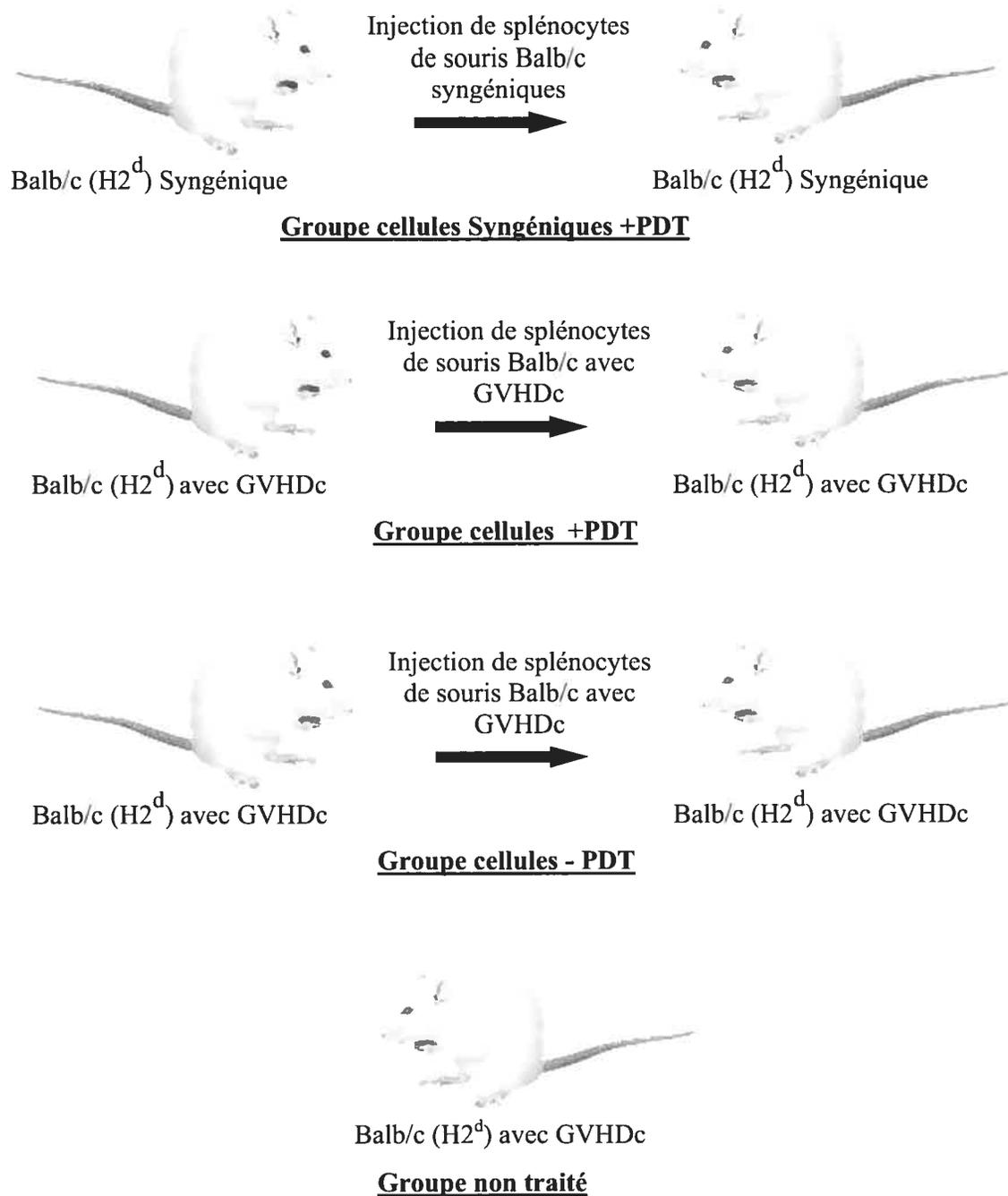


Figure 6 : Représentation graphique des différents groupes expérimentaux au cours de la phase de traitement de la maladie du greffon contre l'hôte chronique.

Dans les différents groupes (syngénique +PDT, cellules +/- PDT), les rates des souris ont été prélevées et les splénocytes traités ou non à la PDT. L'injection des splénocytes a été effectuée par la suite. Dans le groupe non traité, les souris ne reçoivent aucun traitement.

2.4. Préparations des splénocytes

Les souris B10.D2 et Balb/c ont été sacrifiées par dislocation cervicale et les rates prélevées, stérilement, étaient stockées dans le milieu de culture RPMI 1640 (Gigco, Grand island, NY) supplémenté avec 10% FBS (sérum de veau fœtal, de l'anglais "Fetal Bovine Serum", Hyclone Laboratories, Logan, UT) décomplémenté, 100 U/ml pénicilline G, 100 µg/mL streptomycine, 2 mM L-glutamine (Gibco, Grand island, NY). Afin d'extraire les cellules de la rate (splénocytes), les rates ont été délicatement écrasées en utilisant un pilon à triturer. L'extraction était faite avec beaucoup de douceur pour ne pas endommager les cellules. Les cellules étaient recueillies dans du RPMI 1640 avec 10% FBS afin d'obtenir une préparation cellulaire homogène. La préparation cellulaire ainsi obtenue était centrifugée par la suite à 300g afin de laver les splénocytes. Après centrifugation, les cellules étaient resuspendues dans du tampon Tris-NH₄ Cl afin de lyser les globules rouges. Pour ce faire, 1 mL de la solution de lyse était utilisé pour chaque rate, pendant une minute, à la température de la pièce. Après ce temps d'incubation, le milieu était complété avec du RPMI 1640 avec 10% FBS et la suspension cellulaire était centrifugée une seconde fois à 300g durant 10 minutes. Après centrifugation, le surnageant était jeté et les cellules resuspendues dans du milieu de culture RPMI 1640 plus 10% FBS. Le nombre de splénocytes était évalué par un décompte au bleu trypan et la viabilité des suspensions cellulaires déterminée par la même occasion. Un autre décompte automatique, en utilisant le COULTER® Gen-S™ Hematology Analyzer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), était aussi effectué afin d'obtenir des valeurs plus précises. Après décompte cellulaire, les préparations cellulaires étaient centrifugées une fois de plus à 300g, pendant 10 minutes, afin de se débarrasser du surnageant contenant le FBS. Après cette ultime centrifugation, les splénocytes étaient resuspendues à la concentration voulue dans du RPMI 1640 sans FBS afin d'éviter la formation de bulles qui pourraient se former durant l'injection. Pour minimiser la perte de cellules, les suspensions cellulaires étaient conservées sur glace avant injection.

2.5. Induction et suivi de la GVHDc

Afin d'induire la GVHDc, nous avons subdivisé les souris en différents groupes. Dans le but de faciliter l'injection intraveineuse (i.v) sur le plan de la queue des souris, les souris receveuses étaient légèrement chauffées à l'aide d'une source lumineuse dégageant de la chaleur. Dans le groupe de souris GVHDc, 25×10^6 splénocytes de souris donneuses (B10.D2), dans un volume final de 0.5 mL de RPMI1640, étaient injectés de façon intra-veineuse (i.v) dans les souris receveuses Balb/c irradiées. Les souris receveuses, Balb/c irradiées, dans le groupe syngénique, recevaient 25×10^6 splénocytes, dans un volume final de 0.5 mL provenant d'une suspension cellulaire de rates de souris Balb/c. Les souris receveuses B10.D2, dans le contrôle d'asepsie recevaient, quant à elles, un greffon constitué de 25×10^6 splénocytes, provenant d'autres souris B10.D2. Après injection, les souris recevaient de l'eau stérile HCl contenant un antibiotique durant 2 semaines (tétracycline 1 g/L).

Le suivi de l'évolution de la GVHDc était fait par la prise de poids hebdomadaire des souris dans les différents groupes. L'évaluation clinique était faite en observant l'aspect du pelage, les atteintes cutanées sur le plan de la peau, des oreilles et des pattes. Une analyse histologique de la peau, du foie, des intestins était effectuée afin de préciser le diagnostic. L'évaluation immunologique du taux d'anticorps anti-ADN double brin, par un test ELISA ("*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*") quantitatif était effectué sur les échantillons de sérum des souris provenant de différents groupes.

La décision d'euthanasier les animaux était prise par les techniciennes en santé animale de l'animalerie du Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, qui en référaient au vétérinaire responsable de l'unité. Ces intervenants neutres n'étaient pas informés du déroulement de l'expérience et de la distinction entre les différents groupes de souris. Par conséquent, la possibilité d'un biais provenant de l'expérimentateur, sacrifiant préférentiellement certains animaux plutôt que d'autres, était écartée. L'euthanasie était appliquée selon des critères objectifs pré-déterminés, à savoir quand les animaux présentaient une perte de poids dépassant 25% du poids initial ou lorsque des lésions graves irréversibles (perte de poils avec blessures sur le corps,

pattes enflées présentant des plaies, queue nécrosée et coupée) étaient observées. Cette intervention avait pour but d'éviter toutes souffrances inutiles aux animaux.

2.5.1. Test Elisa quantitatif

Pour évaluer les taux d'anticorps anti-ADNdb, nous avons, dans un premier temps prélevé du sang de souris en effectuant une piqûre sur le plan de la veine fémorale. Le sang recueilli, dans les tubes non héparinés, était aussitôt centrifugé à 33g pour un temps maximal de 4 minutes. Le sérum obtenu était conservé à -20°C, jusqu'au jour de l'analyse. La première étape consistait en l'adsorption ("coating") de l'ADNdb sur plaque ELISA. Ainsi 10 mg/mL d'ADNdb, dans un volume final de 100 mL de tampon SSC (NaCl, 0.15 M + Sodium citrate 0.015 M, le tout à pH : 8.0) étaient ajoutés dans tous les puits de la plaque ELISA. Après une incubation à 4°C, toute la nuit ("overnight"), ou 37°C, pendant 2 heures, le "coating" était stoppé et la plaque lavée 4 fois avec du PBS ("Phosphate Buffered Saline") supplémenté avec du Tween 20 (PBS 1X : NaCl 9.0 g/L, Na₂HPO₄ (sodium phosphate dibasique) 0.703 g/L, KH₂PO₄ (potassium phosphate monobasique) 0.232 g/L, pH : 7.2 et Tween 20, 0.05%). Après lavage, 100 mL par puits, d'une solution d'anticorps anti-ADNdb (Mouse monoclonal Anti-DNA IgG, Alpha diagnostic International, San Antonio, TX, USA) de concentration connue (1 mg/mL), était ajoutée aux puits correspondant afin d'établir une courbe standard (100 mg/mL, 80 mg/mL, 60 mg/mL, 40 mg/mL, 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.625 mg/mL). Les différents échantillons de sérum, dilués 1/50 dans du PBS 1X, volume final de 100 mL par puits, étaient ajoutés, en duplicata, aux puits restants sauf dans le puits servant de contrôle négatif et, incubés 45 minutes à 37°C. Après incubation, les échantillons étaient vidés par aspiration et les puits lavés 4 fois avec du PBS Tween 20, 0.05%. Après lavage, 100 mL d'anticorps secondaire dilués 1/6400 dans du PBS 1X (Anti-mouse IgG peroxydase conjugate, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) étaient ajoutés dans tous les puits, sauf celui du contrôle négatif, pour une incubation de 30 minutes à 37°C. Le puits réservé au contrôle négatif était complété avec 100 mL de PBS 1X. Après le temps d'incubation et

les 4 lavages au PBS Tween 20, 0.05%, 100 mL de substrat TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine) étaient ajoutés à tous les puits et incubés 15 minutes à température pièce à l'abri de la lumière. Après ce temps d'incubation, la réaction était stoppée en ajoutant 100 mL de Stop Reagent (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). L'absorbance (densité optique) était lue à 450nm en utilisant le lecteur automatique de plaques ELISA.

2.5.2. Coloration à l'hématoxyline-phloxine-éosine

Afin d'effectuer l'évaluation histologique de la GVHDc, divers prélèvements de tissus ont été effectués et colorés à l'hématoxyline-phloxine-éosine (HPE). Les tissus (peau, foie, rate, intestin) étaient prélevés des souris sacrifiées par dislocation cervicale. Les échantillons ainsi obtenus étaient conservés dans du para formaldéhyde jusqu'à leur utilisation. Après obtention de coupes minces, les pièces de tissus étaient étalées sur les lames, puis séchées dans une étuve à 75⁰C pendant 30 minutes. Après cette période de séchage, les lames étaient trempées dans du toluène pendant 7 minutes. La prochaine étape consistait en la coloration proprement dite. Le principe reposait sur le fait que l'hématoxyline colore le noyau de la cellule en bleu et la phloxine-éosine colore les cytoplasmes en rose foncé. Le processus entièrement automatisé était effectué à l'aide de l'appareil de coloration H/I Linear Stainer (Hacker Instruments Inc. Fairfield, NJ USA). Le cycle de coloration contenait 27 bains dans lesquels les lames étaient trempées pendant 40 secondes. Le cycle était le suivant :

Bains N° :	1-2-25-26-27.....	Toluène
	3-4-23-24.....	Éthanol 100%
	5-18-20-21-22.....	Éthanol 95%
	6.....	Éthanol 70%
	8-9.....	Hématoxyline
	13.....	Acide chlorhydrique (HCl) 0.25%
	15.....	Ammoniaque (NH ₄ OH) 0.5%

19.....	Phloxine-éosine
7-10-11-12-14-16-17.....	Eau courante tiède

2.5.3. Analyses immunophénotypiques (Cytométrie en flux)

L'expression des récepteurs de surface des cellules T (CD4, CD8, CD25) et des cellules B et NK a été évaluée par immunofluorescence. Les cellules traitées par la PDT ainsi que les cellules contrôles non traités à la PDT ont été marquées avec les anticorps suivants : anti-CD4 PE (Isotype : Rat IgG_{2a}, κ), anti-CD4 FITC (Isotype : Rat IgG_{2a}, κ), anti-CD8a APC (Isotype : Rat IgG_{2a}, κ), anti-CD8a PE (Isotype : Rat IgG_{2a}, κ), anti-CD8a FITC (Isotype : Rat IgG_{2a}, κ), anti-CD25 PE (Isotype : Rat IgG_{2b}, κ), anti-CD25 FITC (Isotype : Rat IgM, κ), anti-CD45R/B220 PE (Isotype : Rat IgG_{2a}, κ), anti-CD45R/B220 FITC (Isotype : Rat IgG_{2a}, κ), anti-NK1.1-PE (Isotype : IgG_{2a}, κ), AnnexineV-APC (AnnV) et le 7-amino-actinomycine-D-PerCP (7AAD) toutes de BD Pharmingen (BD Pharmingen™, USA). L'anticorps anti-CD25 PE (Isotype : Rat IgG₁) provenait de Cedarlane (Cedarlane, On. Canada). Afin d'évaluer le marquage non spécifique des anticorps, des isotypes conjugués aux fluorochromes appropriés ont été utilisés dans toutes les études de cytométrie en flux. PE : ("Phycoerythrin"), FITC : ("Fluorescein isothiocyanate"), APC : ("Allophycocyanin"), PerCP : ("Peridinin chlorophyll-a Protein").

2.5.4. Effet de la GVHDc sur la production des lymphocytes CD4+CD25+

Les splénocytes ont été extraits des rates de souris GVHDc et syngéniques tel qu'il a été décrit plus haut. Les suspensions cellulaires contenaient 5×10^5 par tube, dans un volume final de 100 mL en vue de leur marquage, par les anticorps fluorescents appropriés. Pour le cas du marquage CD4+CD25+, 1 mL d'anticorps anti-CD4+ couplé au FITC ("fluorescein isothiocyanate", CD4 FITC) était ajouté à la suspension cellulaire.

De même, 1 mL d'anticorps anti-CD25 couplé au PE (CD25 PE) était ajouté à la même suspension cellulaire. Une autre suspension cellulaire était marquée avec les isotypes (FITC et PE) appropriés. Après 30 minutes d'incubation sur glace et à l'abri de la lumière, les échantillons étaient complétés avec du RPMI 1640 et centrifugés 300g pendant 10 minutes. Après cette étape de lavage, le profil des différents échantillons était déterminé par cytométrie en flux par le biais du cytomètre multiparamétrique (FACS Calibur, Becton Dickinson, Mountain view, CA). Les analyses ont été effectuées en utilisant le programme Cell Quest (Becton Dickinson).

2.5.5. Effet de la PDT sur les population lymphoïdes

Pour étudier le mécanisme de la mort induite par la PDT, les cellules étaient marquées par des anticorps spécifiques des marqueurs membranaires de différenciation et simultanément par l'annexine V (AnnV), un marqueur précoce de l'apoptose et le 7-amino-actinomycine (7AAD) qui marque les cellules mortes. Les combinaisons suivantes, CD4/CD25/AnnV/7AAD, CD8/CD25/AnnV/7AAD, NK1.1/AnnV/7AAD et B220/AnnV/7AAD ont été analysées. De manière plus détaillée, les marquages ont été effectués avec 5×10^5 cellules par échantillon, dans un volume final de 100 μ L de RPMI 1640. Les anticorps (1 μ L), anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-B220, anti-NK1.1, sont ajoutés aux cellules en fonction des combinaisons établies tout en évitant d'utiliser des anticorps différents associés aux mêmes fluorochromes. Les anticorps isotypiques sont ajoutés aux tubes correspondants et tous les tubes sont incubés sur la glace pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Après cette période d'incubation, les tubes sont complétés avec 2 μ L de RPMI 1640 et centrifugés 10 minutes à 300g. Après centrifugation, le surnageant est rejeté et tous les tubes sont complétés avec 100 μ L de binding buffer 1X. Aux tubes devant recevoir l'AnnV, 1 μ L d'AnnV est ajouté et 5 μ L de 7AAD sont ajoutés aux tubes devant recevoir le 7AAD. Tous les tubes sont incubés pour une période de 15 minutes. Après ce temps d'incubation, les tubes sont analysés en cytométrie en flux. Pour ce, au moins 1×10^4 événements étaient enregistrés par un cytomètre multiparamétrique (FACS Calibur, Becton Dickinson, Mountain view, CA).

Toutes les analyses sont effectuées en utilisant le programme Cell Quest (Becton Dickinson).

2.5.6. Traitement photodynamique des cellules

Les cellules de rate des souris du groupe syngénique et GVHDc sont préparées en vue de leur exposition à la PDT, puis injectées pour traiter la GVHDc. Une fois les suspensions cellulaires obtenues, les splénocytes sont donc resuspendus à une concentration de 1×10^6 cellules/mL dans du milieu de coloration X-vivo (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) supplémenté avec 2,5 % FBS. Les cellules du groupe « + PDT » sont mises en présence de 10 μ M TH9402 (Celmed BioScience, Montréal, Canada) pour une période de 40 min et incubées à 37°C, le tout à l'abri de la lumière. Les cellules du groupe « -PDT » ne reçoivent pas de TH9402 et sont aussi mises à l'incubateur à 37°C pour une période de 40 minutes. C'est la phase dite de coloration qui permet aux cellules d'intégrer le TH9402. Après cette période de coloration, les cellules des deux groupes sont centrifugées 10 minutes à 300g pour une étape de lavage. Le surnageant est jeté et les cellules sont resuspendues dans un milieu d'extrusion X-vivo supplémenté avec 10 % FBS, pendant 50 minutes. Signalons que les 10 minutes de centrifugation comptent dans le temps d'extrusion. Cette phase d'extrusion de 50 min permet à l'excès du TH9402 de sortir des cellules. À la fin de la période d'efflux, les cellules sont mises dans des flasques à la concentration de 1×10^6 cellules/mL dans un volume final de 10 mL de milieu d'extrusion. Toutes les manipulations précédant l'étape d'exposition à la lumière sont effectuées à l'abri de la lumière. Pour la PDT, les flasques sont exposés à une énergie lumineuse de 5 j/cm^2 à une longueur d'onde de 514 nm sous une épaisseur de 1.3 mm, à la vitesse d'agitation cellulaire de l'appareil TheraluxTM (Celmed BioScience, Montréal, Canada) étant de 180 Rpm. Le processus d'exposition à la lumière est mesuré de façon continue et entièrement automatisé. Il s'arrête aussitôt que la dose intégrale de lumière (5 $\text{joules}/\text{cm}^2$) est atteinte. Une fois la PDT achevée, les cellules sont lavées et resuspendues avec du RPMI 1640, en vue de leur utilisation subséquente.

2.5.7. Extraction d'ARN messenger

L'extraction de l'ARN messenger (ARNm) s'est faite avec le kit d'extraction *QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit* (Amersham Biosciences, NJ, USA). Le protocole suivi était celui proposé par Amersham Biosciences. Ainsi, pour la phase d'extraction, le nombre maximal de cellules était de 10×10^6 par tube. Après une centrifugation dont le but était l'élimination du milieu de culture, l'extraction débutait par l'ajout de 0.4 mL de solution d'extraction (Guanidinium thiocyanate et N-lauroyl sarcosine) au culot cellulaire. Le mélange est vortexé afin d'obtenir une suspension homogénéisée. À cet homogénat, 0.8 mL de la solution d'élution (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA) est ajouté et le tout est mixé au vortex. La phase d'isolation de l'ARNm était effectuée comme suit. Un homogénat cellulaire est préparé en centrifugeant (entre 5000g et 16000g pendant 1 minute) le contenu des extractions faites plus haut. Le surnageant recueilli est placé dans un tube contenant un culot d'Oligo (dT) cellulose. L'ensemble est mélangé par inversion pendant 3 minutes et centrifugé à 16000g pendant 10 secondes. Après centrifugation, le surnageant est retiré par aspiration et jeté. S'ensuit l'étape de lavage au cours de laquelle 1 mL de la solution "High-Salt Buffer" (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl) est ajoutée au culot d'Oligo (dT) cellulose. Cinq lavages ont été effectués avec une étape de centrifugation de 10 secondes entre elles. Après chaque centrifugation, le surnageant était jeté et la solution "High-Salt Buffer" était ajoutée au culot d'Oligo (dT) cellulose. Après les 5 lavages, le culot était resuspendu avec 1ml de la solution "Low-Salt Buffer" (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl), puis centrifugé à 16000g max pendant 10 secondes pour un total de 3 lavages. Après la dernière étape de lavage, le culot était resuspendu dans 0.3 mL de "Low-Salt Buffer" et transféré dans une colonne. La colonne était centrifugée pendant 5 secondes et le surnageant rejeté. Par la suite, 0.5 mL de "Low-Salt buffer" était ajouté au culot qui était centrifugé à la vitesse maximale pendant 5 secondes. Cette étape était répétée 3 fois. Pour la phase d'élution, 0.2 mL de la solution d'élution (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA), chauffée à 65°C était ajouté à la colonne contenant l'Oligo (dT) cellulose. Après centrifugation, l'éluât contenant l'ARNm était recueilli dans un tube sans ribonucléase (H₂O RNase free).

La quantification de l'ARNm était effectuée suivant la formule : $[ARNm] = A_{260} \times 40$ mg/mL. L'ARNm ainsi obtenu était conservé à $-80^{\circ}C$, jusqu'à utilisation pour la synthèse d'ADN complémentaire

A₂₆₀ : absorbance de l'ARNm à 260nm

2.5.8. Synthèse d'ADN complémentaire

La synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) s'est faite en utilisant le kit, *First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Amersham Biosciences, NJ, USA). Brièvement, l'ARNm était chauffé à $65^{\circ}C$ pendant 10 minutes et conservé immédiatement sur la glace. Pour chaque amplification, 150 ng d'ARNm, dans un volume final de 20 µl d'eau, sans RNAase et DNAase étaient suffisants. À cette solution d'ARNm, 11 µl de la solution "*Bulk First-Strand cDNA Reaction Mix*" (Cloned, FPLCpure® Murine Reverse Transcriptase, RNAGuard (porcine), RNase/DNase-Free BSA, dATP, dCTP, dGTP, et dTTP) était ajoutés en plus de 1µl du primer pd(N)₆ (0.2 mg) et 1 µl de solution DTT (200 mM). Après avoir bien mélangé la préparation, l'ensemble était incubé sur une plaque chauffante à $37^{\circ}C$ pendant 1 heure. La quantification de l'ADNc était effectuée suivant la formule :

$[ADNc] = A_{260} \times 50$ mg/mL. L'ADNc ainsi obtenu était conservé à $-80^{\circ}C$ jusqu'à utilisation pour la PCR.

A₂₆₀ : absorbance de l'ADNc à 260nm

2.5.9. Amplification par PCR

Pour les analyses par PCR, nous avons utilisé le kit *Taq DNA Polymerase* (Qiagen Inc. Mississauga, Ontario, Canada). La préparation des échantillons était effectuée selon les recommandations de Qiagen. Les composantes, pour la préparation des échantillons, sont détaillées dans le tableau 2. Les séquences nucléotidiques des segments variables V bêta (V_β) et de la région constante (C_β) des lymphocytes T sont celles publiées par Pannetier et al.²⁰¹ et présentées dans le tableau 3.

L'analyse des échantillons s'est faite à l'aide de l'appareil GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Le programme utilisé était le suivant : une étape initiale d'incubation à 95°C pendant 4 minutes, suivie de 35 cycles de PCR dont : une étape de dénaturation de 60 secondes à 95°C, une étape de ligation de 60 secondes à 55°C, une étape d'extension de 60 secondes à 72°C.

Pour minimiser les combinaisons intra-PCR, un temps final de 7 minutes à 72°C était nécessaire. Les échantillons étaient analysés sur gels d'agarose 2% et colorés au bromure d'éthidium. Par la suite, les bandes étaient observées à l'aide de l'appareil à UV PV-26B (Bio/Can Scientific, Mississauga, Ontario, Canada).

2.5.10. Analyse spectrotypique (spectratyping)

Pour étudier la diversité du répertoire de la région variable du récepteur des lymphocytes T (Répertoire V bêta), nous avons utilisé la méthode du spectratyping. Les conditions de PCR précédant l'étape de séquençage sont celles décrites plus haut, à la seule différence que l'amorce (C_{β}), de la région constante était couplée au fluorochrome 6-carboxy-fluorescein (6-FAM). Les produits fluorescents générés lors de cette réaction de PCR, variant en longueur suivant la taille de la région CDR3 du récepteur des lymphocytes T (TCR) étaient par la suite soumis au séquençage. Cette étape s'effectuait à l'aide de l'appareil ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). La préparation type, pour l'analyse des produits amplifiés, sur l'analyseur génétique ABI PRISM® 3100 était la suivante. Dans une plaque de 96 puits, 24.7 mL de formamide, 0.3 ml de la solution standard de taille ROX-400 (GeneScan ®) et 0.5 - 1.0 mL des produits issues de la PCR étaient ajoutés. Le processus de séquençage était entièrement automatisé et l'analyse de la distribution de la taille de la région hyper variable du TCR (région CDR3) et de l'intensité du signal était effectué avec le logiciel GeneScan (Perkin-Elmer, Foster City, CA).

Tableau II : Composition de la réaction de PCR utilisant la Taq ADN Polymérase et la solution Q

Composantes	Volume/réaction (mL)	Concentration finale
Tampon 10x +15 mM MgCl ₂	10 mL	1 x
Solution Q 5x	20 mL	1 x
dNTP mix (10 mM chacun)	2 mL	200 mM /dNTP
Amorce V _β	Variable	0.25 mM
Amorce C _β	Variable	0.25 mM
Taq ADN polymérase	0.5 mL	2.5 unités/réaction
Eau distillée	Variable	_____
ADN	Variable	<1mg/réaction
Volume Total	100 mL	_____

Tableau III : Séquences des oligo-nucléotides des régions variables V bêta et constante C bêta

Segment spécifique des oligo-nucléotides	
Segment V bêta	Séquence des gènes V bêta (5' → 3')
V _β 1	CT GAA TGC CCA GAC AGC TCC AAG C
V _β 2	TC ACT GAT ACG GAG CTG AGG C
V _β 3.1	CCT TGC AGC CTA GAA ATT CAG T
V _β 4	GCC TCA AGT CGC TTC CAA CCT C
V _β 5.1	CAT TAT GAT AAA ATG GAG AGA GAT
V _β 5.2	AAG GTG GAG AGA GAC AAA GGA TTC
V _β 5.3	AG AAA GGA AAC CTG CCT GGT T
V _β 6	CT CTC ACT GTG ACA TCT GCC C
V _β 7	TAC AGG GTC TCA CGG AAG AAG C
V _β 8.1	CAT TAC TCA TAT GTC GCT GAC
V _β 8.2	CAT TAT TCA TAT GGT GCT GGC
V _β 8.3	T GCT GGC AAC CTT CGA ATA GGA
V _β 9	TCT CTC TAC ATT GGC TCT GCA GGC
V _β 10	ATC AAG TCT GTA GAG CCG GAG GA
V _β 11	G CAC TCA ACT CTG AAG ATC CAG AGC
V _β 12	G ATG GTG GGG CTT TCA AGG ATC
V _β 13	AGG CCT AAA GGA ACT AAC TCC CAC
V _β 14	AC GAC CAA TTC ATC CTA ACC AC
V _β 15	CCC ATC AGT CAT CCC AAC TTA TCC
V _β 16	C ACT CTG AAA ATC CAA CCC AC
V _β 17	AG TGT TCC TCG AAC TCA CAG
V _β 18	C AGC CGG CCA AAC CTA ACA TTC TC
V _β 19	CT GCT AAG AAA CCA TGT ACC A
V _β 20	TC TGC AGC CTG GGA ATC AGA A
Segment C bêta	Séquence des gènes C bêta (5' → 3')
C _β 20	CTT GGG TGG AGT CAC ATT TCT C

CHAPITRE III : RÉSULTATS

3. Résultats

3.1. Induction de la GVHDc

Le premier objectif de notre étude était de reproduire la maladie du greffon contre l'hôte dans un modèle murin. Le modèle consistait en l'injection de splénocytes des souris B10.D2 dans des souris Balb/c irradiées. Ces souris sont compatibles sur le plan de leurs antigènes d'histocompatibilité majeurs, mais diffèrent par leurs multiples antigènes d'histocompatibilité mineurs. La GVHDc était donc induite dans ces conditions à travers une barrière d'antigènes mineurs d'histocompatibilité. Plusieurs paramètres dont le poids, l'évaluation clinique, l'évaluation histologique, l'évaluation immunologique incluant la production de lymphocytes CD4+CD25+ et la production d'anticorps anti-ADNdb, et finalement la survie ont été évalués dans les différents groupes.

3.1.1. Évaluation du poids des souris post greffe

Dans le but d'induire la GVHDc, nous avons injecté des 25×10^6 splénocytes provenant des souris B10.D2 à des souris Balb/c irradiées : cela représentait le groupe GVHDc (B10.D2 → Balb/c). Comme contrôles, nous avons utilisé un groupe syngénique dans lequel les souris Balb/c irradiées ont reçu 25×10^6 splénocytes d'autres souris Balb/c. Le groupe de souris servant de contrôle d'asepsie du greffon était constitué des souris B10.D2 irradiées recevant aussi 25×10^6 splénocytes d'autres souris B10.D2, soit les mêmes ayant servi à injecter les souris Balb/c, dans le groupe GVHDc. La figure 7 nous montre le pourcentage du poids initial des souris dans les différents groupes après la greffe. Ainsi, on constate qu'après une perte initiale de poids au jour 3 post greffe dans tous les groupes, on assiste à une reprise du poids. Cette prise de poids, va croissante avec le temps dans les groupes syngéniques (Balb/c → Balb/c) et dans le groupe servant de contrôle d'asepsie (B10.D2 → B10.D2). Toutefois, dans le groupe où

les splénocytes allogéniques sont injectés à des souris Balb/c, on observe que le gain de poids n'est pas aussi important que celui observé dans les groupes syngénique et contrôle d'asepsie. En effet, les souris GVHDc présentent une perte de poids significative ($P < 0.001$) par rapport aux souris des deux groupes contrôles.

3.1.2. Évaluation clinique de la GVHDc

L'évaluation clinique de la GVHDc s'est faite en observant les signes externes tels la posture des souris, les atteintes cutanées sur les pattes et les oreilles ainsi que la qualité du pelage sur le corps des souris. De nos observations, il est ressorti qu'après l'injection des splénocytes, les souris étaient moins alertes dans les différents groupes. Toutefois, au fur et à mesure qu'elles reprenaient du poids, les souris dans le groupe syngénique (Balb/c → Balb/c) et contrôle d'asepsie (B10.D2 → B10.D2) étaient plus alertes. Leur pelage ne présentait aucun signe d'infection, ni de perte de poils, ni d'atteinte cutanée sur le plan du corps, des oreilles et des pattes comme on peut l'observer sur la figure 8. À l'opposé, les souris dans le groupe GVHDc (B10.D2 → Balb/c), bien qu'elles présentent une légère prise de poids, n'étaient pas aussi alertes que les souris des groupes contrôles. Plus encore, elles présentaient de sérieuses lésions sur le corps. En effet, comme on peut le remarquer sur la figure 8, ces souris présentaient des atteintes cutanées sur le plan des oreilles et des pattes qui, parfois, étaient enflées. Ces atteintes, comparables à la sclérodémie, apparaissaient généralement vers la deuxième semaine faisant suite à la greffe. Les souris dans le groupe GVHDc présentaient aussi des atteintes oculaires et de sérieuses pertes de poils. Cette perte de poils allait grandissant avec le temps, et il n'était pas exclu d'observer des souris sans pelage aux alentours du jour 50 post greffe. Les souris dans tous les groupes ne présentaient aucun signe de diarrhée. Il ressort donc que l'injection de splénocytes allogéniques a entraîné chez les souris du groupe GVHDc des modifications sur le plan cutané telles une perte de poils, des lésions cutanées avec signes de sclérodémie sur le plan des pattes et des oreilles. Toutes les souris du groupe syngénique avaient un profil normal : pelage intact, physique alerte, prise de poids.

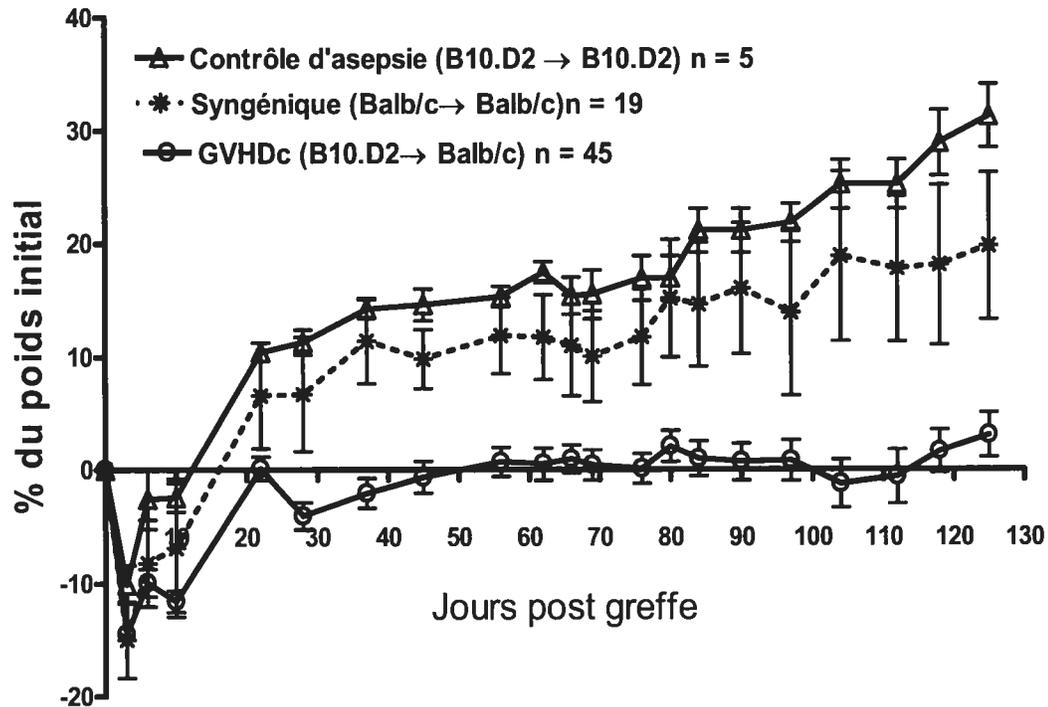


Figure 7 : Pourcentage du poids initial des souris injectées avec des splénocytes allogéniques et autologues.

Toutes les souris receveuses dans les différents groupes ont reçu une irradiation (^{60}Co) de 600 cGy au jour 0, suivie de l'injection de splénocytes. Les souris Balb/c dans le groupe GVHDc (B10.D2 → Balb/c) ont reçu 25×10^6 splénocytes de souris B10.D2. Les souris Balb/c dans le groupe syngénique (Balb/c → Balb/c) ont reçu 25×10^6 splénocytes provenant des souris Balb/c. Le contrôle d'asepsie (B10.D2 → B10.D2) est composé de souris B10.D2 ayant reçu 25×10^6 splénocytes d'autres souris B10.D2. Les courbes représentent les moyennes du pourcentage du poids initial des souris dans les différents groupes. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne (S.E.M). Ce graphique est représentatif de toutes les expériences qui ont impliquées les injections de splénocytes, soit 14 au total.

$p < 0.001$: Souris GVHDc (B10.D2 → Balb/c) vs souris syngéniques (Balb/c → Balb/c)

$p < 0.001$: Souris GVHDc (B10.D2 → Balb/c) vs contrôle d'asepsie (B10.D2 → B10.D2)

$p > 0.05$: Souris syngéniques (Balb/c → Balb/c) vs contrôle d'asepsie (B10.D2 → B10.D2)

Le pourcentage du poids initial est calculé par la formule :

$$\text{Pourcentage du poids initial} = \left[\frac{(\text{Poids de la souris au jour N post greffe}) \times 100}{\text{Poids de la souris au jour 0}} \right] - 100$$



Figure 8 : Évaluation clinique de la GVHDc

Les souris dans les groupe syngénique (Balb/c → Balb/c) et GVHDc (B10.D2 → Balb/c) ayant le même âge ont été évaluées pour les signes de la GVHDc au jour 45 post greffe. Dans la colonne **A**, nous avons les représentations graphiques d'une souris normale ne montrant aucun signe de GVHDc sur les oreilles (photo du haut à gauche), les pattes (photo du centre à gauche) et le corps (photo du bas à gauche). Dans la colonne **B**, nous avons les représentations graphiques d'une souris atteinte de GVHDc et montrant des atteintes cutanées sur le plan des oreilles (photo du haut à droite), des atteintes sur le plan des pattes (photo du centre à droite) et des lésions sur le corps (photo du bas à droite).

3.1.3. Évaluation histologique de la GVHDc

Nous avons par la suite effectué des prélèvements de tissus sur les souris des groupes syngéniques et GVHDc afin d'effectuer une évaluation histopathologique de la GVHDc. Pour ce faire, nous avons effectué des prélèvements de la peau, du foie, de la rate et du petit intestin des souris. Après coloration à l'hématoxyline-phloxine-éosine, nous avons évalué, avec l'aide d'un pathologiste, les échantillons. La figure 9 présente des coupes représentatives de la peau et du foie chez les souris syngéniques et GVHDc. On peut constater que la peau des souris syngéniques ne présente aucune infiltration lymphocytaire, encore moins une perte de gras. Le derme est intact ainsi que les follicules pileux. À contraire, la peau des souris GVHDc présente des atteintes sur le plan du derme. On observe une disparition importante des tissus adipeux. Plus encore, on observe chez les souris GVHDc une infiltration lymphocytaires des follicules pileux, élément caractéristique de la GVHDc. Sur le plan du foie, les souris syngéniques ne présentent aucune anomalie. À l'opposé, les coupes histologiques du foie des souris GVHDc montrent une infiltration lymphocytaire des canaux biliaires. Les observations de la rate ont montré que cette dernière était hypertrophiée, à la suite de l'injection des splénocytes allogéniques dans le groupe GVHDc. Cette hypertrophie de la rate était notable, dans l'intervalle des 4 premières semaines faisant suite à l'injection des splénocytes allogéniques. Toutefois, avec le temps, la rate des souris dans le groupe GVHDc s'atrophiait, mais une hyperplasie folliculaire était toujours observée sur le plan des coupes histologiques. Dans le groupe syngénique, nous n'avons noté aucune anomalie sur le plan de la rate. Pour ce qui était des sections du petit intestin, nous avons constaté que chez toutes les souris du groupe GVHDc analysées, soient six, seules deux ont présenté des cellules épithéliales en apoptose (Tableau 4). Dans le groupe contrôle, aucune anomalie n'a été observée sur le plan des sections du petit intestin. Il ressort donc que l'injection de splénocytes allogéniques a entraîné chez les souris du groupe GVHDc une infiltration lymphocytaire des follicules pileux, la perte de gras. Sur le plan hépatique, l'injection de ces splénocytes allogéniques a provoqué une infiltration lymphocytaire sur le plan des canaux biliaires.

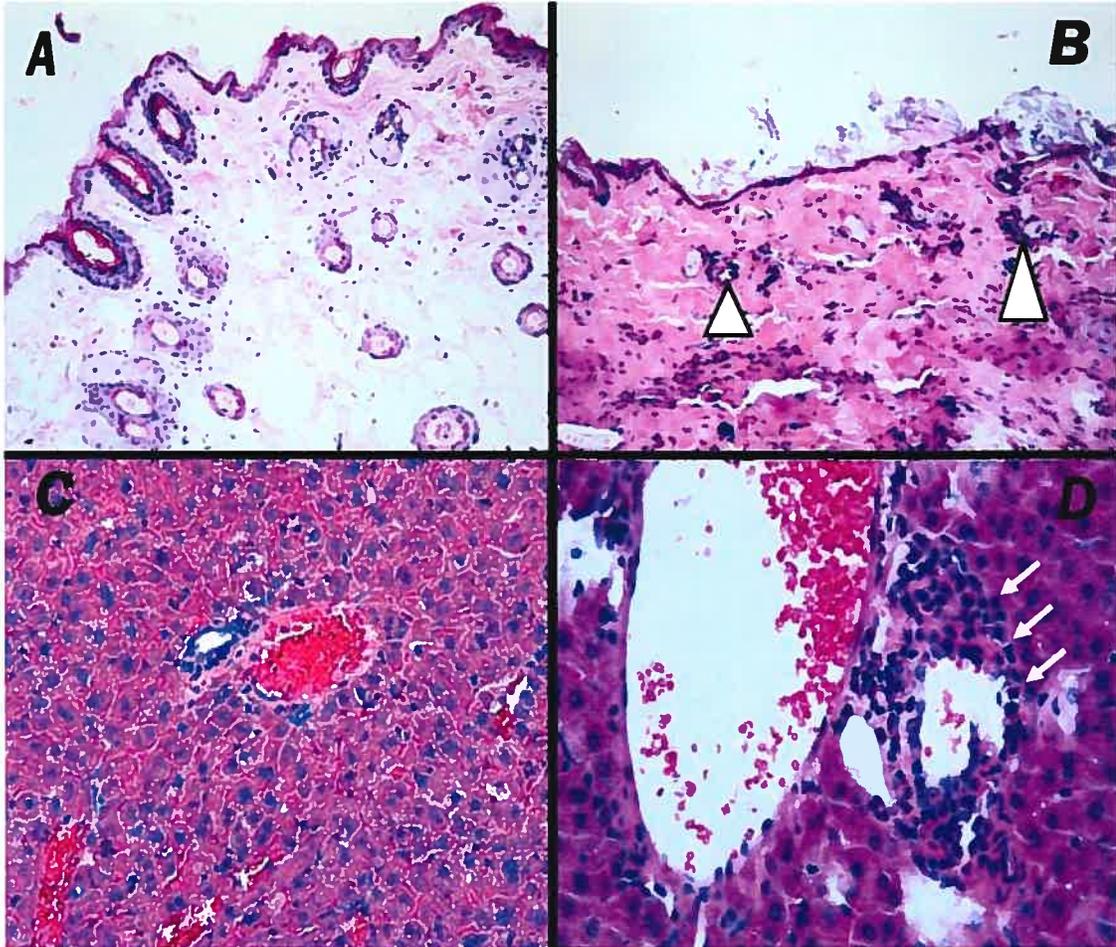


Figure 9 : Coupes histologiques comparatives de la peau et du foie de souris syngéniques et GVHDc

Les photos (A) et (C) représentent, respectivement, les coupes histologiques représentatives, de la peau et du foie d'une souris Balb/c ne souffrant pas de GVHDc. Les photos B et D représentent, respectivement, les coupes histologiques représentatives, de la peau et du foie d'une souris Balb/c souffrant d'une GVHDc. En (B), on constate que l'épiderme et le derme sont altérés, il y'a aussi infiltration lymphocytaire des follicules pileux (triangles blancs) avec une perte énorme des tissus adipeux. À l'opposé (A), l'épiderme, le derme et les tissus adipeux sont intacts ainsi que les follicules pileux. Pour ce qui est du foie (D) on constate une infiltration lymphocytaire des canaux biliaires (flèches blanches). Le foie d'une souris normale (C) montre au contraire un aspect normal. Les coupes histologiques ont été colorées à l'hématoxyline-phloxine-éosine.

Tableau IV : Récapitulatif des observations faites sur les coupes histologiques des souris GVHDc

	Peau	Foie	Rate	Intestin
Observations	Atrophie	Atrophie des canaux biliaires	Atrophie	
	Infiltration lymphoïde des follicules pileux	Infiltration lymphoïde des canaux biliaires	Hyperplasie folliculaire	Cellules épithéliales en apoptose
	2/4	5/6	5/5	2/6

La rate, quant à elle, a présenté des hyperplasies folliculaires, alors que l'intestin était moins affecté par l'injection des splénocytes allogéniques. Les tissus analysés des souris du groupe syngénique avaient un profil normal.

3.1.4. Cinétique de production d'anticorps anti-ADNdb

La production d'anticorps anti-ADNdb a été évaluée à l'aide d'un test ELISA quantitatif. Pour ce faire, nous avons prélevé, à différents temps, le sang des souris appartenant aux groupes syngéniques et GVHDc. Le sérum obtenu a été analysé afin de détecter la présence et la cinétique de production d'anticorps anti-ADNdb (Figure 10). On constate que 14 jours après injection de splénocytes, les souris du groupe GVHDc (B10.D2 → Balb/c), ont un taux moyen d'anticorps anti-ADNdb de l'ordre de 20 mg/mL, alors que chez les souris syngéniques (Balb/c → Balb/c) le taux moyen est de l'ordre de 5 mg/mL. Cette différence de production entre les deux groupes de souris va s'accroître avec le temps. On peut en effet constater que la production d'anticorps anti-ADNdb, dans le groupe GVHDc, passe de 20 mg/mL au jour 14 à environ 38 mg/mL au jour 21. De plus, on constate que ce taux est à son maximum dans l'intervalle qui va du jour 21 (38 mg/mL) au jour 30 (42 mg/mL). Ce maximum peut chez certaines souris atteindre une intensité maximale de 50 mg/mL d'anticorps anti-ADNdb. Après cette explosion dans la production d'anticorps anti-ADNdb, les souris du groupe GVHDc ont une production qui va à la baisse. On constate en effet une chute de la production qui passe de 42 mg/mL au jour 30, à sensiblement 15 mg/mL au jour 40. Toutefois, cette chute se stabilise avec le temps. Comme on peut le constater au jour 80 post greffe, le taux moyen d'anticorps anti-ADNdb est toujours sensiblement de l'ordre de 15 mg/mL. À l'opposé, les souris du groupe syngénique montrent un taux moyen d'anticorps anti-ADNdb qui varie très peu avec le temps. En effet, il est sensiblement de 5 mg/mL du jour 14 au jour 80 post greffe.

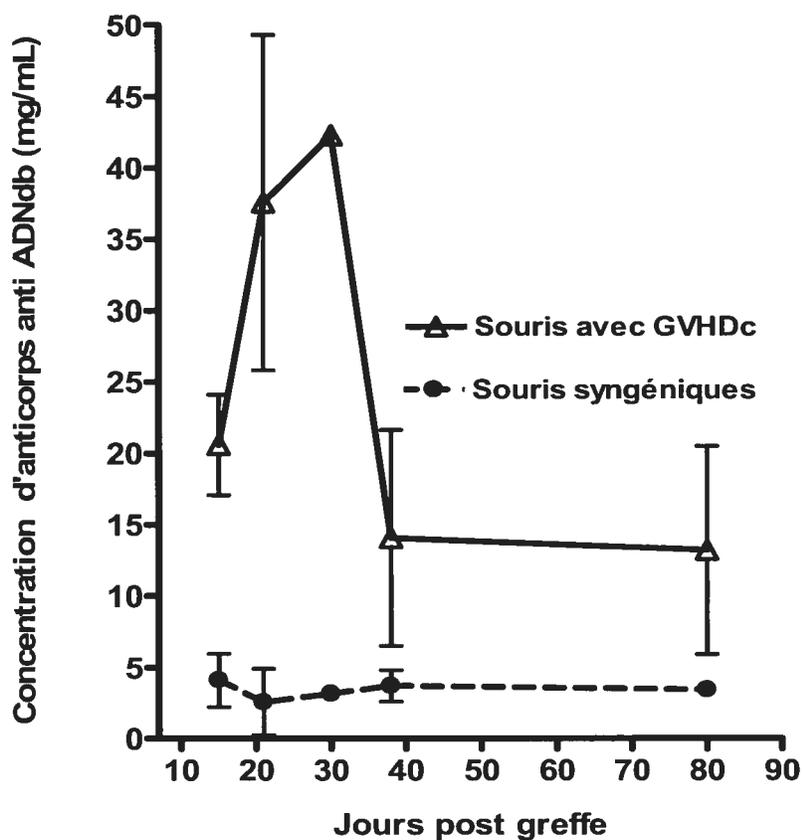


Figure 10 : Cinétique de production d'anticorps anti-ADNdb dans les souris GVHDc et syngéniques.

Le sérum des souris GVHDc (n=4) et syngéniques (n= 4) a été prélevé à différents moments après la greffe. La détection d'anticorps anti-ADNdb s'est faite par le biais d'un test ELISA quantitatif. Tous les échantillons de sérum ont été testés en duplicata et simultanément avec des échantillons d'anticorps anti-ADNdb de concentration connue, en vue de déterminer la courbe standard. Trois expériences de cinétiques ont été effectuées. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne (S.E.M).

$p = 0.0238$ (GVHDc vs syngénique). La valeur « p » est calculée par le test T de Student.

Finalement, le taux moyen, pour la période de temps allant du jour 14 au jour 80 post greffe, d'anticorps dans le groupe GVHDc (B10.D2 → Balb/c) est statistiquement significatif ($p = 0.0238$) par rapport au taux d'anticorps anti-ADNdb dans le groupe syngénique. Il ressort de ces observations que l'injection de splénocytes allogéniques (B10.D2 → Balb/c) conduit à une production marquée d'anticorps anti-ADNdb. Cette production pouvant atteindre de taux de 50 mg/mL avec des valeurs maximales situées entre le jour 21 et le jour 30 post greffe. Au contraire, l'injection de splénocytes autologues (Balb/c → Balb/c) présente une production de 5 mg/ml quasi stable tout au long de l'évolution de la greffe.

3.1.5. Association entre les cellules CD4+CD25+ et la GVHDc

Au cours de nos expériences, nous avons voulu savoir si la GVHDc induite par l'injection de splénocytes allogéniques était associée avec une hausse ou une baisse des cellules CD4+CD25+. Pour ce faire, nous avons prélevé les splénocytes des souris GVHDc et syngéniques afin d'analyser par cytométrie en flux, le taux de cellules CD4+CD25+. La figure 11 représente le pourcentage de cellules CD4+CD25+ tel qu'il a été observé chez les souris du groupe GVHDc (B10.D2 → Balb/c) et syngénique (Balb/c → Balb/c). On constate que les souris du groupe GVHDc ont un pourcentage de cellules CD4+CD25+ supérieur (20%) à celui des souris du groupe syngénique qui est de 10%. Cette différence est statistiquement significative ($p = 0.024$) dans le groupe GVHDc par rapport au groupe syngénique. Les souris du groupe GVHDc ont donc une augmentation du pourcentage des cellules CD4+CD25+.

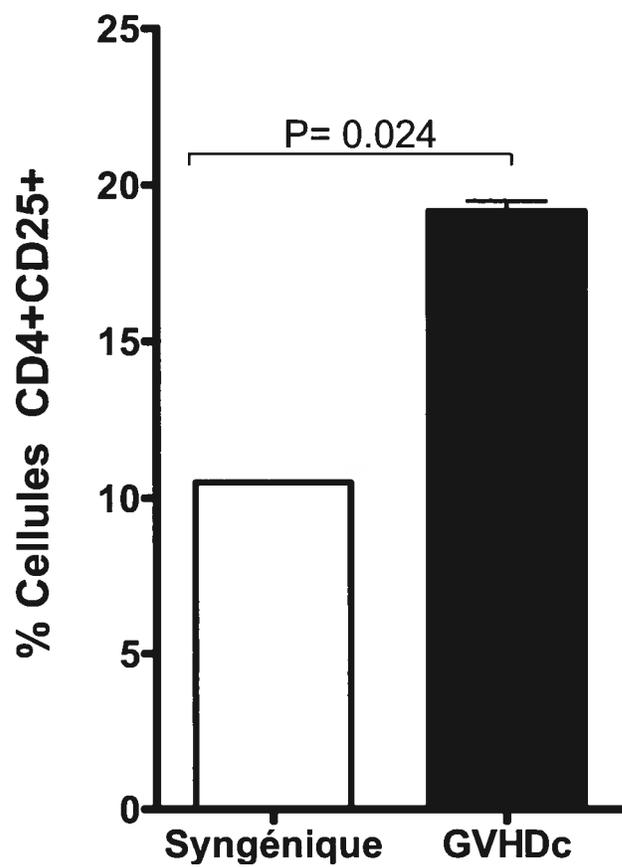


Figure 11 : Pourcentage des cellules CD4+CD25+ après greffe de splénocytes chez les souris du groupe syngénique et GVHDc

3.1.6. Évaluation de la survie dans le groupe syngénique et GVHDc

Un autre paramètre que nous avons évalué est la survie des souris dans les différents groupes après la greffe de splénocytes. Les souris qui avaient atteint l'un et/ou l'autre des points limites, à savoir une perte de poids dépassant 25% du poids initial ou des lésions graves irréversibles étaient euthanasiées. L'analyse des résultats (Figure 12), montre que l'injection de splénocytes autologues dans le groupe syngénique (Balb/c → Balb/c), n'entraîne aucune mortalité. En effet, aucun décès n'est constaté dans ce groupe, à plus de 100 jours post greffe. Dans le groupe GVHDc (B10.D2 → Balb/c), l'injection de splénocytes allogéniques a provoqué une mortalité significative ($p < 0.05$) dans ce groupe en comparaison au groupe syngénique. En effet, on observe que la mortalité survient vers le jour 60 post greffe et, va croissante avec le temps. Dans l'ensemble de nos expériences, nous avons parfois observé une mortalité un peu plus tôt (3 semaines post greffe).

Globalement, les expériences ci-dessus nous ont permis d'évaluer l'effet de l'injection de splénocytes allogéniques et autologues dans les souris receveuses. Les résultats obtenus montrent des différences dans les groupes GVHDc et syngéniques et nous ont amenés à utiliser ce modèle (B10.D2 → Balb/c) pour la réalisation de notre étude.

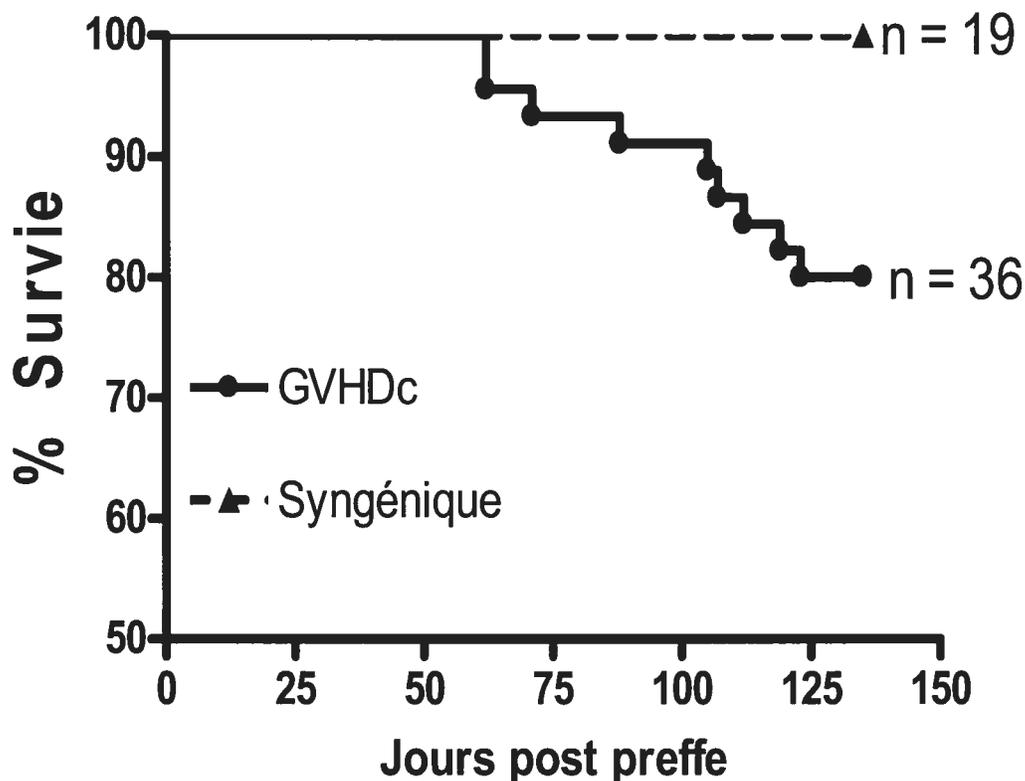


Figure 12 : Courbe de survie des souris dans les groupes GVHDc et syngénique après greffe de splénocytes

Toutes les souris receveuses, dans les différents groupes, ont reçu une irradiation (^{60}Co) de 600 cGy au jour 0, suivie de l'injection de splénocytes. Les souris Balb/c, dans le groupe GVHDc (B10.D2 \rightarrow Balb/c, n = 45), ont reçu 25×10^6 splénocytes de souris B10.D2. Les souris Balb/c, dans le groupe syngénique (Balb/c \rightarrow Balb/c, n = 19), ont reçu 25×10^6 splénocytes provenant des souris Balb/c. Les souris qui avaient atteint l'un et/ou l'autre des points limites, à savoir une perte de poids dépassant 25% du poids initial ou des lésions graves irréversibles, étaient euthanasiées. Le décompte se faisait au fil du temps et la comparaison de la survie et de la mortalité était significativement plus élevée dans le groupe GVHDc ($p < 0.05$; test de Logrank) par rapport au groupe syngénique.

3.2. Traitement de la GVHDc

3.2.1. Effet de la PDT sur les populations lymphoïdes

La première étape du traitement de la GVHDc consistait à exposer les splénocytes des souris GVHDc et syngéniques à la PDT ou non, cela en vue de leur injection subséquente dans les souris présentant ou non une GVHDc. Il était donc important de déterminer l'effet de la PDT sur les populations lymphoïdes afin de déterminer la nature des cellules injectées aux souris. Les populations CD4⁺ et CD8⁺, associées ou non au marqueur de différenciation CD25, ainsi que les lymphocytes B et les cellules NK1.1 ont été évalués. Globalement, nous avons constaté, après décompte au bleu trypan, que la PDT éliminait plus de cellules provenant des splénocytes des souris GVHDc que des splénocytes provenant des souris syngéniques (Figure 13). En effet, dans le groupe syngénique, on constate qu'avant la PDT, la viabilité des splénocytes totaux est de 93.6 % en moyenne. Après la PDT, la viabilité de ces mêmes splénocytes est de 64.6 %. Cette différence de la viabilité, dans le groupe syngénique n'est cependant pas statistiquement significative ($p > 0.05$ syngénique pré PDT par rapport à syngénique post PDT). Dans le groupe GVHDc, on constate qu'avant la PDT, la viabilité des splénocytes totaux est aussi de l'ordre de 90%. Toutefois, après la PDT, la viabilité des splénocytes n'est plus que de 31.4 % en moyenne. La PDT induit donc une perte de splénocytes provenant des souris GVHDc qui est de l'ordre de 60% en moyenne. De plus, il y a une différence significative post PDT ($p < 0.05$) entre la viabilité des cellules syngéniques et celles des souris GVHDc. Globalement, cette expérience fait donc ressortir que les splénocytes provenant des souris avec GVHDc sont plus sensibles à la PDT que les splénocytes provenant des souris syngéniques.

La mort cellulaire, telle qu'évaluée au bleu trypan, ne nous renseigne pas sur le mode de mort cellulaire induit par la PDT. Pour plus de précision sur le type de mort affectant chacune des populations cellulaires, nous avons associé les marqueurs d'apoptose (AnnV) et de nécrose (7AAD) aux différentes populations (CD4, CD8, CD25, B, NK1.1).

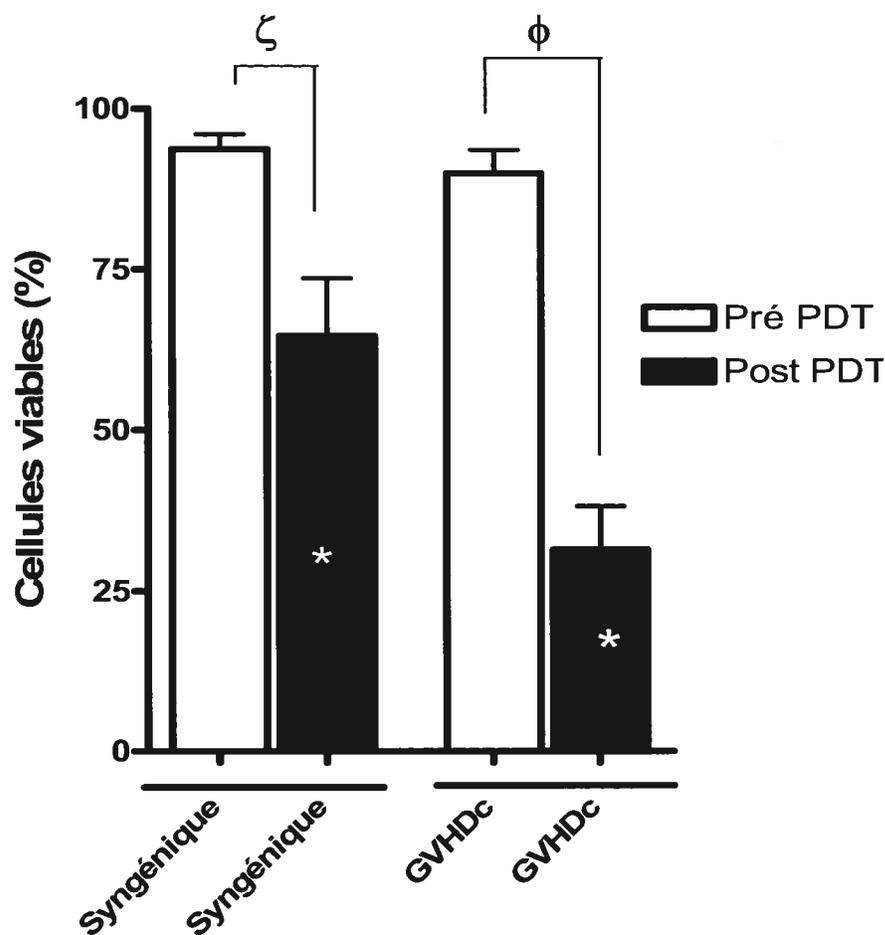


Figure 13 : Effet de la PDT sur les splénocytes totaux provenant des souris syngéniques et GVHDc

Avant la PDT, la viabilité des splénocytes totaux, des souris syngéniques et GVHDc a été évaluée par un décompte au bleu trypan. Après la PDT, la viabilité a de nouveau été évaluée par un décompte au bleu trypan. Les résultats représentent la moyenne +/- l'erreur type de la moyenne (S.E.M). (ϕ : $p < 0.001$ GVHDc pré PDT vs GVHDc post PDT), (ζ : $p > 0.05$ syngénique pré PDT vs syngénique post PDT), (* : $p < 0.05$ syngénique post PDT vs GVHDc post PDT). Les valeurs « p » ont été calculées par le test de l'analyse de variance à un facteur (Test ANOVA).

3.2.2. Élimination spécifique des cellules activées par la PDT

L'efficacité de la PDT à éliminer les cellules T activées dépend de leur capacité à incorporer le TH9402. Les conditions de traitement (10 μ M TH9402, 40 minutes coloration, 50 minutes d'extrusion, exposition à la lumière 5 j/cm²) ont été évaluées dans notre laboratoire et ont montré une accumulation préférentielle du TH9402 dans les cellules T activées. Nous avons donc soumis les splénocytes des souris GVHDC à ces conditions et la viabilité a été évaluée immédiatement après la PDT par cytométrie en flux. Le marquage des récepteurs de différenciation CD4 et CD8 a été effectué en association avec le marqueur d'activation CD25 ainsi qu'avec l'annexine V (un marqueur précoce de l'apoptose) et le 7-actinomycine D (7AAD) qui marque les cellules mortes. Les cellules viables sont les cellules AnnV⁻ / 7AAD⁻, les cellules AnnV⁺ / 7AAD⁻ sont celles qui sont mortes par apoptose, alors que les cellules AnnV⁻ / 7AAD⁺ sont mortes par nécrose alors que celles qui sont AnnV⁺ / 7AAD⁺ sont mortes par apoptose et/ou nécrose. Les mêmes marquages ont été réalisés pour les cellules B et NK1.1.

3.2.2.1. Effet de la PDT sur les CD4+CD25+ et CD4+CD25-

L'application des conditions de traitement mentionnées ci-dessus sur des splénocytes activés (CD4+CD25+) montre que la PDT exerce un effet important sur ces derniers en comparaison avec les cellules non activées (CD4+CD25-). En effet, on constate (Figure 14.A) qu'avant la PDT près de 80% des cellules CD4+CD25+ sont vivantes (AnnV⁻/7AAD⁻). Après la PDT, approximativement 20% de ces mêmes cellules sont vivantes. Par ailleurs, on constate que parmi les cellules mortes, une proportion de 60% est AnnV⁺/7AAD⁺ alors que moins de 5% des cellules mortes sont éliminées directement par apoptose (AnnV⁺/7AAD⁻) et sensiblement 10% directement par nécrose (AnnV⁻/7AAD⁺). À l'opposé, la fraction CD4+CD25- de ces mêmes splénocytes montre un patron différent. En effet, on peut observer (Figure 14.B) que la viabilité des cellules CD4+CD25- telle qu'il a été présenté par le marquage AnnV⁻/7AAD⁻, est d'environ 85% en moyenne avant la PDT.

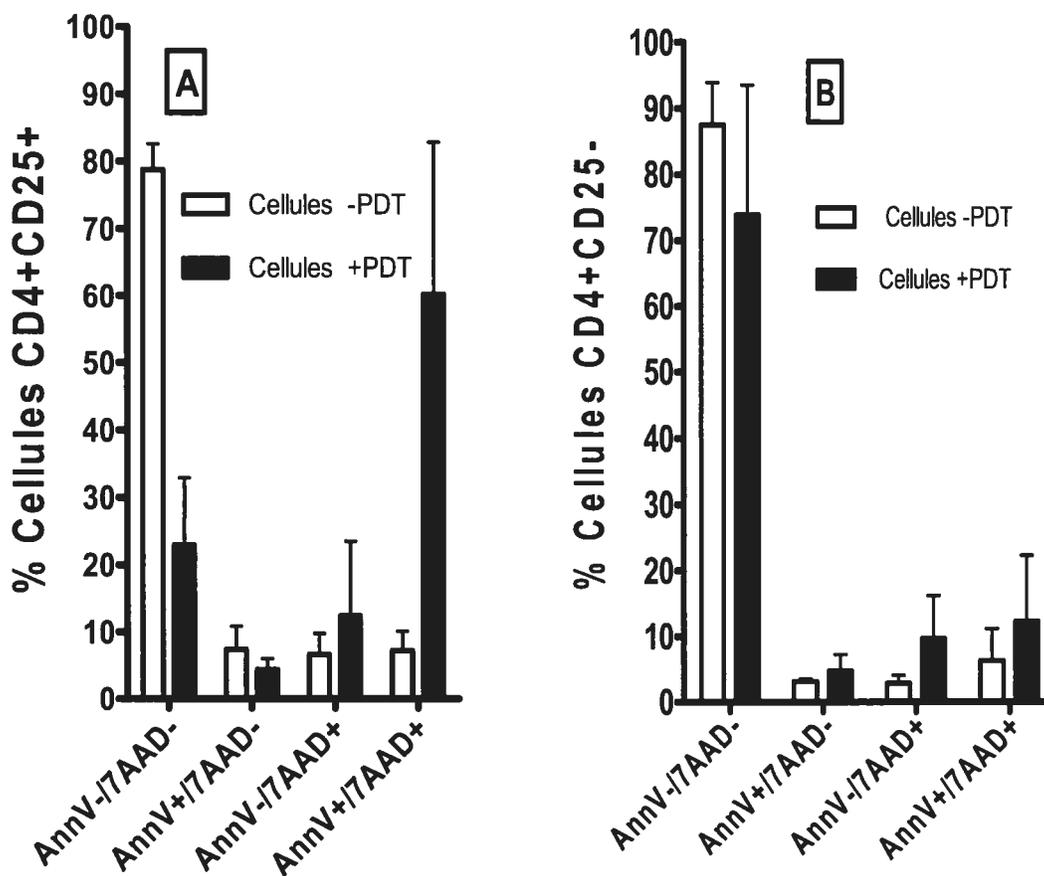


Figure 14 : Mécanisme de la mort cellulaire, induite par la PDT, sur les populations CD4+CD25+ et CD4+CD25-

Les splénocytes des souris GVHDC ont été traités à la PDT avec 10 μ M de TH9402. Les splénocytes ont été marqués avec les anticorps CD4/CD25/AnnV/7AAD. Les cellules viables sont les cellules AnnV- / 7AAD-, les cellules AnnV+ / 7AAD- sont celles qui sont mortes par apoptose, les cellules AnnV- / 7AAD+ sont mortes par nécrose alors que celles qui sont AnnV+ / 7AAD+ sont mortes par apoptose et/ou nécrose. Les graphiques sont la compilation de 3 expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne (S.E.M). L'évaluation a été réalisée dans un intervalle de 2 à 3 heures post PDT.

Toutefois, lorsque cette fraction est soumise à la PDT, on note que le pourcentage de viabilité chute très peu (75% en moyenne). On peut cependant observer une différence quant au mode de mort cellulaire mis en jeu. En effet, on constate que parmi le peu de cellules éliminées après la PDT, on retrouve presque autant de cellules AnnV+/7AAD+ que de cellules AnnV+/7AAD-. Dans l'ensemble, on constate donc que les cellules activées CD4+CD25+ sont très sensibles à la PDT et que la majorité des cellules CD4+CD25+ mortes sont AnnV+/7AAD+. À contraire, les cellules CD4+CD25- sont très peu sensibles à la PDT, et celles qui sont mortes semblent impliquer l'apoptose de façon plus importante.

3.2.2.2. Effet de la PDT sur les CD8+CD25+ et CD8+CD25-

Nous avons évalué de la même manière l'effet de la PDT et le mode de mort cellulaire induit par celle-ci sur les populations CD8+CD25+ et CD8+CD25-. On constate que les cellules CD8 activées exprimant le récepteur CD25 (CD8+CD25+) présentent également une grande sensibilité face à la thérapie photodynamique. En effet, comme nous pouvons l'observer (Figure 15.A), le pourcentage de cellules CD8+CD25+ viables (AnnV-/7AAD-) est de l'ordre de 50%. Il est à noter que cette viabilité précédant la PDT est cependant inférieure à ce qui est observé dans les autres populations mentionnées plus haut (près de 80% pour les CD4+CD25+ et plus de 85% pour les CD4+CD25-). Néanmoins, on peut noter que la PDT a le même effet sur les populations CD8+CD25+ que sur les populations CD4+CD25+. Ainsi, le nombre de cellules viables (AnnV-/7AAD-) passe de 50% avant la PDT à un peu moins de 15% après la PDT. De plus, le patron de mort cellulaire est le même que celui des CD4+CD25+. On note que la majorité (65%) des cellules CD8+CD25+ mortes, après la PDT, est AnnV+/7AAD+, 15% en moyenne sont mortes directement par nécrose (AnnV-/7AAD+) et moins de 5% sont mortes directement par apoptose (AnnV+/7AAD-). À l'opposé, la fraction CD8+CD25- de ces mêmes splénocytes montre un patron différent. En effet, on peut observer (Figure 15.B) que la viabilité des cellules CD8+CD25- telle qu'elle a été présentée par le marquage AnnV-/7AAD- est de 85% en moyenne avant la PDT.

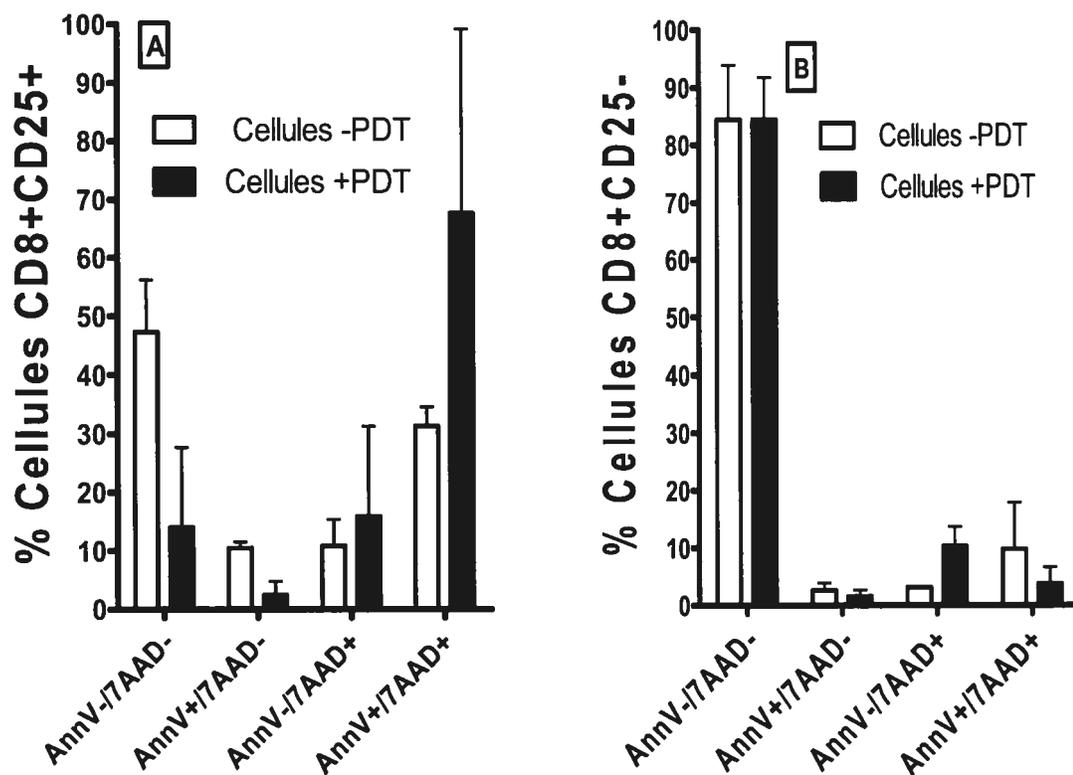


Figure 15 : Mécanisme de la mort cellulaire, induite par la PDT, sur les populations CD8+CD25+ et CD8+CD25-

Les splénocytes des souris GVHDC ont été traités à la PDT avec 10 μ M de TH9402. Les splénocytes ont été marqués avec les anticorps CD8/CD25/AnnV/7AAD. Les cellules viables sont les cellules AnnV- / 7AAD-, les cellules AnnV+ / 7AAD- sont celles qui sont mortes par apoptose, les cellules AnnV- / 7AAD+ sont mortes par nécrose alors que celles qui sont AnnV+ / 7AAD+ sont mortes par apoptose et/ou nécrose. Les graphiques représentent la compilation de 3 expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne (S.E.M). L'évaluation a été réalisée dans un intervalle de 2 à 3 heures post PDT.

Toutefois, lorsque cette fraction est soumise à la PDT, on note que le pourcentage de viabilité n'est pas ou peu affecté (85% en moyenne). Par ailleurs, cet effet de la PDT sur les populations CD8+CD25- est comparable au profil de la fraction CD4+CD25-. On peut cependant observer une légère différence quant à la proportion de cellules mortes directement par nécrose (AnnV-/7AAD+) après la PDT dans la fraction CD8+CD25-. En effet, dans cette fraction la plus forte mortalité post PDT soit 10% est due à la nécrose (AnnV-7AAD+). Comparativement, dans la fraction CD4+CD25- (Figure 14.B), la mortalité due directement à la nécrose, bien que de 10%, est inférieure à celle qui est induite par l'apoptose et/ou la nécrose (AnnV+/7AAD+), soit sensiblement 12.5%. Dans la fraction CD8+CD25- (Figure 15.B) la proportion de cellules AnnV+/7AAD+ est inférieure à 5%. Dans l'ensemble, on constate que les cellules activées CD8+CD25+ sont fortement sensibles à la PDT et que la majorité des cellules CD4+CD25+ mortes sont AnnV+/7AAD+. À contraire, les cellules CD8+CD25- sont très peu sensibles à la PDT, mais celles qui sont mortes parmi elles présentent une plus grande proportion de cellules mortes par nécrose (AnnV-/7AAD+).

3.2.2.3. Effet de la PDT sur les lymphocytes B

L'effet de la PDT et le mode de mort induite ont été évalués, dans les mêmes conditions, sur les lymphocytes B. Les splénocytes provenaient des souris présentant une GVHDc. On observe que parmi les splénocytes quiescents, les cellules B sont les plus sensibles à la PDT (Figure 16). En effet, avant la PDT, 90% des cellules B sont viables (AnnV-/7AAD-). Or, après la PDT, la quasi-totalité des cellules soit 90% est directement éliminée par nécrose (AnnV-/7AAD+). Cette élimination des cellules B par la PDT n'est pas exclusive aux souris atteintes de GVHDc. Les expériences faites dans notre laboratoire ont démontré que les lymphocytes B provenant de sujets sains tant chez l'homme que chez la souris (données non présentées) sont aussi sensibles à la PDT.²⁰² Il est cependant utile de préciser que les cellules B peuvent être régénérées rapidement à partir de cellules souches.

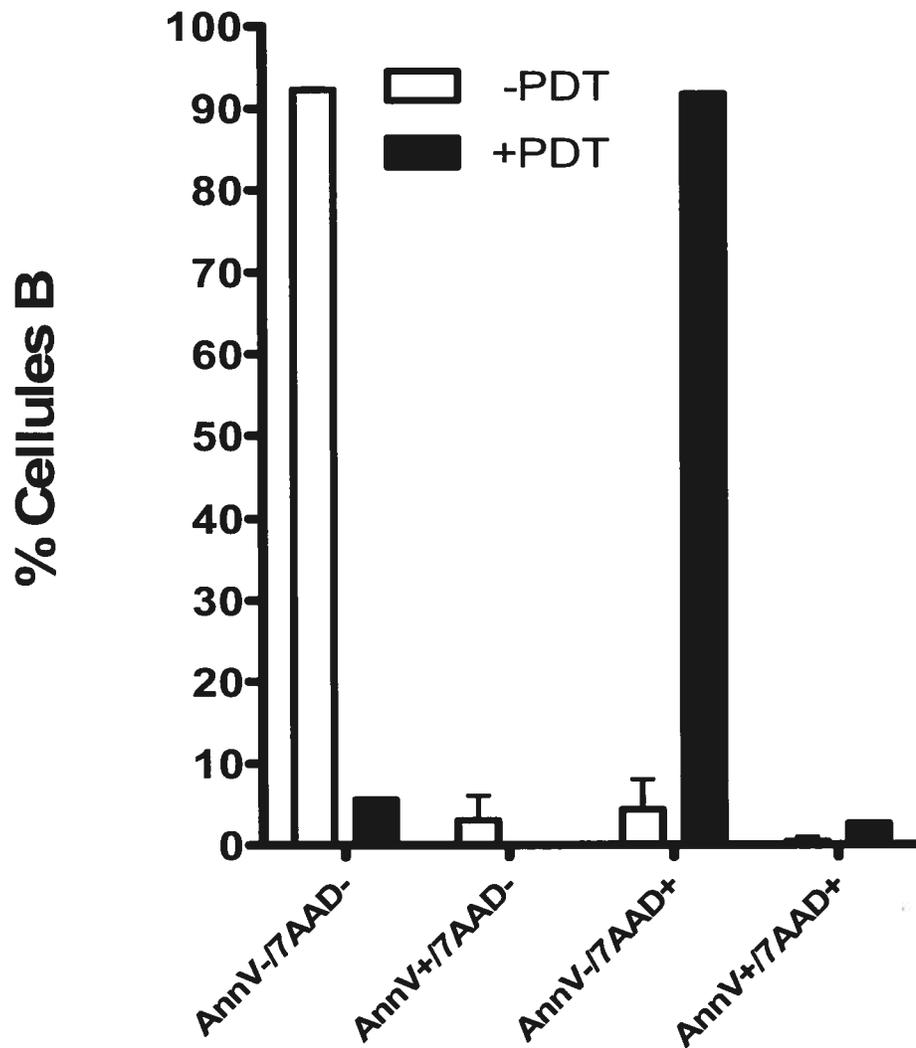


Figure 16 : Mécanisme de la mort cellulaire, induite par la PDT, sur les lymphocytes B

Les splénocytes des souris GVHDC ont été traités à la PDT avec 10 μ M de TH9402. Les splénocytes ont été marqués avec les anticorps B220/AnnV/7AAD. Les cellules viables sont les cellules AnnV- / 7AAD-, les cellules AnnV+ / 7AAD- sont celles qui sont mortes par apoptose, les cellules AnnV- / 7AAD+ sont mortes par nécrose alors que celles qui sont AnnV+ / 7AAD+ sont mortes par apoptose et/ou nécrose. Les graphiques sont la compilation de 3 expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne (S.E.M). L'évaluation a été réalisée dans un intervalle de 2 à 3 heures post PDT.

3.2.2.4. Effet de la PDT sur les cellules NK

L'effet de la PDT sur les cellules NK, provenant des splénocytes des souris GVHDC, a été aussi évalué dans les mêmes conditions que celles qui ont été mentionnées ci-haut. On constate (Figure 17), qu'avant la PDT, les cellules NK ont une viabilité proche de 87%. Toutefois, après la PDT, cette viabilité chute à 37%. On constate aussi que la majorité des cellules NK, soit près de 60%, est éliminée après la PDT et présente un profil nécrotique (AnnV-/7AAD+). Les cellules NK sont aussi plus résistantes à la PDT, en comparaison avec les cellules CD4+CD25+ (20% de viabilité post PDT), CD8+CD25+ (15% de viabilité post PDT) et les cellules B (5% de viabilité post PDT).

En somme, cette série d'expériences évaluant l'effet de la PDT sur les populations lymphoïdes nous a permis de constater que les lymphocytes activés CD4+CD25+ et CD8+CD25+ sont très sensibles à la PDT. À l'opposé, les cellules aux repos CD4+CD25- et CD8+CD25- sont très peu sensibles en la PDT. Les cellules quiescentes B et NK sont aussi sensibles à la PDT. Toutefois, les lymphocytes B sont les plus affectés et sont éliminés prioritairement par nécrose. Les cellules NK ont une sensibilité intermédiaire et sont aussi éliminées prioritairement par nécrose.

Comme nous avons pu le constater, les conditions de PDT que nous avons utilisées (10 μ M TH9402, 40 minutes de coloration, 50 minutes d'extrusion, exposition à la lumière 5 j/cm^2) épargnaient certaines populations lymphocytaires. Nous avons ensuite voulu savoir si la fraction des cellules CD4+CD25+, qui était épargnée par la PDT, était des cellules régulatrices. Pour atteindre cet objectif, des essais de prolifération ont été effectués sur les splénocytes des souris GVHDC et traités ou non à la PDT.

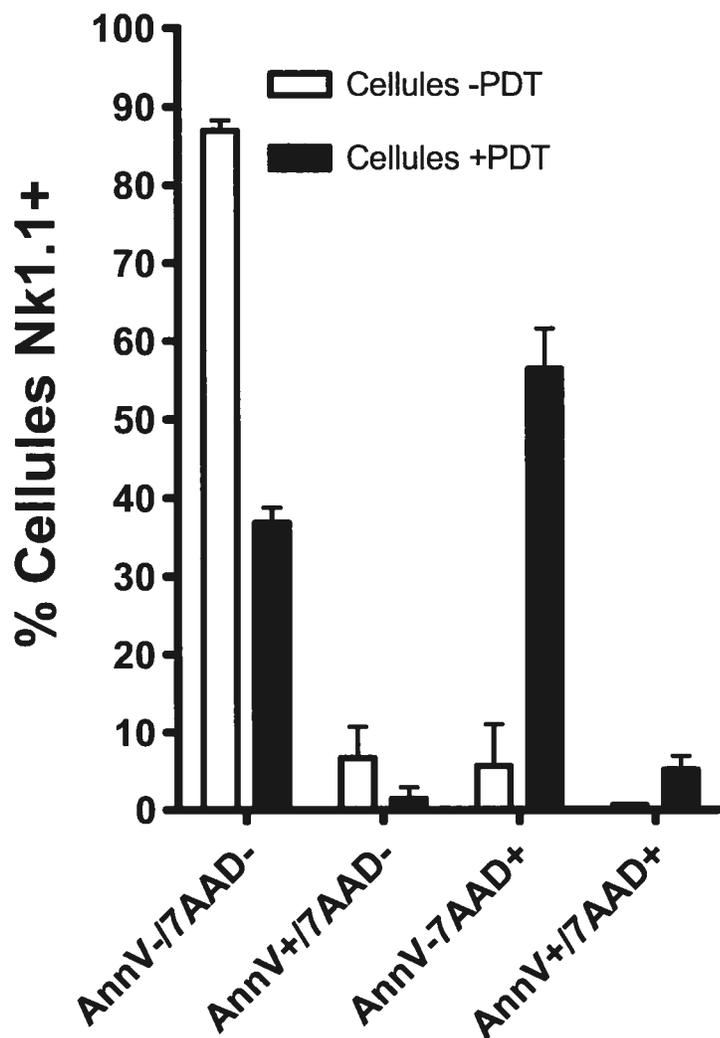


Figure 17 : Mécanisme de la mort cellulaire induite par la PDT, sur les cellules NK

Les splénocytes des souris GVHDC ont été traités à la PDT avec 10 μ M de TH9402. Les splénocytes ont été marqués avec les anticorps NK1.1/AnnV/7AAD. Les cellules viables sont les cellules AnnV- / 7AAD-, les cellules AnnV+ / 7AAD- sont celles qui sont mortes par apoptose, les cellules AnnV- / 7AAD+ sont mortes par nécrose alors que celles qui sont AnnV+ / 7AAD+ sont mortes par apoptose et/ou nécrose. Les graphiques sont la compilation de 3 expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne (S.E.M). L'évaluation a été réalisée dans un intervalle de 2 à 3 heures post PDT.

3.2.3. Effet de la PDT sur les lymphocytes T régulateurs

Dans le but d'évaluer l'effet de la PDT sur l'activité anti-proliférative médiée par les cellules régulatrices, nous avons procédé à des essais de prolifération au succinimidyl ester diacétate de carboxy fluoresceine (CFSE pour "Carboxy-Fluoresceine diacetate Succinimidyl Ester"). Le principe du test repose sur la capacité des cellules à incorporer le CFSE dans le cytosquelette. La quantité de CFSE diminue de moitié suite à la division de chaque cellule mère en 2 cellules filles. Par conséquent, en évaluant l'intensité de fluorescence de chaque condition expérimentale, on peut déterminer le nombre de divisions d'une population cellulaire. Pour ce faire, nous avons mis des splénocytes de souris GVHDc, traités ou non à la PDT, en présence de splénocytes totaux de souris GVHDc ayant incorporé le CFSE, ou dans d'autres expériences, en présence de cellules naïves de souris donneuses B10.D2. Les résultats représentatifs des essais de proliférations sont présentés à la figure 18. Il en ressort que les cellules, lorsque mises en présence de CFSE, l'incorporent effectivement comme on peut le constater avec 92.36% de cellules qui sont positives (Figure 18.A3). À l'opposé, en absence de CFSE, l'auto fluorescence est presque nulle pour les cellules non traitées à la PDT, 0.02% (Figure 18.A1) et pour les cellules traitées à la PDT, 0.29% (Figure 18.A2). Lorsque les populations de cellules B10.D2+CFSE sont mises en présence de cellules GVHDc traitées ou non à la PDT, on constate une différence sur le plan de la division cellulaire. Ainsi, en présence de cellules non traitées à la PDT, les cellules marquées au CFSE, après 6 jours, se divisent à hauteur de 83.24%. Autrement dit, seulement 16.76% ne se sont pas divisées (Figures 18.B1). Lorsque ces mêmes cellules marquées au CFSE sont mises en présence de cellules traitées à la PDT, on constate un taux de division qui est de, 52.89% après 6 jours. Dans ce cas, 47.11% de cellules CFSE+ ne se sont pas divisées (Figure 18.B2). Après 10 jours d'incubation, on constate qu'en présence de cellules non traitées à la PDT, 15.77% de cellules CFSE+ ne se sont pas divisées (Figure 18.C1). Ce taux est de 21.80%, lorsque les cellules CFSE+ sont mises en présence de cellules traitées à la PDT (Figure 18.C2). Il ressort donc que la PDT, associée au TH9402, cause un effet anti-prolifératif important sur les splénocytes cibles.

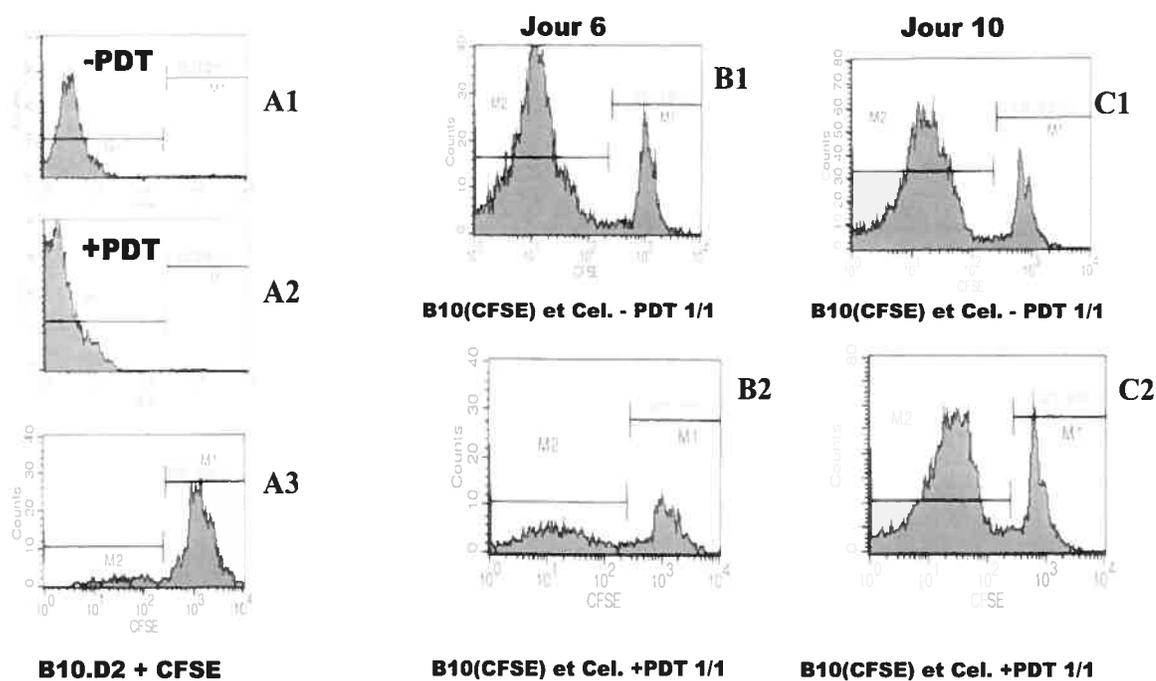


Figure 18 : Effet de la PDT sur les cellules ayant une fonction anti-proliférative

Les splénocytes des souris B10.D2 ont été mis en présence de CFSE. La fluorescence au jour 0 est présentée en (A3). Les splénocytes provenant de souris GVHDC sont traités ou non à la PDT et incubés seuls (A1 et A2) pour établir l'autofluorescence. Ces splénocytes traités ou non à la PDT sont aussi mis en présence des cellules B10.D2/CFSE+ afin d'établir l'effet de la PDT sur les cellules ayant une fonction anti-proliférative au jour 6 (B1, B2) et au jour 10 (C1, C2) post incubation. La figure ci-dessus est représentative de 3 trois expériences différentes. Les acquisitions sont réalisées en cytométrie de flux (FACSCalibur ; Becton Dickinson, Mountain View, CA). Les analyses sont effectuées à l'aide du logiciel Cell Quest (Becton Dickinson).

3.2.4. Traitement des souris GVHDc par injection de splénocytes traités ou non à la PDT

Afin d'évaluer l'effet de la PDT sur le devenir clinique des souris avec la GVHDc, nous avons injecté à ces dernières des splénocytes traités ou non à la PDT. Les injections ont été faites en plusieurs doses à des temps différents suivant l'induction de la maladie. Le poids, le taux d'anticorps anti-ADNdb, la reconstitution immunologique et la survie ont été évalués.

3.2.4.1. Effet du traitement sur le poids et la survie des souris

❖ Injection tardive de lymphocytes (à partir du jour 55)

Au jour 55 post greffe (Figure 19), le poids moyen des souris (-2% à -4%), dans les différents groupes, ne présentait aucune différence significative ($p > 0.05$). Toutefois, après injection des splénocytes aux jours 55, 62 et 69 post greffe dans les groupes « cellules +PDT » et « cellules -PDT », on observe un effet différent sur la chute de poids des souris (Figure 19). Dans le groupe « cellules +PDT », la chute moyenne est de l'ordre de -5% et cela jusqu'au jour 90 post greffe. À partir du jour 90, cette chute de poids est plus accentuée et atteint -10% au jour 158. Dans le groupe « cellules -PDT », la chute de poids est plus marquée et oscille en moyenne de -5% à -15%, du jour 55 au jour 158 post greffe. Une chute de poids (-5% à plus de -10%) est aussi constatée dans le groupe de souris n'ayant reçu aucune cellule « non traité ». Après la deuxième et la troisième injection de splénocytes, on observe que le poids moyen des souris dans le groupe « cellules -PDT », chute significativement en comparaison de celui du poids moyen des souris non traitées ($p < 0.01$). Cette chute du poids moyen des souris du groupe -PDT est aussi significative en comparaison de celui des souris ayant reçu des splénocytes traités à la PDT ($p < 0.001$). Notons que la chute du poids de certaines souris ayant reçu des splénocytes non traités à la PDT coïncide avec l'apparition d'une GVHDc.

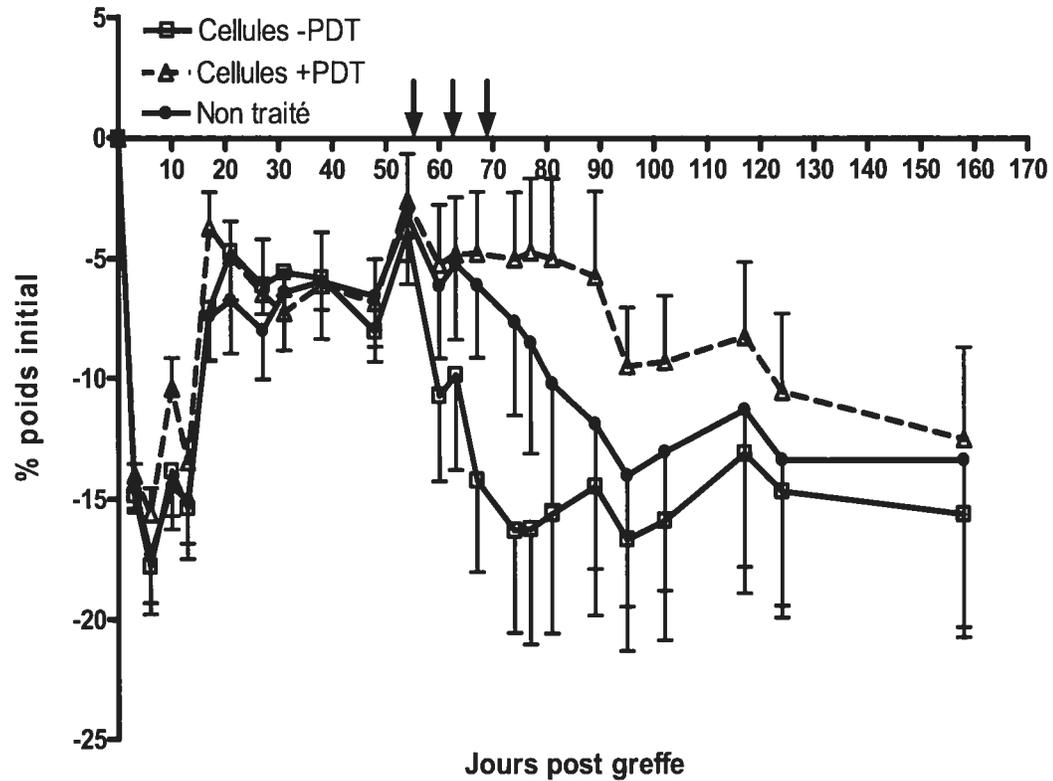


Figure 19 : Effet de l'injection des splénocytes traités ou non à la PDT sur le poids des souris GVHDC traitées à partir du jour 55 post greffe

Les souris atteintes de la GVHDC ont reçu divers traitements aux jours 55, 62 et 69 post greffe. Un groupe de souris (n=8), a reçu 25×10^6 splénocytes non traités à la PDT « cellules -PDT ». Un autre groupe de souris (n = 8), a plutôt reçu 25×10^6 splénocytes traités à la PDT « cellules +PDT » alors qu'un autre groupe de souris (n=8), n'a reçu aucune cellule « groupe non traité ». Au total, 3 injections ont été faites. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne (S.E.M). Les valeurs « p » ont été calculées par le test de l'analyse de variance à un facteur (ANOVA à mesures répétées) : les moyennes prises en compte ne concernent que les valeurs à partir du jour 55 post greffe.

« Cellules -PDT » vs « Cellules +PDT » : $p < 0.001$

« Cellules -PDT » vs « Non traité » : $p < 0.01$

« Non traité » vs « Cellules +PDT » : $p < 0.01$

Fait intéressant, l'injection des splénocytes traités à la PDT à des souris ayant une GVHDc a provoqué une stabilisation significative ($p < 0.001$) du poids moyen de ces souris en comparaison des souris des groupes « cellules -PDT » et « non traité ». En effet, comme on peut le constater (Figure 19), le poids moyen de ces souris (-5% du poids initial) est supérieur à celui des autres groupes (de -5% à -20% du poids initial).

Dans le but d'évaluer la capacité de la PDT, associée au TH9402, à moduler le devenir clinique des souris atteintes de la GVHDc, nous avons aussi compilé la mortalité dans les différents groupes afin d'établir des courbes de survie. La figure 20 montre la survie des souris lorsque le traitement débute au jour 55 post greffe. On constate que l'injection de splénocytes syngéniques (25×10^6) traités à la PDT à d'autres souris syngéniques n'a provoqué aucune mortalité dans ce groupe « syngénique +PDT ». En effet, les souris ($n=8$) présentes dans ce groupe sont toutes vivantes au jour 140 post greffe et indiquent l'absence de toxicité intrinsèque de la PDT au TH9402. À l'inverse, une mortalité est observée dans les groupes de souris ayant une GVHDc : « cellules -PDT », « cellules +PDT » ou « non traité » (Figure 20). On observe que l'injection de splénocytes non traités à la PDT, groupe « cellules -PDT », a rapidement entraîné le décès 50% des animaux de ce groupe. De plus, cette mortalité survient dès le jour 60 post greffe, soit seulement quelques jours après l'injection des splénocytes. La mortalité dans les groupes « cellules +PDT » et « non traité » débute au jour 80 post greffe, soit 20 jours plus tard. Lorsque les souris atteintes de GVHDc ne subissent aucun traitement, groupe « non traité », on constate (Figure 20) néanmoins que 50% des souris décèdent aussi de GVHDc. Finalement, lorsque les souris ayant une GVHDc sont injectées avec des splénocytes traités à la PDT et provenant d'autres souris GVHDc, on constate que la mortalité n'est que de 25%.

L'injection de splénocytes traités à la PDT semble donc induire une mortalité retardée et diminuée par rapport aux 2 autres groupes « cellules-PDT » et « non traité ».

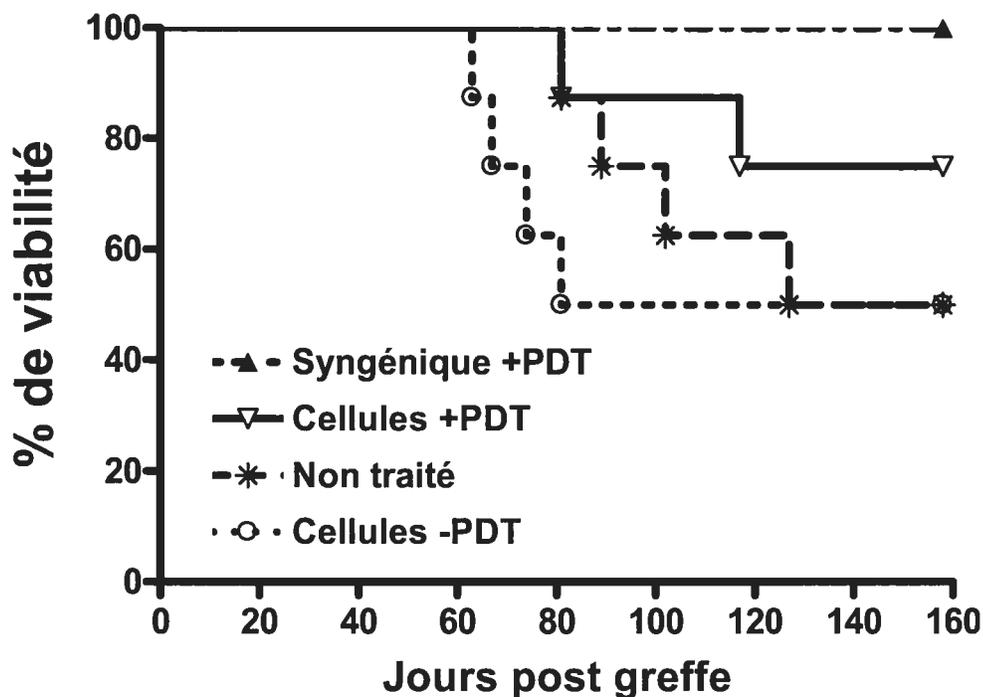


Figure 20 : Effet de la PDT sur la survie des souris GVHDC et syngéniques traitées à partir du jour 55 post greffe.

Les souris atteintes de la GVHDC ont reçu divers traitements aux jours 55, 62 et 69 post greffe. Le groupe de souris « cellules -PDT, n=8 », a reçu 25×10^6 splénocytes non traités à la PDT. Le groupe de souris « cellules +PDT, n=8 » a plutôt reçu 25×10^6 splénocytes traités à la PDT. Le groupe de souris « non traité, n=8 » n'a reçu aucun traitement. Le groupe « syngénique +PDT, n=8 » comprend des souris sans GVHDC qui ont reçu les splénocytes, traités à la PDT, des autres souris syngéniques. Les souris étaient sacrifiées lorsqu'elles avaient atteint l'un et/ou l'autre des points limites suivants : perte de plus de 25% du poids initial, lésions sur la peau, perte marquée de la pilosité, enflures des pattes. Les valeurs « p » ont été évaluées par le test de Logrank.

« Cellules -PDT » vs « Cellules +PDT »	p= 0.215
« Cellules -PDT » vs « Non traité »	p= 0.648
« Cellules +PDT » vs « Non traité »	p= 0.333
« Non traité » vs « Syngénique +PDT »	p= 0.025
« Cellules -PDT » vs « Syngénique +PDT »	p= 0.025
« Cellules +PDT » vs « Syngénique +PDT »	p= 0.143

❖ Injection précoce de lymphocytes (à partir du jour 15)

Par ailleurs, lorsque le traitement est appliqué plus tôt, jour 15 post greffe, on observe globalement la même tendance qu'au jour 55 post greffe. En effet, comme on peut le constater (Figure 21), l'injection des splénocytes non traités à la PDT a entraîné une chute de poids des souris de ce groupe. Cette chute de poids, observable à partir du jour 25 post greffe, présente un maximum de -16% vers le jour 35 post greffe. Les souris n'ayant reçu aucun traitement présentent aussi une chute de poids comparable ($p > 0.05$) à celle du poids des souris du groupe « cellules -PDT ». On peut en effet constater (Figure 21) que le poids moyen oscille de -10% à 20% à partir du jour 25 post greffe jusqu'à environ au jour 120 post greffe (soit 105 jours après le premier traitement). Cette chute de poids présente cependant une légère remontée (probablement due à la mortalité) à partir du jour 120 pour atteindre une moyenne de -15% au jour 233. À l'opposé, l'injection de splénocytes traités à la PDT « cellules +PDT » a limité la chute de poids dans ce groupe qui semble se stabiliser en moyenne à -10% du poids initial. Cette stabilisation du poids, dans le groupe « cellules +PDT », est significative en comparaison du poids moyen des souris dans le groupe « cellules -PDT » ($p < 0.001$) et du poids moyen des souris dans le groupe « non traité » ($p < 0.001$). Il est à noter que le comportement des souris, lorsqu'elles sont injectées au jour 55 post greffe, est différent de celui observé lorsque les souris sont injectées au jour 15 post greffe. En effet, on constate que lorsque les souris sont injectées au jour 55 post greffe (Figure 19), la chute de poids dans le groupe « cellules -PDT », fait suite à la première injection. Cette chute est aussi observée dans le groupe non traité et dans le groupe « cellules +PDT », tandis que cette chute se stabilise dans le groupe « cellules +PDT »; la chute progresse comme nous nous y attendions dans les groupes non traité et « cellules -PDT ». À l'inverse, l'injection au jour 15 post greffe (Figure 21), n'entraîne pas une chute instantanée du poids dans le groupe « cellules -PDT ». Les groupes « cellules -PDT » et « non traité » ne présentent pas non plus une chute de poids. Le poids dans les différents groupes sont tous dans une phase ascendante jusqu'au jour 25 post greffe. Ce n'est qu'après ce temps que les effets des injections se manifestent.

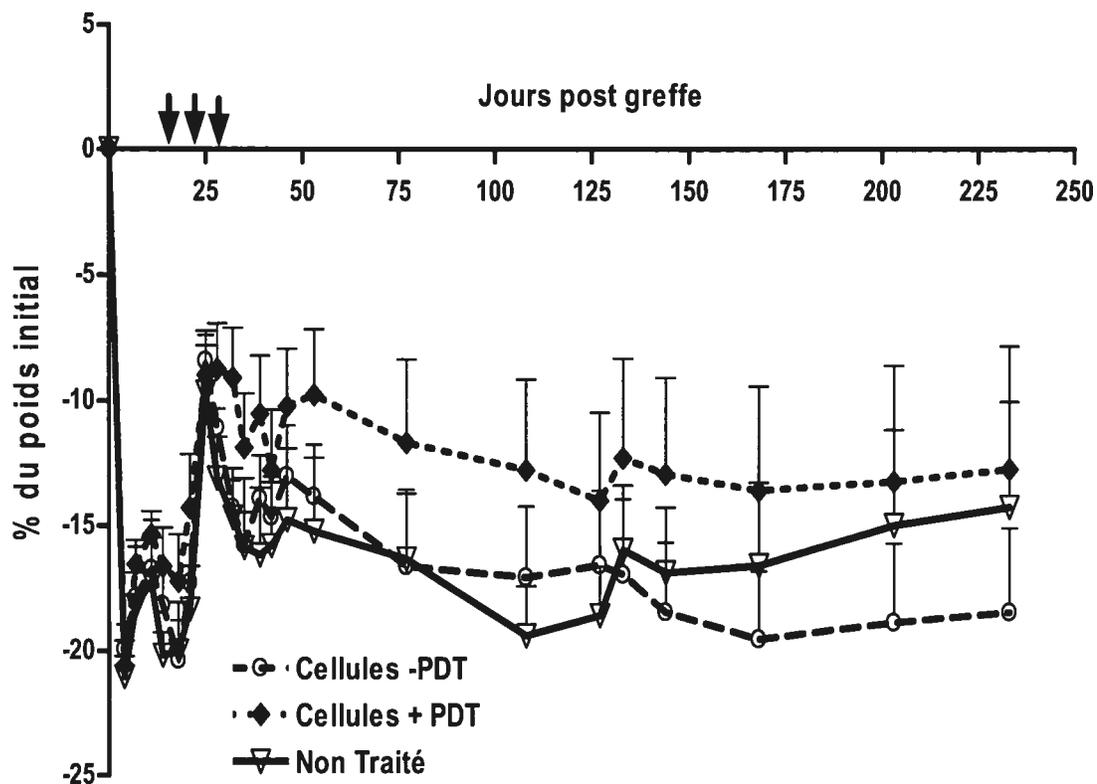


Figure 21 : Effet de l'injection des splénocytes traités ou non à la PDT sur le poids des souris GVHDc traitées à partir du jour 15 post greffe

Les souris atteintes de la GVHDc ont reçu divers traitements aux jours 15, 22 et 29 post greffe. Un groupe de souris ($n=8$), a reçu 25×10^6 splénocytes non traités à la PDT « cellules -PDT ». Un autre groupe de souris ($n=8$), a plutôt reçu 25×10^6 splénocytes traités à la PDT « cellules +PDT » alors qu'un autre groupe de souris ($n=8$), n'a reçu aucune cellule « non traité ». Au total, 3 injections ont été faites. Les flèches noires indiquent les différents jours auxquels les traitements ont été faits. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne (S.E.M). Les valeurs « p » ont été calculées par le test de l'analyse de variance à un facteur (ANOVA à mesures répétées) : les moyennes prises en compte ne concernent que les valeurs à partir du jour 25 post greffe.

« Non traité » vs « Cellules +PDT »

$p < 0.001$

« Non traité » vs « Cellules -PDT »

$p > 0.05$

« Cellules -PDT » vs « Cellules +PDT »

$p < 0.001$

Lorsque les traitements sont effectués à partir du jour 15 post greffe, les effets sur la survie sont similaires à ceux observés au jour 55. Comme on peut le constater (Figure 22), les souris du groupe syngéniques ne présentent aucune mortalité, ceci jusqu'à plus de 200 jours post greffe. En revanche, les souris du groupe « non traité » présentent une cinétique de mortalité plus rapide que celle survenant dans les groupes « cellules – PDT » et « cellules +PDT ». Dans le groupe « cellules –PDT », la mortalité est de 75% alors que dans les groupes « +PDT » et « non traité » la mortalité est de l'ordre de 50% à 200 jours post greffe. On peut conclure que l'injection des splénocytes non traités à la PDT, à partir des jours 15 et 55 post greffe, a entraîné une forte mortalité qui survient tôt dans le temps alors que l'injection des splénocytes traités à la PDT a réduit cette mortalité tout en la retardant. Toutefois, bien qu'une tendance en faveur du traitement soit observée, la différence entre le groupe traité «cellules +PDT» et les groupes «cellules –PDT» et, «non traité» n'est pas significative ($p= 0.432$ et 0.211 respectivement, jour 15) et ($p=0.215$ et 0.333 respectivement, jour 55).

3.2.4.2. Effet de la PDT sur le taux d'anticorps anti-ADNdb

La production d'auto anticorps, notamment d'anticorps anti-ADNdb, est associée à la maladie du greffon contre l'hôte chronique. Dans le but d'évaluer l'impact de la PDT sur cette production, nous avons quantifié, à l'aide d'un test ELISA, la présence des ces auto anticorps dans les différents groupes avant et après le traitement. Ainsi, dans les différents groupes et, avant le traitement au jour 54 (Figure 23), les valeurs dans le groupe « cellules –PDT » est de 6 mg/mL en moyenne. Dans le groupe « cellules +PDT », le taux d'anticorps avant le traitement est du même ordre que celui du groupe « cellules –PDT » soit 6 mg/mL en moyenne. Dans le groupe de souris n'ayant reçu aucun traitement, « Non traité », le taux au jour 54 est de 9 mg/mL en moyenne. Bien que ce taux soit légèrement supérieur à ceux des groupes « cellules –PDT » et « cellules +PDT », il n'existe aucune différence significative entre ces groupes en ce qui a trait à leur taux d'anticorps anti-ADNdb de départ ($p > 0.05$).

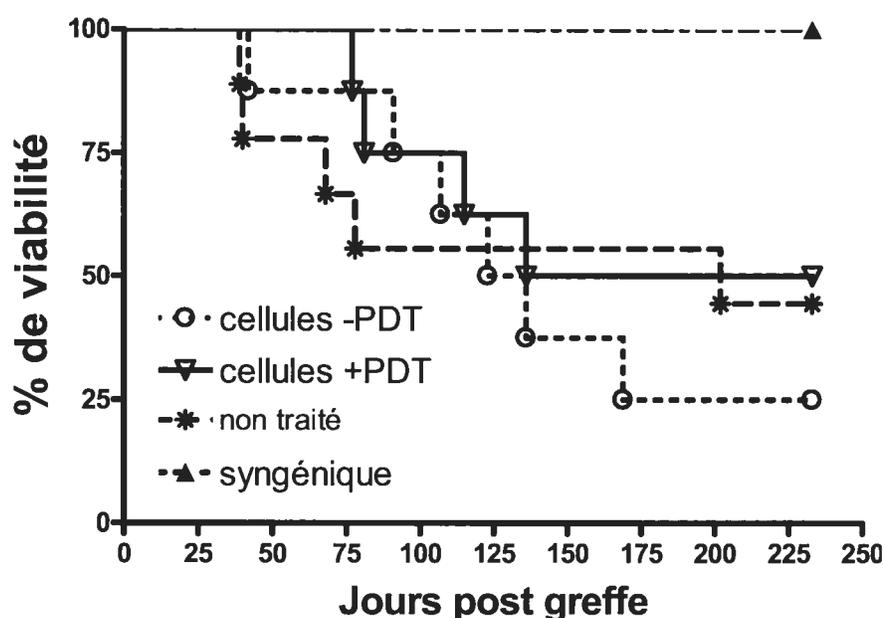


Figure 22 : Effet de la PDT sur la survie des souris GVHDc et syngéniques traitées à partir du jour 15 post greffe.

Les souris atteintes de la GVHDc ont reçu divers traitements aux jours 15, 22 et 29 post greffe. Le groupe de souris « cellules -PDT, n=8 », a reçu 25×10^6 splénocytes non traités à la PDT. Le groupe de souris « cellules +PDT, n=8 » a plutôt reçu 25×10^6 splénocytes traités à la PDT. Le groupe de souris « non traité, n=8 » n'a reçu aucun traitement. Le groupe « syngénique +PDT, n=4 » comprend des souris sans GVHDc qui ont reçu les splénocytes, traités à la PDT, des autres souris syngéniques. Les souris étaient sacrifiées lorsqu'elles avaient atteint l'un et/ou l'autre des points limites suivants : perte de plus de 25% du poids initial, lésions sur la peau, perte marquée de la pilosité, enflures des pattes. Les valeurs « p » ont été évaluées par le test de Logrank.

« Cellules -PDT » vs « Cellules +PDT »	p= 0.432
« Cellules -PDT » vs « Non traité »	p= 0.658
« Cellules +PDT » vs « Non traité »	p= 0.211
« Non traité » vs « Syngénique +PDT »	p= 0.085
« Cellules -PDT » vs « Syngénique +PDT »	p= 0.029
« Cellules +PDT » vs « Syngénique +PDT »	p= 0.112

Après les trois injections dans les groupes respectifs, nous avons prélevé le sérum des souris afin d'évaluer l'effet de la PDT sur la production d'anticorps anti-ADNdb. On constate (Figure 23) que, dans le groupe « cellules -PDT », l'injection de splénocytes non traités à la PDT aboutit à une production moyenne de l'ordre de 6.5 mg/mL; en comparaison du taux de départ qui était de l'ordre de 6 mg/mL dans ce groupe. Signalons tout de même la forte variation du taux d'anticorps anti-ADNdb dans ce groupe (+/-5 mg/mL). Dans le groupe « cellules +PDT », l'injection de splénocytes traités à la PDT aboutit à une production moyenne de l'ordre de 4 mg/mL, par rapport au taux de départ qui était de l'ordre de 6 mg/mL dans ce groupe. La tendance dans ce groupe semble être à la baisse puisque l'on passe de 6 mg/mL à 4 mg/mL en moyenne. Toutefois, cette baisse n'est pas significative ($p>0.05$) par rapport au taux de départ. Finalement, dans le groupe de souris ayant la GVHDc et n'ayant subi aucun traitement, le taux d'anticorps au fil du temps montre une tendance à la hausse. Cette tendance n'est pas non plus significative ($p>0.05$) en comparaison du taux de départ dans le même groupe. Il ressort que la PDT semble amener une baisse de la production d'anticorps anti-ADNdb chez les souris ayant reçu un tel traitement.

3.3. Analyse de la reconstitution immunologique

La reconstitution immunitaire, après conditionnement immunoablatif, est d'une importance capitale pour l'induction d'une tolérance contre des antigènes allogéniques et autologues. Cette reconstitution est cruciale dans les nouvelles approches thérapeutiques non seulement pour la reprogrammation du système immunitaire mais encore pour promouvoir la capacité des patients à répondre à des agressions virales après la transplantation. Le récepteur antigénique des lymphocytes T (TCR) est une protéine hétérodimérique composée de deux chaînes transmembranaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Chaque chaîne comprend un domaine variable (V), à l'extrémité NH₂ terminale et un domaine constant (C). La région d'hypervariabilité, appelée CDR3 ("*Complementarity Determining Region*"), a un rôle important dans la reconnaissance du peptide associé à la molécule du CMH.

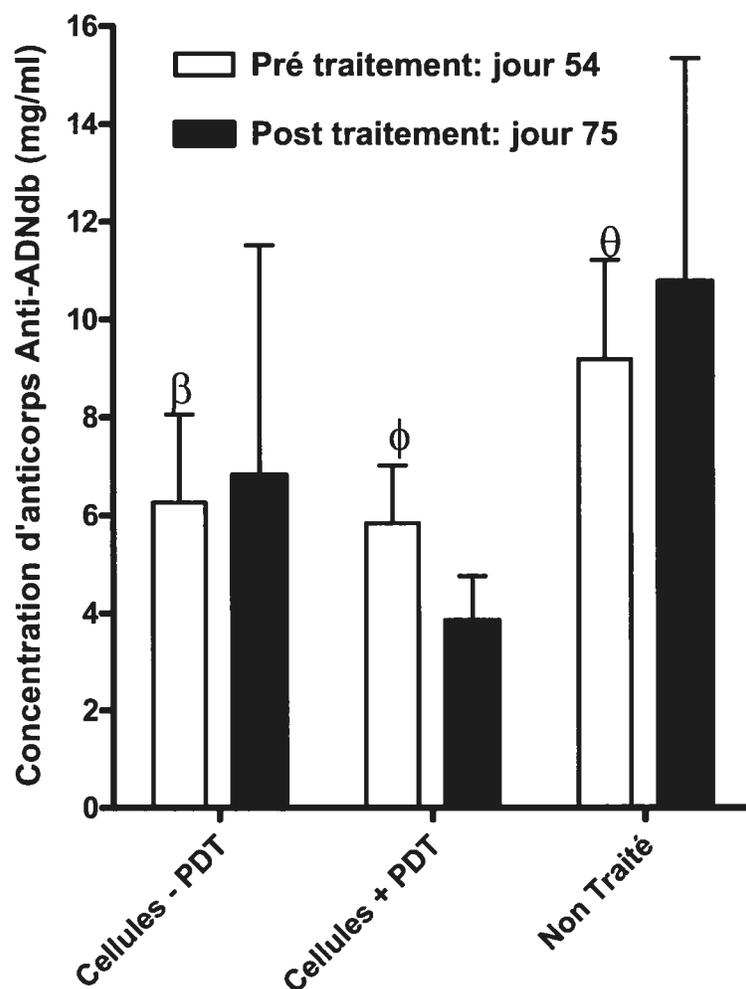


Figure 23 : Taux d'anticorps anti-ADNdb avant et après traitement

Le sérum des souris, dans les groupes « cellules -PDT, n = 8 », « cellules +PDT, n = 8 » et, « non traité, n = 8 » a été prélevé au jour 54 post greffe et évalué par un test ELISA quantitatif ; c'est la période « Pré traitement ». Après trois traitements (jour 55, 62 et 69), le sérum des souris dans les différents groupes, a été de nouveau évalué par un test ELISA quantitatif ; c'est la période « Post traitement ». Les barres d'erreurs, représentent l'erreur type de la moyenne (S.E.M). Les valeurs « p » ont été calculées par le test de l'analyse de variance à un facteur. (β : $p > 0.05$ « cellules -PDT » pré traitement (jour 54) vs « cellules -PDT » post traitement (jour 75). (ϕ : $p > 0.05$ « cellules +PDT » pré traitement (jour 54) vs « cellules +PDT » post traitement (jour 75), θ : $p > 0.05$ « non traité, jour 54 » vs « non traité, jour 75).

La technique immunoscope ("spectratyping") permet d'analyser la distribution des différentes tailles de CDR3 des chaînes α et β du TCR. Pour un réarrangement donné, les profils obtenus se présentent sous la forme de six à huit pics séparés par trois nucléotides et correspondent aux réarrangements en phase de lecture ouverte.²⁰³ La distribution de ces différents pics suit une courbe en cloche caractéristique des répertoires de lymphocytes T polyclonaux observés chez des animaux non immunisés. En revanche, après immunisation, pour certains réarrangements, des expansions oligo ou monoclonales qui altèrent le profil de la distribution en cloche ont pu être mises en évidence. Cette méthode donne une représentation qualitative et quantitative du répertoire mais n'apporte aucune indication sur le nombre de séquences différentes contenues dans chaque pic de CDR3.

Afin d'évaluer l'effet du traitement sur la reconstitution immunologique des souris traitées à la PDT, nous avons donc procédé à une étude prospective de segments donnés du spectre V bêta ($V\beta$). L'analyse des résultats obtenus (Figure 24), montre un profil polyclonal et gaussien des segments $V\beta 1$, $V\beta 2$, $V\beta 3.1$, $V\beta 8.1$, $V\beta 8.2$, $V\beta 8.3$ chez les souris non malades ; un résultat auquel on s'attendait. Chez les souris malades et traitées à la PDT à partir du jour 15 post greffe, on observe que les segments $V\beta 1$, $V\beta 8.1$, $V\beta 8.2$ et $V\beta 8.3$, ont un profil polyclonal et gaussien comme celui des souris normales. Pour les segments $V\beta 2$ et $V\beta 3.1$, on observe une perturbation du spectre qui se traduit par une expansion oligoclonale de 2 à 4 pics majeurs. Bien que nous n'ayons pas pu analyser le spectre $V\beta$ des souris atteintes de la GVHDc et non traitées à la PDT, par la méthode du spectratyping, cette perturbation du répertoire $V\beta 2$ et $V\beta 3.1$ est confirmée par une analyse immunologique (Figure 25) qui nous renseigne sur l'implication de ces segments dans la pathologie de la GVHDc. En effet, on constate que les clones portant le $V\beta 2$ sont présents à hauteur de 20.72% dans les souris GVHDc alors que la normale est de 10.53% chez les souris contrôles. Cette approche immunologique ne nous permet cependant pas de savoir si la perturbation affecte le profil immunologique. Cependant, des données tirées de la littérature nous renseignent que cette perturbation est une expansion oligoclonale des segments $V\beta 2$ et $V\beta 3$ chez les souris atteintes de GVHDc.²⁰⁴

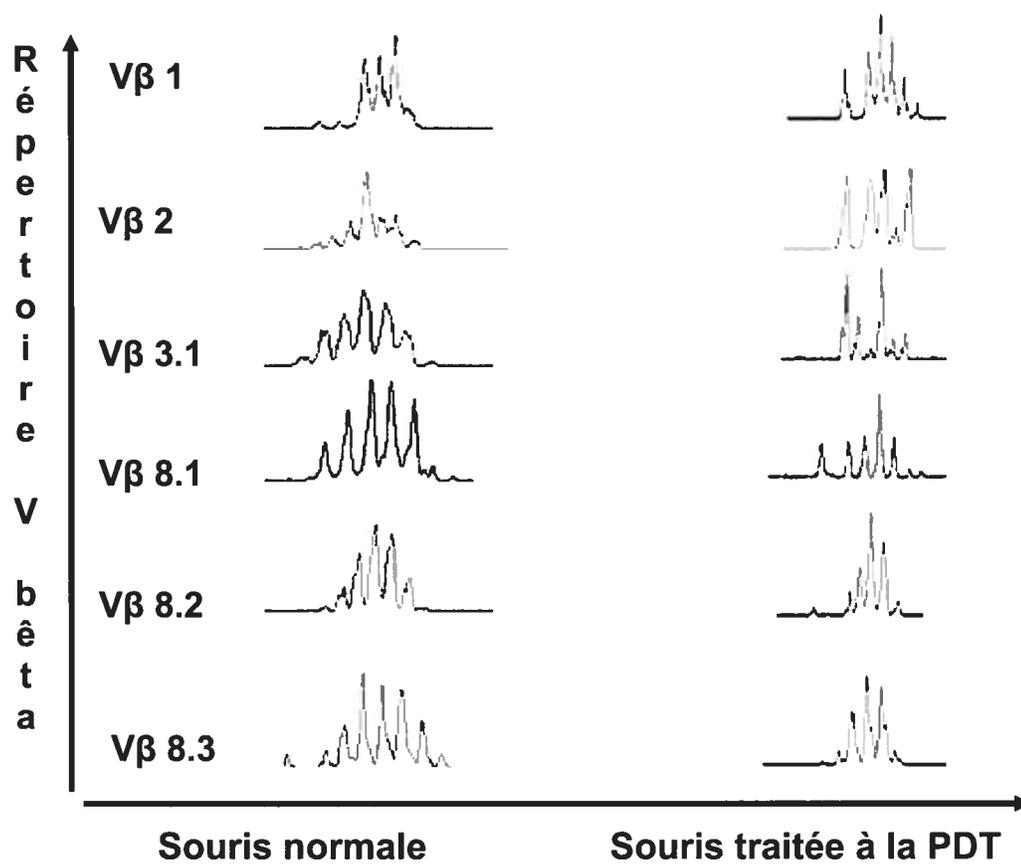


Figure 24 : Analyse phénotypique du répertoire V bêta de souris traitées à la PDT

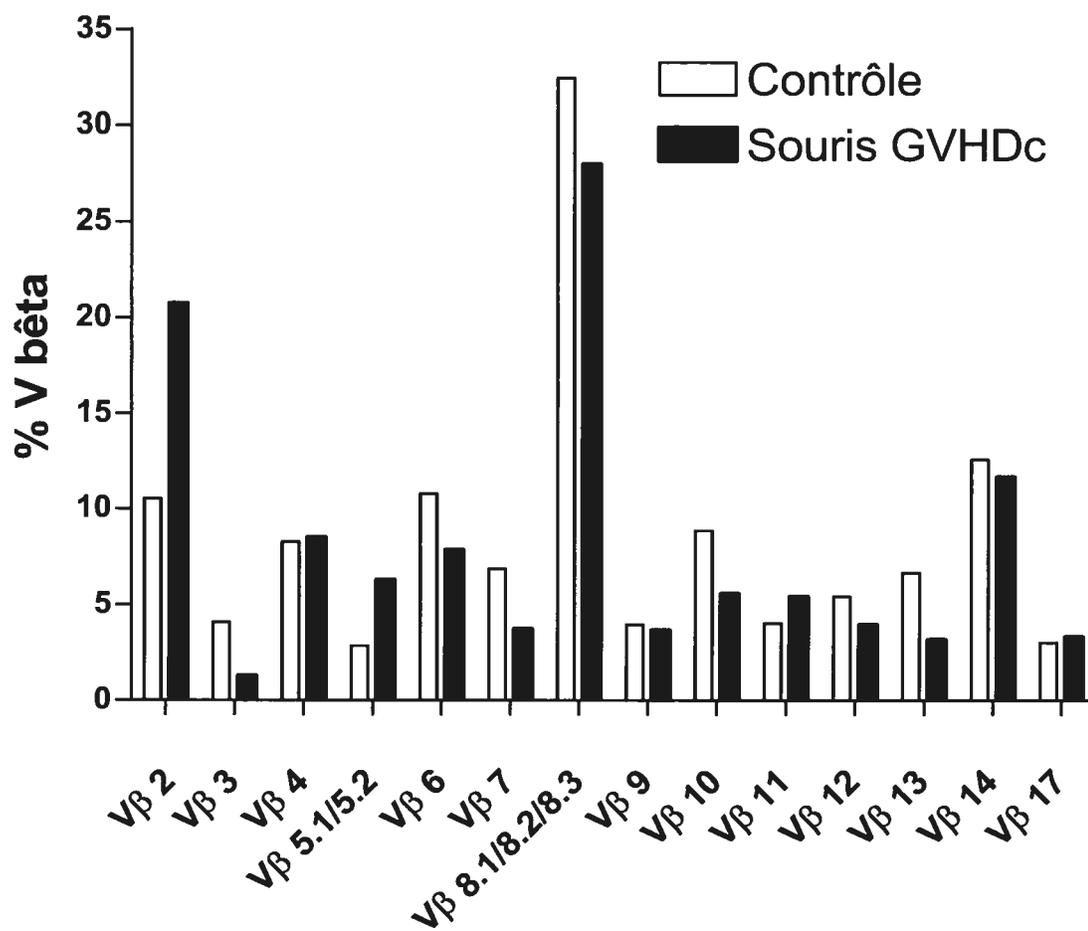


Figure 25 : Pourcentage d'expression du répertoire V bêta sur les cellules CD4+ de souris normales et atteintes de GVHD

CHAPITRE IV : DISCUSSION

4. Discussion

La principale complication des greffes de CSHs allogéniques est la maladie du greffon contre l'hôte ("Graft-Versus-Host-Disease" ou GVHD). La GVHD, dans sa forme chronique (GVHDc), affecte environ 50% des patients greffés et peut être létale pour 20% à 40% de ces derniers, cela en dépit des traitements intensifs.^{33,34} De ce fait, la GVHDc est devenue la complication centrale des patients greffés survivant au-delà du centième jour. Les approches thérapeutiques utilisées, à ce jour, se sont avérées peu efficaces. Cela nous a amené à évaluer, comme objectif principal, le potentiel d'une nouvelle approche thérapeutique : le traitement photodynamique (PDT) couplé à l'agent photosensible 4,5-dibromorhodamine methyl ester (TH9402) de la maladie du greffon contre l'hôte chronique. À cet effet, nous avons reproduit la maladie du greffon contre l'hôte chronique dans un modèle murin. Nous avons ensuite évalué l'impact du traitement par PDT sur des splénocytes et utilisé ces cellules traitées pour inhiber la GVHD chronique. Comme dernier objectif, nous avons évalué la reconstitution immunologique dans les groupes de souris traitées pour mesurer l'efficacité du traitement à long terme.

4.1. Le model expérimental est-il représentatif de la pathologie telle que observée chez l'humain ?

Pour reproduire la maladie du greffon contre l'hôte chronique, nous avons opté pour un modèle murin impliquant, comme donneurs les souris femelles B10.D2- $H2^d$ $H2-T18^c$ $Hc^1/nSnJ$ (**B10.D2**) et, comme receveurs les souris femelles BALB/cJ- $H2^d$ (**Balb/c**). Ces souris sont compatibles sur le plan de leurs antigènes d'histocompatibilité majeurs (CMH), mais différent par leurs multiples antigènes d'histocompatibilité mineurs (miHA). Parmi les différences génétiques connues entre ces deux types de souris, sur le plan des antigènes mineurs, on peut citer les antigènes H-1,-3,-4,-7,-8,-9,-13.²⁰⁵ Notons cependant que, cette différence peut toutefois atteindre une quarantaine

d'antigènes, voire plus et que tous ne sont pas forcément impliqués dans l'induction de la GVHDc.^{206,207} Pour parvenir à notre but, nous nous sommes appuyés sur le précepte selon lequel toute transfusion de culots globulaires ou plaquettaires est susceptible d'apporter des lymphocytes. Ainsi, dans le cas d'une transfusion allogénique, chez un hôte normal ou faiblement immunodéprimé, les lymphocytes de ce dernier, qui ne sont pas compatibles en terme de CMH avec ceux du donneur, élimineront les lymphocytes résiduels du donneur présents dans la transfusion. Or, dans un organisme particulièrement immunodéprimé, on observe l'effet inverse, à savoir les lymphocytes du donneur s'activeront contre l'organisme du receveur. De ce fait, en induisant un état immunodépressif par irradiation non létale (600 cGy) chez les souris Balb/c et en injectant ces dernières avec les splénocytes des souris B10.D2 (différentes sur le plan du complexe mineur d'histocompatibilité), l'on devrait s'attendre à ce que les lymphocytes des souris donneuses B10.D2 s'attaquent aux antigènes des souris receveuses Balb/c et produisent ainsi un effet GVH. Puisque la dose d'irradiation est non létale, l'évolution de la GVHD devrait être progressive dans le temps et, par conséquent chronique. En effet, en plus de la dose d'injection, cet état chronique serait fonction de l'ontogénie des cellules B et T qui présente une cinétique de reconstitution lente après une greffe allogénique.²⁰⁸ Le contexte non létal permettrait donc un état de chimérisme étalé sur une plus grande période de temps, ce qui contribuerait à une stimulation soutenue entre les cellules du donneur et du receveur aboutissant par exemple à une production d'auto-anticorps non présents dans la GVHDa.^{208,209} Bien qu'il existe des modèles murins dits parentaux, où la GVHDc est induite par injection de splénocytes parentaux (P1) à la lignée (F1), nous avons opté pour le modèle B10.D2-→Balb/c validé auparavant^{77,210} pour les raisons suivantes. Les modèles de transplantation parentaux aboutissent généralement à une pathologie plus proche du lupus systémique érythémateux qu'à la GVHD chronique.²¹¹ Le modèle de GVHD chronique B10.D2 →BALB/c, CMH compatible et incompatible sur le plan des antigènes d'histocompatibilités mineurs partage des caractéristiques critiques avec la pathologie de GVHDc, telle qu'elle a été observée chez l'homme. Ces caractéristiques dominantes incluent la fibrose de la peau (due à l'augmentation de dépôt de collagène) aussi bien que des infiltrations lichénoïdes, la perte folliculaire, la perte de gras sous dermique et l'infiltration du derme par les

mononucléaires.²¹² La maladie hépatique est caractérisée par l'infiltration lymphocytaire, intra et extra hépatique, des canaux biliaires.²¹³ La fibrose pulmonaire a été observée.²¹⁴ En outre, dans ce modèle où le début des signes cliniques de GVHDc débute à peu près vers le jour 21, plusieurs groupes y ont examiné les mécanismes de pathogenèse. On peut entre autres mentionner le rôle joué par les sous populations des lymphocytes T, des mastocytes, des molécules d'adhésion, des cytokines et chimiokines dans l'initiation de la maladie.^{40,77,205,214,215} Ce modèle est vu comme un modèle de GVHDc induite de novo et sa valeur tient en sa forte ressemblance clinico-pathologique trouvée tant dans la GVHDc primaire que secondaire chez l'humain.²¹⁶

4.1.1. Le poids et la survie

En injectant les splénocytes des souris B10.D2 aux souris Balb/c, nous avons en effet observé (Figure 7) que les souris Balb/c perdaient du poids en comparaison des souris du groupe syngénique. Fait intéressant, cette perte de poids moyenne n'excède pas plus de 10% du poids initial de ces souris, ce qui est en accord avec les études ayant utilisé ce modèle.²¹⁷ Cependant, cette perte de poids était-elle vraiment due à l'injection des splénocytes alloréactifs ? Pour répondre à cette préoccupation, nous avons injecté à des souris B10.D2 les mêmes splénocytes injectés aux souris Balb/c. Dès lors, si la perte de poids observée chez les souris Balb/c était due à d'autres facteurs (infections virales, bactériennes...) que les splénocytes, alors on aurait aussi observé une perte de poids chez les souris B10.D2. Or tel n'a pas été le cas. Cela nous amène donc à conclure que la perte de poids observée chez les souris Balb/c était due à l'injection des splénocytes alloréactifs B10.D2, reconnaissant les antigènes mineurs des souris Balb/c. Comme nous avons pu le constater sur les coupes histologiques (Figure 9.B), la perte de tissu adipeux à propos du derme des souris GVHDc corrobore nos observations. La perte de poids, observée chez les souris du groupe GVHDc, étant un paramètre observable chez les humains et réputé être un bon indicateur de la GVHD chronique,²¹⁰ constitue donc un signe de l'installation de la GVHDc. Cette perte de poids a eu un effet sur la mortalité des souris.

En effet, on constate (Figure 12) qu'environ 20% des souris atteintes de GVHDc sont mortes et que cette mortalité survient après le jour 50 post greffe. Cette tendance, à voir les souris décéder après le jour 50 post greffe, était généralement observée tout au long de nos expériences (Figures 12, 20 et 22), même s'il arrivait que certaines souris décédassent un peu plus tôt (jour 39 post greffe, figure 22). On remarque cependant que la mortalité du groupe «non traité» passe de 20% (Figure 12) à environ 50% (Figures 20 et 22). Cette différence pourrait s'expliquer, en partie, par le fait que la figure 12 représente les résultats de nos toutes premières expériences. Il est donc possible que les injections de cellules réalisées au cours de ces expériences, en vue d'induire une GVHDc, étaient incomplètes et ont abouti, chez certaines souris, à produire une GVHDc chronique moins importante que celle induite plus tard lorsque l'expérimentateur avait plus d'expérience et réalisait de meilleures injections. En effet, on peut remarquer que lors de l'expérimentation avec la PDT (au moment où l'expérimentateur était plus familier avec la technique d'injection) les résultats de survie présentent une concordance.

La perte de poids ne pouvant constituer, à elle toute seule, une preuve de l'induction de la maladie chez les souris injectées avec les splénocytes alloréactifs, d'autres paramètres ont alors été analysés pour consolider nos observations.

4.1.2. L'atteinte cutanée

L'analyse clinique et histologique de la peau nous a montré que l'infiltration lymphocytaire des follicules pileux était accompagnée par une perte de poils observable sur le corps des souris GVHDc. De plus, des atteintes cutanées proches de la sclérodermie étaient observables sur les pattes de souris GVHDc qui, par endroits présentaient des œdèmes. Une fois de plus, ces signes sont compatibles avec ceux observés chez les patients atteints de la GVHDc. En effet, chez l'humain, la GVHD chronique est associée à des atteintes cutanées de type lichenéenne avec parfois des plaques d'alopecie et des télangiectasies évoquant la sclérodermie.⁴ La présence d'œdème sur les pattes des souris du groupe GVHDc évoque la forme particulière rapportée par Maraninchi et al. qui se manifeste par un œdème des membres et dont

l'apparition brutale est associée à une éosinophilie et à des myalgies.²¹⁸ Bien que, dans le cadre de notre étude, nous n'ayons pas caractérisé de manière systématique le type de lymphocytes qui infiltraient la peau et causaient la perte de poils, il est fort probable que ce soit des lymphocytes T CD4+. En effet, les études ayant caractérisé ce modèle nous révèlent que la nature chronique de la GVHD dans ce modèle est dépendante des lymphocytes T CD4+.^{17,212}

4.1.3. Les auto-anticorps

Les similitudes entre la GVHD chronique et plusieurs maladies auto-immunes, ont poussé de nombreuses équipes à s'intéresser à la présence d'auto-anticorps après allogreffe de moelle. Les auto-anticorps, contre divers antigènes du soi, sont en effet détectables chez les patients atteints de GVHD chronique.^{67,73,219} L'analyse de la production d'auto-anticorps anti-ADNdb nous a montré (Figure 10) une différence significative ($p=0.0238$) entre le groupe de souris GVHDc et le groupe de souris syngénique. Le profil d'expression d'anticorps anti-ADNdb, marqué par un pic de production observé aux alentours du jour 30 post greffe, suivi d'une baisse qui se stabilise, par la suite, tout au long de l'évolution de la maladie, est observé dans d'autres études.²²⁰ La production d'anticorps anti-ADNdb peut s'expliquer par le fait que la GVHDc est une maladie de type Th2. Autrement dit, les lymphocytes se trouvent dans un complexe moins inflammatoire où la stimulation entre les lymphocytes T et B est soutenue. Dès lors, les cellules T alloréactives du donneur, en association avec les peptides dérivant ou non des auto-antigènes contre lesquels les lymphocytes B sont censés réagir, vont reconnaître les molécules CMH de classe II des lymphocytes B. Il s'ensuit donc un signal qui va pousser les lymphocytes B à produire des spécificités inopportunes, c'est-à-dire des auto-anticorps. Cette activation des lymphocytes B semble être de nature oligoclonale.²²¹ Cette présence d'auto-anticorps est observée chez l'humain, même si leur signification pathologique n'est pas établie. Par ailleurs, d'autres modèles de GVHDc présentant une production d'auto-anticorps, une splénomégalie, une expansion de lymphocytes B avec une glomérulonéphrite, existent. Dans ces cas, la pathologie est induite par la transplantation de cellules (P1) parentales dans les lignées

F1 (P1 croisé avec P2) non irradiées. Cependant, la pertinence de ces modèles a été mise en doute, car la splénomégalie et la glomérulonéphrite ne sont pas les composantes de la GVHD chronique chez l'humain.⁶⁶

En définitive, bien qu'il existe d'autres modèles de GVHD chronique dans la littérature, il ressort clairement, qu'en injectant à des souris femelles BALB/cJ-H2^d (**Balb/c**), des splénocytes provenant de souris femelles B10.D2-H2^d H2-T18^c Hc^l/nSnJ (**B10.D2**), nous avons induit une GVHD chronique semblable à celle qui a été observée chez l'humain.

4.2. Nature du greffon injecté aux souris GVHDc

4.2.1. La PDT élimine sélectivement les lymphocytes T alloréactifs

La chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25), lorsque exprimée de manière inductible à la surface des lymphocytes, constitue un marqueur d'activation. Elle est, de ce fait un indicateur du caractère alloréactif d'une population lymphocytaire. L'évaluation par cytométrie en flux de l'effet de la PDT sur les cellules alloréactives CD4+CD25+ et CD8+CD25+ nous a permis de constater que ces dernières étaient fortement éliminées au point que seulement 20% des CD4+CD25+ survivait après la PDT (Figure 14.A). Dans le cas des cellules CD8+CD25+, la viabilité passait de 50% avant la PDT à 15% après la PDT (Figure 15.A). Les cellules non activées CD4+CD25- et CD8+CD25-, quant à elles, présentaient une bonne viabilité avant et après la PDT, soit en moyenne 80% avant et après la PDT (Figures 14.B et 15.B). Cette élimination sélective peut s'expliquer par la rétention préférentielle du TH9402 dans les cellules activées. En effet, le TH9402 pénètre dans toutes les cellules (activées et non activées) et son extrusion est facilitée par la glycoprotéine P (Pgp), un produit du gène de résistance aux médicaments 1 (MDR-1). La Pgp est exprimée à la surface des cellules et des lymphocytes T²²². Il est démontré que l'activation des cellules T conduit à l'inactivation de la Pgp.¹⁹⁵ Comme le rôle de la Pgp est de pomper, à l'extérieur de la cellule, les

médicaments comme l'agent photosensible TH9402, il s'ensuit que les cellules T activées vont retenir plus de TH9402. Au contraire, les cellules non activées, quant à elles, vont réussir à l'exclure étant donné que la Pgp n'est pas inactivée. Toutefois, il est possible que d'autres mécanismes soient aussi impliqués dans la rétention préférentielle du TH9402 dans les cellules activées. En effet, les mitochondries dont la présence est augmentée dans les cellules présentant un cycle cellulaire rapide et un potentiel membranaire augmenté^{223,224} pourraient être une autre source de rétention de l'agent photosensible. Durant l'activation des lymphocytes T, l'activation mitochondriale est accrue dans le but de palier le besoin énergétique de la cellule. Il s'ensuit une dépolarisation transmembranaire et une augmentation de la masse mitochondriale. L'agent photosensible TH9402, qui est un dérivé de la rhodamine 123, est réputé s'incorporer sélectivement sur le plan des mitochondries.¹⁸⁵ Or il a été démontré que les agents photosensibles dont la localisation se fait au niveau des mitochondries induisent plus efficacement la mort cellulaire que les agents se localisant dans d'autres sites cellulaires.^{225,226} Cependant, bien que cela soit le cas, on observe tout de même une faible mortalité, après la PDT, dans la population des cellules non activées. Cela pourrait être dû au fait que certaines cellules non activées ont encore, dans leur milieu intérieur, une quantité résiduelle de TH9402 capable de provoquer leur mort après exposition à la lumière. Il est aussi possible que la concentration de TH9402 utilisée dans notre étude, soit 10 μM , puisse être abaissée afin d'obtenir une rétention différentielle plus élevée entre les cellules activées et non activées. Ce TH9402, résiduel, en plus de se trouver dans les mitochondries, pourrait être présent dans la membrane cellulaire ou les lysosomes et serait à l'origine de cette mortalité non spécifique. Un stress oxydatif subi par les cellules non activées pourrait aussi expliquer leur élimination non spécifique.

4.2.2. Les cellules T vivantes après la PDT pourraient être des lymphocytes T régulateurs

Bien que les cellules activées retiennent plus de TH9402 que les cellules non activées, on observe qu'après la PDT (Figures 14.A et 15.A), un faible pourcentage de

cellules activées est préservé. Le fait que ces cellules CD4+CD25+ et CD8+CD25+ soient encore vivantes après la PDT indique effectivement qu'un certain nombre de lymphocytes T activés a échappé à la PDT, a subi un dommage sub-létal induit par un stress oxydatif dû à la PDT, mais cela n'a pas conduit à des dommages suffisamment importants pour provoquer leur élimination. Il est aussi possible que ces cellules soient des cellules mémoires/activées ayant des propriétés biologiques leur permettant d'échapper à l'action de la PDT. Finalement, ces cellules pourraient être des cellules T régulatrices qui expriment de manière constitutive le marqueur CD25. Alors qu'est-ce qui pourrait donc expliquer que ces cellules, que nous croyons être des Tregs, soient préservées. Il est possible que la Pgp dans ces cellules ne soit pas inactivée comme dans le cas des autres cellules activées CD25+, ou alors ces cellules Tregs pourraient être protégées par la présence d'un gène particulier. À cet effet, on sait qu'en plus du fait que les cellules Tregs expriment le marqueur CD25 de manière constitutive, elles ont le gène Foxp3 (encode pour le facteur de transcription Scurfin²²⁷) qui n'est pas exprimé chez les CD4+CD25- même si ces dernières sont activées en CD4+CD25+.²²⁸ Est-il donc possible que le FoxP3 soit à l'origine de la préservation des cellules CD4+CD25+ après la PDT ? Signalons tout de même qu'à ce stade, rien ne nous permet de croire que ces cellules sont exclusivement des Tregs. Il est en effet fort possible que des cellules T alloréactives aient échappé à l'action de la PDT. Cependant, afin d'avoir une idée de la fonction des cellules T qui échappent à la PDT, nous avons procédé à des essais de prolifération. Comme il est démontré que les cellules Tregs ont une activité suppressive envers les cellules T conventionnelles¹⁵⁶, si les cellules T qui sont préservées ont une fonction suppressive, alors l'on devrait observer une activité anti-proliférative au moins égale à celle qui a été observée dans la population non traitée à la PDT. Les résultats obtenus nous montrent que les cellules non traitées à la PDT, lorsqu'elles sont mises en présence de cellules naïves à un ratio 1/1, bloquent la prolifération de 16.76% de ces cellules après 6 jours (Figure 18.B1). Lorsque ces cellules sont traitées à la PDT et mises en présence de cellules naïves ayant incorporé le CFSE à un ratio 1/1, on constate qu'elles bloquent la prolifération de 47.11% de celles-ci (Figure 18.B2). Au vu de ces résultats, on peut affirmer que la PDT n'a pas éliminé les cellules ayant une fonction suppressive. Mieux, la PDT n'a pas affecté la fonction anti-proliférative de ces cellules.

Bien que ces résultats indiquent que des cellules régulatrices sont préservées après la PDT, on ne peut conclure que ces cellules soient des cellules CD4+CD25+ exclusivement. En effet, l'approche méthodologique que nous avons employée ne nous permet pas de donner une telle précision. Pour y parvenir, il aurait fallu que nous procédions à un tri cellulaire pour isoler les cellules CD4+CD25+ et exposer une fraction des cellules à la PDT. Cependant, au vu du profil des cellules après la PDT, on peut affirmer que ces cellules peuvent être comprises dans la fraction des cellules CD4+CD25+, CD8+CD25+ et NK ayant survécue à la PDT. En effet il est connu que les cellules régulatrices peuvent être des cellules CD4+CD25+, CD8+CD25+ ou des cellules partageant des marqueurs des cellules T et des cellules NK, ce sont les NKT.^{229,230} La préservation de ces cellules régulatrices constituerait un avantage non négligeable dans le traitement photodynamique de la GVHDc.

4.2.3. Élimination totale des lymphocytes B : avantage ou inconvénient pour le traitement ?

L'effet de la PDT, associé à l'agent photosensible TH9402, nous a permis de voir différents profils d'élimination des populations lymphoïdes. L'effet de la PDT sur les cellules B nous montre que cette population est fortement sensible au traitement appliqué. En effet, plus de 90% de celles-ci décèdent après la PDT, et ce majoritairement par nécrose (Figure 16). Cette sensibilité des lymphocytes B à la PDT pourrait s'expliquer par le fait que ces derniers n'arrivent pas à éliminer le TH9402 de leur milieu intérieur. Toutefois, bien que les lymphocytes B expriment peu de Pgp à la surface de leur membrane,²³¹ ce qui aurait, à priori, pour conséquence une rétention accrue de TH9402, des expériences effectuées dans notre laboratoire ont révélé que les lymphocytes B et T renaient une quantité similaire de TH9402 (Nancy Dallaire et al., manuscrit soumis). De plus, au cours de ces mêmes études effectuées dans notre laboratoire, il a été démontré que des cellules B normales ont été supprimées à des niveaux semblables à ceux de cellules B malignes. Ces observations indiquent clairement que la cytotoxicité n'est pas totalement dépendante des niveaux de TH9402

et suggère que les propriétés biologiques intrinsèques de TH9402 soient extrêmement efficaces à cibler une voie prédominante chez les cellules B. Comme autre explication, il est fort probable que les lymphocytes B n'arrivent pas à réparer avec célérité les dommages oxydatifs subits à la suite de la PDT, comme cela est proposé être le cas chez les cellules non activées.²³² Ou encore la PDT pourrait induire chez les lymphocytes B une augmentation du récepteur de mort Fas (CD95).²³³ Cependant, une telle augmentation de Fas se serait traduit par une mort cellulaire induite par apoptose telle qu'on l'a observée dans les études faites dans notre laboratoire sur d'autres modèles.²⁰² Or nos résultats présentent une mort cellulaire des lymphocytes B induite majoritairement (plus de 90%) par nécrose. Est-il donc possible que les lymphocytes B, provenant des souris atteintes de GVHDc, présentent des caractéristiques qui les orientent vers une mort cellulaire par voie de nécrose ? Une autre hypothèse serait que l'apoptose survient rapidement (en moins d'une heure) chez ces lymphocytes après la PDT. En étudiant la cinétique de mortalité, tout en analysant le type de mort cellulaire qui en découle, ceci entre les lymphocytes B des souris GVHDc et ceux des souris normales, on devrait être en mesure de savoir si l'apoptose survient tôt au point que nous n'arrivons pas à la détecter au cours de nos analyses. L'étude des voies moléculaires impliquées devrait aussi nous permettre de mieux comprendre la différence observée. Finalement, le fait qu'après l'incubation prolongée à de hautes concentrations d'agents photosensibles, des cellules non activées, comme les lymphocytes B, soient aussi éliminées par la PDT, suggère que les différences de la sensibilité entre des cellules activées et normales sont quantitatives plutôt que qualitatives.²³⁴

Cette élimination presque totale des lymphocytes B post PDT pourrait toutefois constituer un avantage pour le traitement. Il y a de plus en plus d'évidences impliquant les lymphocytes B dans la pathophysiologie de la GVHDc. Ainsi, à titre d'exemple, la production d'anticorps anti-chromosome Y générés après une greffe allogénique entre des individus de sexe différent est réputé corrélée avec la GVHDc.⁸⁹ Une telle corrélation entre la présence des lymphocytes B et la GVHDc génère donc l'hypothèse selon laquelle une thérapie anti-B pourrait être une approche effective pour traiter la GVHDc. Ainsi, l'utilisation du rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20, résulte en une déplétion marquée des cellules B du sang périphérique et contribue en

conséquence à améliorer le pronostic clinique des patients atteints de GVHDc.^{56,235} Dans le cadre de notre étude, cette élimination des lymphocytes B a été observée après la PDT.

Les cellules B peuvent jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (APCs).²³⁶ Comme les APCs jouent un rôle important dans la médiation de la GVHD, l'élimination d'un apport supplémentaire de ces cellules, lors du traitement, ne peut être que bénéfique dans la mesure où le risque de présentation des antigènes mineurs du receveur est réduit. De plus, il a été proposé que les APCs du donneur, quoique requis pour l'induction de la GVHD, ne sont pas nécessaires pour la réponse GVL,¹²⁶ ce qui confirme que l'élimination des cellules B par la PDT pourrait être bénéfique pour le traitement de la GVHD. Aussi est-il clairement démontré que certaines formes de GVHDc peuvent être traitées par déplétion de cellules B.⁵⁶

Par ailleurs, les études de prolifération que nous avons effectuées tendent à démontrer, à priori, que l'élimination des cellules B, par la PDT dans le greffon, limite la prolifération des cellules alloréactives du donneur. Cet effet est bénéfique en ce sens que les cellules alloréactives prolifèrent moins et sont donc par conséquent moins susceptibles de causer des dommages à l'hôte. En effet, on constate (Figure 18) que les splénocytes alloréactifs provenant des souris B10.D2 puis traités au CFSE et mis en présence des splénocytes traités à la PDT (contenant très peu de lymphocytes B) et provenant de souris GVHDc prolifèrent moins (52.89%, jour 6). Or on constate que ces mêmes cellules alloréactives traitées au CFSE ont une prolifération accrue (83.24%, jour 6) lorsqu'elles sont mises en présence de splénocytes non traités à la PDT (contenant plus de lymphocytes B) et provenant des mêmes souris GVHDc. Les lymphocytes B étant une excellente source d'APCs, leur absence, en grande quantité (plus 90% d'élimination), dans le greffon traité à la PDT, pourrait contribuer à la faible prolifération des cellules alloréactives B10.D2 dommageables pour l'hôte. Cela à notre avis, constitue un avantage considérable pour le traitement de la GVHDc. Cependant, il ne nous est pas possible, à ce stade, d'affirmer que c'est cette absence, à elle seule, des cellules B qui justifie une telle activité anti-proliférative. Pour y voir plus clair, il serait intéressant de déterminer si la déplétion des lymphocytes B dans le greffon non traité à la PDT aura le même effet que celui d'un greffon non traité à la PDT et contenant les

lymphocytes B. Dans le cas du greffon traité à la PDT, l'ajout de lymphocytes B aura-t-il le même effet que le greffon traité à la PDT et mis en présence des cellules alloréactives B10.D2 ? La réalisation de ces expériences serait intéressante afin de permettre une meilleure compréhension du rôle de l'élimination des lymphocytes B dans le traitement de la GVHDc par la PDT.

Il ressort donc que la déplétion des lymphocytes B par la PDT pourrait constituer un avantage pour le traitement de la GVHDc. Les risques d'immunodéficience, dus à l'absence de lymphocytes B, pourraient aboutir à une susceptibilité accrue aux agents viraux et bactériens.²³⁷ Néanmoins, leur remplacement relativement rapide à partir de cellules souches devrait limiter ce risque. De plus, il est connu que l'utilisation d'anticorps anti-lymphocytes B (rituximab) n'est pas associée à une augmentation significative des infections.

4.2.4. Élimination partielle des cellules NK : avantage ou inconvénient pour le traitement ?

L'effet de la PDT, sur les cellules NK, nous a montré que cette population présentait une sensibilité intermédiaire. En effet, environ 37% de cellules survivent après la PDT sur les 87% de départ (Figure 17). Cette sensibilité pourrait, une fois de plus, être due à un stress oxydatif causé par la PDT. Par ailleurs, il est aussi probable que la concentration de TH9402, utilisée, 10 μ M, ne permet pas aux cellules un efflux complet du colorant causant ainsi leur mort. La sensibilité intermédiaire observée, pourrait être due aussi à l'existence d'une sous population des cellules NK présentant une sensibilité différente à la PDT. En effet, l'existence de sous populations de cellules NK exprimant ou non la Pgp a été mentionnée chez des patients atteints du désordre lympho-prolifératif granulaire.²³⁸ Il serait intéressant de voir si une telle sous population de cellules NK est présente dans la pathologie de la GVHDc. Toutefois, la préservation d'une partie des cellules NK pourrait être un avantage pour le traitement. En effet, cette préservation des cellules NK pourrait avoir une activité anti-virale et anti-tumorale.²³⁹

4.3. Traitement de la GVHDc par injection de splénocytes

4.3.1. L'injection des splénocytes traités à la PDT améliore le devenir clinique des souris GVHDc : Effet sur le poids et la survie

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de l'injection répétitive de splénocytes traités ou non à la PDT à des souris ayant une GVHD chronique. Il en est ressorti que l'injection de splénocytes traités à la PDT à des souris atteintes de la GVHDc a entraîné, chez ces dernières, diverses améliorations en comparaison des souris atteintes de GVHDc non traitées ou celles injectées avec des splénocytes non traités à la PDT. En effet, l'évaluation du poids qui est un indicateur de la GVHDc, nous a montré que, dans le groupe injecté avec des splénocytes traités à la PDT, la chute du poids était freinée et stabilisée tout au long du traitement (Figures 19 et 21). À l'inverse, les souris du groupe «non traité» ou celles du groupe injecté avec des splénocytes non traités à la PDT perdaient du poids. Fait marquant, lorsque les souris étaient injectées avec des splénocytes non traités à la PDT, elles perdaient davantage du poids que les souris atteintes de GVHDc n'ayant reçu aucun traitement. Cette amélioration de l'état clinique des souris pourrait s'expliquer par une amélioration des fonctions hépatiques et digestives chez les souris injectées avec les splénocytes traités à la PDT. En effet, comme nous le savons, les canaux biliaires comme dans la GVHD aiguë sont la cible de la GVH chronique dans 80 % des cas. La destruction de ces canaux biliaires associe une perte de poids qui peut être due à une mauvaise assimilation des lipides, elle-même due à un mauvais acheminement de la bile chargée de l'assimilation des lipides. Le mauvais acheminement est la conséquence logique de la destruction des canaux biliaires. Par ailleurs, l'atteinte digestive, bien que plus rare qu'à la phase aiguë et touchant surtout l'œsophage dans sa partie supérieure avec une inflammation diffuse source de dysphagie et de reflux, pourrait être moins grave chez les souris injectées avec les splénocytes traités à la PDT que chez les souris du groupe -PDT et celles du groupe «non traité».

Cette observation confirme que la PDT a éliminé la majeure partie des splénocytes alloréactifs présents dans le greffon, et qu'une fois injectés, ces derniers ne contribuent pas à aggraver la maladie. Au contraire, l'ajout de splénocytes alloréactifs aggrave la maladie et confirme le fait qu'ils sont à la base de l'induction de la GVHDc. Cependant, cet effet sur le poids ne s'est pas traduit par une différence significative sur le plan de la mortalité, même si une tendance en faveur du traitement est observée (Figures 20 et 22). Cette différence pourrait être expliquée par le nombre de souris dans les différents groupes (n=8) qui ne serait pas assez grand pour déceler, à ce stade, une telle différence significative. Par conséquent, le nombre de souris dans les différents groupes devrait être augmenté dans les expériences à venir. Par ailleurs, on a aussi observé que les souris recevant un traitement précoce au jour 15 post greffe, donc à priori, sont moins malades que celles ayant reçu un traitement au jour 55 post greffe, n'étaient pas plus avantagées. Il est possible que le traitement appliqué, «cellules -PDT» et «cellules +PDT», soit noyé par le désordre homéostatique causé par la maladie fraîchement induite. En effet, on observe (Figure 21) que les souris sont dans une phase (ascendante) de récupération, à la suite du régime de conditionnement (irradiation), au moment où elles reçoivent les deux premières doses de cellules jours 15 et 22. À ce stade, on devrait s'attendre à voir les souris ayant reçu un apport supplémentaire de cellules alloréactives «cellules -PDT» perdre plus de poids que celles des groupes «cellules +PDT» et «non traité». Tel n'est pas le cas. La perte de poids, post traitement, survient lorsque la récupération post conditionnement atteint un plateau, généralement entre les jours 25 et 30 post greffe (Figures 7, 19 et 21). La présence d'une grande quantité d'auto-anticorps anti-ADNdb durant cette phase ascendante pourrait-elle expliquer, en partie, l'atténuation de l'effet de traitement ? En effet, on constate (Figure 10) que ce taux est à son maximum dans l'intervalle qui va du jour 21 (38 mg/mL) au jour 30 (42 mg/mL). Ce maximum peut, chez certaines souris, atteindre un pic de 50 mg/mL d'anticorps anti-ADNdb. Cependant, une fois que ce taux d'anticorps anti-ADNdb baisse (à partir du jour 30 post greffe) et atteint une phase de plateau (à partir du jour 40 post greffe), l'effet du traitement se fait ressentir. Cet effet est observable particulièrement lorsque le traitement est appliqué à partir du jour 55 post greffe, où l'apport supplémentaire de cellules alloréactives «cellules -PDT» accentue la perte de

poids (de -5% à près de -15%) dans ce groupe de souris (Figure 19). La présence d'IL-4, qui favorise la production d'auto-anticorps, l'augmentation d'IL-10, du TNF- α , et de l'INF- γ qui stimule la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène, pourrait aussi expliquer le fait que l'action du traitement soit masqué lorsque les souris sont traitées plus tôt. Ces résultats suggèrent que le fait d'appliquer le traitement 15 jours après la greffe, au moment où les souris GVHDc subissent une déferlante de cytokines et, par conséquent, un déséquilibre homéostatique majeur, ne constitue pas un avantage important. Un traitement tardif, au jour 55 post greffe (Figure 20), ne présente pas non plus une différence significative ($p=0.215$) en terme de survie entre le groupe «cellules +PDT» et le groupe «cellules -PDT». Cependant, dans ce cas, une tendance plus marquée en faveur du traitement est observée. La mortalité est en effet plus décalée dans ce cas. En effet, elle survient 20 jours plus tard dans le groupe «cellules +PDT» en comparaison du groupe «cellules -PDT». Traiter au jour 55 post greffe, quand l'équilibre homéostatique semble être installé, pourrait être plus avantageux que de le faire au jour 15 post greffe.

4.3.2. L'injection des splénocytes traités à la PDT améliore le devenir clinique des souris GVHDc : Effet sur les auto-anticorps

L'effet bénéfique de la PDT sur le devenir clinique des souris atteintes de GVHDc, s'est aussi traduit par une tendance à la baisse du taux d'anticorps anti-ADNdb. Les anticorps anti-ADNdb, au cours de la GVHDc, présentent une cinétique de production particulière. Après des pics de production aux alentours du jour 30, il y a une baisse de production suivie d'une phase de plateau. Nous avons choisi d'exploiter cette cinétique, présentant une phase de plateau, pour évaluer l'effet du traitement que nous appliquons aux souris. Autrement dit, si l'injection de splénocytes alloréactifs non traités à la PDT accentue la maladie, le taux d'anticorps anti-ADNdb dans cette phase se verra augmenter. À l'inverse, si l'injection de splénocytes alloréactifs traités à la PDT aboutit à une amélioration de l'état clinique des souris malades, alors l'on devrait s'attendre à voir le taux d'anticorps anti-ADNdb diminuer. Bien que la signification clinique de la

présence de ces auto-anticorps ne soit pas encore bien comprise, il y a des évidences entre leur présence et le développement d'une GVHDc.^{240,241} Ainsi, comme nous avons pu le constater (Figure 23), les souris injectées avec des splénocytes traités à la PDT avaient un profil moyen du taux d'anticorps anti-ADNdb à la baisse. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le greffon ayant servi à injecter ces souris était dépourvu de cellules B éliminées par la PDT. De plus, le fait que ce greffon ne contenait plus une grande population de splénocytes alloréactifs a diminué la capacité d'interaction entre les cellules T et les lymphocytes B. En effet, les cellules T helper du donneur exprimant les récepteurs spécifiques pour les antigènes du receveur apportent leur aide aux cellules B quiescentes du receveur, stimulant ainsi la production d'auto-anticorps.^{242,243} Bien que le rôle pathologique des auto-anticorps ne soit pas clairement défini dans la pathologie de la GVHD chronique, il n'en demeure pas moins que leur diminution était associée à une survie améliorée dans le groupe traité à la PDT. À l'inverse, un taux d'anticorps accru était associé à une survie altérée dans le groupe non traité et dans le groupe traité avec les cellules -PDT. Il serait intéressant d'évaluer la corrélation entre ces deux paramètres dans les études à venir.

4.3.3. Mécanismes immunobiologiques de la thérapie photodynamique

Comme il a été mentionné plus haut, l'effet physicochimique de la PDT est fondé non seulement sur la génération des radicaux libres et des singulets d'oxygènes, mais aussi sur la rétention préférentielle et sélective de l'agent photosensible dans les cellules anormales ou hyper prolifératives. Dans le cadre de notre étude, l'injection de cellules alloréactives traitées à la PDT provenant des souris ayant la GVHDc à d'autres souris souffrant de cette pathologie a démontré un effet bénéfique chez ces dernières. Il apparaît que l'effet physicochimique ne saurait expliquer, à lui tout seul, les changements observés tant sur le plan clinique que biologique. Dans le cas de la GVHDc, la PDT pourrait exercer son action par divers mécanismes biologiques et immunologiques. En effet, il a été suggéré que l'effet immuno-modulateur de la PDT résulterait, entre autres, d'une induction de l'apoptose des cellules T et d'une hypo

régulation de l'alloréactivité induisant une tolérance immunologique due à des mécanismes tels l'anergie, l'ignorance, la délétion et la suppression.²⁴⁴ Une réponse vaccinale de type T pourrait être impliquée ainsi que la mise en place d'une réponse immune régulatrice et la stimulation de la sécrétion de certaines cytokines. Il est aussi à noter que l'impact de certains paramètres sur la réponse clinique tels la composition de la suspension cellulaire, la bio distribution (durée de vie, circulation, élimination) des cellules après réinjection n'est pas clairement défini. Discutons, plus en détails, des mécanismes qui pourraient expliquer les effets observés.

4.3.4. Mécanismes immunobiologiques de la thérapie photodynamique : importance de l'apoptose

L'efficacité de la photophérese extracorporelle dans le traitement de la GVHD résulterait de l'induction de l'apoptose des cellules T activées et potentiellement d'autres cellules immunes.²⁴⁵ Ces cellules T apoptotiques seraient par la suite phagocytées par les macrophages, ce qui aurait pour conséquence de faciliter la génération d'une réponse immune anti-T. Une telle action pourrait être impliquée dans le mécanisme d'action de la PDT. En effet, il a été démontré que la PDT associée au TH9402 induisait une mort cellulaire par apoptose. La conséquence directe d'une telle action est l'élimination physique des cellules alloréactives du greffon. De ce fait, la baisse du nombre de cellules alloréactives du greffon, induite par la PDT, serait donc un moyen de contrôler la GVHDc. Le fait que cette élimination de cellules alloréactives se fasse par apoptose, constituerait un avantage pour la génération d'une réponse immune robuste.²⁴⁶ En effet, une cellule apoptotique est moins endommagée qu'une cellule nécrotique, ce qui rend la présentation des récepteurs cellulaires T (TCR) par les cellules dendritiques plus efficace. Le rôle de l'apoptose est d'autant plus important que, plusieurs études suggèrent qu'elle joue un rôle dans le mécanisme d'action de la PDT que ce soit dans les lymphomes T cutanés ou la GVHD.^{145,246} Cependant, il est à noter qu'au cours de nos études, nous avons constaté que la PDT associée au TH9402 induisait une mort cellulaire majoritairement due par nécrose. En effet, dans le cas de cellules provenant

des souris GVHDc, la mort cellulaire induite chez les cellules NK était par voie de nécrose (près de 60%). Cette tendance a aussi été observée chez les lymphocytes B (90%). Pour le cas des cellules T CD4+CD25+ (Figure 14), nous avons constaté qu'une proportion de 60% est AnnV+/7AAD+, alors que moins de 5% de cellules mortes sont éliminées directement par apoptose (AnnV+/7AAD-) et sensiblement 10% directement par nécrose (AnnV-/7AAD+). Ce profil d'élimination est le même dans le cas des cellules T CD8+CD25+ (Figure 15). Notons que les cellules AnnV+/7AAD+ sont soit dans une phase avancée d'apoptose, soit déjà mortes. L'approche méthodologique que nous avons utilisée ne distingue donc pas, en soi, entre les cellules dont le processus de mort implique l'apoptose et celles qui sont mortes par voie nécrotique parce que dans l'un ou l'autre des cas, les cellules mortes se teinteront tant avec l'AnnV qu'avec le 7-AAD.²⁴⁷⁻²⁵⁰ Cette induction préférentielle de la nécrose dans les cellules NK et B par le TH9402 qui se localise presque exclusivement, dans les mitochondries est inhabituelle. En effet, les agents photosensibles se localisant dans les mitochondries comme le TH9402 sont réputés induire la mort cellulaire par apoptose.^{225,226,251} Il est donc fort probable que les conditions de traitement utilisées (10µM TH9402, 40 minutes d'incubation, 50 minutes d'extrusion, exposition à la lumière 5 J/cm²) soient très intenses pour les cellules provenant des souris atteintes de GVHDc. Comme il n'est pas possible de savoir, en se référant aux conditions expérimentales utilisées, si les cellules T sont mortes par apoptose ou pas, il nous est difficile d'évaluer leur influence sur la qualité de la réponse immune engendrée *in vivo*. Toutefois, il est à noter que ces mêmes conditions ont induit une mort cellulaire par apoptose des cellules T et B lors des études impliquant des lignées cellulaires dans notre laboratoire. L'apoptose, comme mode d'action de la PDT, est donc à considérer car ce phénomène permet non seulement une élimination des cellules alloréactives du greffon (au même titre que la nécrose) mais aurait aussi un avantage considérable dans l'induction d'une réponse immune robuste.

4.3.5. La réponse vaccinale T comme mécanisme immunobiologique de la thérapie photodynamique ?

Dans plusieurs modèles de maladies auto-immunes, les cellules régulatrices responsables de la résistance à l'auto-immunité sont les cellules T anti-idiotype.^{252,253} Ces cellules reconnaissent les épitopes du récepteur des cellules T (TCR). La réponse immune qui en résulte fait référence au concept de la vaccination T décrit par Irun R. Cohen.^{254,255} Ce système régulateur dépend de facteurs différents comme la présence de clones de lymphocytes T dont l'activité est dirigée contre les lymphocytes T autoréactifs. Le concept de vaccination de cellules T est aussi valable pour tous les lymphocytes T activés incluant les cellules T alloréactives. De telles réactions "d'anti-auto-immunité" peuvent être initiées *in vitro* et *in vivo* par la manipulation de lymphocytes autoréactifs et/ou alloréactifs par photophérèse extracorporelle ou par thérapie photodynamique. En effet, les expérimentations animales consistant à traiter les lymphocytes T pathogènes à l'aide du 8-MOP avec des UVA suggèrent que la photophérèse extracorporelle induit une réaction immunitaire de type « vaccine like » dirigée contre les cellules pathogènes.^{256,257} Cette hypothèse du développement d'une réponse immunitaire vis-à-vis des clones T pathogènes au cours de la photophérèse extracorporelle pourrait être initiée au cours de la PDT et se présenter comme suit : les clones T alloréactifs responsables de la GVHDc, traités par la PDT en association avec le TH9402 sont phagocytés par des cellules dendritiques qui, en présence d'un signal de danger, arrivent à maturité et migrent vers les organes lymphoïdes. Les cellules dendritiques vont digérer les clones T pathogènes et présenter, par l'intermédiaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, des antigènes modifiés par la PDT à des lymphocytes T régulateurs. Ces lymphocytes reconnaissent par leur récepteur spécifique de l'antigène (TCR) ces antigènes modifiés et s'activent en présence de molécules de costimulation exprimées par les cellules dendritiques. Il s'ensuit une prolifération de lymphocytes T régulateurs activés. Ces Tregs vont se différencier en effecteurs et patrouiller l'organisme à la recherche des clones pathogènes non traités par la PDT pour inhiber leur fonction, leur prolifération ou encore pour les détruire. Comme il n'est pas possible, dans le cadre de notre étude, de savoir quels sont spécifiquement les

antigènes impliqués, il ne nous est pas possible de mettre en évidence cette réponse vaccinale. Toutefois, des indications récentes suggèrent que, dans le modèle que nous avons utilisé (B10.D2 → Balb/c), les clones de cellules T exprimant le récepteur de cellules T V β 2 et V β 3, montrent une activation oligoclonale.²⁰⁴ Cela voudrait dire que ces clones reconnaissent un nombre restreint d'antigènes mineurs et seraient les plus impliqués dans la pathologie de la GVHDc dans ce modèle. En tirant donc avantage de l'expansion oligoclonale de ces deux clones, l'on pourrait identifier les antigènes mineurs qu'ils reconnaissent et ainsi mettre en évidence la présence d'anticorps anti-idiotypique générés à la suite de l'injection de ces clones traités à la PDT à des souris GVHDc. Cet effet anti-idiotypique, déjà démontré dans le cas de traitement par photophérese extracorporelle associé au 8-MOP de lymphome cutané,²⁵⁸ pourrait donc constituer un des modes d'action de la PDT dans le traitement de la GVHDc.

4.3.6. La réponse vaccinale T comme mécanisme immunobiologique de la PDT : importance de la dose d'injection

Dans le cadre de notre étude, nous avons injecté à des souris GVHDc à trois reprises, 25×10^6 splénocytes alloréactifs traités ou non traités à la PDT, pour un total de 75×10^6 splénocytes. De ce fait, il est donc fort probable que les lymphocytes T, spécifiques de certains antigènes mineurs, aient initié une réponse immune de type « vaccine like ». La qualité de la réponse serait tributaire du nombre de cellules injectées. En effet, il a été démontré que l'injection de quantités sous pathogéniques ou atténuées de cellules T autoréactives prévient l'auto-immunité induite par de telles cellules.^{254,259-261} En injectant un total de 75×10^6 splénocytes non traités à la PDT, nous avons plutôt aggravé la GVHDc telle qu'on a observée par une perte de poids accélérée et une mortalité plus accentuée (Figures 19, 20 et 21). Cela voudrait donc dire que cette quantité totale de 75×10^6 splénocytes alloréactifs non traités à la PDT n'a pas induit une réponse vaccinale. Des quantités plus modestes de cellules alloréactives non traitées à la PDT auraient-elles pu produire un effet vaccinal ? Une telle issue est probable. En effet, les études de Josée A.M. Borghans et al. suggèrent que pour protéger des animaux

contre l'auto-immunité en injectant des cellules T autoréactives normales sans inciter la maladie, on devrait atteindre l'état vaccinal en donnant une faible dose de cellules autoréactives. Par contre, une trop petite dose de cellules autoréactives échoue à amorcer les boucles de réactions. En donnant une dose des cellules autoréactives qui est petite, mais suffisante, les auteurs ont observé que la réaction s'approchait de l'état vaccinal tandis qu'aucune maladie autoimmune n'était initiée.²⁶² Ceci pouvant s'expliquer par le fait que la prolifération de cellules autoréactives est si lente que les cellules régulatrices peuvent se maintenir à leur niveau et contrôler les cellules autoréactives du début. Ceci est aussi valable pour les cellules alloréactives. Au cours d'une de nos expériences (résultat non présenté), nous avons constaté que trois injections de 15×10^6 splénocytes non traités à la PDT, pour un total de 45×10^6 splénocytes non traités, n'ont pas entraîné une chute de poids chez les souris GVHDc. Le poids moyen de ces souris a montré un gain transitoire avant de se stabiliser. Cette observation était la même chez les souris ayant reçu le même nombre de cellules totales traitées à la PDT. Dès lors, l'on pourrait logiquement penser qu'il serait plus facile d'injecter de petites quantités de cellules alloréactives non traitées à la PDT. Toutefois, cette approche souffre d'une insuffisance étant donné que l'effet observé est transitoire. Ce qui voudrait dire que pour le maintenir, il faudrait injecter continuellement plusieurs doses de petites quantités de cellules non traitées à la PDT. Le risque d'une telle approche serait l'accumulation de ces cellules alloréactives avec pour conséquence l'aggravation de la GVHDc. L'injection de cellules traitées (atténuées) à la PDT semble donc être plus avantageuse. Puisque la PDT élimine une forte proportion de cellules alloréactives, le risque d'aggraver la GVHDc en injectant des doses répétitives de cellules traitées à la PDT est faible. Dans la littérature, il ressort que la vaccination T a aussi été réalisée avec de grandes doses de cellules autoréactives atténuées.^{259,261} Parce que l'atténuation bloque la division de cellules, l'effet ultime d'une injection de cellules autoréactives atténuées est une stimulation des cellules régulatrices. Cela mènera évidemment à la protection contre la maladie : c'est une façon de stimuler la boucle de réactions régulatrice sans stimuler la boucle de réactions positive causant la maladie.

4.3.7. Mécanisme immunobiologique de la thérapie photodynamique : impact des lymphocytes T régulateurs

La population de lymphocytes T CD4+CD25+, caractérisée par une expression constitutive de la chaîne α du récepteur de l'interleukine-2 (CD25) (soit 7-10 % des lymphocytes T CD4+) joue un rôle important dans la régulation de nombreuses maladies auto-immunes. Ces lymphocytes semblent agir par inhibition de l'activation des cellules T CD4+ et T CD8+. Fait intéressant, les lymphocytes T régulateurs ont un potentiel thérapeutique dans le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte. En effet, l'infusion de ces cellules Tregs CD4+CD25+ est réputé inhiber la GVHD tout en préservant l'effet contre les cellules cancéreuses (effet GVL).^{163,164} L'importance de ces lymphocytes Tregs étant démontré dans le contrôle de plusieurs pathologies, il était important, pour nous, de savoir si la PDT les éliminait ou pas. Les résultats obtenus suggèrent que cette souspopulation est préservée par la PDT. Dès lors, comment la PDT pourrait-elle tirer avantage de la présence de ces Tregs qui sont déjà présents chez les souris malades ? Le fait que la PDT épargne les Tregs constitue à coup sûr un avantage. En effet, ces cellules sont impliquées dans l'initiation d'une réponse de type vaccinale en reconnaissant les épitopes du TCR. Dans le cas de la prévention d'une maladie auto-immune, Josée A.M. Borghans suggère que, si le nombre de cellules régulatrices stimulées par les cellules autoréactives atténuées est élevé quand des cellules auto-immunes viables sont introduites, ces dernières vont proliférer moins vigoureusement et s'approcher de l'état vaccinal sans atteindre les hauts nombres exigés pour l'auto-immunité.²⁶² En projetant cette hypothèse à notre approche de traitement de la GVHDc par PDT, cela pourrait expliquer le mode d'action des Tregs et le pourquoi de l'importance de la préservation de ces Tregs par la PDT. En effet, ces cellules sont présentes dans les souris atteintes de GVHDc, pourtant elles n'arrivent pas à contrôler la GVHDc. Cette situation peut être due au fait que le nombre de cellules alloréactives est plus élevé que les cellules Tregs. De ce fait, elles sont incapables, à elles toutes seules, de limiter leur prolifération. Par contre, lorsque ces mêmes cellules alloréactives sont atténuées par la PDT et injectées aux souris, les cellules Tregs préservées par la PDT,

peuvent alors initier une réponse vaccinale anti-idiotypique. Bien que les mécanismes par lesquels les lymphocytes Tregs contrôlent l'émergence de maladies autoimmunes soient très mal connus, des expériences réalisées *in vivo* montrent que ces cellules pourraient bloquer l'activation des lymphocytes T autoréactifs et inhiber ainsi leur prolifération et/ou leur différenciation en cellules effectrices pathogènes.^{263,264} Cette inhibition de l'activation et/ou de la prolifération peut se faire par contact direct avec les cellules alloréactives ou par le biais des APCs.^{265,266} Par conséquent, la préservation des lymphocytes Tregs post PDT serait un mode d'action par lequel, la PDT exerce son action dans le traitement de la GVHDc.

4.4. Le traitement de la GVHDc par injection de splénocytes traités à la PDT améliore-t-il la reconstitution immunologique ?

Au cours de notre étude, nous avons utilisé le modèle de souris B10.D2→Balb/c. Les souris donneuses (B10.D2) et receveuses (Balb/c) présentent des différences sur le plan des antigènes mineurs d'histocompatibilité (miHA). Les souris Balb/c expriment aussi le stimulateur mineur de lymphocyte-3 (Mls)-3, un super antigène rétroviral endogène (VSAg) qui est codé par le virus de tumeur mammaire 6 (VSAg-6) de souris et reconnu par la chaîne variable V β 3 du TCR. L'expression du VSAg-6 pendant le développement néonatal cause la délétion des cellules T V β 3 positives dans les souris Balb/c. Au contraire, les souris B10.D2 n'expriment pas le VSAg-6 et ont par conséquent des cellules T V β 3 qui sont capables de reconnaître ce VSAg *in vivo*.²⁰⁴ Comme nous l'avons mentionné plus haut, les clones V β 2 et V β 3 présentent une expansion oligoclonale dans le modèle murin de GVHDc que nous avons utilisé. L'évaluation de la reconstitution immunologique chez les souris traitées à la PDT (Figure 24), nous montre un profil hétéroclite. Nous avons observé un profil oligoclonal pour le segment V β 3, ce qui ne suggère, à priori, aucune amélioration pour ce segment chez la souris traitée à la PDT. Toutefois, le segment V β 2 montre un profil polyclonal

même s'il n'est pas gaussien. Rappelons une fois de plus que ce segment est réputé avoir un profil oligoclonal.²⁰⁴ L'apparition d'un profil polyclonal suggère donc une amélioration de la reconstitution immunologique, du moins, pour ce qui est de ce clone. En l'état actuel des résultats obtenus, il ne nous est pas possible d'affirmer que la reconstitution immunologique est meilleure chez les souris traitées à la PDT que chez celles non traitées. Pour ce faire, une analyse complète de tout le répertoire tant chez les souris traitées que non traitées à la PDT, nous aiderait à tirer une conclusion précise. Nous avons aussi observé que les clones V β 8.1, V β 8.2 et V β 8.3 ont un profil polyclonal au même titre que celui des souris non atteintes de GVHDc. Cette observation laisse sous entendre que ces segments ne sont pas impliqués dans l'induction de la GVHD chronique ou qu'il y a une reconstitution adéquate de ces derniers après le traitement au cas où ces segments seraient impliqués dans l'induction de la GVHDc. En observant la Figure 25, on constate que le pourcentage de ces clones est quasi identique tant chez les souris normales (32.51%) que chez les souris atteintes de GVHDc (28%). Ce fait tend à démontrer que ces clones ne sont pas impliqués dans la pathologie de la GVHDc en référence au modèle utilisé. En effet, il est suggéré que ces clones reconnaissent plutôt des antigènes d'histocompatibilité mineurs exprimés de façon ubiquitaire tant chez les souris normales que chez les souris atteintes de GVHDc.²⁶⁷ Par conséquent, le profil gaussien observé n'est pas le résultat d'une amélioration due au traitement à la PDT. Toutefois, le fait que ce profil normal n'ait pas été altéré par le traitement suggère que la PDT associée au TH9402 n'est pas néfaste pour la diversité du répertoire immunologique. Des études plus poussées du répertoire V β devraient permettre de clarifier le rôle de la PDT sur la reconstitution immunitaire.

Conclusions et Perspectives

La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) demeure la principale complication après les greffes allogéniques de cellules souches hématopoïétiques. L'incidence de cette pathologie, notamment dans sa forme chronique, ne cesse de s'accroître du fait de l'âge du receveur et du donneur, du haut degré d'incompatibilité sur le plan des antigènes HLA, du recours à un donneur non apparenté ou non, un historique d'infection au cytomégalovirus ainsi que de l'utilisation d'un donneur de sexe féminin. Malheureusement, il n'existe pas un agent pharmacologique spécifique pour le traitement de cette pathologie. Les approches classiques utilisées sont associées à de nombreux effets secondaires.

Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes proposés d'évaluer l'efficacité d'une nouvelle approche thérapeutique de la forme chronique de la GVHD : la thérapie photodynamique (PDT) associée à l'agent photosensibilisateur 4,5-dibromorhodamine methyl ester (TH9402).

Pour ce faire, nous avons dans un premier temps reproduit la GVHDc dans un modèle murin largement utilisé dans littérature. Les résultats obtenus nous ont permis de constater que la pathologie induite chez ces souris était semblable à celle observée chez l'homme; faisant du modèle de souris (B10.D2→Balb/c) un excellent support pour l'évaluation de l'efficacité de notre traitement.

Les travaux réalisés nous ont permis de montrer que la PDT associée au TH9402, éliminait les lymphocytes T alloréactifs responsable de la GVHDc. Cette élimination était cependant spécifique puisque que la PDT/TH9402 épargnait les lymphocytes T non activés responsables de monter une réponse immune contre les cellules cancéreuses et les virus. Fait intéressant, la PDT éliminait en grande partie les cellules B. Étant donné que ces cellules peuvent jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes et avoir un impact important dans la médiation de la GVHD, l'élimination d'un apport supplémentaire de ces cellules lors du traitement ne pouvait être que bénéfique même si un risque d'immunodéficience était présent. Nous avons aussi observé que la PDT avait une activité intermédiaire sur les cellules tueuses naturelles (NK). La préservation de ces

cellules est importante car les NK ont une activité anti-virale et anti-tumorale. Les résultats obtenus suggéraient aussi que la PDT préservait la population des lymphocytes T régulateurs (CD4+CD25+). Dans les études avenir, il serait intéressant d'évaluer directement l'effet de la PDT sur une population pure de cellules CD4+CD25+. De plus, l'effet de la PDT sur les cellules dendritiques devrait aussi être évalué étant donné que ces cellules jouent un rôle important dans l'initiation d'une réponse immune.

En injectant les souris atteintes de GVHDc avec les splénocytes alloréactifs non traités à la PDT, nous avons observé une aggravation de l'état de ces dernières. Au contraire, lorsque ces souris étaient injectées avec des splénocytes traités à la PDT, on observait une stabilisation du poids accompagnée d'une baisse du taux d'anticorps anti-ADNdb. Tous ces effets ont eu pour conséquence une amélioration de la survie des souris atteintes de la GVHDc et injectées avec des splénocytes traités à la PDT. Les études à venir devraient nous permettre d'évaluer l'impact du nombre de splénocytes injectés sur la qualité du traitement. L'effet de la fréquence d'injection serait aussi un paramètre important à évaluer. Par ailleurs, une comparaison histologique entre les souris traitées à la PDT et celles non traitées devrait être réalisée afin d'établir un score histologique entre ces différents groupes de souris. Aussi, nous avons globalement observé une tendance vers un effet positif de la PDT sur le devenir clinique des souris. Toutefois, la différence entre nos différents groupes (en terme de survie) n'étant pas significative, il serait judicieux dans les expériences à venir d'utiliser un plus grand nombre de souris.

En conclusion, au vu et au su des résultats obtenus, il ressort que l'injection additionnelle de cellules exposées à un traitement photodynamique associé au TH9402 sans enlever de cellules du receveur pourrait avoir une activité anti-GVHD et potentiellement améliorer le devenir clinique des sujets présentant une GVHD chronique.

Références

1. Armitage, J.O. Bone Marrow Transplantation. *N Engl J Med* **330**, 827-838 (1994).
2. Gluckman, E. *et al.* Outcome of Cord-Blood Transplantation from Related and Unrelated Donors. *N Engl J Med* **337**, 373-381 (1997).
3. Bensinger, W.I. *et al.* Transplantation of Bone Marrow as Compared with Peripheral-Blood Cells from HLA-Identical Relatives in Patients with Hematologic Cancers. *N Engl J Med* **344**, 175-181 (2001).
4. Vargas-Diez, E., Garcia-Diez, A., Marin, A. & Fernandez-Herrera, J. Life-threatening graft-vs-host disease. *Clinics in Dermatology* **23**, 285-300 (2005).
5. Vinzio, S., Lioure, B., Grunenberger, F., Schlienger, J.-L. & Goichot, B. Les manifestations d'allure auto-immune apres allogreffe de moelle osseuse. *La Revue de Medecine Interne* **25**, 514-523 (2004).
6. Wara, W.M., Phillips, T.L., Margolis, L.W. & Smith, V. Radiation pneumonitis: a new approach to the derivation of time-dose factors. *Cancer* **32**, 547-552 (1973).
7. Down, J.D. *et al.* Late tissue-specific toxicity of total body irradiation and busulfan in a murine bone marrow transplant model. *International Journal Of Radiation Oncology, Biology, Physics* **17**, 109-116 (1989).
8. Turner, S.L., Tiver, K.W. & Boyages, S.C. Thyroid dysfunction following radiotherapy for head and neck cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* **31**, 279-283 (1995).

9. Gordon,K.B., Char,D.H. & Sagerman,R.H. Late effects of radiation on the eye and ocular adnexa. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* **31**, 1123-1139 (1995).
10. Livesey,S.J., Holmes,J.A. & Whittaker,J.A. Ocular complications of bone marrow transplantation. *Eye (London, England)* **3 (Pt 3)**, 271-276 (1989).
11. Thomas,O. *et al.* Long-term complications of total body irradiation in adults. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* **49**, 125-131 (2001).
12. McDonald,G.B., Sharma,P., Matthews,D.E., Shulman,H.M. & Thomas,E.D. Venocclusive disease of the liver after bone marrow transplantation: diagnosis, incidence, and predisposing factors. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **4**, 116-122.
13. Sviland,L. The pathology of bone marrow transplantation. *Current Diagnostic Pathology* **6**, 242-250 (2000).
14. Appelbaum,F.R. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* **411**, 385-389 (2001).
15. Sullivan,K.M. & Parkman,R. The pathophysiology and treatment of graft-versus-host disease. *Clin. Haematol.* **12**, 775-789 (1983).
16. Appleton,A.L. & Sviland,L. Pathogenesis of GVHD: role of herpes viruses. *Bone Marrow Transplant* **11**, 349-355 (1993).
17. Kaplan,D.H. *et al.* Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype. *J. Immunol.* **173**, 5467-5475 (2004).
18. Korngold,R. Biology of graft-vs.-host disease. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **15**, 18-27 (1993).

19. Krenger,W. & Ferrara,J.L. Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Res.* **15**, 50-73 (1996).
20. Ferrara,J.L. & Deeg,H.J. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* **324**, 667-674 (1991).
21. Decoste,S.D., Boudreaux,C. & Dover,J.S. Transfusion-associated graft-vs-host disease in patients with malignancies. Report of two cases and review of the literature. *Archives Of Dermatology* **126**, 1324-1329 (1990).
22. Funkhouser,A.W. *et al.* Graft Versus Host-Disease After Blood-Transfusions in A Premature-Infant. *Pediatrics* **87**, 247-249 (1991).
23. Jamieson,N.V. *et al.* Graft-Versus-Host Disease in Solid Organ-Transplantation. *Transplant International* **4**, 67-71 (1991).
24. Michallet,M., Dhedin,N. & Michallet,A.S. [Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for hematological malignancies]. *Bull. Cancer* **88**, 908-926 (2001).
25. Billingham,R.E. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lectures* **62**, 21-78 (1966).
26. Korngold,R. & Sprent,J. T-Cell Subsets and Graft-Versus-Host Disease. *Transplantation* **44**, 335-339 (1987).
27. Miura,Y. *et al.* Induction of autologous graft-versus-host disease with cyclosporin A after peripheral blood stem cell transplantation: Analysis of factors affecting induction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106**, S51-S57 (2000).

28. Gluckman,E., Devergie,A., Sohier,J. & Saurat,J.H. Graft-versus-host disease in recipients of syngeneic bone marrow. *Lancet* **1**, 253-254 (1980).
29. Hess,A.D., Jones,R.C. & Santos,G.W. Autologous graft-vs-host disease: mechanisms and potential therapeutic effect. *Bone Marrow Transplantation* **12**, S65-S69 (1993).
30. Latif,T. *et al.* Syngeneic graft-versus-host disease: a report of two cases and literature review. *Bone Marrow Transplantation* **32**, 535-539 (2003).
31. Ferrara,J.L., Cooke,K.R., Pan,L. & Krenger,W. The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells* **14**, 473-489 (1996).
32. Kansu,E. The pathophysiology of chronic graft-versus-host disease. *Int. J Hematol.* **79**, 209-215 (2004).
33. Flowers,M.E., Kansu,E. & Sullivan,K.M. Pathophysiology and treatment of graft-versus-host disease. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **13**, 1091-10ix (1999).
34. Kansu,E. & Sullivan,K.M. Late Effects of Hematopoietic Stem Cell Transplantation; Bone Marrow Transplantation. *Hematol.* **5**, 209-222 (2000).
35. Aractingi,S. & Chosidow,O. Cutaneous graft-versus-host disease. *Arch. Dermatol.* **134**, 602-612 (1998).
36. Sullivan,K.M. *et al.* Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood* **57**, 267-276 (1981).

37. Lawley,T.J., Peck,G.L., Moutsopoulos,H.M., Gratwohl,A.A. & Deisseroth,A.B. Scleroderma, Sjogren-like syndrome, and chronic graft-versus-host disease. *Ann. Intern. Med.* **87**, 707-709 (1977).
38. Hess,A., Thoburn,C., Chen,W. & Horwitz,L. Autoreactive T-Cell subsets in acute and chronic syngeneic graft-versus-host disease. *Transplantation Proceedings* **33**, 1754-1756 (2001).
39. Parkman,R. Chronic graft-versus-host disease. *Curr. Opin. Hematol.* **5**, 22-25 (1998).
40. Zhang,Y., McCormick,L.L., Desai,S.R., Wu,C. & Gilliam,A.C. Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation. *J Immunol* **168**, 3088-3098 (2002).
41. Maury,S. *et al.* Prolonged immune deficiency following allogeneic stem cell transplantation: risk factors and complications in adult patients. *Br. J Haematol.* **115**, 630-641 (2001).
42. Beschorner,W.E., Tutschka,P.J. & Santos,G.W. Chronic graft-versus-host disease in the rat radiation chimera. I. Clinical features, hematology, histology, and immunopathology in long-term chimeras. *Transplantation* **33**, 393-399 (1982).
43. Tutschka,P.J., Teasdall,R., Beschorner,W.E. & Santos,G.W. Chronic graft-versus-host disease in the rat radiation chimera. II. Immunological evaluation in long-term chimeras. *Transplantation* **34**, 289-294 (1982).

44. Atkinson,K., Shulman,H.M., Deeg,H.J. & et,a. Acute and chronic graft-versus-host disease in dogs given hemopoietic grafts from DLA-nonidentical littermates. Two distinct syndromes. *AM. J. PATHOL.* **108**, 196-205 (1982).
45. DeClerck,Y., Draper,V. & Parkman,R. Clonal analysis of murine graft-vs-host disease. II. Leukokines that stimulate fibroblast proliferation and collagen synthesis in graft-vs. host disease. *J. Immunol.* **136**, 3549-3552 (1986).
46. Hamilton,B.L. & Parkman,R. Acute and chronic graft-versus-host disease induced by minor histocompatibility antigens in mice. *Transplantation* **36**, 150-155 (1983).
47. Nonomura,A., Kono,N., Minato,H. & Nakanuma,Y. Diffuse biliary tract involvement mimicking primary sclerosing cholangitis in an experimental model of chronic graft-versus-host disease in mice. *Pathology International* **48**, 421-427 (1998).
48. Slayback,D.L., Dobkins,J.A., Harper,J.M. & Allen,R.D. Genetic factors influencing the development of chronic graft-versus-host disease in a murine model. *Bone Marrow Transplantation* **26**, 931-938 (2000).
49. Kataoka,Y. *et al.* The role of donor T cells for target organ injuries in acute and chronic graft-versus-host disease. *Immunology* **103**, 310-318 (2001).
50. Marmont,A.M. *et al.* T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* **78**, 2120-2130 (1991).
51. Hess,A.D. *et al.* Specificity of effector T lymphocytes in autologous graft-versus-host disease: role of the major histocompatibility complex class II invariant chain peptide. *Blood* **89**, 2203-2209 (1997).

52. Horwitz,M.E. & Sullivan,K.M. Chronic graft-versus-host disease. *Blood Reviews* **In Press, Corrected Proof**.
53. Okamoto,I. *et al.* IL-18 Prevents the Development of Chronic Graft-Versus-Host Disease in Mice. *J Immunol* **164**, 6067-6074 (2000).
54. Reinherz,E.L., Parkman,R., Rapoport,J. & et,a. Aberrations of suppressor T cells in human graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* **300**, 1061-1068 (1979).
55. Aractingi,S. & Chosidow,O. Cutaneous Graft-versus-Host Disease. *Archives Of Dermatology* **134**, 602-612 (1998).
56. Ratanatharathorn,V. *et al.* Anti-CD20 Chimeric Monoclonal Antibody Treatment of Refractory Immune-Mediated Thrombocytopenia in a Patient with Chronic Graft-versus-Host Disease. *Ann Intern Med* **133**, 275-279 (2000).
57. Perreault,C. *et al.* Minor histocompatibility antigens. *Blood* **76**, 1269-1280 (1990).
58. Weinberg,K. *et al.* The effect of thymic function on immunocompetence following bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **1**, 18-23 (1995).
59. Crisi,G.M., Tsiagbe,V.K., Russo,C., Basch,R.S. & Thorbecke,G.J. Evaluation of presence and functional activity of potentially self- reactive T cells in aged mice. *Int. Immunol.* **8**, 387-395 (1996).
60. Kisielow,P., Teh,H.S., Bluthmann,H. & Von Boehmer,H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* **335**, 730-733 (1988).

61. Weinberg,K. *et al.* Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **97**, 1458-1466 (2001).
62. Letterio,J.J. & Roberts,A.B. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol* **16**, 137-161 (1998).
63. Tanaka,J. *et al.* The important balance between cytokines derived from type 1 and type 2 helper T cells in the control of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation* **19**, 571-576 (1997).
64. Siadak,M. & Sullivan,K.M. The management of chronic graft-versus-host disease. *Blood Reviews* **8**, 154-160 (1994).
65. Rouquette-Gally,A.M., Boyeldieu,D., Prost,A.C. & Gluckman,E. Autoimmunity after allogeneic bone marrow transplantation. A study of 53 long-term surviving patients. *Transplantation* **46**, 238-240 (1988).
66. Lee,S.J. New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host disease. *Blood* **105**, 4200-4206 (2005).
67. Quaranta,S. *et al.* Autoantibodies in Human Chronic Graft-versus-Host Disease after Hematopoietic Cell Transplantation. *Clinical Immunology* **91**, 106-116 (1999).
68. Martin,S.J. *et al.* Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* **20**, 45-48 (1997).
69. Siegert,W., Stemerowicz,R. & Hopf,U. Antimitochondrial antibodies in patients with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation* **10**, 221-227 (1992).

70. Holmes,J.A., Livesey,S.J., Bedwell,A.E., Amos,N. & Whittaker,J.A. Autoantibody analysis in chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* **4**, 529-531 (1989).
71. Rouquette-Gally,A.M., Boyeldieu,D., Gluckman,E. & et,a. Autoimmunity in 28 patients after allogeneic bone marrow transplantation: Comparison with Sjogren syndrome and scleroderma. *Br. J. Haematol.* **66**, 45-47 (1987).
72. Dighiero,G., Intrator,L., Cordonnier,C., Tortevoye,P. & Vernant,J.P. High levels of anti-cytoskeleton autoantibodies are frequently associated with chronic GVHD. *Br. J. Haematol.* **67**, 301-305 (1987).
73. Kier,P. *et al.* Autoantibodies in chronic GVHD: High prevalence of antinucleolar antibodies. *Bone Marrow Transplant.* **6**, 93-96 (1990).
74. DeClerck,Y., Draper,V. & Parkman,R. Clonal analysis of murine graft-vs-host disease. II. Leukokines that stimulate fibroblast proliferation and collagen synthesis in graft-vs. host disease. *J Immunol* **136**, 3549-3552 (1986).
75. Parkman,R. Clonal analysis of murine graft-vs-host disease. I. Phenotypic and functional analysis of T lymphocyte clones. *J Immunol* **136**, 3543-3548 (1986).
76. Parkman,R. *et al.* Cellular interactions in graft-v-host disease. *Transplant. Proc.* **19**, 52-54 (1987).
77. Howell,C.D., Yoder,T., Claman,H.N. & Vierling,J.M. Hepatic homing of mononuclear inflammatory cells isolated during murine chronic graft-vs-host disease. *J. Immunol.* **143**, 476-483 (1989).
78. Kasten-Sportes,C., Masset,M., Varrin,F., Devergie,A. & Gluckman,E. Phenotype and function of T lymphocytes infiltrating the skin during graft-versus-host

- disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* **47**, 621-624 (1989).
79. Godder, K. *et al.* De novo chronic graft-versus-host disease presenting as hemolytic anemia following partially mismatched related donor bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.* **19**, 813-817 (1997).
 80. Urdahl, K.B., Pardoll, D.M. & Jenkins, M.K. Self-reactive T cells are present in the peripheral lymphoid tissues of cyclosporin A-treated mice. *Int. Immunol.* **4**, 1341-1349 (1992).
 81. Lee, S.J., Vogelsang, G. & Flowers, M.E. Chronic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **9**, 215-233 (2003).
 82. Bhushan, V. & Collins, R.H., Jr. Chronic Graft-vs-Host Disease. *JAMA* **290**, 2599-2603 (2003).
 83. Gilman, A.L., Schultz, K.R. & Gaziev, D. Treatment of chronic GVHD (multiple letters) [2]. *Bone Marrow Transplantation* **26**, 460-462 (2000).
 84. Goerner, M. *et al.* Morbidity and mortality of chronic GVHD after hematopoietic stem cell transplantation from HLA-identical siblings for patients with aplastic or refractory anemias. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **8**, 47-56 (2002).
 85. Lee, S.J. *et al.* Severity of chronic graft-versus-host disease: Association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* **100**, 406-414 (2002).
 86. Sullivan, K.M. *et al.* Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin. Hematol.* **28**, 250-259 (1991).

87. Niederwieser,D. *et al.* Factors predicting chronic graft-versus-host disease and survival after marrow transplantation for aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant.* **4**, 151-156 (1989).
88. Bostrom,L. *et al.* Pretransplant herpes virus serology and chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* **4**, 547-552 (1989).
89. Miklos,D.B. *et al.* Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood* **105**, 2973-2978 (2005).
90. Zorn,E. *et al.* Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation. *J Exp. Med* **199**, 1133-1142 (2004).
91. Higman,M.A. & Vogelsang,G.B. Chronic graft versus host disease. *Br. J. Haematol.* **125**, 435-454 (2004).
92. Storek,J. *et al.* Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation may be associated with a high risk of chronic graft-versus-host disease. *Blood* **90**, 4705-4709 (1997).
93. Champlin,R.E. *et al.* Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. *Blood* **95**, 3702-3709 (2000).
94. Snowden,J.A. *et al.* Allogeneic PBPC transplantation: an effect on incidence and distribution of chronic graft-versus-host disease without long-term survival benefit? *Bone Marrow Transplantation* **25**, 119-120 (2000).
95. Cutler,C. *et al.* Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: A meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology* **19**, 3685-3691 (2001).

96. Wagner, J.E. *et al.* Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* **100**, 1611-1618 (2002).
97. Zaucha, J.M. *et al.* CD34 cell dose in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cell grafts affects engraftment kinetics and development of extensive chronic graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplantation. *Blood* **98**, 3221-3227 (2001).
98. Stanzani, M. *et al.* CD25 expression on donor CD4+ or CD8+ T cells is associated with an increased risk for graft-versus-host disease after HLA-identical stem cell transplantation in humans. *Blood* **103**, 1140-1146 (2004).
99. Maloney, D.G., Sandmaier, B.M., Mackinnon, S. & Shizuru, J.A. Non-myeloablative transplantation. *Hematology / The Education Program Of The American Society Of Hematology. American Society Of Hematology. Education Program* 392-421 (2002).
100. Arai, S. & Vogelsang, G.B. Management of graft-versus-host disease. *Blood Rev.* **14**, 190-204 (2000).
101. Wingard, J.R. *et al.* Predictors of death from chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Blood* **74**, 1428-1435 (1989).
102. Schubert, M.M. *et al.* Oral Manifestations of Chronic Graft-Upsilon-Host Disease. *Archives of Internal Medicine* **144**, 1591-1595 (1984).
103. Nagler, R. *et al.* Major salivary gland dysfunction in human acute and chronic graft-versus-host disease (GVHD). *Bone Marrow Transplantation* **17**, 219-224 (1996).

104. McDonald,G.B., Sullivan,K.M., Schuffler,M.D. & et,a. Esophageal abnormalities in chronic graft-versus-host disease in humans. *GASTROENTEROLOGY* **80**, 914-921 (1981).
105. McDonald,G.B., Sullivan,K.M. & Plumley,T.F. Radiographic features of esophageal involvement in chronic graft-vs.-host disease. *AM. J. ROENTGENOL.* **142**, 501-506 (1984).
106. Benyunes,M.C. *et al.* Cataracts after bone marrow transplantation: Long-term follow-up of adults treated with fractionated total body irradiation. *International Journal of Radiation Oncology*Biolog*Physics* **32**, 661-670 (1995).
107. Corson,S.L., Sullivan,K., Batzer,F. & et,a. Gynecologic manifestations of chronic graft-versus-host disease. *OBSTET. GYNECOL.* **60**, 488-492 (1982).
108. Seber,A., Khan,S.P. & Kersey,J.H. Unexplained effusions: Association with allogeneic bone marrow transplantation and acute or chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation* **17**, 207-211 (1996).
109. Miralbell,R. *et al.* Renal toxicity after allogeneic bone marrow transplantation: The combined effects of total-body irradiation and graft-versus-host disease. *Journal of Clinical Oncology* **14**, 579-585 (1996).
110. Atkinson,K., Norrie,S., Chan,P. & et,a. Hemopoietic progenitor cell function after HLA-Identical sibling bone marrow transplantation: Influence of chronic graft-versus-host disease. *INT. J. CELL CLONING* **4**, 203-220 (1986).
111. Anasetti,C., Rybka,W., Sullivan,K.M., Banaji,M. & Slichter,S.J. Graft-v-host disease is associated with autoimmune-like thrombocytopenia. *Blood* **73**, 1054-1058 (1989).

112. Godder,K. *et al.* De nova chronic graft-versus-host disease presenting as hemolytic anemia following partially mismatched related donor bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplantation* **19**, 813-817 (1997).
113. Siadak,M.F., Kopecky,K. & Sullivan,K.M. Reduction in transplant-related complications in patients given intravenous immune globulin after allogeneic marrow transplantation. *Clinical and Experimental Immunology, Supplement* **97**, 53-57 (1994).
114. Seidler,C.W., Mills,L.E., Flowers,M.E.D. & Sullivan,K.M. Spontaneous Factor VIII inhibitor occurring in association with chronic graft-versus-host disease. *American Journal of Hematology* **45**, 240-243 (1994).
115. Socie,G. *et al.* Avascular necrosis of bone after allogeneic bone marrow transplantation: Clinical findings, incidence and risk factors. *British Journal of Haematology* **86**, 624-628 (1994).
116. Kurtzberg,J. *et al.* Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* **335**, 157-166 (1996).
117. Cantor,H. The effects of anti-theta antiserum upon graft-versus-host activity of spleen and lymph node cells. *Cell Immunol* **3**, 461-469 (1972).
118. Rodt,H.V., Thierfelder,S. & Eulitz,M. Suppression of acute secondary disease by heterologous anti-brain serum. *Blut* **25**, 385-389 (1972).
119. Vallera,D.A. *et al.* Anti-T-cell reagents for human bone marrow transplantation: ricin linked to three monoclonal antibodies. *Science* **222**, 512-515 (1983).
120. Vallera,D.A. & Blazar,B.R. T cell depletion for graft-versus-host-disease prophylaxis. A perspective on engraftment in mice and humans. *Transplantation* **47**, 751-760 (1989).

121. Truitt,R.L. *et al.* Characterization of alloimmunization-induced T lymphocytes reactive against AKR leukemia in vitro and correlation with graft-vs-leukemia activity in vivo. *J Immunol* **131**, 2050-2058 (1983).
122. Barrett,A.J. Mechanisms of the Graft-versus-Leukemia Reaction. *Stem Cells* **15**, 248-258 (1997).
123. Weisdorf,D. *et al.* Treatment of moderate/severe acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: an analysis of clinical risk features and outcome. *Blood* **75**, 1024-1030 (1990).
124. Shlomchik,W.D. *et al.* Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* **285**, 412-415 (1999).
125. Germain,R.N. Mhc-Dependent Antigen-Processing and Peptide Presentation - Providing Ligands for T-Lymphocyte Activation. *Cell* **76**, 287-299 (1994).
126. Matte,C.C. *et al.* Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nature Medicine* **10**, 987-992 (2004).
127. Loughran,T.P., Jr. *et al.* Value of day 100 screening studies for predicting the development of chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **76**, 228-234 (1990).
128. Meijer,E., Cornelissen,J.J., Lowenberg,B. & Verdonck,L.F. Antithymocytoglobulin as prophylaxis of graft failure and graft-versus-host disease in recipients of partially T-cell-depleted grafts from matched unrelated donors: a dose-finding study. *Exp. Hematol.* **31**, 1026-1030 (2003).
129. Vogelsang,G.B. How I treat chronic graft-versus-host disease. *Blood* **97**, 1196-1201 (2001).

130. Koc,S. *et al.* Therapy for chronic graft-versus-host disease: A randomized trial comparing cyclosporine plus prednisone versus prednisone alone. *Blood* **100**, 48-51 (2002).
131. Sullivan,K.M. *et al.* Alternating-day cyclosporine and prednisone for treatment of high-risk chronic graft-v-host disease. *Blood* **72**, 555-561 (1988).
132. Vogelsang,G.B. *et al.* Thalidomide for the treatment of chronic graft-versus-host disease. *N Engl J Med* **326**, 1055-1058 (1992).
133. Parker,P.M. *et al.* Thalidomide as salvage therapy for chronic graft-versus-host disease. *Blood* **86**, 3604-3609 (1995).
134. Jacobsohn,D.A. & Vogelsang,G.B. Novel pharmacotherapeutic approaches to prevention and treatment of GVHD. *Drugs* **62**, 879-889 (2002).
135. Sullivan,K.M. *et al.* Prednisone and azathioprine compared with prednisone and placebo for treatment of chronic graft-v-host disease: prognostic influence of prolonged thrombocytopenia after allogeneic marrow transplantation. *Blood* **72**, 546-554 (1988).
136. Tzakis,A.G. *et al.* FK 506 rescue in chronic graft-versus-host-disease after bone marrow transplantation. *Transplant. Proc.* **23**, 3225-3227 (1991).
137. Halevy,O., Nagler,A., Levi-Schaffer,F., Genina,O. & Pines,M. Inhibition of collagen type I synthesis by skin fibroblasts of graft versus host disease and scleroderma patients: Effect of halofuginone. *Biochemical Pharmacology* **52**, 1057-1063 (1996).
138. Nagler,A. & Pines,M. Topical treatment of cutaneous chronic graft versus host disease with halofuginone: A novel inhibitor of collagen type I synthesis. *Transplantation* **68**, 1806-1809 (1999).

139. Marcellus,D.C. *et al.* Etreinate therapy for refractory sclerodermatous chronic graft-versus- host disease. *Blood* **93**, 66-70 (1999).
140. Willenbacher,W., Basara,N., Blau,I.W., Fauser,A.A. & Kiehl,M.G. Treatment of steroid refractory acute and chronic graft-versus-host disease with daclizumab. *British Journal of Haematology* **112**, 820-823 (2001).
141. Chiang,K.Y., Abhyankar,S., Bridges,K., Godder,K. & Henslee-Downey,J.P. Recombinant human tumor necrosis factor receptor fusion protein as complementary treatment for chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* **73**, 665-667 (2002).
142. Sniecinski,I. Extracorporeal photochemotherapy: a scientific overview. *Transfus. Sci.* **15**, 429-437 (1994).
143. Greinix,H.T., Volc-Platzer,B. & Knobler,R.M. Extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe graft-versus-host disease. *Leuk. Lymphoma* **36**, 425-434 (2000).
144. Oliven,A. & Shechter,Y. Extracorporeal photopheresis: a review. *Blood Rev.* **15**, 103-108 (2001).
145. Foss,F.M., Gorgun,G. & Miller,K.B. Extracorporeal photopheresis in chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* **29**, 719-725 (2002).
146. Dall'Amico,R. & Messina,C. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of graft-versus-host disease. *Ther. Apher.* **6**, 296-304 (2002).
147. Ullrich,S.E. Photoinactivation of T-cell function with psoralen and UVA radiation suppresses the induction of experimental murine graft-versus-host disease across major histocompatibility barriers. *J Invest Dermatol* **96**, 303-308 (1991).

148. Girardi,M., McNiff,J.M. & Heald,P.W. Extracorporeal photochemotherapy in human and murine graft-versus-host disease. *J Dermatol Sci.* **19**, 106-113 (1999).
149. Child,F.J. *et al.* Extracorporeal photopheresis (ECP) in the treatment of chronic graft-versus-host disease (GVHD). *Bone Marrow Transplant.* **23**, 881-887 (1999).
150. Schooneman,F. & Claise,C. Treatment of graft versus host disease (GVHD) by photopheresis? *Transfus. Sci.* **17**, 527-536 (1996).
151. Nijsten,T.E. & Stern,R.S. Genital squamous cell carcinoma in men treated by photochemotherapy. A cancer registry-based study from 1978 to 1998. *Br. J Dermatol* **147**, 184-185 (2002).
152. Johansson,O. "PUVA-induced skin pain"--speculations from a neuroscientist. *Exp. Dermatol* **3**, 95-96 (1994).
153. Burrows,N.P., Ratnavel,R.C. & Norris,P.G. PUVA-induced skin pain. *Br. J Dermatol* **129**, 504 (1993).
154. Tegner,E. Severe skin pain after PUVA treatment. *Acta Derm. Venereol.* **59**, 467-470 (1979).
155. Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Asano,M., Itoh,M. & Toda,M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**, 1151-1164 (1995).
156. Levings,M.K., Sangregorio,R. & Roncarolo,M.G. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp. Med* **193**, 1295-1302 (2001).

157. Thornton,A.M. & Shevach,E.M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp. Med* **188**, 287-296 (1998).
158. Hara,M. *et al.* IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* **166**, 3789-3796 (2001).
159. Gregori,S. *et al.* Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* **167**, 1945-1953 (2001).
160. Graca,L., Cobbold,S.P. & Waldmann,H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp. Med* **195**, 1641-1646 (2002).
161. Chiffoleau,E. *et al.* Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol* **168**, 5058-5069 (2002).
162. Trenado,A. *et al.* Recipient-type specific CD4CD25 regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *Journal of Clinical Investigation* **112**, 1688-1696 (2003).
163. Jones,S.C., Murphy,G.F. & Komgold,R. Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD4+25+ T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **9**, 243-256 (2003).
164. Cohen,J.L., Trenado,A., Vasey,D., Klatzmann,D. & Salomon,B.L. CD4(+)/CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp. Med* **196**, 401-406 (2002).

165. Dieckmann,D., Bruett,C.H., Ploettner,H., Lutz,M.B. & Schuler,G. Human CD4CD25 regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 1-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine* **196**, 247-253 (2002).
166. Jonuleit,H. *et al.* Identification and functional characterization of human CD4CD25 T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *Journal of Experimental Medicine* **193**, 1285-1294 (2001).
167. Levings,M.K., Sangregorio,R. & Roncarolo,M.G. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *The Journal Of Experimental Medicine* **193**, 1295-1302 (2001).
168. Hori,S., Nomura,T. & Sakaguchi,S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
169. Dougherty,T.J. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin. Laser Med Surg.* **20**, 3-7 (2002).
170. Ackroyd,R., Kelty,C., Brown,N. & Reed,M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **74**, 656-669 (2001).
171. Epstein,J.H. Phototherapy and photochemotherapy. *N Engl J Med* **322**, 1149-1151 (1990).
172. Allison,R.R. *et al.* Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**, 27-42 (2004).
173. Kessel,D. Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**, 3-7 (2004).

174. Fuchs,J. & Thiele,J. The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med* **24**, 835-847 (1998).
175. Ochsner,M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem. Photobiol. B* **39**, 1-18 (1997).
176. LIPSON,R.L., BALDES,E.J. & OLSEN,A.M. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *Journal Of The National Cancer Institute* **26**, 1-11 (1961).
177. Brown,S.A. Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **19**, 1-14 (1996).
178. Sharman,W.M., Allen,C.M. & van Lier,J.E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov. Today* **4**, 507-517 (1999).
179. Mohr,H., Lambrecht,B. & Selz,A. Photodynamic virus inactivation of blood components. *Immunological Investigations* **24**, 73-85 (1995).
180. Mohr,H., Lambrecht,B. & Schmitt,H. Photo-inactivation of viruses in therapeutical plasma. *Developments In Biological Standardization* **81**, 177-183 (1993).
181. Wagner,S.J. *et al.* Differential sensitivities of viruses in red cell suspensions to methylene blue photosensitization. *Transfusion* **34**, 521-526 (1994).
182. Stables,G.I. & Ash,D.V. Photodynamic therapy. *Cancer Treatment Reviews* **21**, 311-323 (1995).
183. Levy,J.G. Photosensitizers in photodynamic therapy. *Semin. Oncol* **21**, 4-10 (1994).

184. Diwu,Z. & William Lown,J. Phototherapeutic potential of alternative photosensitizers to porphyrins. *Pharmacology & Therapeutics* **63**, 1-35 (1994).
185. Villeneuve,L. Ex vivo photodynamic purging in chronic myelogenous leukaemia and other neoplasias with rhodamine derivatives. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30** (Pt 1), 1-17 (1999).
186. Pal,P. *et al.* Phototoxicity of some bromine-substituted rhodamine dyes: synthesis, photophysical properties and application as photosensitizers. *Photochem. Photobiol.* **63**, 161-168 (1996).
187. Detty,M.R., Gibson,S.L. & Wagner,S.J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Journal Of Medicinal Chemistry* **47**, 3897-3915 (2004).
188. Agarwal,M.L. *et al.* Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *CANCER RES.* **51**, 5993-5996 (1991).
189. Plaetzer,K., Kiesslich,T., Krammer,B. & Hammerl,P. Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to ALPcS4-PDT. *Photochemical and Photobiological Sciences* **1**, 172-177 (2002).
190. Nagata,S., Obana,A., Gohto,Y. & Nakajima,S. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na). *Lasers In Surgery And Medicine* **33**, 64-70 (2003).
191. Dahle,J., Kaalhus,O., Moan,J. & Steen,H.B. Cooperative effects of photodynamic treatment of cells in microcolonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 1773-1778 (1997).

192. Oleinick,N.L. & Evans,H.H. The photobiology of photodynamic therapy: Cellular targets and mechanisms. *Radiation Research* **150**, S146-S156 (1998).
193. Roy,D.C. *et al.* Elimination of chronic myeloid leukemia (CML) cells with a novel photodynamic treatment. *Blood* **94**, 144A (1999).
194. Guimond,M. *et al.* P-glycoprotein targeting: a unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood* **100**, 375-382 (2002).
195. Pilarski,L.M., Paine,D., McElhaney,J.E., Cass,C.E. & Belch,A.R. Multidrug transporter P-glycoprotein 170 as a differentiation antigen on normal human lymphocytes and thymocytes: modulation with differentiation stage and during aging. *Am. J Hematol.* **49**, 323-335 (1995).
196. Roy,D.C. *et al.* Phase I study of autologous progenitor cell transplantation (PCT) purged with a photodynamic approach for patients with chronic myeloid leukemia (CML). *Blood* **96**, 583A-+ (2000).
197. Boumedine,R.S., KrosI,G., Vaillancourt,M., Perreault,C. & Roy,D.C. Elimination of alloreactive T lymphocytes using photodynamic therapy prevents the development of GVHD and promotes B and T cell reconstitution after MHC-mismatched transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **11**, 57-58 (2005).
198. Chen,B.J., Cui,X., Liu,C. & Chao,N.J. Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process. *Blood* **99**, 3083-3088 (2002).
199. Boumedine,R.S. & Roy,D.C. Elimination of alloreactive T cells using photodynamic therapy. *Cytotherapy* **7**, 134-143 (2005).

200. Boumedine,R.S., KrosI,G., Vaillancourt,M., Perreault,C. & Roy,D.C. Specific elimination of alloreactive T lymphocytes using photodynamic therapy prevents GVHD and enables rapid immune reconstitution. *Blood* **104**, 328B (2004).
201. Pannetier,C. *et al.* The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 4319-4323 (1993).
202. KrosI,G., Dube,P., Dallaire,N., Vaillancourt,M. & Roy,D.C. Preferential Induction of B Cell Apoptosis Using Photodynamic Therapy. *ASH Annual Meeting Abstracts* **104**, 4643 (2004).
203. Cochet,M. *et al.* Molecular detection and in vivo analysis of the specific T cell response to a protein antigen. *Eur. J Immunol* **22**, 2639-2647 (1992).
204. Chen,W. & Howell,C.D. Oligoclonal expansion of T cell receptor V beta 2 and 3 cells in the livers of mice with graft-versus-host disease. *Hepatology* **35**, 23-29 (2002).
205. Korngold,R. & Sprent,J. Variable capacity of L3T4+ T cells to cause lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers in mice. *J Exp. Med* **165**, 1552-1564 (1987).
206. Lindahl,K.F. Minor histocompatibility antigens. *Trends Genet.* **7**, 219-224 (1991).
207. Brochu,S., Baron,C., Hetu,F., Roy,D.C. & Perreault,C. Oligoclonal expansion of CTLs directed against a restricted number of dominant minor histocompatibility antigens in hemopoietic chimeras. *J Immunol* **155**, 5104-5114 (1995).
208. Atkinson,K. *et al.* Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 2459-2464 (1990).

209. Lum,L.G. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* **69**, 369-380 (1987).
210. Jaffee,B.D. & Claman,H.N. Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma : I. Description of model systems. *Cellular Immunology* **77**, 1-12 (1983).
211. Sasaki,M. *et al.* Antagonist of secondary lymphoid-tissue chemokine (CCR ligand 21) prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice. *J Immunol.* **170**, 588-596 (2003).
212. Anderson,B.E. *et al.* Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J Clin Invest* **112**, 101-108 (2003).
213. Li,J., Helm,K. & Howell,C.D. Contributions of donor CD4 and CD8 cells to liver injury during murine graft-versus-host disease. *Transplantation* **62**, 1621-1628 (1996).
214. McCormick,L.L., Zhang,Y., Tootell,E. & Gilliam,A.C. Anti-TGF- β Treatment Prevents Skin and Lung Fibrosis in Murine Sclerodermatous Graft-Versus-Host Disease: A Model for Human Scleroderma. *J Immunol* **163**, 5693-5699 (1999).
215. Claman,H.N., Jaffee,B.D., Huff,J.C. & Clark,R.A. Chronic graft-versus-host disease as a model for scleroderma. II. Mast cell depletion with deposition of immunoglobulins in the skin and fibrosis. *Cell Immunol.* **94**, 73-84 (1985).
216. Anderson,B.E. *et al.* Recipient CD4+ T cells that survive irradiation regulate chronic graft-versus-host disease. *Blood* **104**, 1565-1573 (2004).

217. Levy,S., Nagler,A., Okon,S. & Marmary,Y. Parotid salivary gland dysfunction in chronic graft-versus-host disease (cGVHD): a longitudinal study in a mouse model. *Bone Marrow Transplant.* **25**, 1073-1078 (2000).
218. Maraninchi,D. *et al.* IMPACT OF T-CELL DEPLETION ON OUTCOME OF ALLOGENEIC BONE-MARROW TRANSPLANTATION FOR STANDARD-RISK LEUKAEMIAS. *The Lancet* **330**, 175-178 (1987).
219. Holmes,J.A., Livesey,S.J., Bedwell,A.E., Amos,N. & Whittaker,J.A. Autoantibody analysis in chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* **4**, 529-531 (1989).
220. Chen,F., Maldonado,M.A., Madaio,M. & Eisenberg,R.A. The role of host (endogenous) T cells in chronic graft-versus-host autoimmune disease. *J Immunol* **161**, 5880-5885 (1998).
221. Shlomchik,M. *et al.* Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arise by clonal expansion and somatic mutation. *J Exp. Med* **171**, 265-292 (1990).
222. Ludescher,C., Pall,G., Irschick,E.U. & Gastl,G. Differential activity of P-glycoprotein in normal blood lymphocyte subsets. *Br. J Haematol.* **101**, 722-727 (1998).
223. Leprat,P., Ratinaud,M.H., Maftah,A., Petit,J.M. & Julien,R. Use of nonyl acridine orange and rhodamine 123 to follow biosynthesis and functional assembly of mitochondrial membrane during L1210 cell cycle. *Exp. Cell Res.* **186**, 130-137 (1990).
224. Davis,S., Weiss,M.J., Wong,J.R., Lampidis,T.J. & Chen,L.B. Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of

- rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *J Biol. Chem.* **260**, 13844-13850 (1985).
225. Kessel,D. & Luo,Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J Photochem. Photobiol. B* **42**, 89-95 (1998).
226. Kessel,D., Luo,Y., Deng,Y. & Chang,C.K. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **65**, 422-426 (1997).
227. Rieger,K. *et al.* Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* (2005).
228. Hori,S. & Sakaguchi,S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes. Infect.* **6**, 745-751 (2004).
229. Bach,J.F. [Immunoregulation and autoimmunity]. *J Soc. Biol.* **196**, 255-258 (2002).
230. Bach,J.F. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat. Rev. Immunol* **3**, 189-198 (2003).
231. Klimecki,W.T., Futscher,B.W., Grogan,T.M. & Dalton,W.S. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* **83**, 2451-2458 (1994).
232. Daziano,J.P. *et al.* Preferential photoinactivation of leukemia cells by aluminum phthalocyanine. *J Photochem. Photobiol. B* **43**, 128-135 (1998).
233. Ahmad,N., Gupta,S., Feyes,D.K. & Mukhtar,H. Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Invest Dermatol* **115**, 1041-1046 (2000).

234. Singer,C.R., Linch,D.C., Bown,S.G., Huehns,E.R. & Goldstone,A.H. Differential phthalocyanine photosensitization of acute myeloblastic leukaemia progenitor cells: a potential purging technique for autologous bone marrow transplantation. *Br. J Haematol.* **68**, 417-422 (1988).
235. Cutler,C. *et al.* Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood* **108**, 756-762 (2006).
236. Lapointe,R., Bellemare-Pelletier,A., Housseau,F., Thibodeau,J. & Hwu,P. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *CANCER RES.* **63**, 2836-2843 (2003).
237. Villard,J. Immunity after organ transplantation. *Swiss. Med. Wkly.* **136**, 71-77 (2006).
238. Egashira,M., Kawamata,N., Sugimoto,K., Kaneko,T. & Oshimi,K. P-Glycoprotein Expression on Normal and Abnormally Expanded Natural Killer Cells and Inhibition of P-Glycoprotein Function by Cyclosporin A and Its Analogue, PSC833. *Blood* **93**, 599-606 (1999).
239. Ruggeri,L. *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **295**, 2097-2100 (2002).
240. Patriarca,F. *et al.* The development of autoantibodies after allogeneic stem cell transplantation is related with chronic graft-vs-host disease and immune recovery. *Experimental Hematology* **34**, 389-396 (2006).
241. WECHALEKAR,A., CRANFIELD,T., SINCLAIR,D. & GANZCKOWSKI,M. Occurrence of autoantibodies in chronic graft vs. host disease after allogeneic

- stem cell transplantation. *Clinical and Laboratory Haematology* **27**, 247-249 (2005).
242. Rolink,A.G., Pals,S.T. & Gleichmann,E. Allosuppressor and allohelper T cells in acute and chronic graft-vs.-host disease. II. F1 recipients carrying mutations at H-2K and/or I-A. *J Exp. Med* **157**, 755-771 (1983).
243. Morris,S.C., Cheek,R.L., Cohen,P.L. & Eisenberg,R.A. Autoantibodies in chronic graft versus host result from cognate T-B interactions. *The Journal Of Experimental Medicine* **171**, 503-517 (1990).
244. Yu,X., Carpenter,P. & Anasetti,C. Advances in transplantation tolerance. *Lancet* **357**, 1959-1963 (2001).
245. Miracco,C. *et al.* 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).
246. Yoo,E.K., Rook,A.H., Elenitsas,R., Gasparro,F.P. & Vowels,B.R. 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).
247. Vermes,I., Haanen,C., Steffens-Nakken,H. & Reutelingsperger,C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**, 39-51 (1995).
248. Martin,S.J. *et al.* Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp. Med* **182**, 1545-1556 (1995).

249. Koopman,G. *et al.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**, 1415-1420 (1994).
250. Homburg,C.H. *et al.* Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* **85**, 532-540 (1995).
251. Castano,A.P., Demidova,T.N. & Hamblin,M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one--photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**, 279-293 (2004).
252. Lider,O., Beraud,E., Reshef,T., Friedman,A. & Cohen,I.R. Vaccination against experimental autoimmune encephalomyelitis using a subencephalitogenic dose of autoimmune effector T cells. (2). Induction of a protective anti-idiotypic response. *J Autoimmun.* **2**, 87-99 (1989).
253. Sun,D., Qin,Y., Chluba,J., Epplen,J.T. & Wekerle,H. Suppression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T cell interactions. *Nature* **332**, 843-845 (1988).
254. Cohen,I.R. Regulation of autoimmune disease: Physiological and therapeutic. *Immunol. Rev.* **No. 94**, 5-21 (1986).
255. Cohen,I.R. T-cell vaccination for autoimmune disease: a panorama. *Vaccine* **20**, 706-710 (2001).
256. Heshmati,F. Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy. *Transfus. Apher. Sci* **29**, 61-70 (2003).

257. Girardi,M., Herreid,P. & Tigelaar,R.E. Specific suppression of lupus-like graft-versus-host disease using extracorporeal photochemical attenuation of effector lymphocytes. *J Invest Dermatol* **104**, 177-182 (1995).
258. Berger,C.L. *et al.* Induction of human tumor-loaded dendritic cells. *Int. J Cancer* **91**, 438-447 (2001).
259. Ben Nun,A., Wekerle,H. & Cohen,I.R. Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature* **292**, 60-61 (1981).
260. Beraud,E., Lider,O., Baharav,E., Reshef,T. & Cohen,I.R. Vaccination against experimental autoimmune encephalomyelitis using a subencephalitogenic dose of autoimmune effector cells (1). Characteristics of vaccination. *J Autoimmun.* **2**, 75-86 (1989).
261. Lider,O., Shinitzky,M. & Cohen,I.R. Vaccination against experimental autoimmune diseases using T lymphocytes treated with hydrostatic pressure. *Ann N Y. Acad Sci* **475**, 267-273 (1986).
262. Borghans,J.A., De Boer,R.J., Sercarz,E. & Kumar,V. T cell vaccination in experimental autoimmune encephalomyelitis: a mathematical model. *J Immunol* **161**, 1087-1093 (1998).
263. Apostolou,I., Sarukhan,A., Klein,L. & Von Boehmer,H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat. Immunol* **3**, 756-763 (2002).
264. Green,E.A., Choi,Y. & Flavell,R.A. Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity.* **16**, 183-191 (2002).

265. Shevach,E.M., McHugh,R.S., Piccirillo,C.A. & Thornton,A.M. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunological Reviews* **182**, 58-67 (2001).
266. Cederbom,L., Hall,H. & Ivars,F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J Immunol* **30**, 1538-1543 (2000).
267. Margolis,D.A. *et al.* Infiltrating T cells during liver graft-versus-host disease show a restricted T-cell repertoire. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **6**, 408-415 (2000).

