

Université de Montréal

Évaluation de l'activité anti-leucémique des cellules T traitées
par photodéplétion au TH9402

par
Élise Cournoyer

Département de Sciences Biomédicales
Université de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en Sciences Biomédicales options générale

Août 2016

© Élise Cournoyer, 2016

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :
Évaluation de l'activité anti-leucémique des cellules T traitées par photodéplétion au
TH9402

Présenté par :
Élise Cournoyer

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Directeur de recherche :
Denis Claude Roy

Président Rapporteur :
Hugo Wurtele

Membre du Jury :
Michel Duval

Résumé

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) représente la seule avenue thérapeutique curative pour les leucémies résistantes au traitement de chimiothérapie. Ce traitement consiste à implanter chez un patient immunosupprimé des CSH provenant d'un donneur compatible au niveau des antigènes majeurs du HLA. Cependant, il n'est pas toujours possible de trouver un donneur qui sera compatible au niveau du groupe HLA. Depuis environ une dizaine d'années, une nouvelle forme d'allogreffe a commencé à être développée. Il s'agit d'une greffe partiellement incompatible appelée la greffe haploidentique de cellules souches. Cette greffe permet une disparité entre le patient et le donneur pouvant atteindre 50% des antigènes HLA. La greffe haploidentique permet ainsi au patient de pouvoir bénéficier d'une greffe de cellules souches. L'avantage potentiel d'utiliser des cellules d'un donneur qui n'est pas entièrement compatible est l'augmentation de la réactivité du greffon contre les cellules leucémiques résiduelles au conditionnement (GVL). Ce sont les cellules alloréactives qui remplissent ce rôle. Cependant, avec la disparité partielle des molécules de HLA, les cellules alloréactives peuvent également être la cause du développement de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD), l'une des causes majeures de décès suivant l'allogreffe. Dans notre laboratoire, nous avons développé une technique de photodéplétion (PD) des cellules T basée sur l'utilisation d'un photosensibilisateur activé par la lumière visible. Il s'agit du 4,5-dibromorhodamine-123 (TH9402), une molécule photosensible qui va sélectivement éliminer les cellules alloréactives, donc les cellules responsables de la GVHD. L'échantillon traité se retrouve enrichi en cellules T naïves et en cellules T régulatrices (Treg). Des travaux antérieurs réalisés par notre laboratoire ont montré que des cellules T CD4+ régulatrices étaient préservées dans le greffon de lymphocytes T traités à la PD, participant ainsi au contrôle de la sévérité de la GVHD du patient. Des résultats préliminaires ont permis de démontrer que les cellules T post-PD conservent leurs capacités fonctionnelles lorsqu'elles sont stimulées par une librairie de peptides viraux (Epstein-Barr, cytomegalovirus et influenza). C'est pourquoi, nous nous sommes

intéressés dans un second temps à la réactivité anti leucémique de ces cellules. Nous avons donc étudié d'une part la capacité des cellules T à s'activer post PD et d'autre part, leur capacité à éliminer une lignée leucémique monocyttaire (THP-1). Nous avons déterminé que des cellules T allogéniques résiduelles au traitement de photodéplétion pouvaient s'activer face aux antigènes d'un donneur sélectionné. Nous avons par la suite démontré que ces mêmes cellules avait le potentiel de reconnaître des peptides de l'antigène leucémique WT1 et de développer une réponse cytotoxique. Ces travaux ont permis de démontrer le potentiel de plasticité anti-GVHD/GVL de la photodéplétion au TH9402 des cellules T.

Mots Clés : Leucémie, greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allogreffe), maladie du greffon contre l'hôte (GVHD), greffon contre la leucémie (GVL), lymphocytes T CD4+, lymphocytes T CD8+, WT1.

Abstract

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) represents the only efficient therapeutic avenue in a number of patients with chemotherapy resistant or relapsed leukemia. This treatment aims at enabling the engraftment of donor stem cells into an immunocompromised patient. However, it isn't always possible to find a fully HLA compatible donor. Over the last decade, a new form of allograft has been developed for those remaining patients: haploidentical stem cell transplantation. This treatment enables transplantation to be performed with donor cells that demonstrate up to 50% HLA mismatch with those of the patient. Thus, this approach enables patients without a suitably matched donor to benefit from an HSCT. The potential advantage of using mismatched cells is the increase of the graft-versus-leukemia effect (GVL). The latter is induced by alloreactive cells. Nonetheless, the disparity of HLA can also drive alloreactive cells to cause graft-versus-host disease, which is one of the major causes of death following allogeneic HSCT. In our laboratory, we have developed a T cell photodepletion (PD) approach based on the use of a photosensitizer activated with visible light. It consists of 4,5-dibromorhodamine-123 (TH9402), a photosensitive molecule that selectively eliminates alloreactive (GVHD causing) cells. Following treatment, the sample is enriched in naive and regulatory T cells (Treg). We previously demonstrated that PD preserves CD4⁺ T cells displaying a regulatory effect, thus potentially controlling the severity of GVHD. On the other hand, preliminary results showed that PD can preserve cells with the functional capacity to react against a viral peptide pool (Epstein-Barr, cytomegalovirus, and influenza). This prompted us to assess the anti-leukemia reactivity of these cells. Therefore, we first studied the ability of these cells to become activated après PD. We also tested the capacity of those restimulated cells to eliminate a monocytic leukemia cell line (THP-1). We determined that it is possible to generate after PD cells that have the capacity to become activated when cocultured with antigens from a given donor. In addition, we demonstrated that these cells have the potential to recognize WT1 antigen

peptides and to develop a cytotoxic response. Thus, this work demonstrated the anti-GVHD/GVL plasticity of T cells photodepleted using TH9402.

Key words: Leukemia, allogeneic stem cell transplantation (alloSCT), graft-versus-host disease (GVHD), graft versus leukemia (GVL), CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, WT1.

Table des matières

Table des matières	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations	xiii
Remerciements.....	xvii
Introduction.....	1
La leucémie, cancer du système hématopoïétique	2
La Leucémie au Canada : quelques chiffres.....	2
Comprendre la leucémie, c'est d'abord connaître l'hématopoïèse.....	3
Cibles immunologiques de la leucémie aigue.....	6
Approches pour cibler les cellules leucémiques résiduelles causant la rechute	8
La greffe de cellules souches : un des seuls traitements curatifs actuel des leucémies aigues récidivantes.....	12
Les complications post greffe.....	14
Implication des lymphocytes dans l'effet GVH/GVL.....	22
Prévention et traitement de la aGVHD.....	26
Immunosuppresseurs et inhibiteurs de la signalisation cellulaire	26
Déplétion partielle ou totale des lymphocytes	26
Photosensibilisateurs.....	28
Hypothèse et objectifs du projet.....	32
Contribution des auteurs à l'article.....	33
Présentation de l'article	34
Introduction	35
Materials & Methods.....	37
Results	41

Discussion	46
References.....	51
Figure legends	55
Discussion.....	70
Références bibliographiques	77

Liste des tableaux

Tableau I : Surexpression de WT1 dans les leucémies aiguës

Liste des figures

Mémoire :

Figure 1 : Projection du nombre de cas annuel de leucémie de 2003-2032

Figure 2 : L'hématopoïèse

Figure 3 : Mutations associées au développement de différents sous-types de LMA

Figure 4 : Développement de la aGVHD

Figure 5 : Différentiation lymphocytaire durant la phase amorçage

Figure 6 : Paradoxe entre GVHD et GVL

Article :

Figure 1: PD cells have the capacity to respond to same antigen stimulus

Figure 2: Restimulated PD CD4+ lymphocytes display activated phenotype

Figure 3: Restimulated PD CD8+ lymphocytes display activated phenotype

Figure 4: Prolonged stimulus leads to exhaustion of restimulated PD cells

Figure 5: Restimulated PD cells respond to leukemic peptide WT1

Figure 6: Restimulated PD cells have the potential to develop a specific response toward WT1

Liste des abréviations

8-MOP	8-methoxypsoralen
ADCC	Cytotoxicité anticorps dépendante à médiation cellulaire, «antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity»
ADN	Acide désoxyribonucléique
APC	cellule présentatrice d'antigène, «antigen-presenting cell»
ATG	Globuline anti-thymocyte, «anti-thymocyte globulin»
CAR	Récepteur antigénique chimérique, «chimeric antigen receptor»
CD	Cluster de différenciation, «cluster of differentiation»
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CTL	Lymphocyte T cytotoxique, «cytotoxic T cell»
Cy	Cyclophosphamide
DAMP	Motif moléculaire associé aux dégâts, «danger associated-molecular patterns»
DC	Cellule dendritique, «dendritic cell»
DLI	Perfusion de lymphocytes du donneur, «donor lymphocyte infusion»
FOXP3	«Forkhead box P3»
G-CSF	Facteur de stimulation des colonies granulocytaires, “Granulocyte colony-stimulating factor”
GVHD	Maladie du greffon contre l'hôte, « Graft versus host disease »
GVL	Greffon contre la leucémie, «graft-versus-leukemia»
HLA	antigène leucocytaire humain, «human leukocyte antigen»
IDO	Indoléamine 2,3-dioxygénase, «indoleamine 2,3-dioxygenase»
IFN-α	Interferon alpha

IFN-β	Interferon bêta
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukine
IL-2Rβ	Récepteur bêta de l'interleukine 2
KGF	Facteur de croissance des kératinocytes, «keratinocyte growth factor»
LMA	Leucémie myéloïde aigue
LAA	Antigène leucémique associé, «leukemic associated antigen»
LAL	Leucémie aigue lymphoblastique
LMC	Leucémie myéloïde chronique
LLC	Leucémie lymphoïde chronique
LPS	lipopolysaccharide
LSA	Antigène leucémique spécifique, «leukemic specific antigen»
LSC	Cellule souche leucémique
MiHa	Antigène mineur d'histocompatibilité, «minor histocompatibility antigen»
MLR	Réaction lymphocytaire mixte, «mixed lymphocyte reaction»
MMF	Mycophenolate mofetil
Mo-DC	Cellule dendritique dérivée de monocyte, «monocyte-derived dendritic cell»
MSC	Cellule souche mésenchymale, «mesenchymal stem cell»
NK	Cellule tueuse naturelle, «natural killer cell»
PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes, «pathogen associated molecular patterns»
PBMC	Cellule mononucléaire du sang périphérique

PD	Photodéplétion
PML	Protéine promyélocitique leucémique, «promyelocytic leukemia protein»
RARA	Récepteur alpha rétinoïque, «retinoic receptor alpha»
SNP	polymorphisme nucléotidique simple, «single nucleotide polymorphism»
STAT	Transducteur du signal et activateur de la transcription, «signal transducer and activator of transcription»
TEC	Cellule thymique épithéliale, «thymic epithelial cell»
TCR	Récepteur du lymphocyte T, «T cell receptor»
TGF-β	Facteur de transformation de croissance bêta, «transforming growth factor beta»
TGI	tractus gastro-intestinal
Th	Lymphocyte T auxiliaire, «helper T cell»
TH9402	4,5-dibromorhodamine methyl ester
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale alpha, «tumor necrosis factor»
Treg	Lymphocyte T régulateur, «regulatory T cell»
UV	Ultraviolet
WT1	«Wilms' tumor protein 1»

*« Rien n'est jamais fini, il suffit d'un peu de bonheur pour que tout
recommence »*

Émile Zola

Remerciements

En premier lieu, je souhaiterais remercier mon directeur de recherche, le Dr Denis- Claude Roy qui m'a accepté au sein de son laboratoire. Ayant auparavant effectué un stage d'été au baccalauréat, j'appréciais grandement la qualité de la recherche qui s'y faisait. La thérapie cellulaire est un sujet passionnant et en plein développement. De ce fait, je désirais ardemment contribuer à l'essor de ce domaine très prometteur. Voyant l'intérêt que je démontrais pour ses projets de recherches, le Dr Roy m'a encouragé à poursuivre des études graduées dans son laboratoire. J'aimerais remercier la confiance dont il m'a fait preuve en me confiant un nouveau projet. Il m'a toujours poussé à me dépasser, mais m'a également laissé la liberté de m'épanouir dans mon projet. Sous sa tutelle, j'ai énormément appris en plus de développer mes compétences dans tous les aspects de la recherche. Le Dr Roy m'a toujours appuyé dans mon parcours académique, tant dans le développement de mon projet de maîtrise que dans le cheminement de mon parcours académique. Je l'en remercie infiniment.

Je désire remercier le Dr Vibhuti Dave, mon superviseur, avec qui j'ai eu de nombreuses discussions qui m'ont permis d'améliorer mes connaissances, ma capacité de synthèse et mon esprit critique. Son vaste savoir en recherche m'a permis d'optimiser bon nombre de mes expériences. Son aide et support m'ont été cruciaux dans la réalisation de ce nouveau projet.

Je dois également remercier la Dre Stéphanie Thiant qui a également participé à l'élaboration de certaines expériences, surtout au début du projet. Son aide ainsi que son esprit critique m'ont également permis de commencer sur des bases solides. J'aimerais également remercier tous les autres membres du laboratoire pour leurs idées, leur soutien moral et leur enthousiasme. La bonne humeur et l'ambiance dans le laboratoire ont certainement été des facteurs positifs dans la réalisation de mon projet. J'aimerais remercier plus particulièrement Radia Sidi-Boumédine, Jessica Trottier ainsi que mon superviseur de stage, le Dr Jean-Philippe Bastien.

De plus, je tiens à remercier tous les étudiants et le personnel du Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (CRHMR). Notamment, je voudrais remercier les membres du laboratoire du Dr Delisle, le personnel du centre de thérapie cellulaire ainsi que Martine Dupuis à la cytométrie qui m'a aidé avec des marquages cellulaires pas toujours évidents.

J'aimerais remercier spécialement tous les donneurs sains ayant bien voulu faire don de leur sang. Sans vous, il n'y aurait pas eu de projet !

Finalement, je remercie mes amis, mais surtout mes parents pour l'appui inconditionnel dont ils ont fait preuve, non seulement tout au long de ma maîtrise, mais également depuis le début de mon parcours académique.

Un gros merci à vous tous !

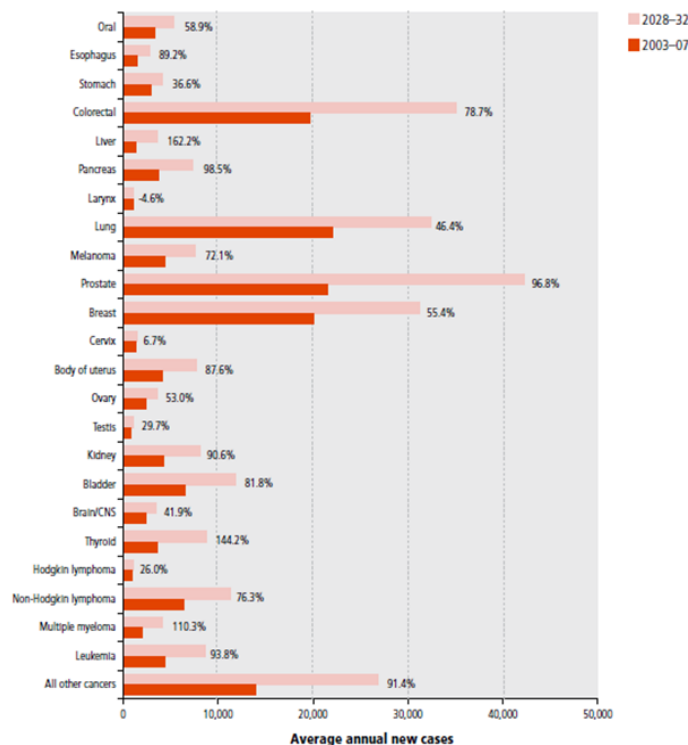
Introduction

La leucémie, cancer du système hématopoïétique

La Leucémie au Canada : quelques chiffres

Au Canada, la leucémie représente 6,3% de tous les nouveaux cas de cancer diagnostiqués chaque année ¹. Les hommes sont légèrement plus touchés que les femmes (3,5% vs 2,8%). En 2015, il y a eu 6200 nouveaux cas de cette maladie à travers le pays¹. La leucémie a des caractéristiques très variées d'un individu à l'autre et elle se manifeste différemment selon l'âge de la personne atteinte^{2,3}. Ainsi, la leucémie aigüe représente près du tiers des cas de nouveaux cancers chez les enfants de 0-14 ans et environ 6% des cas pour les personnes de 15-29 ans¹. Alors, l'incidence diminue significativement à l'âge adulte. Cependant l'incidence augmente avec l'âge et plus une personne vieillit, plus elle a de risques de développer une leucémie, tant aigüe que chronique. Il a été estimé que d'ici 2032, il y aura une augmentation de 94% des cas annuellement (Figure 1)¹. Cela représente une hausse plus importante que pour de nombreux cancers tels les cancer du sein (55,4%), des poumons (46,4%) ou du colon (78,7%).

Figure 1 : Projection du nombre de cas annuel des différents cancers de 2003-2032

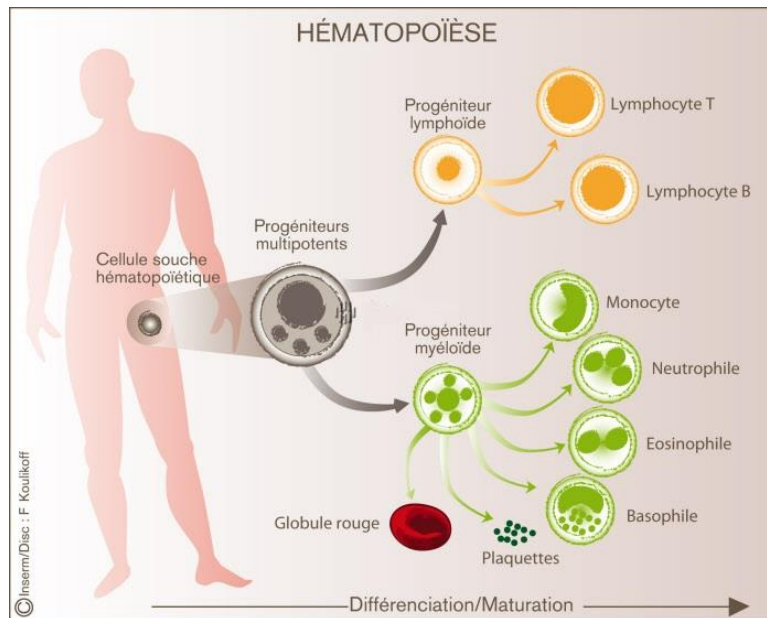


Comprendre la leucémie, c'est d'abord connaître l'hématopoïèse

L'hématopoïèse, processus général

L'hématopoïèse représente le processus de développement des cellules souches de la moelle osseuse en cellules sanguines compétentes⁴. Selon le stimulus rencontré, les cellules souches multipotentes vont se différencier soit en progéniteurs myéloïdes (donnant naissance entre autres aux macrophages, érythrocytes et plaquettes), soit en progéniteurs lymphoïdes (donnant naissance aux cellules NK et lymphocytes B et T)⁴⁻⁶. La différenciation myéloïde se fait de concert avec certains facteurs tels GM-CSF⁴, thrombopoïétine (TPO) pour les plaquettes et érythropoïétine (EPO)⁷ pour les érythrocytes. La différenciation lymphoïde se fait par le biais de facteurs comme l'IL-2, l'IL-12 et le TNF- α ^{4,6}. Les cellules souches de la moelle osseuse se divisent de manière asymétrique, assurant ainsi à la fois l'auto-renouvellement de celles-ci ainsi que leur différenciation en cellules sanguines compétentes (Figure 2)⁸.

Figure 2 : L'hématopoïèse



La leucémie, une maladie complexe et hétérogène : Classification des sous-types

La leucémie est un cancer caractérisé par une prolifération incontrôlée de cellules à caractère souche : les blastes. Les causes précises restent inconnues et cette maladie semble résulter d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux entraînant une accumulation de mutations ponctuelles au niveau des cellules souches multipotentes^{9,10}.

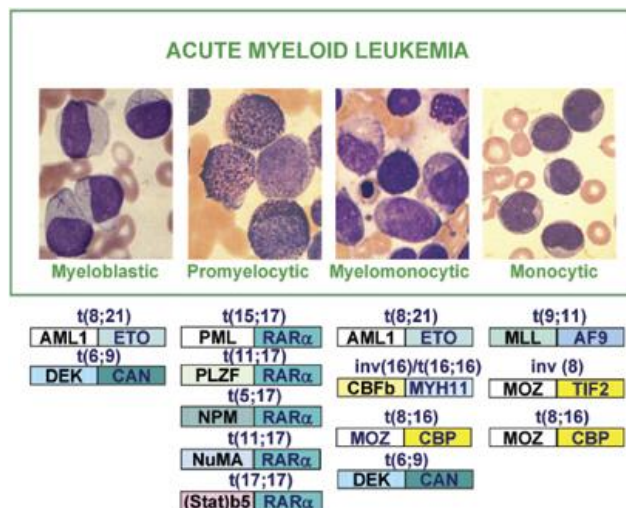
On classifie les sous types de leucémie selon deux critères : la vitesse à laquelle elle se développe (aiguë ou chronique) et l'origine des blastes¹¹. La leucémie aiguë se développe en quelques semaines. Les blastes générés sont immatures et prolifèrent très rapidement. En ce qui concerne la leucémie chronique, celle-ci prend des années à se développer¹². Les blastes différenciés sont des cellules pouvant être partiellement ou non fonctionnelles, dépendamment du nombre et de la spécificité des mutations accumulées au cours des années. Le second critère de classification est l'origine cellulaire des blastes. En effet, les mutations peuvent affecter les lignées leucocytaires myéloïdes ou lymphoïdes entraînant dans un premier temps une accumulation des blastes dans la moelle osseuse pour ensuite circuler dans le sang périphérique¹². L'accumulation de blastes entraîne un dysfonctionnement graduel du système hématopoïétique. La vitesse de développement ainsi que l'origine cellulaire des blastes permettent de distinguer quatre grandes catégories de leucémies: la leucémie myéloïde aiguë (LMA), la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), la leucémie myéloïde chronique (LMC) et la leucémie lymphoïde chronique (LLC)¹³.

La leucémie myéloïde aiguë, la leucémie la plus courante chez l'adulte

La leucémie myéloïde aiguë (LMA) est un type de leucémie caractérisé par l'apparition soudaine et la prolifération rapide de blastes provenant de cellules souches de la lignée myéloïde¹¹. Les cellules blastiques non matures de la LMA vont peu à peu prendre la place des cellules saines. Cela aura un impact important sur la fonctionnalité du système immunitaire du patient. Le modèle hiérarchique de la LMA, qui a été démontré, consiste en une petite population de cellules souches leucémiques (LSCs) qui ont un haut potentiel

de réplication et qui sont généralement plus résistantes aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie que les cellules plus matures^{9,14}. Ces LSCs mènent au développement d'une plus grande population de blastes plus matures ayant l'incapacité de s'auto-renouveler⁹. Selon la «French-American-British classification», les LMA ont été classées en huit sous-catégories (M0-M7)¹³. Chaque sous-catégorie représente une LMA apparue à un stade particulier de la maturation des blastes. Ainsi, une LMA peut être de nature myéloblastique, myélomonocytaire, monocytaire, mégakaryocytaire, etc. Les mutations génétiques menant au développement de la LMA sont nombreuses, à l'image de la nature du blaste généré. Quelques translocations chromosomiques ont été associées à l'apparition de certains sous-types plus communs. Par exemple, une LMA M3 (promyélocytaire) représentant près de 10% des cas de LMA a été associée à la translocation chromosomique (15 ;17)¹⁵. Cette translocation implique une fusion entre le gène PML (« promyelocytic leukemia protein ») du chromosome 15 avec le gène RARA (« retinoic acid receptor alpha ») du chromosome 17. D'autres translocations chromosomiques ont été identifiées comme étant récurrentes au niveau d'autres sous-types (Figure 3).

Figure 3 : Mutations associées au développement de différents sous-types de LMA



Modifié de : Zardo G. et al, *Epigenetic plasticity of chromatin in embryonic and hematopoietic stem/progenitor cells: therapeutic potential of cell reprogramming*, *Leukemia*, 2008.22:1503-1518¹⁵

Cibles immunologiques de la leucémie aigue

Les cellules leucémiques ont un métabolisme bien distinct des cellules hématopoïétiques normales. Le fait d'acquérir certaines mutations favorables à leur développement engendre la surexpression ou la sous-expression de gènes. Parfois, ces mutations peuvent engendrer la traduction de nouvelles protéines dérivées de fusions chromosomiques. Cette spécificité d'expression permet de focaliser une réponse GVL par les cellules T $\alpha\beta$ du donneur. Outre ces cellules, il a été démontré que les lymphocytes T $\gamma\delta$ auraient un potentiel GVL sans les effets GVHD¹⁶. Dans le même sens, des immunothérapies à base de cellules NK ont été développées¹⁷. Pour en revenir aux cellules T $\alpha\beta$, de nombreuses cibles immunologiques ont été identifiées et sont utilisées en clinique dans le but de développer une thérapie personnalisée pour chaque patient.

miHa

Les antigènes mineurs d'histocompatibilité (miHa) sont de petites molécules immunogènes que l'on retrouve en surface des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II¹⁸. Ils sont formés par des polymorphismes nucléotidiques (SNPs)¹⁹. Ces antigènes activent uniquement les cellules T¹⁸. Le répertoire antigénique des miHa est vaste et varie selon les organes et les compartiments du corps²⁰. Plusieurs miHa spécifiques pour les cellules hématopoïétiques ont été identifiés, ce qui en font des choix potentiellement intéressants dans le développement d'une immunothérapie ciblée²¹. C'est le cas de l'antigène HA-1^{18,22}. Il est complexé avec le HLA-A2 et permet de développer des cellules CD8+ cytotoxiques spécifiques. Il a été démontré que ces CTLs avaient la capacité d'éliminer les cellules leucémiques tout en épargnant les cellules non-hématopoïétiques, minimisant ainsi la possibilité de développer une maladie du greffon versus l'hôte (GVHD)²².

Antigènes spécifiques des leucémies (« leukemia specific antigens » ou LSA)

Les antigènes leucémiques spécifiques (LSA) sont des molécules exprimées exclusivement par les cellules leucémiques. Elles résultent la plupart du temps de translocations chromosomiques menant au développement de la leucémie. C'est le cas des protéines AML1-ETO et PML-RAR α (translocation (8;21) et (15;17) respectivement)²³. Les LSA peuvent également provenir d'une mutation d'un gène impliqué dans la leucémogénèse, menant à l'expression d'une protéine mutante. C'est le cas des mutations du gène *nucleophosmin-1* (NPM1) et *Fms-like tyrosine kinase 3* (FLT3)²⁴. Une étude comparative sur 521 patients souffrant de LMA a permis de démontrer que les individus ayant développé des mutations au niveau de ces deux protéines avaient un pronostic de survie largement diminué comparativement aux patients ne possédant qu'une mutation de NPM1²⁵. Des études cliniques de phases II et III menées sur des inhibiteurs de FLT3 ont été effectuées. Particulièrement, l'administration du lestaurtinib a mené à l'inhibition de FLT3 chez 58% des patients traités²⁶. Cependant, la thérapie ciblée de FLT3 n'a pas démontré dans son ensemble une amélioration marquée de l'espérance de vie des patients. Des recherches plus approfondies sont en cours afin de mieux comprendre et adapter cette thérapie ciblée²⁷.

Antigènes associés à la leucémie (« leukemia associated antigens » ou LAA)

Les antigènes associés à la leucémie (LAA) sont des molécules qui sont exprimées à la fois par les cellules saines et les cellules leucémiques²³. De ce fait, l'un des risques relié à une immunothérapie utilisant un LAA est l'autoimmunité²⁸. Avant tout essai clinique, il est donc primordial de connaître l'expression des LAA au niveau des autres types cellulaires. L'un des LAA les plus étudiés est le «Wilms' tumor protein 1» (WT1)²⁹. Cette protéine est formée à partir du gène *WT1*, localisé sur le chromosome 11³⁰. Le domaine N-terminal est important dans le contrôle de la transcription. Le domaine C-terminal est composé de quatre doigts de zinc et est important dans la régulation de l'expression de gènes impliqués au niveau de la prolifération cellulaire et de facteurs de croissance³¹. Physiologiquement, WT1 est exprimé au niveau des gonades et des reins. Il est également

exprimé en petite quantité par les cellules souches hématopoïétiques²⁹. Cependant, cette protéine est surexprimée dans près de 75% des cas de LMA et plus particulièrement au niveau des LSCs (Tableau I)²⁹. Plusieurs essais cliniques ont été menés afin de tester une immunothérapie spécifique à WT1. Premièrement, il a été démontré que les immunothérapies testées ne menaient pas à une toxicité vis-à-vis les tissus sains des patients. Pour ce qui est de la réponse anti-leucémique, plusieurs approches ont été utilisées, notamment la vaccination peptidique et la vaccination à partir de DCs stimulées avec des peptides de WT1³². Plusieurs des patients ainsi traités ont développé une réponse cytotoxique positive face cette protéine.

Taleau I : Surexpression de WT1 dans les leucémies aiguës

Type of leukemia	Newly diagnosed (new) or relapsed leukemia	Total number of cases reported	Percentage of Patients with WT1 overexpression by RT-PCR (range in cited studies) (%)	References
Adult AML	New	374	73–100	18–21
	one relapse	32	88	22
Adult ALL	New	60	66–100	¹⁸ (Stock W <i>et al. Blood</i> 1998; 92 (Suppl 1):223a; abstract)
Pediatric AML	Relapsed	0		
	New	131	73–99	23–26 (Gruhn B <i>et al. Blood</i> 2000; 96 (Suppl 1, Part 2):190b; abstract)
	Relapsed	23	100	(Gruhn B <i>et al. Blood</i> 2000; 96 (Suppl 1, Part 2):190b; abstract)
Pediatric ALL	New	210	60–99	^{24,25,27} (Gruhn B <i>et al. Blood</i> 1999; 94 (Suppl 1):492a. abstract)
	Relapsed	50	80–100	24

³Analysis limited to series with > 10 patients. Reports on acute leukemia lacking clinical status or certain details about methods not included in Table 1.²⁸⁻³⁰ A pediatric report with < 10 ALL or AML cases is referenced for completeness.³¹

Modifié de : Rosenfeld C. et al, *WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies*, *Leukemia*, 2003. 17: 1301-12²⁹

Approches pour cibler les cellules leucémiques résiduelles causant la rechute

Bien que les LSA semblent être les cibles les plus judicieuses dans le développement d'immunothérapies anti-leucémiques, cette approche est restreinte à un petit nombre de leucémies et ne semble pas générer les résultats cliniques attendus. Le choix d'autres cibles, entre autres peptidiques pourrait s'avérer intéressantes, surtout si elles présentes

des caractéristiques favorables au plan de la distribution tissulaire. Dans le développement d'une approche immunothérapeutique, il y a plusieurs facteurs à tenir en compte dont la sélection de l'antigène. La spécificité de l'antigène est très importante afin de ne pas cibler des tissus sains. Bien évidemment, des essais *in vitro* de cytotoxicité peuvent être effectués afin de vérifier ce point et tenter de prédire la réponse clinique. La fréquence de l'antigène chez une population de patients est également importante. Il faut privilégier les cibles les plus communes afin de pouvoir développer un traitement pouvant être administré au plus grand nombre de patients. D'une manière plus spécifique, il faut considérer l'oncogénicité d'une protéine, c'est-à-dire l'importance de son rôle dans le développement de la leucémie. Un autre point considérable est l'immunogénicité de la protéine, en particulier des peptides utilisés. Dépendamment de la composition (affinité du peptide pour une molécule HLA donnée) et de la longueur du peptide, celui-ci sera présenté par différentes molécules HLA. Les peptides plus long sont présentés par les HLA de classe II et font la promotion de l'activation des cellules CD4+ auxiliaires³³. Il a été démontré que ces cellules avaient un rôle de premier plan dans le développement et le maintien d'une réponse GVL effective par les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs)³⁴.

Outre ces critères, il existe plusieurs techniques qui ont été développées dans le but d'accroître la réponse GVL. Parmi les plus remarquables, il y a les «chimeric T cell receptor» (CARs) et les cellules T spécifiques à un peptide.

Les cellules CAR T (« chimeric antigen receptor T cells »)

Les cellules CAR sont des cellules T génétiquement modifiées pour exprimer un récepteur chimérique spécifique pour un antigène³⁵. Ce récepteur est composé à la base d'un domaine extracellulaire composé d'une région variable associée à un peptide signal assurant l'expression du CAR à la membrane. La région variable, généralement composée d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde, est spécifique à un antigène sélectionné. Le CAR est également composé d'un domaine transmembranaire reliant l'ectodomaine et l'endodomaine par un «spacer». Le domaine intracellulaire est composé d'un segment de

transduction du signal et d'un ou plusieurs segments de costimulation³⁵. Le domaine de transduction du signal est souvent dérivé de la chaîne zêta du CD3 alors que les domaines de costimulation proviennent des molécules CD28, 4-1BB, OX40 et autres³⁶⁻³⁸. Les cellules T sont transfectées avec un virus intégrant contenant l'information génétique du récepteur (lentivirus, γ -retrovirus) ou électroporées directement avec un plasmide contenant la séquence. Les cellules T artificiellement générées sont par la suite injectées au patient. Les essais cliniques utilisant les CARs de 2^e et 3^e génération, menés chez des patients souffrant de lymphomes ou de leucémies dérivées d'une lignée de cellules B, ont démontré des résultats des plus prometteurs^{39,40}. Un essai clinique a été mené sur un patient AML en lui infusant des CARs CD33 autologues⁴⁰. Une baisse du ratio blastique de 50% à 6% a été observée suite au traitement. Par contre, ceci a été suivi d'une augmentation graduelle des cellules leucémiques à 70% lorsque mesurées 9 semaines post traitement. Cependant, les thérapies de CARs ciblant les LMA sont relativement récentes. De plus, il arrive que ces cellules ne réussissent pas à persister dans le corps du patient. L'effet bénéfique est donc de courte durée. Également, en attribuant une cible comme de CD19 ou le CD33 qui sont retrouvés normalement sur les cellules saines, le CAR devient une cellule cytotoxique manquant de spécificité. De ce fait, il peut également attaquer des tissus sains comme les cellules B (exprimant le CD19) et les cellules myéloïdes (exprimant le CD33). Afin de remédier à cette situation, il a été pensé d'introduire un gène suicide afin de limiter les effets secondaires y étant associés⁴¹. Il reste encore beaucoup de recherches à faire afin de trouver la bonne combinaison de domaines de costimulation additionnant à la fois la force du signal et de la réponse ainsi que la survie des cellules infusées.

Peptides dérivés des cellules leucémiques

Une autre approche utilisée dans le but d'augmenter l'effet GVL tout en minimisant la GVHD est le développement de cellules T spécifiques à un ou des peptides dérivés de LAA ou de miHas⁴². L'éducation peptidique se fait au niveau des cellules T CD8+ par le biais d'APCs, principalement des DCs. Ces dernières sont cultivées en présence de peptides

synthétiques qui seront phagocytés et présentés. La nature des cellules en culture peut être, jusqu'à ce jour, autologue ou allogénique. Une fois les cellules T CD8+ activées en fonction du peptide sélectionné, elles sont réintroduites chez le patient par injection. Quelques essais cliniques utilisant entre autre des peptides dérivés de HA-1 et de WT1 ont donné des résultats partagés chez des patients LMA⁴²⁻⁴⁵. Les conclusions tirées sont que les cellules stimulées sont capables de monter une réponse cytotoxique contre les cellules leucémiques restantes. Cependant, le contrôle de la maladie résiduelle n'a pas été obtenu à long terme. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les cellules T CD8+ stimulées se sont activées jusqu'à un stade d'épuisement, ce qui a réduit considérablement leur durée de vie et leur potentiel anti-leucémique. De plus, il a été démontré qu'il était plus difficile de stimuler par exposition peptidique les cellules des patients lorsqu'ils étaient en rémission complète que les cellules de sujets normaux⁴⁴.

La greffe de cellules souches : un des seuls traitements curatifs actuel des leucémies aiguës récidivantes

La greffe de cellule souche représente une alternative de choix pour de nombreux patients présentant une leucémie agressive. Ainsi les patients présentant dès le départ une leucémie à haut risque ou encore les patients leucémiques présentant une rechute sont des candidats de choix à une greffe de cellules souches. Après avoir déterminé un ratio bénéfices/risques, les patients présentant une condition clinique adéquate peuvent se voir administrer une greffe de cellules souches. Ce traitement améliore les chances de survie sans récurrence leucémique. Il existe différents types de greffes, dépendamment de l'origine des cellules, soit l'autogreffe et l'allogreffe. Cette dernière se divise en greffe familiale HLA identique ou partiellement compatible (haplo-identique) et non-apparentée de donneur adulte ou de sang de cordon ombilical.

Autogreffe de cellules souches

L'autogreffe consiste à prélever les cellules souches d'un patient et à les réintroduire suite à un traitement de chimiothérapie. Les cellules souches sont prélevées soit directement de la moelle osseuse ou du sang⁴⁶. Une première étape de conditionnement consiste en un traitement de chimiothérapie associé ou non à de la radiothérapie afin de détruire les cellules leucémiques. Comme ce traitement induit aussi un dommage massif aux cellules de la moelle osseuse et des cellules souches hématopoïétiques qui s'y retrouvent, le patient reçoit par la suite une greffe constituée de ses propres cellules souches préalablement congelées dans le but de recoloniser sa moelle osseuse et de reconstituer son système sanguin et immunitaire. L'autogreffe n'est pas l'option la plus utilisée dans un contexte de leucémie. En effet, la chimiothérapie permet de traiter à court terme la leucémie, mais le patient finit presque toujours par présenter une rechute à moyen-long terme⁴⁷. C'est pourquoi l'autogreffe est davantage employée pour traiter d'autres cancers hématologiques comme les lymphomes et les myélomes multiples⁴⁸.

Allogreffe ou comment remplacer un système défaillant

L'allogreffe, ou greffe allogénique, consiste à remplacer le système hématopoïétique dysfonctionnel/leucémique d'un patient par un système compétent provenant d'un donneur compatible apparenté ou non à ce dernier⁴⁹. Cette technique de greffe est l'avenue thérapeutique la plus utilisée dans un contexte de leucémie, car les cellules du donneur peuvent présenter une réactivité contre les cellules du patient, permettant ainsi au nouveau greffon de combattre les cellules leucémiques résiduelles, diminuant ainsi le risque de rechute⁵⁰. Ce phénomène recherché lors du traitement s'appelle plus communément «greffon-versus-leucémie» (GVL). La première étape consiste à tenter d'identifier un membre de la famille du patient qui soit compatible, mais ce dernier peut également provenir des registres nationaux ou internationaux existants. Les deux parties doivent présenter la plus grande compatibilité possible et idéalement être identiques au niveau des antigènes leucocytaires humain (HLA) majeurs. On considère les HLA de classe I (A, B, C) et ceux de classe II (DR, DP et DQ) pour déterminer cette compatibilité, soit une combinaison identique de 10/10 ou 12/12 allèles⁵⁰. Une disparité trop importante de ces molécules engendre en effet le développement d'une complication grave et potentiellement mortelle appelée la maladie du greffon versus l'hôte (GVHD).

Haplogreffe: nouvel enjeu en transplantation

Sachant que seulement 50-60% des patients réussiront à trouver un donneur compatible pour la greffe, de nouvelles techniques ont été développées afin de pouvoir offrir une greffe de cellules souches à un plus grand nombre de personnes. La greffe de cellules souches haploidentiques a été proposée dans cette optique⁵¹. Ici, le donneur et le receveur auront une compatibilité minimale de 50%, correspondant par exemple à 5/10 antigènes du groupe HLA parmi le HLA-A, B, C, DQ et DR. Cette plus grande disparité pourrait entraîner une plus grande réponse GVL, mais également une GVHD plus sévère⁵².

Les complications post greffe

Infections opportunistes

Suivant la greffe, le patient fera face à de nombreux problèmes. Les infections opportunistes représentent l'une des plus importantes de ces complications. Le patient étant immunosupprimé jusqu'à la prise de greffe, celui-ci se retrouve vulnérable aux pathogènes qui sont la plupart du temps inoffensifs à tout individu en santé⁵³. Ces infections sont principalement de nature bactérienne, virale ou fongique. Les foyers d'infection de prédilection sont : le système digestif et les poumons. Des antibiotiques et médicaments antiviraux sont couramment administrés après la greffe afin de prévenir les infections potentielles et ce, jusqu'à ce que le compte sanguin de leucocytes commence à grimper à des niveaux acceptables. Conséquemment, certains agents stimulants peuvent être administrés dans le but d'accélérer le processus de reconstitution immunitaire⁵⁴. De nos jours, les infections précoces sont relativement bien contrôlées grâce aux stratégies de prévention. Les infections se déclarent plus tardivement, dépendamment de plusieurs facteurs comme le niveau de toxicité du conditionnement, le développement d'une GVHD et l'intensité de l'immunosuppression administrée en post greffe⁵⁴.

GVHD aigue : le choc lié à un nouveau système immunitaire

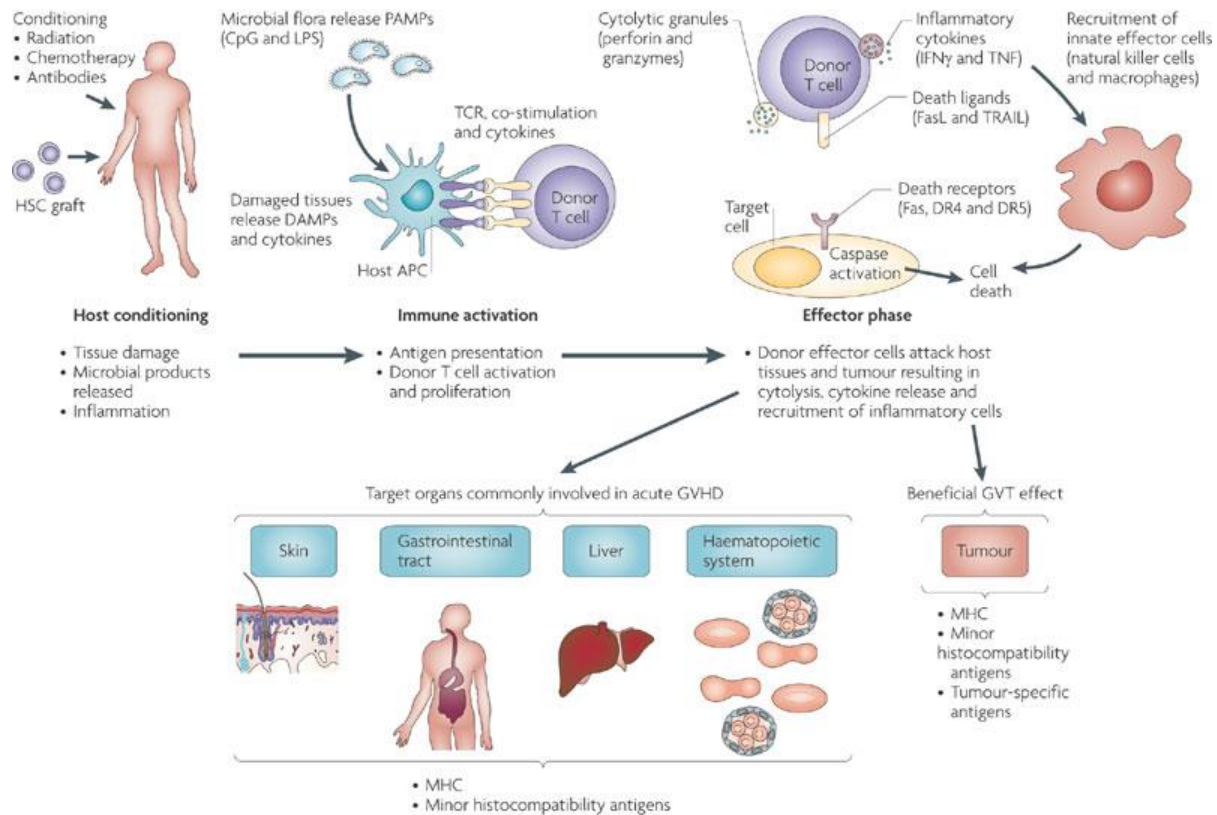
La maladie du greffon contre l'hôte ou «graft-versus-host disease» (GVHD) est la résultante d'une greffe entre un donneur et un receveur ayant une disparité au niveau de leur HLA ainsi que des antigènes mineurs qui y sont rattachés. Il s'agit d'une réaction inflammatoire où les cellules greffées d'un donneur s'attaquent aux tissus sains du patient. Il existe 2 formes de la maladie : aigue et chronique. Ce qui les distingue habituellement est le temps d'apparition des symptômes, soit avant 100 jours post greffe pour la phase aigue et au-delà de 100 jours pour la phase chronique⁵⁵. Cette délimitation temporelle est cependant maintenant délaissée pour se concentrer sur les manifestations cliniques propres aux GVHD aigues et chroniques. La forme aigue représente une attaque

du système immunitaire du donneur principalement dirigée contre les tissus cutanés, hépatiques et intestinaux. Elle s'attaque aussi à la moelle osseuse et au thymus du receveur. La forme classique se développe avant les 100 jours de greffe, mais cette dernière peut se présenter après ces 100 jours avec les mêmes atteintes au plan clinique. La GVHD chronique se présente souvent après 100 jours de la greffe, mais elle peut elle aussi se présenter avant ce délai. Pour ce qui est des sous-catégories de la GVHD chronique, il existe la de novo, la quiescente et la progressive⁵⁶. La GVHD « de novo » est la forme chronique qui apparaît chez un patient qui n'a pas présenté de GVHD aigue. La forme quiescente apparaît après une résolution apparente de la phase aigue. Enfin, la forme progressive correspond avec une continuation directe avec la GVHD aigue. Cette dernière représente la forme la plus grave de GVHD chronique. Elle compte pour environ 75% des cas de cGVHD⁵⁶. Quant à la forme «overlap», il s'agit une GVHD présentant à la fois les caractéristiques des formes aigue et chronique. La GVHD chronique est également associée à des manifestations d'allures auto-immunes importantes et avec la génération de cellules B auto-réactives⁵⁷.

Les disparités au niveau des antigènes HLA entre donneur et receveur engendrent la maladie du greffon contre l'hôte. Le prochain chapitre explique les aspects immunologiques de cette maladie. Cette maladie se développe quand les cellules du donneur s'activent et vont attaquer les tissus sains du patient, causant d'importantes lésions et problèmes de toutes sortes qui seront décrits dans le texte qui suit⁵⁸. La GVHD aigue est classée en quatre grades distincts, selon le nombre d'organes touchés ainsi que la gravité des dommages encourus⁵⁹. Plus le grade est élevé, plus l'espérance de vie du patient est courte. Les manifestations cliniques au niveau de la peau sont principalement reliées à l'apparition de rougeurs et d'éruptions. Au niveau du foie, il y aura une hausse marquée de la bilirubine et de la phosphatase alcaline. Au niveau du tractus gastro-intestinal, le patient présente la plupart du temps des diarrhées et nausées⁶⁰. Comme il s'agit d'une complication grave, plusieurs stratégies préventives ont été développées afin de diminuer la gravité de la GVHD.

Au plan de la physiopathologie, la GVHD aigüe peut être divisée en trois phases : La phase de conditionnement du patient, la phase d'amorçage (activation lymphocytaire + différenciation) et la phase effectrice⁵⁸ (Figure 1).

Figure 4 : Développement de la aGVHD



Nature Reviews | Cancer

Modifié de : Jenq R.R. et al, *Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation : individualized stem cell and immune therapy of cancer*, Nat. Rev. Cancer, 2010. 10:213-221⁵⁸

Conditionnement pré-greffe et inflammation

Le conditionnement du patient est l'étape nécessaire avant la greffe. Le patient reçoit de la chimiothérapie et/ou de la radiothérapie cytoréductrice et immunosuppressive ayant pour objectif de détruire sa moelle osseuse ainsi que son système immunitaire, ceci dans le but de préparer le patient à recevoir la greffe de CSHs⁵⁹.

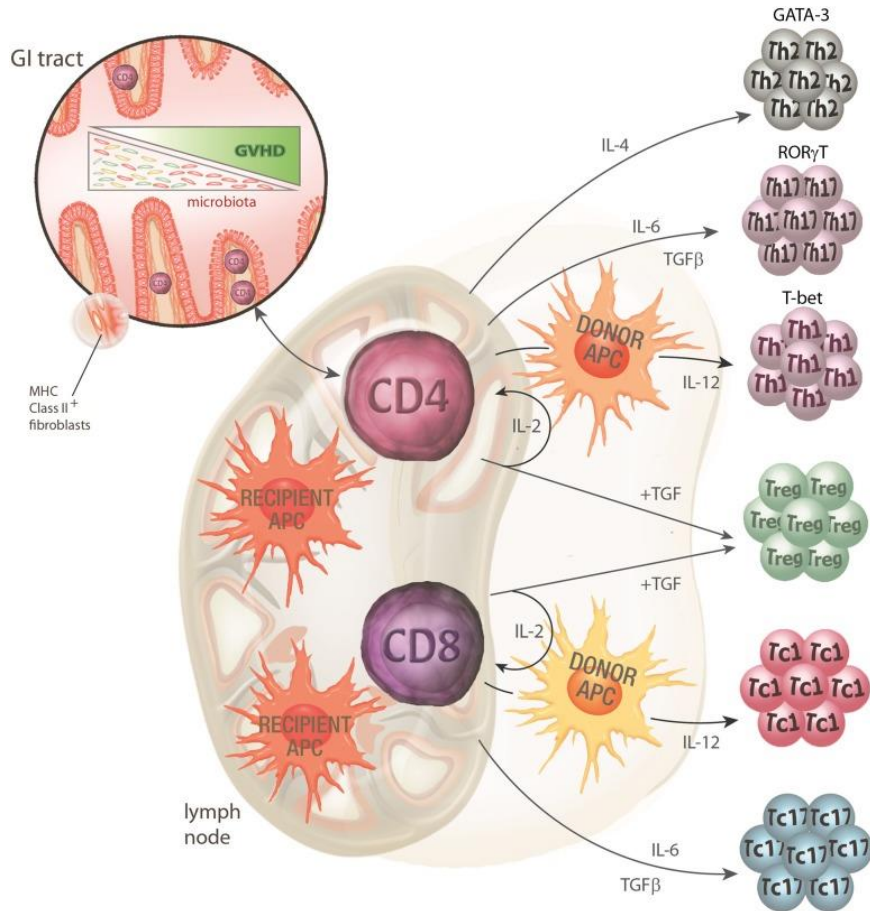
Le conditionnement est également associé à l'induction d'une inflammation spécifique de tissus. Les traitements intenses que reçoit le patient vont affecter à plus ou moins forte intensité l'intégrité de la muqueuse gastro-intestinale. Il y aura une atteinte partielle de la flore bactérienne s'y retrouvant, ayant pour effet de relâcher des PAMPs («pathogen associated molecular patterns»), des DAMPs («danger-associated molecular patterns») et des lipopolysaccharides bactériens (LPS). Ces molécules hautement immunogènes vont se retrouver dans la circulation systémique et donc, libres d'interagir avec des APCs, dont les cellules dendritiques et les macrophages résiduels du patient. Il y aura une relâche importante de cytokines impliquées dans l'inflammation ainsi que dans la costimulation des cellules T. Il y a entre autres la production de TNF- α , IFN- γ IL-1 et IL-6⁶¹. La production de cytokines proinflammatoires dans un contexte de aGVHD est couramment appelé «tempête cytokinique» et se prolonge suivant la greffe. De ce fait, les cellules provenant du donneur seront déjà dans un environnement inflammatoire.

La phase d'amorçage

Cette phase consiste en l'activation et l'expansion massive des lymphocytes dans la circulation périphérique. Avec l'avènement de la tempête cytokinique, il y a une activation massive des populations lymphocytaires provenant du greffon. Il a été décrit dans la littérature que les lymphocytes CD4+ et CD8+ ne sont pas tout-à-fait activés par les mêmes APCs. Les cellules CD8+ sont principalement activées par les APCs hématopoïétiques du patient. Les cellules CD4 peuvent également être activées par des APCs non-hématopoïétiques comme les cellules épithéliales principalement au niveau du tractus gastro-intestinal (TGI)⁶²⁻⁶⁴. Les APCs qui sont en cours d'activation vont migrer vers les réservoirs lymphoïdes secondaires, notamment les plaques de Peyer dans le TGI. Au niveau de l'épithélium de la peau, les cellules de Langerhans sont des DCs prééminents dans l'activation lymphocytaire⁶⁵. Les lymphocytes entrant dans les organes lymphoïdes secondaires sont alors activés et prolifèrent. Les DCs contenues dans le greffon contribuent également à l'activation des lymphocytes, mais leur rôle est moindre⁵⁸.

Les lymphocytes proliférant vont par le fait même se différencier en différentes catégories phénotypiques, soit effectrices ou tolérogéniques (Figure 5). Il peut y avoir une différenciation Th1, polarisée par l'expression d'IL-12 par les APCs⁶⁶. Les Th1 sont caractérisés par une importante production d'IFN- γ et TNF- α et font la promotion de l'activité cytotoxique des lymphocytes CD8^{67,68}. La polarisation Th17 a lieu via IL-6, TGF- β , IL-21 et IL-23⁶⁹. Les Th17 auraient un plus grand rôle dans le développement de la GVHD au niveau de la peau et des poumons et dans le développement de la GVHD chronique en général⁵⁸. Ces cellules sécrètent de l'IL-17A, IL-17F, IL-22 et IL-23. Il peut également y avoir une différenciation Th2 via l'IL-4. Les cellules Th2 ont un rôle important dans l'activation humorale et sont davantage situées au niveau du foie et de la peau pendant la GVHD⁵⁸. Les lymphocytes CD8 sont également susceptibles à une différenciation. Ils peuvent être soit Tc-1, ou Tc-2 ou Tc-17. Une remarque importante ici est que les Tregs, qui sont les cellules induisant la tolérance (et donc importantes dans le contrôle de l'inflammation reliée à la GVHD), sont en déficience et/ou ont une incapacité d'induire leur action immunosuppressive⁵⁸. Entre autre, il a été démontré que les inhibiteurs de la calcineurine empêchaient l'activation et la prolifération de ces cellules⁷⁰. Face à cette problématique, de nombreux essais cliniques ont été menés dans le but d'accroître la quantité de Tregs ou de préserver leurs fonctions⁷¹⁻⁷³.

Figure 5 : Différentiation lymphocytaire durant la phase amorçage



Modifié de : Markey K.A. et al, *The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice*, Hematology, 2014. 124: 354-362⁵⁸

La phase effectrice

Une fois les cellules T activées et différenciées, celles-ci vont migrer vers les différents organes touchés par la maladie. Leurs différentes activités inflammatoires sont décrites plus en détail dans les sections ci-dessous. Les cytokines majeures de la phase effectrice sont l'IFN-γ, TNF-α et l'IL-1. La dégradation et destruction des organes est principalement médiée par les voies apoptotiques Fas/FasL, TNF et perforine/granzyme⁵⁸.

GVHD chronique (cGHVD)

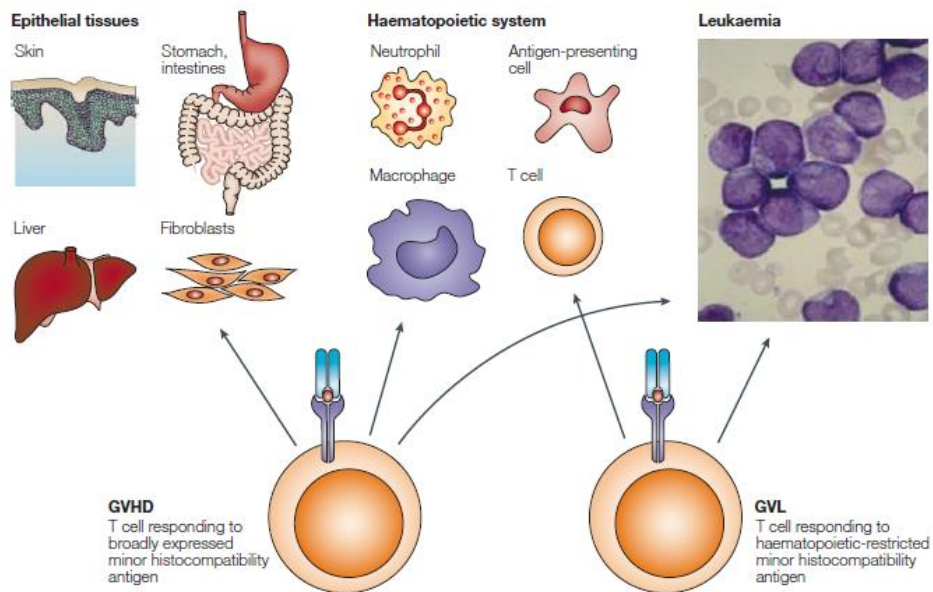
La cGVHD est médiée, tout comme sa version aiguë, par les lymphocytes T du donneur. Cependant, la phase chronique ressemble davantage à une maladie auto-immune. Le patron cytokinique de la cGVHD est fortement Th2, alors que celui de la aGVHD est davantage Th1⁵⁶. Cela signifie qu'il y a une forte activation humorale, donc une activation des cellules B. Ces cellules deviennent dysfonctionnelles, elles produisent des anticorps indésirables qui iront cibler tant des antigènes de surface qu'intracellulaires. Ceux-ci peuvent être des allo-anticorps (dirigés vers les tissus sains) ou des autoanticorps (dirigés vers le système hématopoïétique greffé). Les cellules T folliculaires auxiliaires (Tfh) sont des cellules importantes dans le développement des cellules B au niveau des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires et seraient potentiellement impliquées dans le développement de ces autoanticorps⁷⁴. Ces derniers jouent un rôle important dans le développement de la cGVHD, surtout au niveau des poumons. Toutefois, le développement immunologique de la cGVHD n'est pas encore totalement compris.

Les manifestations cliniques de la cGHVD sont plus hétérogènes que celles de la GVH aiguë. Les patients souffrant de cGVHD peuvent avoir plusieurs organes atteints. Tout comme la phase aiguë, le foie, la peau et les intestins peuvent être touchés. Au niveau du foie, les patients présentent fréquemment une atteinte cholestatique. Au niveau de la peau, ils développent des lésions lichenoïdes ou sclerodermiques. Les intestins ne représentent pas une cible fréquente. Il est cependant intéressant de noter que les patients ayant déjà eu une GVHD intestinale aiguë sont à plus haut risque de développer une GVHD intestinale chronique. Ceci peut entraîner de graves problèmes et des dommages permanents et nuire au bon fonctionnement du système digestif. En plus des organes mentionnés ci-haut, la cGVHD peut affecter d'autres endroits ciblés. Les muqueuses de la bouche, représentent l'un des endroits les plus affectés par la cGVHD. Les patients auront la plupart du temps une infiltration lymphocytaire au niveau des glandes labiales. Certains patients peuvent développer une bronchiolite oblitérante pouvant mener à une insuffisance respiratoire. Environ 60% des patients développeront une sécheresse oculaire, ou xérophtalmie⁵⁶.

GVHD et GVL : deux concepts paradoxaux

La GVHD et la GVL sont deux phénomènes qui sont intimement liés (figure 6)⁷⁵. Néanmoins, la GVL est l'un des principaux effets recherchés suivant la greffe allogénique et haploidentique. En effet, la GVL permet d'éliminer les cellules leucémiques résiduelles ayant échappé à la chimiothérapie et la radiothérapie. La plupart de ces cellules résiduelles sont considérées comme étant des LSCs. Ces dernières sont généralement en phase G₀, elles sont donc quiescentes⁷⁶. Cela leur confère une certaine résistance face aux chimiothérapies préalables à la greffe.

Figure 6 : Paradoxe entre GVHD et GVL



Modifié de : Bleakley M. et al, *Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect*, Nat. Rev. Cancer, 2004. 4 : 371-380⁷⁵

Pour qu'il y ait un effet GVL, les cellules T vont être activées par les APCs contre une diversité d'antigènes. Ces derniers peuvent être de nature allogénique, incluant des antigènes mineurs d'histocompatibilité (MiHa), des antigènes leucémiques associés (LAA) ou des antigènes leucémiques spécifiques (LSA). De ce fait, les cellules T alloréactives ont la capacité de s'attaquer aux tissus sains et aux cellules leucémiques résiduelles. Cependant, les cellules T recevant un stimulus LSA développeront une réponse exclusive

aux cellules leucémiques. Il est question ici de la spécificité, qui est un enjeu clé dans le traitement du patient⁷⁵.

Il arrive dans certains cas que les cellules leucémiques du patient recolonisent la moelle osseuse. Il est question ici de rechute. Plusieurs facteurs peuvent influencer les chances de développer une rechute⁷⁷. Une thérapie immunosuppressive trop intensive peut mener à la réapparition de la leucémie. Bien que les cellules T alloréactives soient néfastes au niveau de la GVHD, une fraction de celles-ci est essentielle dans le maintien de l'effet GVL. Si la GVL n'est pas suffisamment puissante, les cellules leucémiques résiduelles n'auront plus d'obstacle à leur prolifération et leur dissémination. La prise de greffe est également un facteur important dans le développement d'une réponse GVL adéquate. En particulier au niveau de la récupération lymphocytaire au premier mois suivant la greffe. Face à un environnement hostile, les cellules leucémiques peuvent également acquérir des mutations somatiques favorables à leur survie. Dans une situation de rechute, le patient peut recevoir de la chimiothérapie suivie la plupart du temps dans une infusion de cellules T (DLI) ou encore une deuxième greffe de cellules souches. Cependant, ces approches, même combinées, résultent en une pauvre espérance de survie (médiane d'environ 6 mois)⁷⁸.

Implication des lymphocytes dans l'effet GVH/GVL

Cellules T

Les lymphocytes T représentent la pierre angulaire de la réponse immunitaire acquise. Ces cellules sont produites à partir de la moelle osseuse et acquièrent leur maturation au niveau du thymus par succession de sélection positive au niveau du cortex (préservation des cellules T présentant une affinité appropriée et élimination des cellules qui ne reconnaissent pas un complexe CMH-peptide) et négative au niveau de la médulla (élimination des cellules ayant une trop forte affinité pour un antigène)⁷⁹. Ces cellules se différencient, selon différents facteurs lors de la maturation, en sous-types tels les lymphocytes T CD4+ auxiliaires, les lymphocytes T CD4+ régulateurs (Tregs) et les

lymphocytes T CD8+. Les cellules T CD4+ et CD8+ passent par différents stades d'activation. Elles passent d'un état naïf à central mémoire, puis effecteur mémoire et finalement effecteur. Plus une cellule est activée, moins elle prolifère, mais plus elle acquiert de fonctions effectrices⁸⁰. Les lymphocytes T sont les principaux acteurs de l'alloréactivité retrouvée dans la GVHD. Comme mentionné plus haut, le type de cellule est relativement spécifique selon l'organe ciblé, en partie relié par le type de chimiokines exprimées dans le milieu environnant⁵⁸.

CD4 auxiliaire

De manière générale, les cellules T CD4+ sont impliquées soit dans la réponse inflammatoire ou dans la réponse de tolérance. Les cellules dites auxiliaires ont un rôle de premier plan dans la polarisation de cette réponse immune. Une cellule CD4+ naïve peut se différencier en un profil Th1 (phosphorylation de STAT4 par l'IL-12) et être impliquée dans l'immunité antivirale et anti-tumorale⁸¹. Les cellules Th1 peuvent aussi jouer un rôle dans l'activation des cellules T CD8+ cytotoxiques. Au niveau de la GVHD aigue, les TH1 sont impliqués dans la dégradation de la peau, du foie et du tractus gastro-intestinal⁵⁸. Cette même cellule CD4+ naïve peut devenir une cellule Th2 (phosphorylation de STAT6 par l'IL-4) et avoir un rôle important dans la réponse humorale, i.e. réponse contre les parasites extracellulaires et les allergies⁸¹. Lors de GVHD aigue, les Th2 vont davantage se retrouver au niveau du foie et de la peau⁵⁸. Un autre groupe important des cellules T auxiliaires sont les Th17 (par l'activation de STAT3). Ces cellules sont impliquées dans le maintien du foyer d'inflammation. Les Th17 et Tc-17 sont principalement retrouvés au niveau de la peau et des poumons lors d'une GVHD aigue.

CD4 régulateur

Les lymphocytes T CD4+ régulateurs (Tregs) sont les cellules qui régulent l'inflammation d'une réponse immunitaire. Elles sont générées soit au niveau du thymus par l'expression du facteur de transcription FOXP3 ou en périphérie par la phosphorylation de STAT5 via la liaison de l'IL-2 au récepteur IL-2R β ^{82,83}. Les Tregs induisent la tolérance immunitaire par différents mécanismes^{84,85}. Ils peuvent exprimer des cytokines anti-inflammatoires

comme l'IL-10 et le TGF- β . Ils peuvent aussi induire la cytolysse de cellules effectrices par l'expression de granzymes et perforine. Ils peuvent également empêcher les cellules effectrices de recevoir des molécules essentielles à leur survie et à leur prolifération en consommant l'IL-2 du milieu métabolique ou en sécrétant de l'adénosine dans ce même milieu. Finalement, les Tregs peuvent empêcher la maturation des cellules dendritiques et ces dernières vont par le fait même exprimer l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), qui est une enzyme tolérogénique dégradant le L-tryptophane dans le milieu extracellulaire. Les Tregs pourraient jouer un rôle majeur dans la prévention de la GVHD. Cependant, leur nombre n'est généralement pas suffisant pour contrôler l'alloréactivité causée par les cellules T effectrices. C'est pourquoi de nombreuses études ont été menées dans le but d'exploiter leur potentiel thérapeutique. L'une des stratégies les plus en vue est l'isolation et expansion massive de ces cellules suivie d'une ou plusieurs infusions chez le patient. Les patients suivant ces protocoles cliniques ont vu leurs symptômes de GVHD ainsi que leurs médicaments immunosuppresseurs diminués ^{71,86,87}.

CD8

Les lymphocytes T CD8 ont un rôle de premier plan dans la réponse cytotoxique contre les pathogènes intracellulaires comme les virus. Ils sont également très importants dans la réponse anti-tumorale. L'activation des cellules T CD8+ naïves se fait principalement par la stimulation antigénique du TCR via la liaison avec la combinaison de peptides présentés par les molécules HLA de classe I. Une fois activés, les cellules CD8+ deviennent cytotoxiques (CTL) et vont sécréter des molécules cytolytiques (granzymes et perforine et granulysine) qui vont activer la voie apoptotique caspase dépendante ^{88,89}. Ces mêmes cellules produisent également de grandes quantités d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-2 dans le but d'influencer la réponse d'autres cellules comme les cellules «natural killer» (NK) ou les macrophages ^{66,90}. L'activation des CTL peut aussi impliquer l'encadrement des cellules T CD4+ Th1 toujours par la sécrétion d'IFN- γ . De plus, l'implication des cellules Th1 permet à la génération de cellules CD8+ mémoires suite à l'infection. Ces cellules ont la capacité de perdurer à long terme en périphérie et seront responsables d'une réponse plus rapide en cas de deuxième infection. Les cellules CD8+ ont un rôle très important dans la réponse

cytotoxique allogénique au niveau de la peau, du foie et du TGI lors d'une aGVHD⁵⁸. Cependant, la différenciation Tc-2 semble être reliée à un meilleur pronostic pour le patient, car ces cellules semblent avoir un effet préférentiel contre les cellules leucémiques tout en contribuant moindrement à la GVHD⁵⁸.

Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont dérivées de la lignée myéloïde. Elles ont un rôle central dans l'établissement de la réponse adaptative. À l'état *in vivo*, il existe principalement deux types de DCs. Les DCs conventionnels ou myéloïdes (mDCs) et les DCs plasmacytoïdes (pDCs)⁹¹. Les mDCs immatures sont retrouvés en périphéries et ont un potentiel de phagocytose élevé. Lorsque ces cellules phagocytent et transforment une protéine pathogénique en peptides, elles vont entamer un processus de maturation qui va les mener jusqu'aux ganglions lymphatiques secondaires. Au cours de la maturation, les mDCs vont perdre leur capacité de phagocyter, mais vont se mettre à exprimer des récepteurs ayant un rôle dans l'activation lymphocytaire (HLA I et II), des molécules de costimulation (B7.1, B7.2, CD40) et de l'IL-12 (favorisent la production de cellules Th1)^{91,92}. Elles deviennent ainsi des cellules présentatrices d'antigènes (APCs). De leur côté, les pDCs immatures s'apparentent morphologiquement davantage à des plasmocytes. Elles n'ont pas de dendrites au départ mais acquièrent les caractéristiques de cellules dendritiques après maturation. Elles se distinguent des mDCs par leur production d'interféron de classe I (IFN- α , IFN- β) et sont très importantes dans la réponse antivirale et l'autoimmunité⁹¹. En laboratoire, il est possible de générer des DCs à partir de monocytes. Ces cellules sont appelées des Mo-DCs et sont utilisées dans certaines expériences dans le but de présenter sélectivement un ou des peptides à une population de lymphocytes⁴². Comme mentionné plus haut, les DCs ont un rôle de premier plan dans le déclenchement de la réponse alloréactive lors d'une GVHD.

Prévention et traitement de la aGVHD

Immunosuppresseurs et inhibiteurs de la signalisation cellulaire

Afin de tenter de contrôler l'inflammation à des niveaux acceptables, des médicaments peuvent être administrés au patient. Celui-ci peut recevoir des immunosuppresseurs visant particulièrement les cellules T alloréactives comme de la cyclophosphamide (Cy), tacrolimus et autres inhibiteurs de la calcineurine et mycophenolate mofetil (MMF). Il a été démontré que la Cy engendrait la tolérance immune par destruction clonale des cellules anti-hôte et anti-donneur au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Les inhibiteurs de la calcineurine empêchent l'activation des cellules T en bloquant la hausse intracellulaire de calcium et le MMF inhibe la prolifération de ces cellules (par blocage de la synthèse de novo des purines). Cependant, ces médicaments peuvent augmenter les chances de rechute⁹³.

Déplétion partielle ou totale des lymphocytes

Déplétion T *in vivo*

Afin de contrer le développement de la GVHD chez le patient, plusieurs autres stratégies ont été développées. Sachant que les cellules T représentent le catalyseur principal de la GVHD, des approches ont été élaborées dans le but de cibler spécifiquement cette population cellulaire. Il existe une approche *in vivo* de déplétion des cellules T par l'administration de globuline anti-thymocyte ou ATG («anti-thymocyte globulin») ou encore d'alemtuzumab avant la greffe^{94,95}. Ce dernier anticorps monoclonal inhibe les lymphocytes matures en se liant au CD52 (absent sur les cellules souches). Ces approches sont combinées avec une injection subséquente de cellules souches CD34+. La déplétion des cellules T du donneur se fait donc à l'intérieur du patient. Une autre approche de déplétion T *in vivo* a été étudiée par Luznik et al dans les cas de greffe avec un donneur haplo-identique. Les patients suivant ce protocole ont suivi une chimiothérapie non-myéloablatrice (c'est-à-dire que la moelle osseuse est partiellement détruite) suivie d'une dose massive de Cy post greffe⁹⁶. Sur 68 patients, le nombre d'individus ayant développé

une aGVHD de grade II-IV était de 34% et de grade III-IV était de 6%. Cependant, ils ont observés une proportion assez élevée de rechute 1 an suivant le traitement et donc un effet GVL très faible.

Déplétion T ex vivo

De nombreuses approches *ex vivo* ont également été développées afin d'éliminer les cellules T du greffon. Il est possible de procéder à une sélection positive de cellules CD34+ en utilisant des anticorps monoclonaux liés à des billes magnétiques. Quelques études cliniques ont démontrés qu'une délétion immuno-magnétique CD3/CD19 (cellules T/B) permettait un meilleur contrôle de la GVHD⁹⁴. Cette délétion ciblée permet également de préserver des cellules NK, qui sont très importantes dans le maintien de la GVL⁹⁷. En effet, ces cellules expriment les «immunoglobulin-like receptors» (KIRs) qui sont des protéines allotypiques et reconnaissent certaines molécules HLA. Les cellules NK exercent donc une certaine alloréactivité contre les cellules leucémiques, car celles-ci ont une expression réduite de leur HLA. Une méthode de délétion plus précise et puissante consiste à éliminer les cellules T (TCR $\alpha\beta$)⁹⁵. Les cellules T $\gamma\delta$ ne sont pas alloréactives et ont un rôle important dans la réponse aux infections ainsi que dans la réponse GVL. Il existe une autre approche plus récente de délétion T qui consiste à éliminer subséquentement les cellules CD3+ et les cellules CD45RA+⁹⁸. Ce récepteur est présent sur les cellules T naïves, qui sont considérées comme étant les cellules avec le plus grand potentiel alloréactif. Par ailleurs, des études ont également été menées sur l'utilisation de gènes suicides introduits dans les cellules T infusées⁹⁹. Par exemple, Di Stasi et al. ont inséré dans des cellules T destinées à la greffe un gène inductible de la caspase 9, protéine participant à l'apoptose cellulaire^{100,101}. Ils ont administré aux patients développant une GVHD un agent dimérisant activant spécifiquement le gène inductible. Ce traitement a permis d'éliminer leur GVHD sans récurrence.

Photosensibilisateurs

La thérapie photodynamique (ECP) est une forme de photothérapie où l'on administre un agent photosensible dans le but d'éliminer une cible donnée. Cette technique a commencé à être utilisée dans les années 1970 pour le traitement de maladies cutanées comme le psoriasis et même pour le lymphome T cutané en 1976¹⁰². Les agents photosensibles sont des molécules qui deviennent actives en présence d'une stimulation lumineuse à une certaine longueur d'onde. Elles passent par la suite par différents stades d'excitations et atteignent un état triplet excité capable de réactions d'oxido-réduction avec des composantes biologiques, ce qui favorise la relâche de molécules d'oxygène réactives¹⁰². Les photosensibilisateurs sont, encore de nos jours, utilisés couramment dans le traitement de plusieurs maladies cutanées^{103,104} et de plus en plus dans le traitement de GVHD^{105,106}. L'un des principaux avantages recherchés dans le traitement de la GVHD est basé sur l'élimination spécifique des cellules T alloréactives^{102,107}. Cette spécificité est due par le fait que ces cellules, qui sont activées, ont un potentiel réplicatif élevé. De ce fait, elles ont donc un ADN plus accessible. Cela favorise la formation de liens covalents ADN-photosensibilisateurs et mène fatalement à des dommages irréversibles de l'ADN. Parmi les agents les plus étudiés pour la prévention et le traitement de la GVH, il y a le 8-methoxypsoralen (8-MOP) et le 4,5-dibromorhodamine (TH9402)^{102,108}.

8-MOP

Le 8-MOP a une capacité mutagénique lorsqu'il est activé par lumière UV. Il forme un monoadduit avec une pyrimidine, ce qui va induire un produit croisé et ainsi altérer l'ADN avec lequel il se lie pour mener éventuellement à l'apoptose cellulaire. Il a été proposé que le mécanisme d'action par lequel l'apoptose est déclenchée soit l'activation de la caspase-9¹⁰⁹. Il s'ensuivrait l'activation d'autres caspases et éventuellement de l'apoptose. L'effet peut être amplifié en inhibant la voie PI3K-AKT, très importante dans l'effet anti-apoptotique. Il a également été démontré que le traitement de monocytes par le 8-MOP engendrait des DCs ayant un phénotype immunosuppresseur. En effet, ceux-ci se mettent à exprimer le «glucocorticoid-induced leucine zipper» (GILZ) et expriment en

moins grande quantité les molécules de costimulation CD80 et CD86^{110,111}. Au niveau des cellules T, le traitement photodynamique *ex vivo* entraîne une élimination des cellules alloréactives et un enrichissement *in vivo* en Tregs a été observé¹¹². Une étude menée sur des patients aGVHD et cGVHD a démontré que le traitement d'ECP permettait d'augmenter le nombre de Tregs en circulation périphérique. Les patients de l'étude ont par ailleurs démontré une amélioration de leur GVHD¹¹³.

TH9402

Le TH9402 est un dérivé de la rhodamine et a été découvert dans les années 90. Sa phototoxicité en faisait un candidat idéal pour son utilisation en tant que photosensibilisateur¹¹⁴. Son activation se fait par une exposition lumineuse à 514nm. Son principal mécanisme d'action se fait par stress oxydatif au niveau de la mitochondrie¹¹⁴. Plus particulièrement, le traitement lumineux effectué après exposition des cellules au TH9402 mène à une relâche d'oxygène singulet qui est une molécule ayant une forte affinité pour plusieurs composants cellulaires tels les protéines et les acides nucléiques. L'accumulation d'oxygène singulet mène au dysfonctionnement de la cellule et ultimement, à son apoptose. Nous avons démontré que le traitement d'ECP avec le TH9402 menait également à l'élimination de cellules alloréactives^{115,116}. Le TH9402 est pompé à l'extérieur des cellules via le transporteur P-glycoprotéine (Pgp). Cette protéine est exprimée à partir du gène «multidrug-resistance-1» (*MDR1*)¹¹⁵. Or, dans les cellules T activées par stimulation antigénique, la Pgp devient déficiente¹¹⁷. Le TH9402 s'accumule donc à l'intérieur de la cellule. Il a été démontré que son expression était diminuée entre lymphocytes T naïf (CD45RA+ ; expression à 50%) et lymphocytes T mémoire (CD45RO+; expression à 33%)¹¹⁷. Cependant, la cause exacte de cette perte de fonction au niveau des cellules activées n'a pas été encore démontrée.

Ceci dit, nous avons également constaté que le traitement par le TH9402 préserve les cellules T au repos. Cette molécule, contrairement au 8-MOP, est activée par une longueur d'onde de 514 nm (lumière visible). Mabed et al. ont constaté que le traitement d'ECP par le 8-MOP inhibait la capacité clonogénique des progéniteurs de cellules souches

hématopoïétiques à court terme et inhibait cette même capacité au niveau des cellules souches immatures¹¹⁸. Cette inhibition se fait par la radiation ultraviolette et engendre vraisemblablement des mutations non désirables à l'ADN. L'utilisation d'un photosensibilisateur s'activant à la lumière visible comme le TH9402 lui confère donc un avantage par rapport au 8-MOP.

Protocole ECP développé au sein de notre laboratoire

Le traitement par lequel les cellules T alloréactives sont éliminées par le TH9402 s'appelle photodéplétion (PD). Les cellules alloréactives d'un donneur envers un patient donné peuvent être éliminées avant leur administration. Pour cela, les cellules du donneur sont d'abord exposées aux antigènes d'un patient donné dans le cadre d'une réaction lymphocytaire mixte (MLR) pendant 4 jours. Suivant cette incubation, les cellules sont incubées avec le TH9402, puis traitées par PD à l'aide d'un dispositif émettant une lumière à 514nm. Il est aussi possible d'utiliser cette approche de photodéplétion pour des patients présentant une GVHD chronique. Ainsi, lorsque la GVHD est installée, les lymphocytes T sont activés in vivo. Ces cellules peuvent ainsi être collectées au niveau du sang par apherèse et traitées par notre approche photodynamique au TH9402. Cette stratégie permet d'éliminer les cellules alloréactives tout en préservant les cellules T régulatrices. Les cellules ainsi traitées présentent des caractéristiques favorables lors de leur administration au patient.

Cette approche a été évaluée dans le cadre d'une étude clinique menée auprès de patients atteints de cGVHD¹¹⁹. Ici, les cellules des patients ont été traitées directement suivant leur apherèse, car les cellules du donneur qui reconnaissent les cellules des patients sont déjà activées. Les cellules photodéplétées ont été réinjectées le jour même au patient. Il a été observé que non seulement les cellules alloréactives étaient éliminées, mais que la population de Tregs était préservée. De plus, cette population avait tendance à s'accroître au fur et à mesure du traitement. Ce double effet de la PD sur les cellules des patients a mené à une amélioration notable de la cGVHD chez plusieurs patients.

ATIR

Une autre étude clinique a été menée cette fois-ci chez des patients leucémiques ayant présenté une rechute ou réfractaires aux traitements de chimiothérapie conventionnelle¹⁰⁵. Le but de cette étude était d'infuser chez le patient des cellules T photodéplétées afin d'accélérer la reconstitution immune suite à une greffe allogénique haplo-identique T déplétée. Le principe de base de cette étude est d'activer in vitro les cellules T d'un donneur familial face aux antigènes du patient. Par la suite, ces cellules activées ex vivo sont traitées par thérapie photodynamique au TH9402 et cryopréservées. Le patient reçoit un régime de conditionnement à base de chimio- et de radiothérapie suivi d'une greffe de cellules souches CD34+ sélectionnées. Quatre semaines plus tard, ce même patient reçoit une infusion de cellules T photodéplétées. Sur 19 patients, seulement 5 ont développé une GVHD de grade II et aucun n'a développé de GVHD sévère (de grade III-IV). Il est particulièrement intéressant que les patients ayant reçu une dose plus élevée de cellules photodéplétées ont présenté moins d'infections et une meilleure survie que les patients ayant reçu de plus petites doses de ces cellules. Ces résultats sont fort encourageants puisqu'ils démontrent la capacité du traitement photodynamique à éliminer les cellules T alloréactives, tout en préservant les cellules T avec une activité anti-infectieuse. Or l'importante survie des patients ainsi traités, patients qui étaient à haut risque de rechute, suggère que les lymphocytes T injectés aux patients sont aussi capables de reconnaître les cellules leucémiques.

Hypothèse et objectifs du projet

La photodéplétion des cellules T alloréactives par le TH9402 est une photothérapie cytoréductrice qui est utilisée en clinique depuis quelques années pour la prévention de la GVHD en greffe haplo-identique ainsi que dans le traitement des patients atteints de GVHD chronique. L'élimination sélective des cellules T alloréactives, les cellules qui causent la GVHD, a permis de traiter plusieurs patients réfractaires à bon nombre de traitements conventionnels. Sachant que l'effet GVL et GVHD sont intimement liés, l'élimination des cellules alloréactives pourraient résoudre la GVH mais aussi augmenter le risque de rechute chez les patients. Les essais cliniques déjà réalisées à l'hôpital Maisonneuve Rosemont et à travers le monde démontrent moins de rechutes qu'anticipé dans ces populations de patients. Considérant l'importance capitale de maintenir une capacité immunitaire anti leucémique chez les patients atteints de GVH, notre objectif principal était de réaliser une étude *in vitro* mettant en évidence la persistance d'une réponse anti leucémique des cellules traitées par PDT.

Notre hypothèse est que le traitement de photodéplétion éliminerait une grande proportion des cellules T alloréactives dirigés contre les tissus sains du patient mais préserverait toutefois suffisamment de cellules anti-leucémiques pour assurer le maintien d'une réponse GVL efficace. Nous nous sommes premièrement penchés sur la capacité des cellules photodéplétées à s'activer en présence d'un stimulus antigénique. Nous avons dans un premier temps mis en évidence la persistance de cellules alloréactives résiduelles post PDT en élaborant un système de coculture entre cellules photodéplétées (PD) et cellules stimulatrices irradiées. Nous avons ainsi montré leur capacité de réactivation en présence de cellules allogéniques. Nous avons ensuite évalué le potentiel de réponse anti-leucémique des cellules PD vis-à-vis d'un antigène leucémique ciblé. Nous avons sélectionné l'antigène leucémique associé WT1 ainsi qu'une lignée leucémique surexprimant cette protéine et mis au point une culture de différenciation et d'activation de DCs.

Contribution des auteurs à l'article

Élise Cournoyer a entièrement rédigé l'article, sous la supervision de son directeur de recherche, le Dr Denis-Claude Roy. La totalité des résultats et expériences présentées ont été exécutées par Élise Cournoyer. Les Drs Roy, Vibhuti Dave ainsi que Stéphanie Thiant et Jean-Philippe Bastien ont participé à l'élaboration de la plupart de ces expériences. De plus, Radia Sidi-Boumédiène a contribué à quelques expériences. L'article n'a pas été encore soumis.

Présentation de l'article

Evaluating the anti-leukemia activity of T cells photodepleted of GVHD activity

Introduction

Graft-versus-host disease (GVHD) and primary relapse are the most severe complications following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT)¹⁻³. Those reactions are mostly due to undesired or inadequate alloactivation of donor T cells by antigen mismatch of major and/or minor HLA molecules between donor and patient. Chemotherapy and radiotherapy conditioning regimens used prior to alloHSCT causes apoptotic and necrotic cell death generating cellular debris that are phagocytosed by professional antigen presenting cells (APCs), mostly dendritic cells (DCs)⁴. Debris that come from healthy tissues, particularly the skin, gut and liver, eventually lead to GVHD. Debris coming from apoptotic leukemic cells can allow for graft-versus-leukemia effect (GVL)⁵.

It has been well established that GVHD and GVL are tightly linked to one another. Indeed, it is known that the presence of GVHD inversely correlates to the disease relapse occurrence⁶⁻⁸. In this matter, several clinical strategies have been designed in an attempt to eliminate severe GVHD. We have elaborated a photodynamic cell depletion approach using a rhodamine derivative: 4,5-dibromorhodamine-123 (TH9402)⁹⁻¹¹. This molecule mediates phototoxicity upon visible light exposure (514nm), leading to a photodepletion (PD) of alloreactive T cells with concomitant preservation of resting T cells^{9,12}.

In an attempt to find the right balance between unwanted GVHD and desirable GVL activity of donor T cells, we sought to determine if PD treated T cells still have the potential to display a cytotoxic response toward residual leukemic cells following conditioning regimen. First, we demonstrate that PD T cells can be reactivated toward second and third party alloantigens. We also determined that prolonged intense re-stimulation of PD T cells could lead to cellular exhaustion. Moreover, we found that re-stimulation of PD T cells using a specific leukemic antigen (WT-1) leads to an increase in activated memory phenotype T cells. Finally, antigen-specific PD T cells displayed cytotoxic activity toward a leukemic cell line (THP-1) expressing the same antigen (WT-1) that was used for re-stimulation. Thus, photodepletion with TH9402 represents a

promising avenue for treatment of leukemia with the subsequent elimination of GVHD causing alloreactive T cells and preservation of T cells with anti-leukemia activity.

Materials & Methods

Healthy donors & cell lines

Peripheral blood samples were obtained from healthy donors (N=8). Each individual signed a written consent prior to blood donation (based on the Declaration of Helsinki). TH9402 photodepletion protocol for treatment of GVHD is clinically approved at HMR. Leukocytes were obtained by density gradient isolation (Ficoll-Paque, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, United-States) and number of cells was assessed by Coulter Counter. THP-1 cell line (monocytic leukemic) overexpressing WT-1 was used in the cytotoxicity assay described below.

Photodepletion

In vitro cultures were established following ECP (extracorporeal photopheresis) or ATIR protocol (Addition of T cells for immune reconstitution; DC Roy et al manuscript in preparation). The ECP protocol has been previously described with use of 0,33 μ M TH9402 for 45 minutes at 37°C in 5% CO₂ incubator and subsequently exposed to 5J/cm² of visible light (514nm) (Kiadis Pharma, Amsterdam)¹⁰. Mixed lymphocyte reaction (MLR) was carried out at a 1:1 ratio of responder to stimulator (stimulator consisted of a pool of PBMCs from 5 donors and irradiated at 60Gy; Gammacell 3000 Elan, MDS Nordion). For ATIR protocol, cells from a healthy donor (donor A) were cultured at a 1:1 ratio with irradiated cells from another donor (subject B). The MLR was carried out for 4 days and culture media was supplemented with [50IU/mL] of IL-2 (R&D Systems). Complete culture medium contained X-Vivo medium supplemented with 5% serum AB (Valley Biomedical Inc.), 1mM sodium pyruvate, 2 μ M L-Glutamine, [100U/mL] of penicillin and [100 μ g/mL] of streptomycin (all from Gibco). Four days post-MLR, cells were plated at 37°C in 5% CO₂ at a concentration of 1x10⁶ cells/mL and incubated with 10 μ M of TH9402 for 40 minutes in X-vivo medium containing 2,5% serum AB (37°C in 5% CO₂ incubator). Then, they were incubated another 90 minutes at [1x10⁶cells/mL] in X-Vivo 10% serum AB for extrusion of TH9402. Following these steps, cells were subjected to photodepletion in T75 suspension

flasks (VWR) using a scanning device delivering 5J/cm² of visible light (514nm; Kiadis Pharma).

Generation of Monocyte-derived Dendritic Cells (Mo-DCs)

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were incubated for 2 hours in 6-well plate (VWR) at a concentration of 2x10⁶ cells/mL ((2mL/well); 37°C and 5% CO₂)¹³. Culture supernatant was gently removed and to the plastic adherent cells 2mL of fresh media containing of IL-4 [100IU/mL] and GM-CSF [800IU/mL] were added. After 3 days of incubation, cells were visualized under microscope, pooled, centrifuged, resuspended in the same growth medium and incubated for another 4 days. At day 7, cells were phenotyped and immature dendritic cells (iDCs) were pulsed with 1µg/mL of WT-1 peptide pool (JPT Peptide Technologies) for 2 hours. The pulsed DCs were resuspended at 1x10⁶ cells/mL in 2ml/well of maturation media containing IL-4 [100IU/mL], GM-CSF [800IU/mL], TNF-a [10ng/mL], IL1-b [10ng/mL], IL-6 [100ng/mL] and prostaglandin E2 [PGE₂; 1µg/mL] in a fresh 6-wells plate. After another 24hrs, IFN-γ [1000IU/mL] of was added to complete the maturation of DCs (all cytokines from Biolegend).

Generation of WT-1 specific PD cells

To generate WT-1 specific PD cells, we co-cultured PD treated PBMCs with irradiated (40Gy) peptide pulsed mature Mo-DCs at a 1:10 ratio (effector:stimulator; effector being PD cells and stimulator being Mo-DCs) in either GRex10 flask (Wilson Wolf) or 6-well plates with complete media supplemented with [30ng/mL] of IL-21, [10ng/mL] of IL-12 and [10ng/mL] of IL-7 (all from Biolegend) for 7 days¹³.

Flow Cytometry

T cell activation following MLR in the presence of irradiated PBMCs was assessed by multiparametric flow cytometry. Following monoclonal antibodies were used: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD3 (clone OKT3), allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD3 (clone OKT3), Pacific Blue-conjugated anti-CD4 (clone OKT4),

allophycocyanin cyanine 7 (APC-Cy7)-conjugated anti-CD8 (clone SK1), phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD25 (clone BC96), phycoerythrin cyanine 7 (PE-Cy7)-conjugated anti-CD25 (clone BC96), peridinin chlorophyll-protein complex cyanine 5.5 (PerCP-Cy5.5)-conjugated HLA-DR (clone L243) all from Biolegend). To measure cytokine secretion, activated T cells were re-stimulated with PMA/ionomycin (0,05µg/0,5µg/mL) for 4 hours in the presence of Brefeldin A (50µg/mL; was added 2 hours prior to staining). Cells were washed with 1X phosphate-buffered saline containing 1% fetal bovine serum (FBS). Cells were fixed and permeabilized using commercially available reagents according to manufacturer's instruction (IC fixation buffer and 10X permeabilization buffer, all from eBioscience). The following antibodies were used for intracellular staining: IFN-γ (APC) (Biolegend). For assessment of T cell activation following stimulation with irradiated peptide-loaded DCs, following monoclonal antibodies were used: Pacific blue-conjugated anti-CD3 (clone OKT3), PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD4 (clone OKT4)), APC-Cy7-conjugated anti-CD8, PE-Cy7-conjugated anti-CD45RA (clone HI100), FITC-conjugated anti-CD45RO (clone UCHL1), APC-conjugated anti-IFN-γ (clone 4S.B3). At least 1000 events were collected for each gated cell subset using FACS LSRII (BD Biosciences). Flow cytometry data were analyzed using FlowJo software Version 10 (TreeStar).

Cr⁵¹ cytotoxicity assay

To determine antigen specific cytotoxic activity, WT-1-expanded PD cells were plated together with Chromium51 (Cr⁵¹) loaded WT-1 expressing THP1 cells in round-bottom 96-well plates (Corning) at various ratios (50:1, 25:1, 12:1, 6:1) of responder to target cells (responder is PD cells and target is THP-1 cell line). WT-1 expressing THP-1 target cells were incubated for 90 minutes with 100µCi of Cr⁵¹ (Perkin Elmer) and washed to remove excess Cr⁵¹. Then, 1 x 10⁴ THP-1 were added to each well in final volume of 200 µL of complete medium. Plates were centrifuged at 500 rpm for 5min and incubated for 4 hours (37°C, 5% CO₂). At the end of the incubation period, plates were centrifuged at 1000 rpm for 5min. 150 µL of supernatant was transferred to microtubes (Bio-Rad) and Cr⁵¹ release was measured in a gamma counter. Minimum release was assessed by incubating THP-1

cells alone and maximum release, by adding 5N HCl to Cr51 loaded THP-1 cells. The specific lysis of target cells was assessed by using following formula:

$$\% \text{ Specific lysis} = \frac{\text{experimental value} - \text{minimum release}}{\text{maximum release} - \text{minimum release}} * 100$$

Statistical analysis

All experimental data were analysed with GraphPad Prism 5 software. Data significance was assessed using two-tailed Student's *t*-test. Significant results were considered when P values were <0,05.

Results

PD cells have the capacity to respond to priming stimulus

TH9402-mediated photodepletion is shown to eliminate GVHD causing activated T cells¹⁰. However, it is not clear if this mode of photodepletion spares anti-leukemia specific T cells. Thus the first aim of our study was to evaluate the capacity of PD cells to exhibit anti-leukemic cell specific immune activity. First, it was essential to test if these cells could respond to the same stimulus that was used to prime them prior to photodepletion. For this purpose, we employed the photodepletion protocol established in our lab that has been previously described. In brief, PBMCs from healthy donors were stimulated in a mixed lymphocyte reaction (MLR) with irradiated PBMCs of 5 mismatched healthy donors and incubated with 0,33 μ M of TH9402 for photodepletion and activated with the same stimulator (freshly isolated from the same donors and irradiated). For maximum activation before and after PD process irradiated stimulator consisted of a pool of PBMCs isolated from 5 different donors. To assess if PD restimulated cells displayed activation, we first looked at their sizes on a Forward Scatter (FSC-A) vs Side Scatter (SSC-A) plot using flow cytometry. After 3 days of re-stimulation of PD cells, we didn't observe any increase in cell size, meaning that there is no substantial activation of the lymphocytes, irrespective of the number of stimulator cells (Figure 1A). However, after 6 days of restimulation, we observed a strong tendency in the size increase of PD cells. Moreover, the frequency of activated T cells was further augmented when higher ratio of stimulator was used (4:1 ratio of stimulator to responder).

The above described results prompted us to investigate in-depth the activation state of the PD cells. To this end, we developed a culture system based on the ATIR clinical protocol that is used presently to treat leukemic patients receiving alloHSCT. PBMCs from a healthy donor (Donor A) were stimulated in MLR with irradiated PBMCs from a second healthy donor (subject B). After 4 days of incubation, alloreactive cells were photodepleted using 10 μ M of TH9402 (instead of 0.33 μ M used in ECP protocol). The photodepleted cells were re-stimulated with irradiated PBMCs of the same donor

(Subject B) or an unrelated third party constituted of 5 different donors (Figure 1B). The cultures were phenotyped after 6 and 9 days of incubation (3 day re-stimulation time point was not included as it did not show any T cell activation). As with ECP protocol, we noticed significant increase in the frequency and absolute number of activated T cells after 6 days of co-culture of PD cells re-stimulated with cells from the same donor. Interestingly, extending the culture for 9 days did not result in any further increase in the frequency or number of activated T cells and was comparable to 6 day culture. By using a 3rd party for stimulation of PD cells, we wanted to optimize our stimulation of those cells. This positive control allowed us to assess the activation of PD cells re-stimulated by same antigen party. As expected, the 3rd party re-stimulation allowed for superior proliferation of PD cells. Taken together, these results indicated that under extended culture conditions, PD cells can be activated by stimulator cells thus paving the way for further investigation of the functional potency of re-stimulated PD cells.

Restimulated PD CD4+ lymphocytes display activated phenotype

We then sought to characterize the subsets of T lymphocytes that were activated by such re-stimulation. Following ATIR protocol, we first analyzed the CD4+ T lymphocyte population. We determined the activation state of these cells by assessing surface expression of two widely accepted markers on that matter: CD25 and HLA-DR. In agreement with our previously published report, photodepletion of PBMCs post-MLR led to almost complete elimination of CD4+CD25+ activated cells (Figure 2A). Interestingly, after 6 days of re-stimulation with same stimulator, the frequency of activated CD4+CD25+ and CD4+CD25+HLA-DR+ T cells in PD population was increased (Figure 2A and D). Furthermore, this was reflected in ~2-fold increase in the absolute number of CD4+CD25+ cells (Figure 2B). Equally, 6 day re-stimulation culture that used third-party stimulator also showed increase in the frequency and absolute number of CD4+CD25+ and CD4+CD25+HLA-DR+ T lymphocytes (Figure 2A-D).

Re-stimulated PD CD8+ lymphocytes display an activated phenotype

We then sought to verify if CD8+ lymphocytes could also mount a response upon a second stimulation. Similarly to CD4+ T cells, photodepletion allowed for a significant decrease in CD8+CD25+ T cells (Figure 3A). However, stimulation using the same party antigen led to ~2-fold increase in both the frequency and absolute number of CD8+CD25+ population 6 days of re-stimulation after PD (Figure 3B-C), and increased further when analyzed at 9 days after re-stimulation. As for third-party stimulation, we observed an almost 3-fold increase in the frequency and 5-fold increase in the absolute number of CD8+CD25+ T cells 6 days of re-stimulation culture of PD compared to unstimulated PD cells. Furthermore, after 9 days of re-stimulation the frequency and absolute number of CD8+CD25+ T cells in the PD population continued to increase; compared to control 10-fold more cells were observed suggesting that PD cells are capable of strongly responding to a third-party stimulus as well (figure 3B-C).

We also analyzed HLA-DR expression on the CD8+CD25+ population. Similarly to CD25, HLA-DR was significantly upregulated 6 days after both types of antigenic re-stimulation (Figure 3D). Interestingly the absolute count of third-party stimulated cells showed a greater number of HLA-DR+ cells compared to same party stimulation. In regard to our previous results, our data indicate that PD lymphocytes retain the capacity to mount a response upon re-stimulation.

Prolonged re-stimulation of PD cells causes exhaustion like phenotype

It has been shown that a prolonged antigenic stimulation eventually leads to exhaustion of activated cells, which is associated with reduced anti-tumor activity and used as a poor prognosis marker in leukemia patients¹⁴⁻¹⁷. Thus, we wanted to verify if extending the culture period for PD cells was inducing T cell exhaustion. We used T-cell immunoglobulin and mucin 3 (TIM-3) as exhaustion marker. Interestingly, we observed an increased absolute number of TIM-3 expressing cells both in CD4+ T cells re-stimulated with same party cells and upon third party stimulation compared to CD4+ T cells in MLR after 6 and

9 days (Figure 4A-B). Similarly, TIM3 expression was increased in CD8+ lymphocytes upon antigen restimulation. Although, there is no significant differences between same antigen stimulation and 3rd party (Figure 4B). Taken together, these results indicate that antigenic re-stimulation may induce exhaustion in PD CD4+ and CD8+ T lymphocytes.

Re-stimulated PD cells respond to leukemic peptide WT-1

As PD cells are capable of responding to an allogenic stimulus, we then sought to guide the re-stimulation of PD cells towards mounting a cytotoxic response against a leukemia-specific peptide. We began by developing a culture system that would allow us to stimulate PD cells with a tumor antigen. We employed WT-1-derived peptide as WT-1 is overexpressed in approximately 80% of all AML cells and is partially responsible for tumor proliferation (Figure 5A)¹⁸. We did the same MLR procedure up until the day of photodepletion. In parallel, we isolated monocytes from the same donor used as stimulator and pulsed monocyte-derived DCs with a peptide pool encompassing the entire length of WT-1 protein (Figure 5A-B). After TH9402-induced photodepletion, PD cells were co-cultured with WT-1 pulsed DCs in the presence of stimulating cytokines for 7 days.

Analysis of PD cells re-stimulated with peptide pulsed DCs showed that this culture condition activated CD4+ T cells in PD population and increased the frequency of CD45RO expressing memory like cells with a concomitant decrease in CD45RA expressing naïve cells (Figure 5C). Similarly, for CD8+ lymphocytes, we observed a 3-fold decrease in the naive population. Interestingly, we identified the formation of an intermediate population of CD45RO cells, lying between naive and memory compartments. This intermediate population may represent CD8+ naive lymphocytes that are on their way to become memory like cells (Figure 5C). Indeed CD45RO+ cells demonstrated increased HLA-DR expression upon WT1 stimulation, confirming a change in their phenotype.

We also measured IFN- γ secretion in the PD CD45RO+ memory cells. We determined that addition of WT-1 peptide led to a 2-fold increase in both CD4+ and CD8+ memory cells

expressing IFN- γ (Figure 5D). We also compared IFN- γ secretion with PD only treated cells and assessed a 2-fold increase only by adding Mo-DCs alone that were not peptide pulsed. However, adding WT-1 pulsed Mo-DCs led to a 6-fold increase of IFN- γ secreting CD4+ lymphocytes and a 4-fold increase in CD8+ lymphocytes. These results indicate that PD cells can respond to WT-1 stimulation and generate functional CD4+ and CD8+ memory phenotype cells.

Re-stimulated PD cells have the potential to develop a specific cytotoxic response toward WT-1

We then sought to determine if PD cells could display cytotoxic activity toward WT-1 expressing cells, i.e., having the capacity to kill a WT-1 expressing leukemic cells. We used THP-1, which is a monocytic leukemic cell line with upregulated WT-1 expression as target¹⁸, in a Chromium-51 release assay. As expected, PD treatment led to a decrease in cytotoxic cells from the MLR condition (Figure 6). The addition of unpulsed DCs failed to increase anti-WT1 cytotoxicity, but exposure to WT-1 peptide pulsed DCs resulted in increased cytotoxicity to THP-1 cells. These data show that, upon exposure to tumor antigen, PD cells have the potential to mount a specific cytotoxic response against a leukemic cell line expressing this tumor antigen. However, THP-1 cell line express a large number of other antigens. To confirm the specific cytotoxic response, we could use a shRNA or even a CRISPR to silence WT-1 expression in our cell line. By combining those newly target cells in the Chromium-51 release assay, we would be able to determine that WT-1 specific lysis by PD cells is well founded.

Discussion

In this study, we have described a novel strategy for the preservation and testing of leukemia specific T cells following photodepletion. Indeed, we demonstrated that TH9402-mediated photodepletion led to preservation of a proportion of antigen-reactive T cells. Such T cells, both CD4+ and CD8+, displayed the potential to be re-stimulated following exposure to the same antigen that was used for primary stimulation. While exhaustion was observed primarily against upon restimulation with host antigens, anti-third party reactivity was preserved. We also showed that re-stimulating PD cells with a specific leukemic antigen stimulus (WT-1 peptide pulsed DCs) led to the expansion of functional cytotoxic memory like cells. Finally, we found that those cells could mount a cytotoxic response against a leukemic cell line expressing the same tumor antigen (WT-1).

Photodepletion treatment using the rhodamine derivative TH9402 provides an appealing alternative for the treatment of patients with chronic GVHD that are steroid refractory. It has been previously shown that this procedure allows for selective elimination of alloreactive (GVHD causing) cells while leading to the enrichment of regulatory CD4+ T cells¹⁰. Thus, patients could benefit from a dual anti-inflammatory effect of TH9402 treatment. Similarly, TH9402 photodepletion can be used for the prevention of GVHD in the context of haplo-identical stem cell transplantation¹². However, in both instances, GVL is also essential for the prevention of leukemia relapse. Since GVHD and GVL are tightly linked to one another, it is essential to investigate whether PD cells could fulfill both roles consisting in the prevention of uncontrolled inflammation as well as being able to kill residual leukemic cells. In an attempt to answer the latter notion we have developed a strategy for antigen specific re-stimulation following PDT that derives from ongoing clinical protocols.

Our first objective was to assess if PD cells retained the potential to become activated upon antigen restimulation. For the initial experiments, we increased antigenic activation by including 5 donors into a broad antigenic pool of cells. When lymphocytes become

activated, they enlarge due to increased metabolic activities^{19,20}. On a scattered plot based on size and granularity, higher values of FSC-A indicate bigger cellular bodies. We analysed re-stimulated PD cells at 3 and 6 days of culture by gating only the CD25 positive activated population. We found that PD cells have the potential to become activated following re-stimulation. However, the stimulus had to be stronger than for the primary activation (stimulator to responder ratio of 4:1 vs 1:1 for the primary activation in MLR) and required a longer period of incubation (6 to 9 days of re-stimulation instead of 4 days for the initial MLR). This could be explained by the fact that not all lymphocytes may become activated at the same time^{21,22}. The ones eliminated by PDT were likely the most alloreactive T cells expressing high affinity receptors for antigens, whereas the surviving residual T cells may express low affinity receptors, thus necessitating longer and stronger re-stimulation. Since our aim is to translate lab-based research to a clinical procedure involving only two parties (patient and donor), we modified our approach to a two-party system constituted of a donor A and a subject B. In this system, MLR and re-stimulation was done using cells from the same subject B. As a control, we also included re-stimulation with cells from third-party as a control. Similarly to what we have shown earlier, we found a 2-fold increase in viable cell count 6 days after PD when we re-stimulated with irradiated subject B cells and did not increase further in 9 day culture. However, we observed that the viable cell count was higher in both restimulation conditions compared to our MLR. Prior to PD treatment, some cells from our first MLR were kept separately. After PD treatment, we plated those cells alongside PD treated cells (negative control) and PD restimulated conditions. Therefore, we should consider that those cells were in MLR condition for a total of 10 to 13 days (4 days prior to PD and 6 or 9 days after). Even if we put new culture, those cells are probably exhausted and a large population is probably dead. This could explain the lower fold increase observed. A better comparative experiment would have been to start a new MLR the same day of PD. It will be interesting to determine in future experiments whether the increase following restimulation implies that PD cells proliferated upon the same or different antigenic stimulation.

Activation of lymphocytes is not only characterized by an increase in cell size but changes in phenotype as well. We analysed surface markers that are classically upregulated upon antigen stimulation. We selected CD25 and HLA-DR as activation markers for that purpose²³. Both markers were upregulated on CD4+ and CD8+ lymphocytes in PD population following re-stimulation with irradiated cells of subject B that were also used for MLR. There was only a marginal increase in CD4+CD25+, but not CD8+CD25+, PD cells indicating lack of any significant proliferation during 6 days re-stimulation culture of PD cells. Alternatively, the increase in CD4+CD25+ cells may represent an increase in regulatory T cells. Expression of FoxP3 as well as functional inhibitory assays are required to determine which proportion of these cells reflects Treg expansion. One possible reason for lack of proliferation could be that prolonged antigen exposure is known to cause CD4+ and CD8+ T cell exhaustion. While the absolute numbers of CD4+ and CD8+ PD cells expressing TIM-3, a marker of T cell exhaustion^{17,24}, were not elevated significantly in 6 day re-stimulation culture, they were significantly higher in the longer (9 day) re-stimulation culture condition. This observation has an important clinical implication as too much activation may impair PD cells' capacity to mount an effective response against leukemic cells as they would eventually enter an early stage of apoptosis. Based on these results, we propose that 6 day of re-stimulation is ideal for optimal activation of CD4+ and CD8+ PD cells. More detailed study employing other exhaustion markers such as PD-1 and LAG-3 is warranted to determine the extent of T cell exhaustion in re-stimulated PD cells.

The second objective of this study was to find a procedure allowing us to activate PD cells against a specific antigen preferentially expressed on leukemic cells. The protein WT-1 was selected as it is overexpressed in as many as 80% of AML. To achieve tumor antigen specific activation of PD cells, we used dendritic cells from subject B that were pulsed with a WT-1 peptide pool. Using this approach, we observed a significant decrease in CD45RA+ naïve CD4+ PD cells and a corresponding increase in CD45RO+ memory like cells. In CD8+ PD cells the transition from naïve to memory-like phenotype appeared delayed and resulted in the appearance of large number of intermediate population. We also found that those WT-1 stimulated memory CD4+ and CD8+ cells expressed 2-fold more IFN- γ , a

major cytokine secreted in Th1 response and cytotoxicity^{25,26}. We also demonstrated that WT-1 peptide pool immunization lead to a 3-fold increase of memory cells expressing IFN- γ compared to DCs alone and up to 6-fold increase compared to PD cells alone. These data suggest that PD cells not only recognize allogeneic cells but can mount an effective response to a specific antigen presented by the same allogeneic cells. To confirm this hypothesis, we utilized a Cr⁵¹ release assay to test the cytotoxic function of PD cells. PD cells stimulated with WT-1 pulsed DCs had the capacity to lyse THP-1 cells. However, it seems that PD cells alone cannot mediate any GVL activity. Regarding previously described clinical results showing close to none relapse of patients, this could indicate that PD cells are likely to preserve some alloreactivity. We could benefit from this assumption by focusing this potential alloreactivity against a leukemic target. Be that as it may, to be clinically more relevant, we should do this experiment again by using patient cells (prior to conditioning) and leukemic blasts from the same patient. In the same way, we should transpose this system into a mouse model to assess if restimulated PD cells can cause any GVHD. Nonetheless, further modifications of our method could be considered to optimise the cytotoxic response. We could pulse DCs multiple times instead of once with the peptides, addition of freshly prepared DCs during the culture or even consider matching a particular WT-1 peptide specific for an HLA as it has been demonstrated that many WT-1 peptides have stronger affinity for HLA-A0201, HLA-DR and HLA-DP^{27,28}.

In conclusion, re-stimulation of PD cells with the same party irradiated cells allowed the generation and proliferation of activated cells. The CD4+ and CD8+ PDT lymphocytes that had been re-stimulated showed greater expression of CD25 and HLA-DR, two T-cell activation markers. However, to achieve this state, PD cells needed longer and stronger antigen stimulus which may reflect either a lower number of responding cells or response to an antigen distinct from the initial immunizing antigen. Prolonged stimulation also appeared to lead to T cell exhaustion. Further markers are needed to characterize these cells exhaustion status. PD cells successfully responded to WT-1, a tumor specific antigen associated with AML. Those cells displayed functional cytotoxic capabilities as they produced appreciable amounts of IFN- γ . The PD cells also killed WT-1 expressing THP-1

leukemic cells. Taken together, our results demonstrate the relative plasticity of PD cells where treatment conditions can be modified to generate cytotoxic effector cells targeting a specific leukemic antigen. This approach could pave the way to an improved personalized treatment for patients in order to increase the GVL effect while tampering GVHD.

References

1. Ratanatharathorn, V., Ayash, L., Lazarus, H., Fu, J. & Uberti, J. Mini-review Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. *Bone Marrow Transplant.* **28**, 121–129 (2001).
2. Barrett, a J. & Battiwalla, M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev. Hematol.* **3**, 429–441 (2012).
3. Rambaldi, a, Biagi, E., Bonini, C., Biondi, a & Introna, M. Cell-based strategies to manage leukemia relapse: efficacy and feasibility of immunotherapy approaches. *Leukemia* **29**, 1–10 (2014).
4. Markey, K. a, Macdonald, K. P. a & Hill, G. R. The biology of graft-versus-host disease : experimental systems instructing clinical practice *Hematology* **124**, 354–362 (2014).
5. Bleakley, M. & Riddell, S. R. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 371–380 (2004).
6. Van Der Straaten, H. M., Fijnheer, R., Dekker, A. W., Karel Nieuwenhuis, H. & Verdonck, L. F. Relationship between graft-versus-host disease and graft-versus-leukaemia in partial T cell-depleted bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol.* **114**, 31–35 (2001).
7. Jones, S. C., Murphy, G. F. & Korngold, 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. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **9**, 243–256 (2003).
8. Slavin, S., Ackerstein, A., Naparstek, E., Or, R. & Weiss, L. The graft-versus-leukemia (GVL) phenomenon: is GVL separable from GVHD? *Bone Marrow Transpl.* **6**, 155–

161 (1990).

9. Guimond, M. *et al.* P-glycoprotein targeting: A unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood* **100**, 375–382 (2002).
10. Bastien, J. *et al.* cells from patients with chronic graft-versus-host disease Photodepletion differentially affects CD4⁺ Tregs versus CD4⁺ effector T cells from patients with chronic graft-versus-host disease. **116**, 4859–4869 (2011).
11. Boumédine, R. S. & Roy, D. C. Elimination of alloreactive T cells using photodynamic therapy. *Cytotherapy* **7**, 134–143 (2005).
12. Roy, D.-C. *et al.* Haploidentical Stem Cell Transplantation: High Doses of Alloreactive-T Cell Depleted Donor Lymphocytes Administered Post-Transplant Decrease Infections and Improve Survival without Causing Severe Gvhd. *ASH Annu. Meet. Abstr.* **114**, 512 (2009).
13. Janelle, V., Carli, C., Taillefer, J., Orio, J. & Delisle, J.-S. Defining novel parameters for the optimal priming and expansion of minor histocompatibility antigen-specific T cells in culture. *J. Transl. Med.* **13**, 123 (2015).
14. Zuniga, E. I. & Harker, J. A. T-cell exhaustion due to persistent antigen: Quantity not quality? *European Journal of Immunology* **42**, 2285–2289 (2012).
15. Yi, J. S., Cox, M. A. & Zajac, A. J. T-cell exhaustion: Characteristics, causes and conversion. *Immunology* **129**, 474–481 (2010).
16. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 486–499 (2015).
17. Wherry, E. J. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **12**, 492–499 (2011).
18. Rosenfeld, C., Cheever, M. a & Gaiger, A. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of

- WT1 targeted therapies. *Leukemia* **17**, 1301–12 (2003).
19. Grumont, R. *et al.* The mitogen-induced increase in T cell size involves PKC and NFAT activation of Rel/NF- κ B-dependent c-myc expression. *Immunity* **21**, 19–30 (2004).
 20. Teague, T. K., Munn, L., Zygourakis, K. & McIntyre, B. W. Analysis of lymphocyte activation and proliferation by video microscopy and digital imaging. *Cytometry* **14**, 772–782 (1993).
 21. Stone, J. D., Chervin, A. S. & Kranz, D. M. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology* **126**, 165–176 (2009).
 22. Martinez, R. J. & Evavold, B. D. Lower affinity T cells are critical components and active participants of the immune response. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
 23. Caruso, A. *et al.* Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* **27**, 71–76 (1997).
 24. Ferris, R. L., Lu, B. & Kane, L. P. Too Much of a Good Thing? Tim-3 and TCR Signaling in T Cell Exhaustion. *J. Immunol.* **193**, 1525–1530 (2014).
 25. Romagnani, S. Th1/Th2 cells. *Inflamm. Bowel Dis.* **5**, 285–294 (1999).
 26. Bradley, L. M., Dalton, D. K. & Croft, M. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J. Immunol.* **157**, 1350–8 (1996).
 27. Weber, G. *et al.* Generation of multi-leukemia antigen-specific T cells to enhance the graft-versus-leukemia effect after allogeneic stem cell transplant. *Leukemia* **27**, 1538–47 (2013).
 28. Rezvani, K. *et al.* T-cell responses directed against multiple HLA-A*0201-restricted epitopes derived from Wilms' tumor 1 protein in patients with leukemia and healthy donors: Identification, quantification, and characterization. *Clin. Cancer*

Res. 11, 8799–8807 (2005).

Figure legends

Figure 1: PD cells have the capacity to respond to priming stimulus

(A; up) Culture method of ECP protocol has been previously described. However, we cocultured PBMCs from a healthy donor A and irradiated PBMCs from healthy 5 donor pool for the MLR. For second stimulation following PD treatment, the same pool of donor cells was irradiated and used. PD cells were mixed with irradiated cells in ratios of 1:1 and 4:1. After 3 and 6 days, activation of lymphocytes was assessed using flow cytometry using BD LSR II (n=4). (A; down) Compilation of the analysis of lymphocyte activation. (B) Translation of ECP PD protocol to ATIR protocol. Briefly, PBMCs from a healthy donor A were mixed with 60Gy irradiated cells from an healthy donor B in a MLR for 4 days. On PD treatment day, cells were first incubated with 10 μ M of TH9402 for 40 minutes followed by 90 minute extrusion period. MLR cells were treated by visible light exposure. PD cells culture was continued with or without stimulation. Stimulator cells, either the same irradiated cells from subject B (freshly isolated and irradiated) or pool of cells from 5 donors, were added at a 4:1 ratio (stimulator:PD cells). We analysed cell activation after 3, 6 and 9 days of co-culture by flow cytometry using BD LSR II. (C) Before staining, viable cells were counted by trypan blue. To obtain fold increase of cells, we did a ratio of the final count divided by the initial number of cells plated (n=11 for 6 days and n=6 for 9 days). * $P > ,05$, ** $P > ,01$ and *** $P > ,001$.

Figure 2: Re-stimulated PD CD4+ lymphocytes display activated phenotype

Following the ATIR method described above, we assessed the activation of re-stimulated CD4+ PD lymphocytes. (A) CD25 expression on CD4+ PD cells was determined after 6 and 9 days of re-stimulation. Control conditions are MLR (activated control) and PDT (treated but not re-stimulated control). PD cells were re-stimulated with irradiated cells of the same party (SP) or third-party (3rd P) origin. (B) shows compilation of CD25 expression analysis. The analysis was done both in frequency and in absolute count of CD4+CD25+ cells. (C) The frequency and the absolute count of CD25+ expressing CD4 cells in PD were compared to control cultures for the indicated time points shown in B. (D) HLA-DR

expression was determined by analysing the CD4+CD25+ population (results from 8 independent experiments, n=8 for day 3, n=15 for day 6 and n=11 for day 9). * $P > ,05$, ** $P > ,01$ and *** $P > ,001$.

Figure 3: Re-stimulated PD CD8+ lymphocytes display activated phenotype

Following the ATIR method described above, we assessed the activation of re-stimulated CD8+ PD lymphocytes. (A) CD25 expression was determined on the CD8+ PD population 6 and 9 days after re-stimulation. Control conditions are MLR (activated control) and PDT without re-stimulation (treated control). PD cells were re-stimulated with the same party (SP) or third-party (3rd P). (B) Compilation of CD25 expression analysis. The analysis was done both in frequency and in absolute count of CD8+CD25+ cells. (C) The frequency and the absolute count of CD25+ expressing CD8 cells were compared for the same party and third-party stimulation at the three time points shown in B. (D) HLA-DR expression was determined by analysing the CD8+CD25+ population (results from 8 independent experiments, n=5 for day 3, n=10 for day 6 and n=8 for day 9). * $P > ,05$, ** $P > ,01$ and *** $P > ,001$.

Figure 4: Prolonged stimulus possibly leads to exhaustion of restimulated PD cells

To determine if re-stimulated PDT cells show signs of exhaustion, same ATIR method was used. (A) TIM-3 expression was analysed 6 days (top panels) and 9 days (bottom panels) after PDT on CD4+CD45RO+ cells in absolute count. (B) TIM-3 expression was analysed at the indicated time points after PDT on CD8+CD45RO+ cells, both in the frequency and absolute count (results from 2 independent experiments, n=3). * $P > ,05$.

Figure 5: Re-stimulated PD cells respond to leukemic peptide WT-1

Some modifications of ATIR method have been performed with the aim of stimulating PD cells using tumor specific antigens. (A-B) In parallel of the MLR, monocytes-derived dendritic cells from subject B were cultured and pulsed during maturation with the WT-1 peptide pool for 2 hours. After photodepletion, PD cells were cocultured with 40Gy

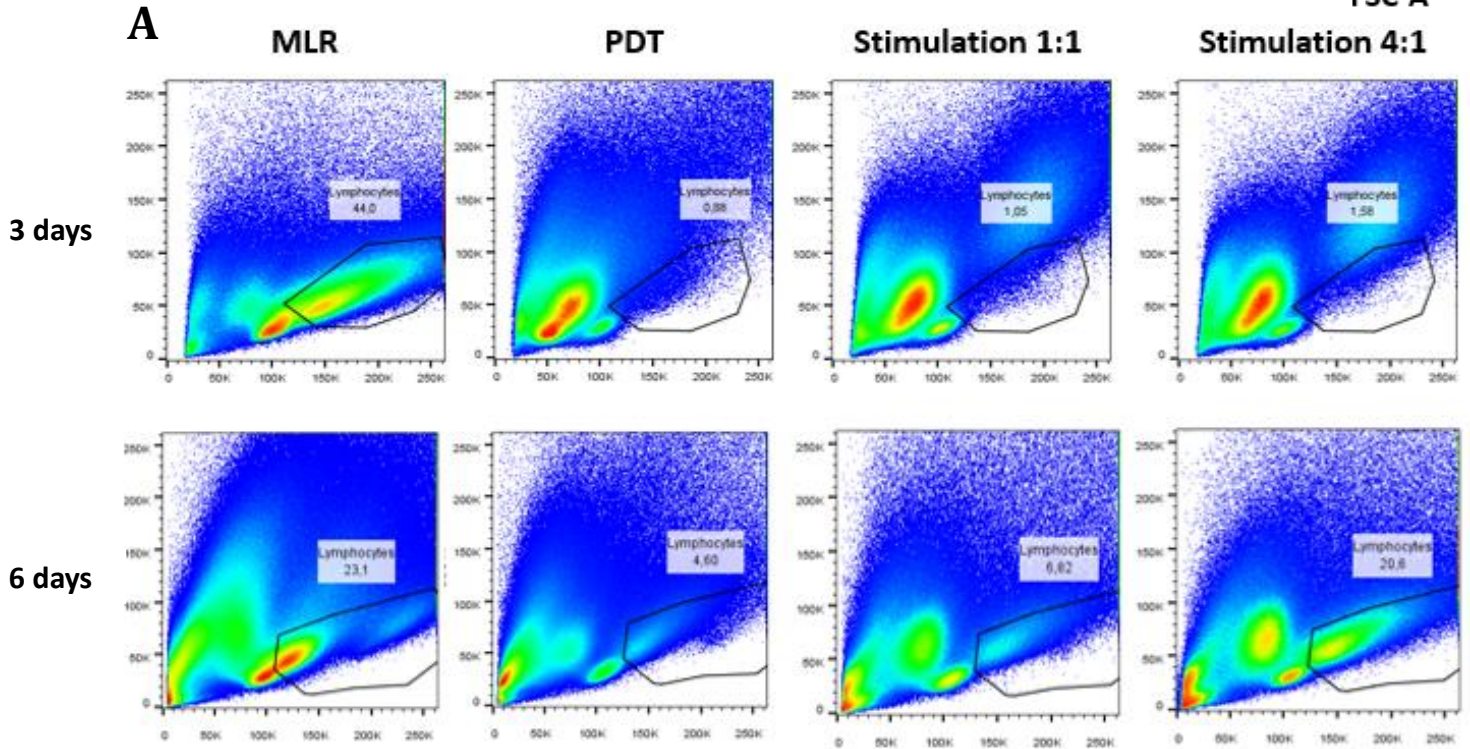
irradiated Mo-DCs pulsed with peptides or not (DMSO control). The cultures were done firstly in G-Rex10, then in adherent 6-well plates for 7 days and supplemented with cytokines. At the end of the coculture, cells were used for flow cytometry (BD LSR II) and cytotoxic assay in Chromium-51 release assay. (C) For the cytometry part, CD4+ and CD8+ cells were divided into naive (CD45RA) and memory (CD45RO) phenotypes. HLA-DR expression was measured on CD45RA and CD45RO gated subsets. (D) Functionality of memory CD4+ and CD8+ lymphocytes was determined by looking at the IFN- γ secretion of memory cells. The population of memory cells expressing IFN- γ doubles when adding WT-1 peptide pool. (E) IFN- γ secretion was also determined on memory CD4+ and CD8+ lymphocytes cultured in adherent 6-well plates. Like with the ATIR method, MLR (activation control) and PDT unstimulated (treated control) were kept in addition to re-stimulation conditions (DCs +/- WT-1 peptide pool). Here again, we observed an increase in memory cells expressing IFN- γ (2 independent experiments, n=2).

Figure 6: Re-stimulated PD cells have the potential to develop an antigen specific cytotoxic response toward WT-1

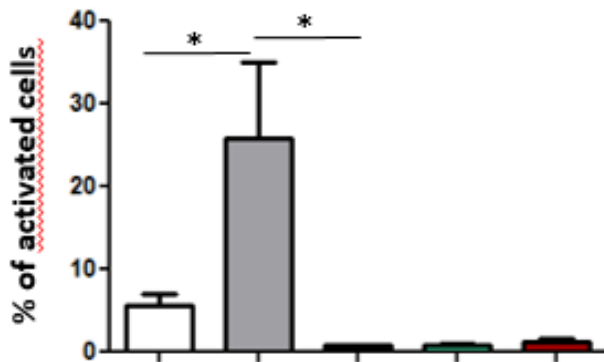
Chromium-51 release assay was executed using effector cells (MLR, PDT, PDT + DCs, PDT+DCs+WT-1) and a WT-1 expressing target cell line (THP-1) at various ratios (100:1, 50:1, 25:1, 12:1 and 6:1). (A) 50:1 ratio gave the most potent response. (B) Compilation of the % of THP-1 specific lysis (2 independent experiments, n=5). * $P > ,05$.

Figure 1: PD cells have the capacity to respond to same antigen stimulus

SSC-A ↑
FSC-A →

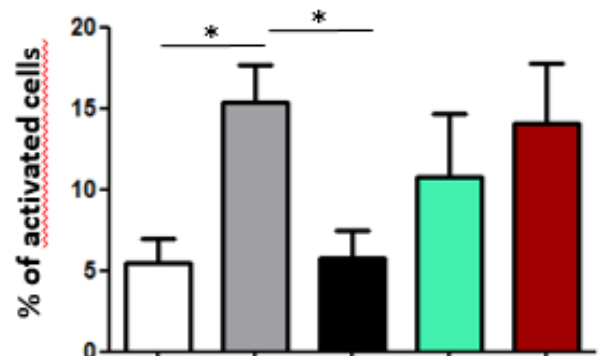


Day 3 Post PDT



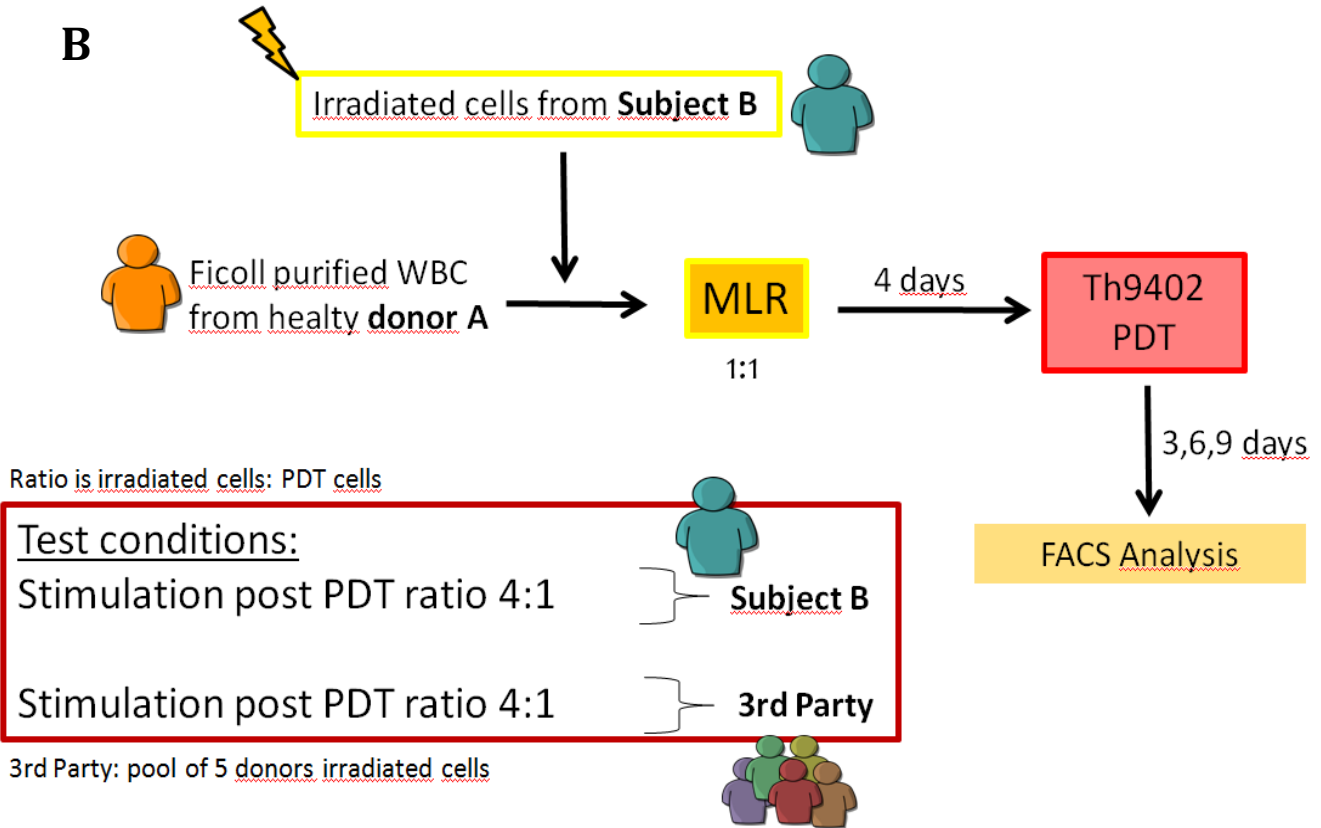
No MLR	+	-	-	-	-
MLR	-	+	+	+	+
PDT	-	-	+	+	+
Stimulation 1:1	-	-	-	+	-
Stimulation 4:1	-	-	-	-	+

Day 6 Post PDT



No MLR	+	-	-	-	-
MLR	-	+	+	+	+
PDT	-	-	+	+	+
Stimulation 1:1	-	-	-	+	-
Stimulation 4:1	-	-	-	-	+

B



C

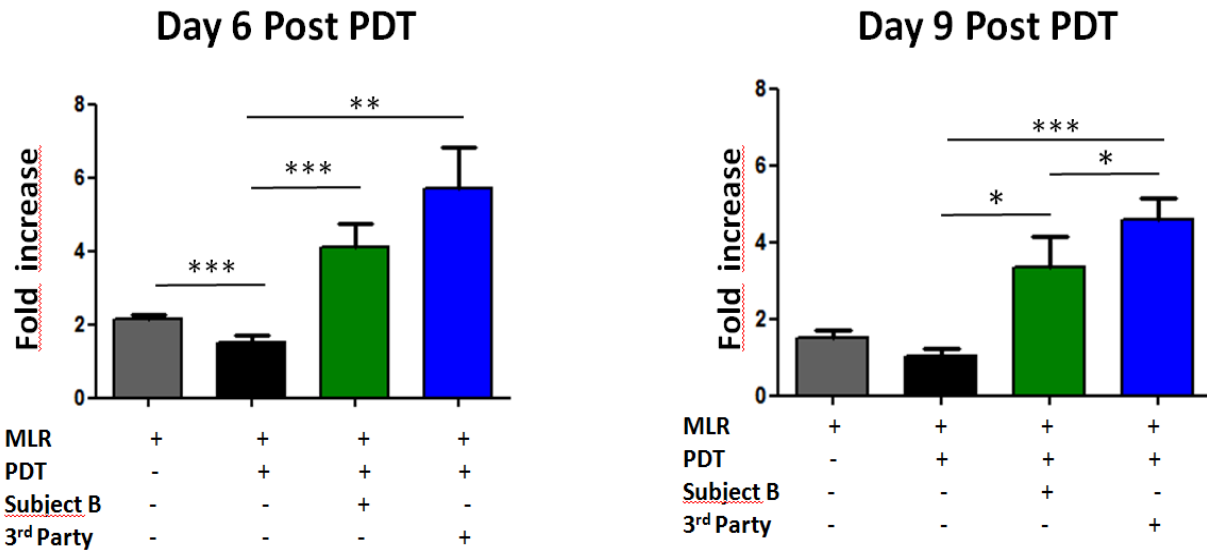
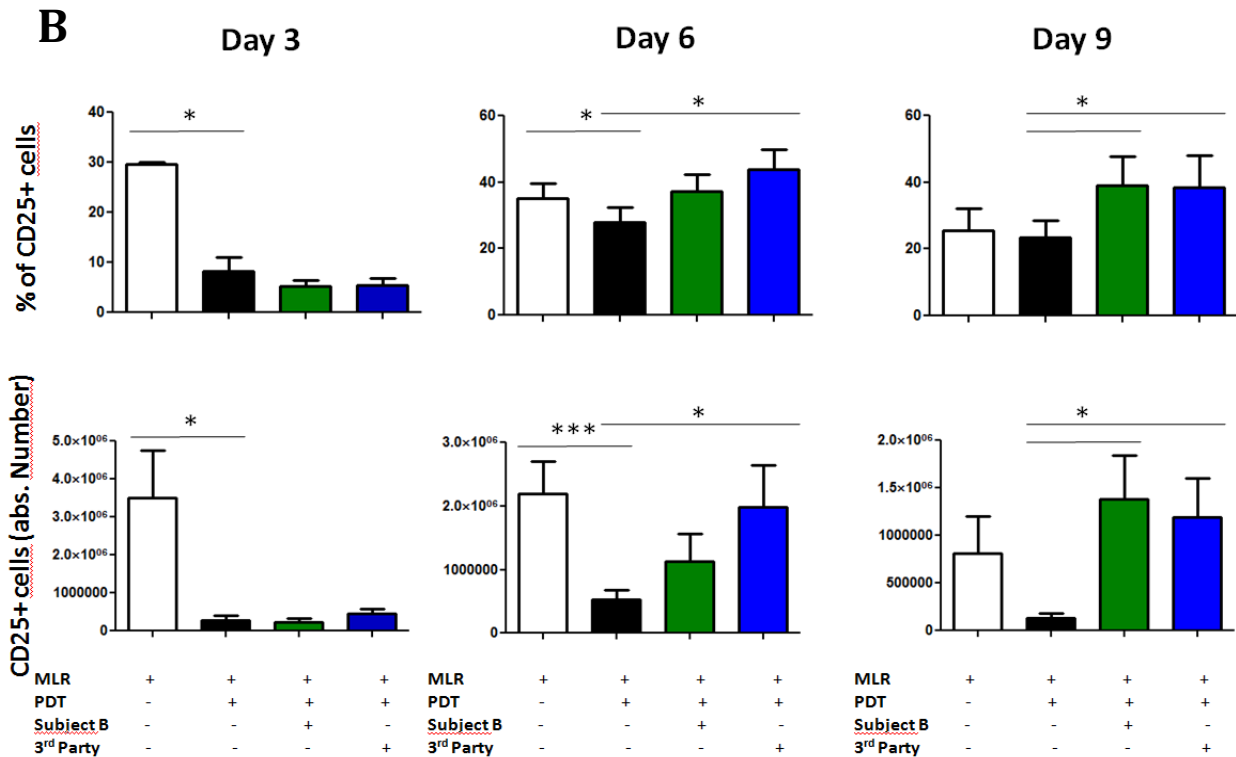
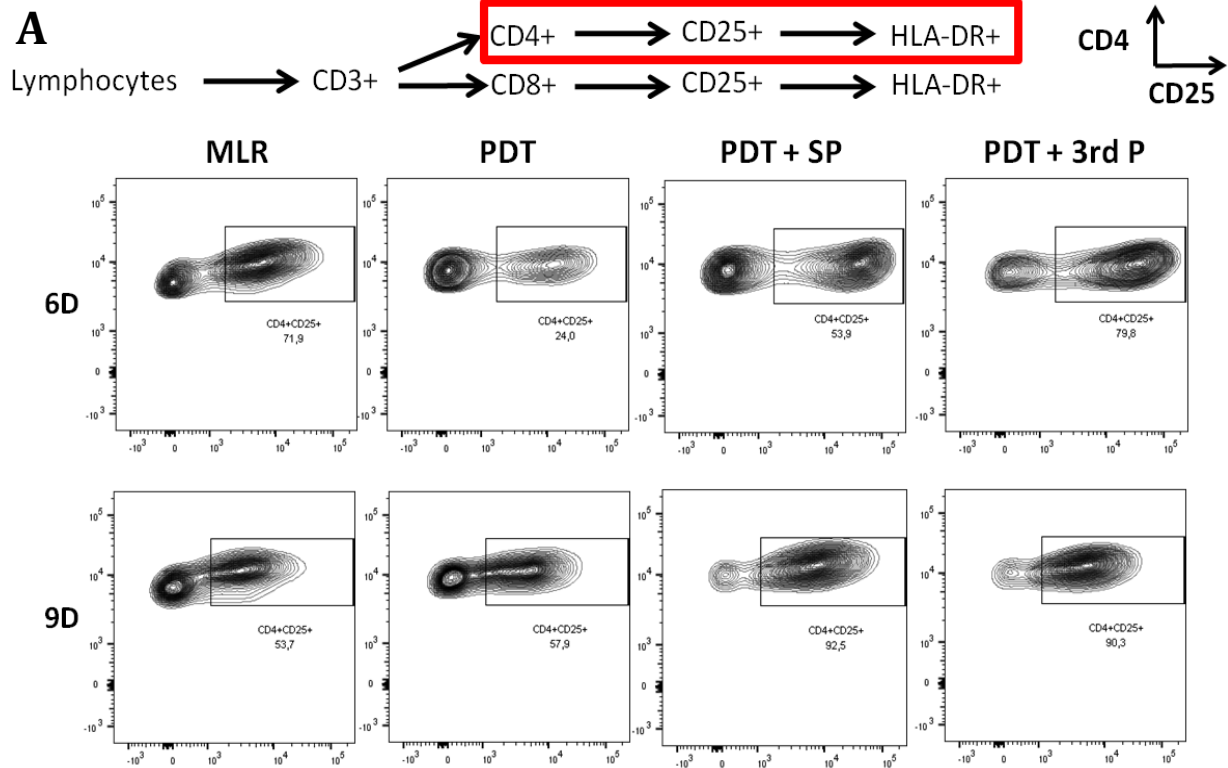
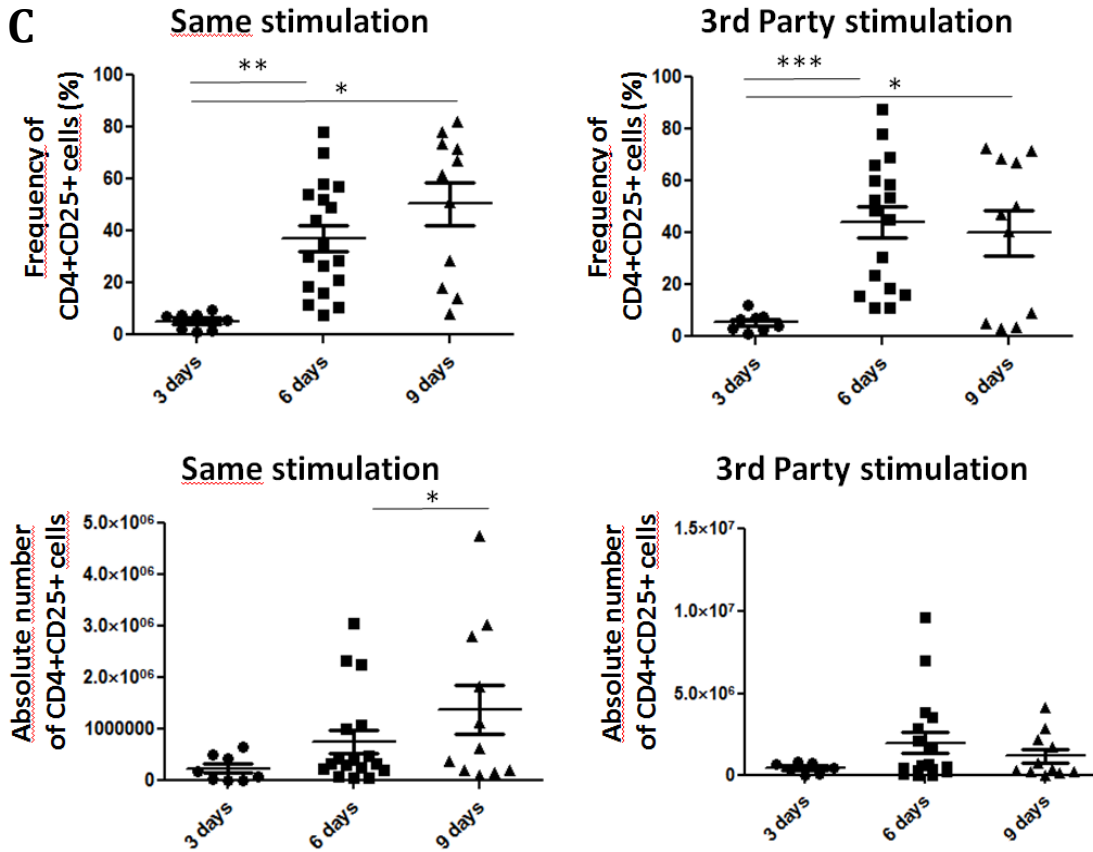


Figure 2: Restimulated PD CD4+ lymphocytes display activated phenotype



C



D

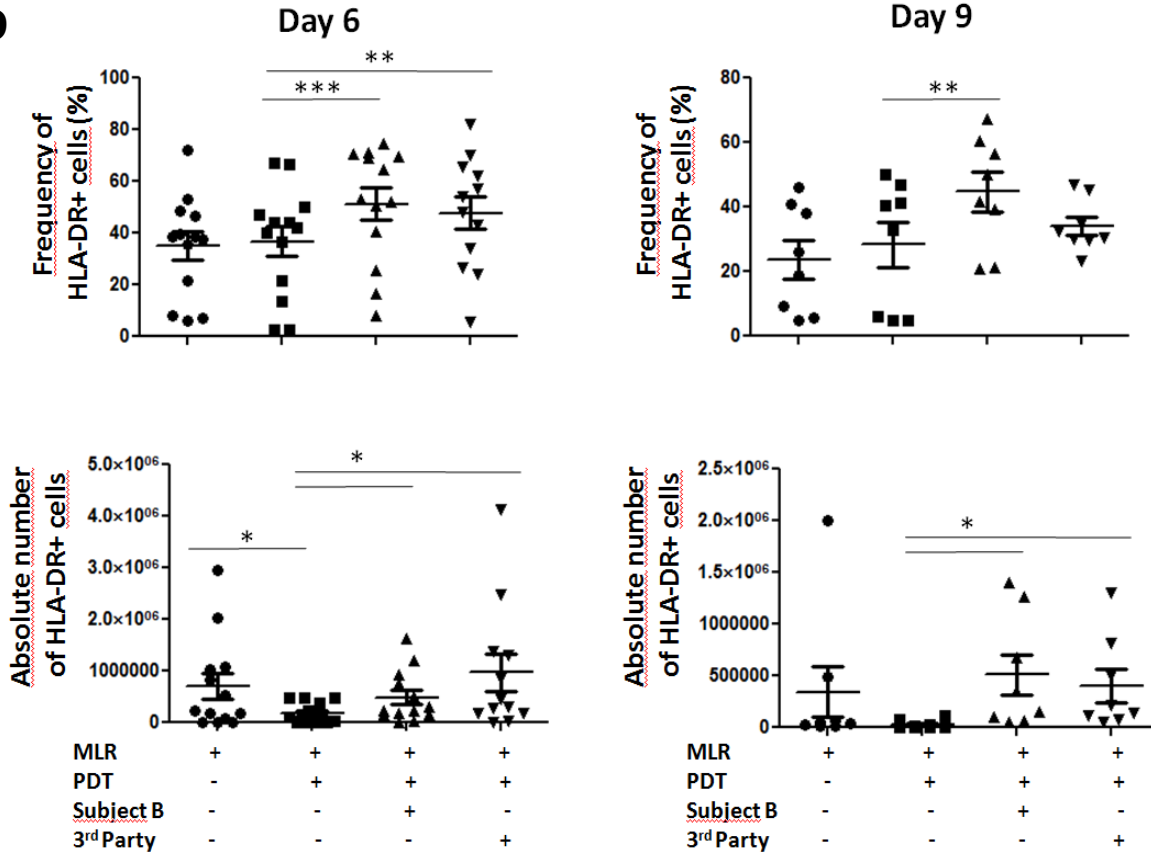
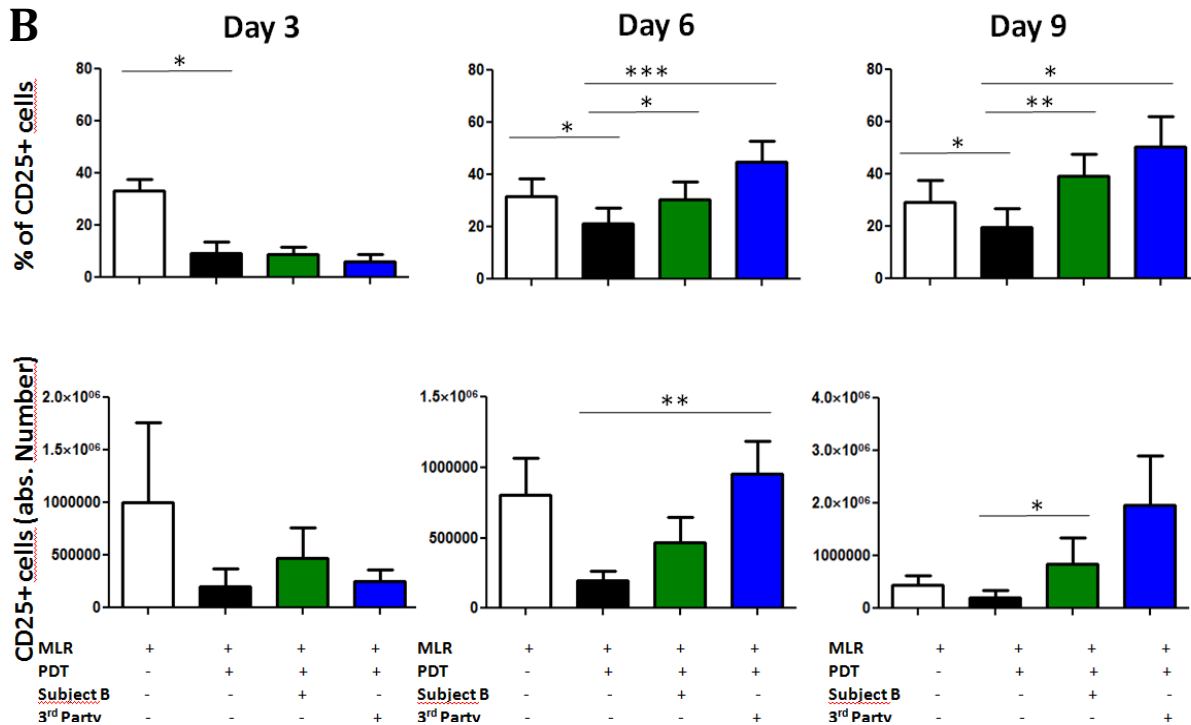
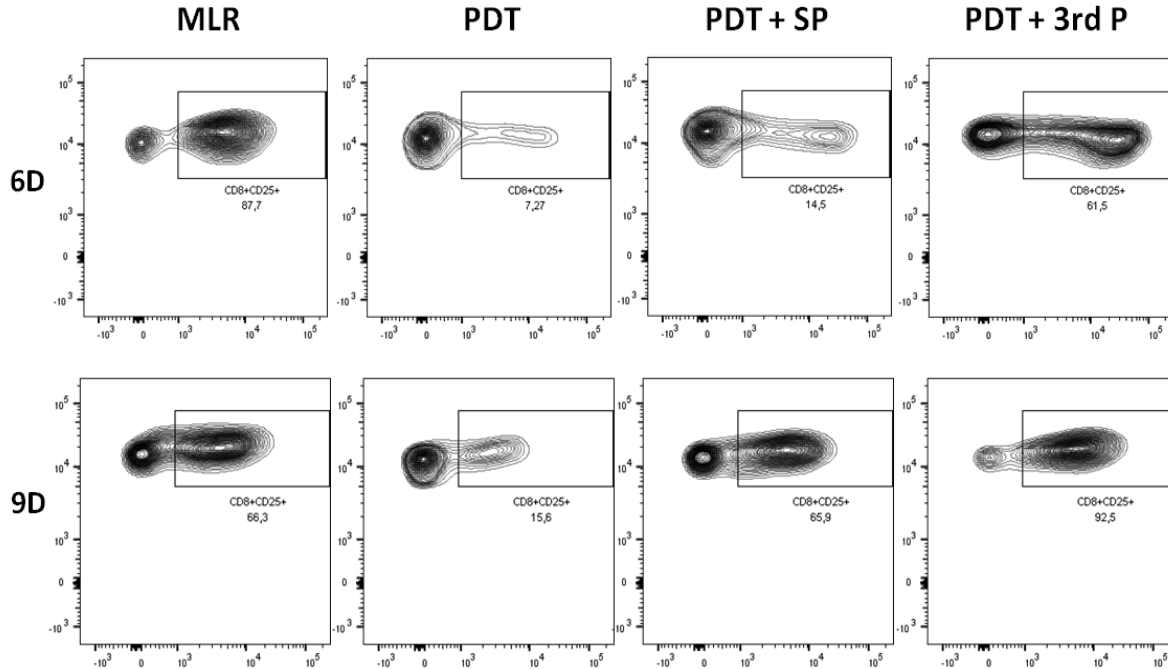
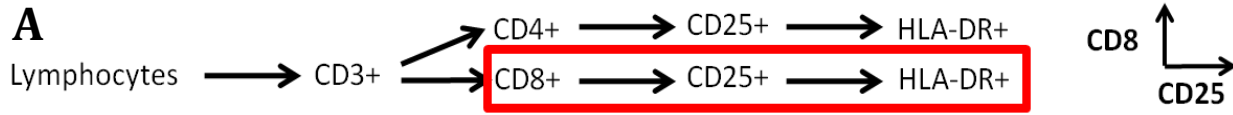
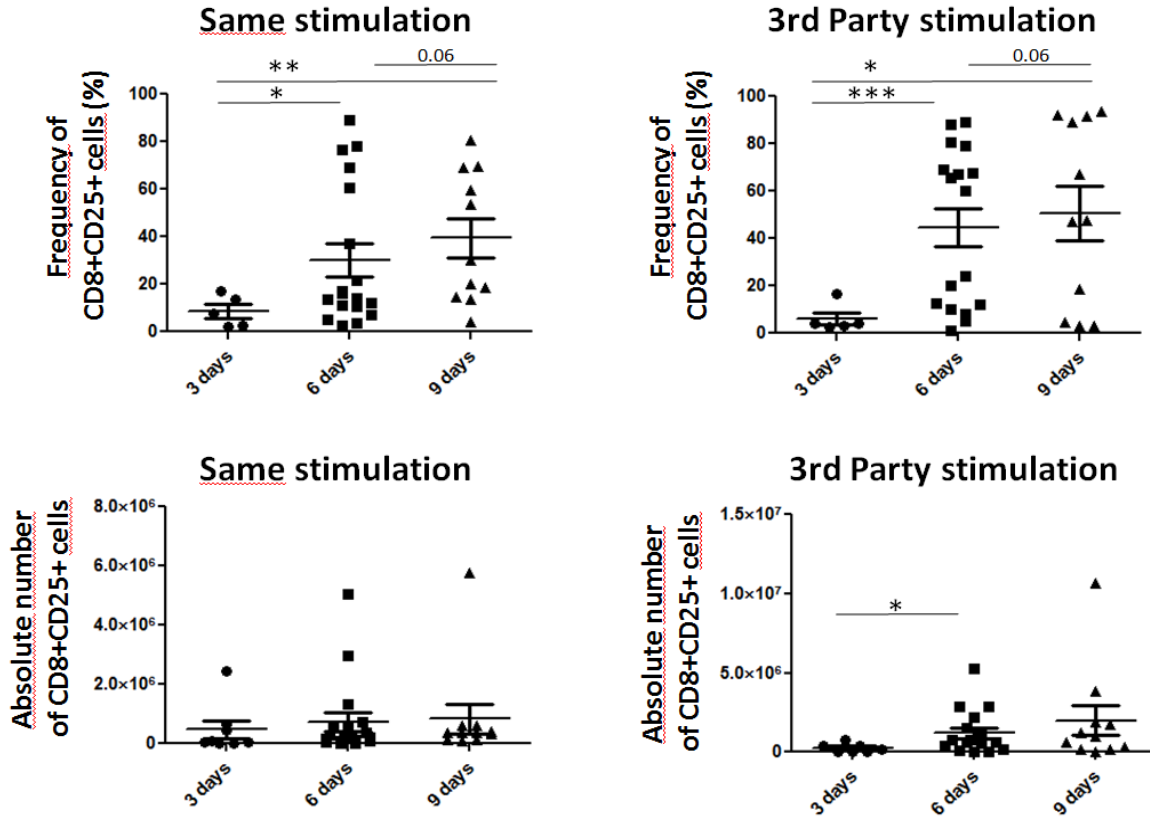


Figure 3: Restimulated PD CD8+ lymphocytes display activated phenotype



C



D

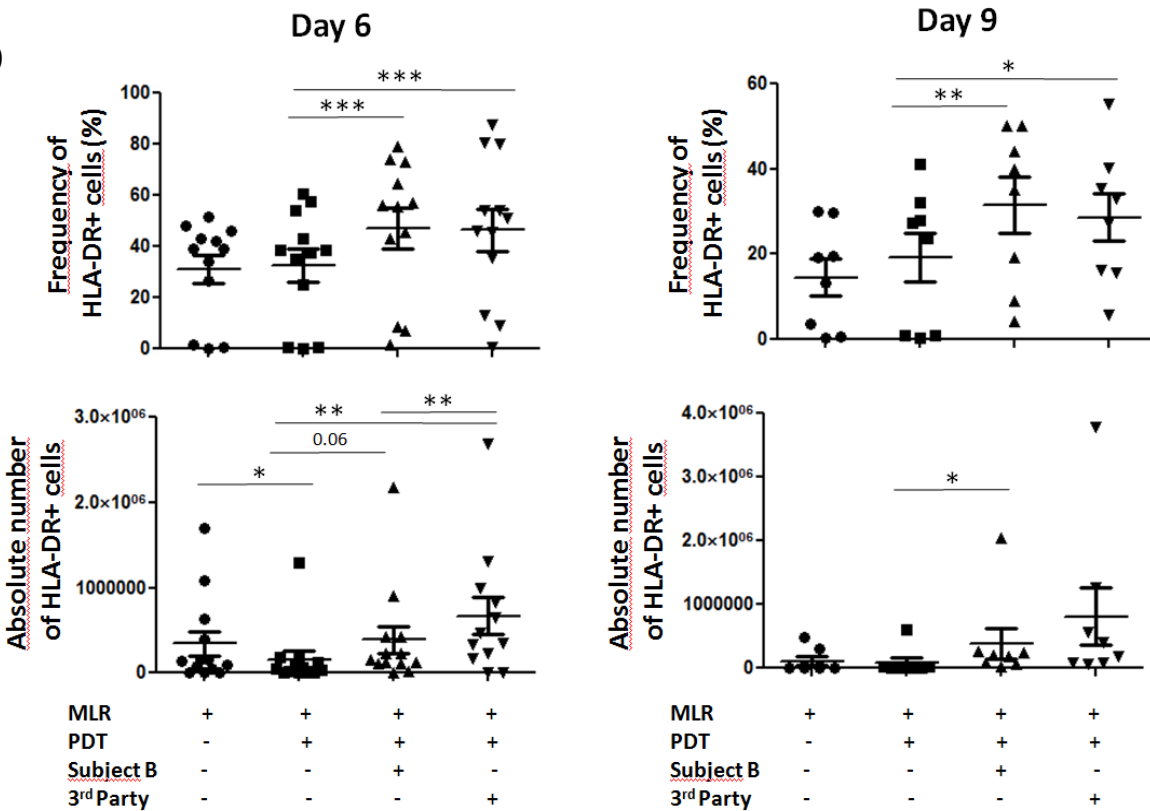
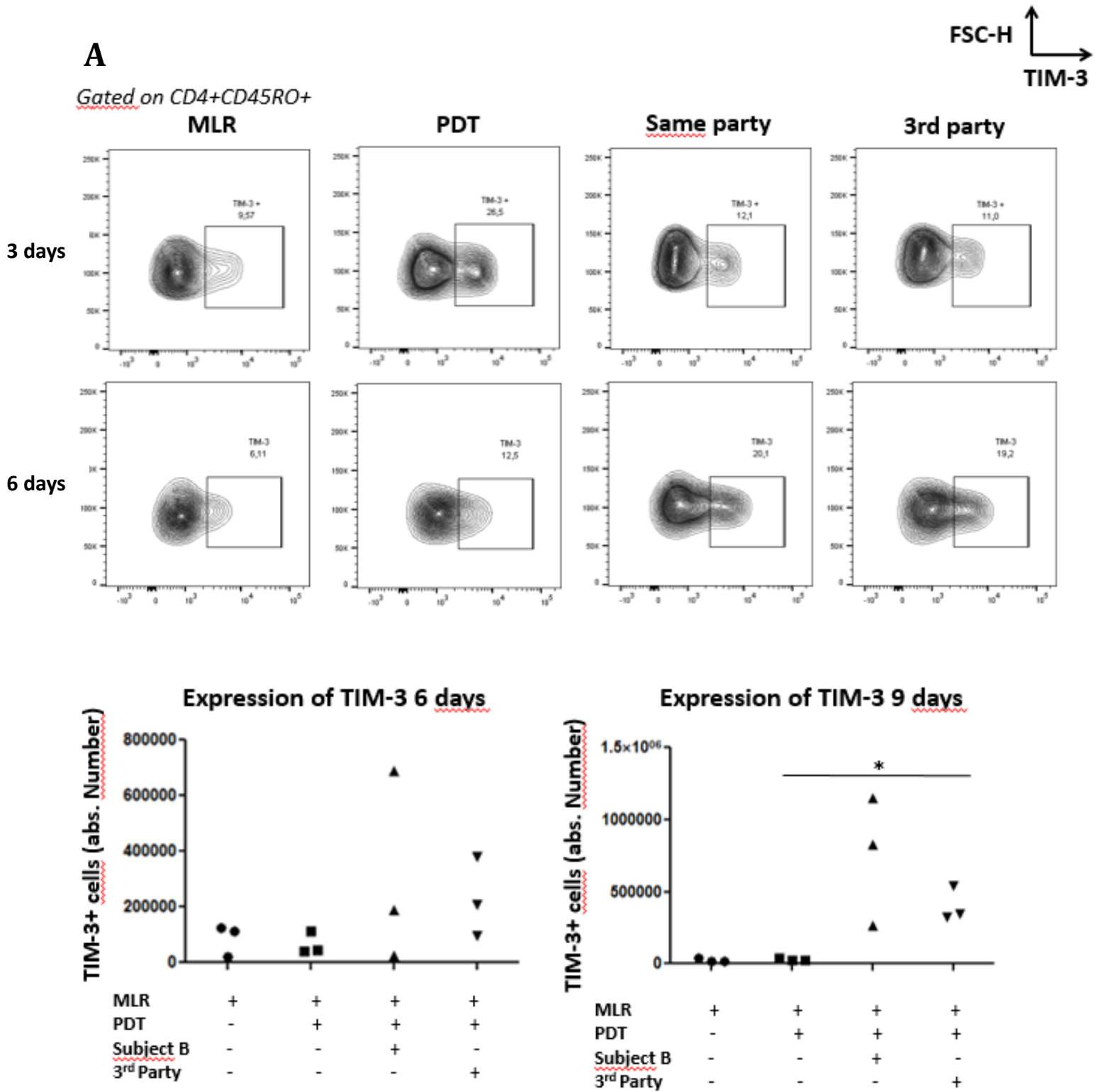


Figure 4: Prolonged stimulus possibly leads to exhaustion of restimulated PD cells



B

Gated on CD8+CD45RO+

FSC-H ↑
TIM-3 →

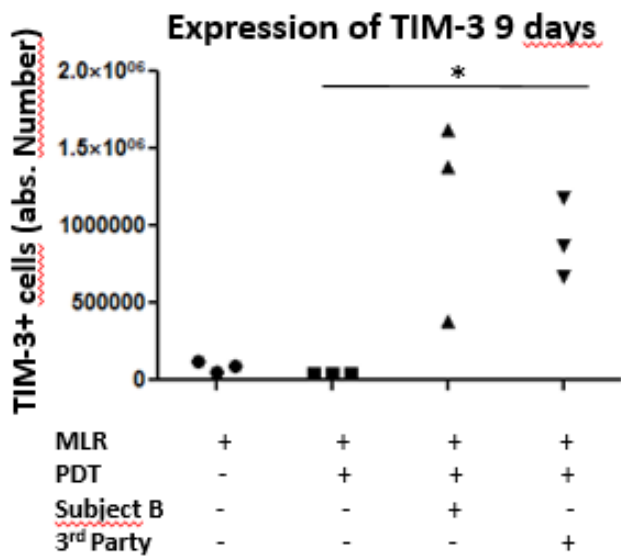
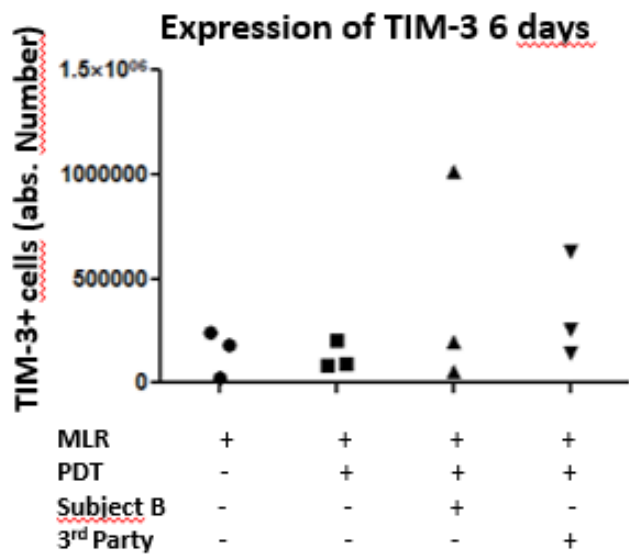
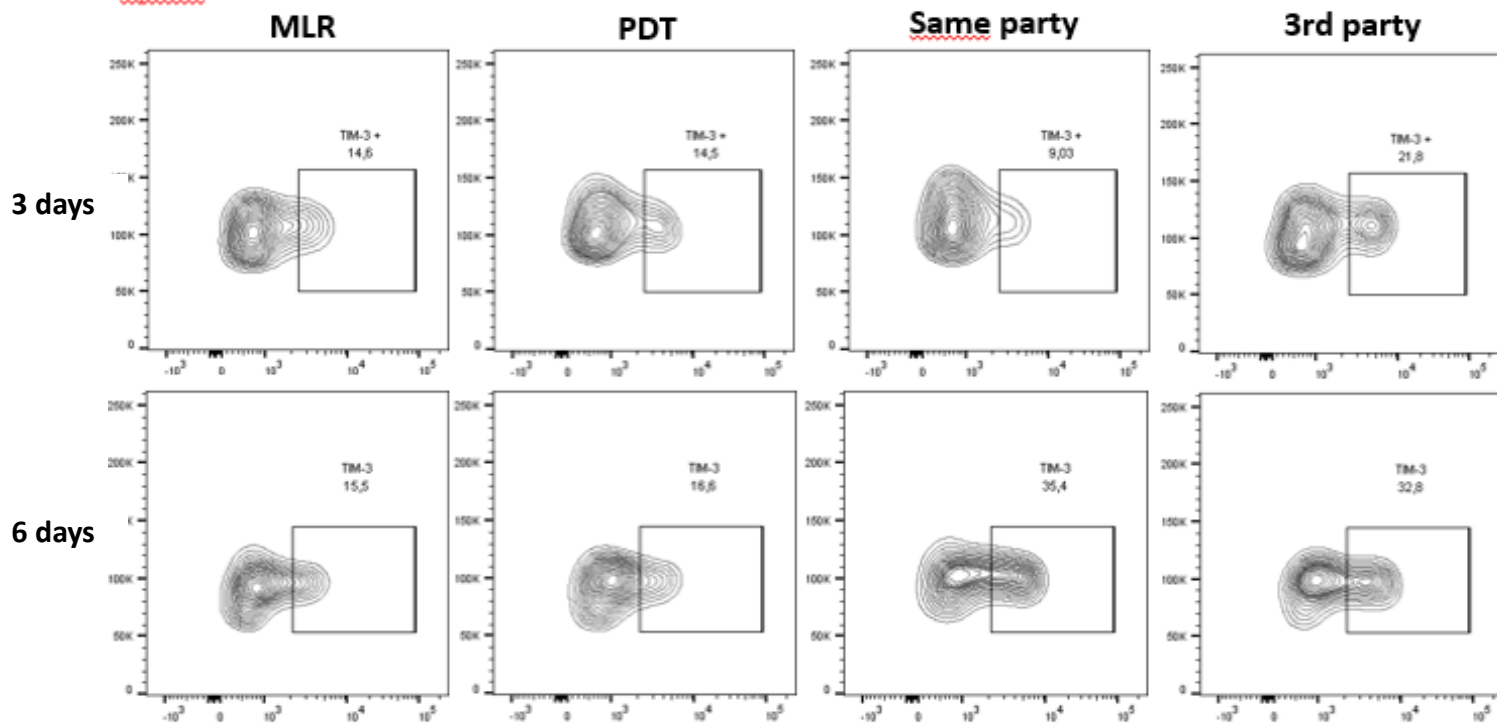
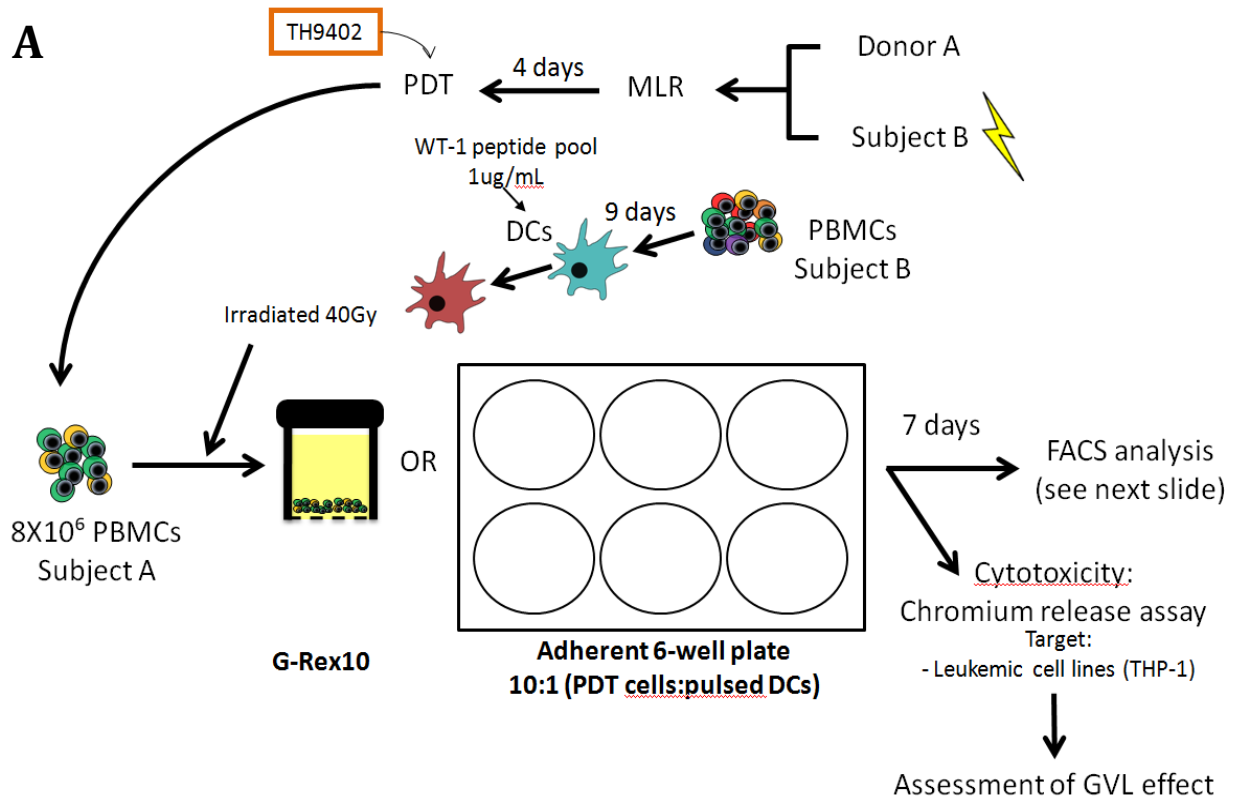
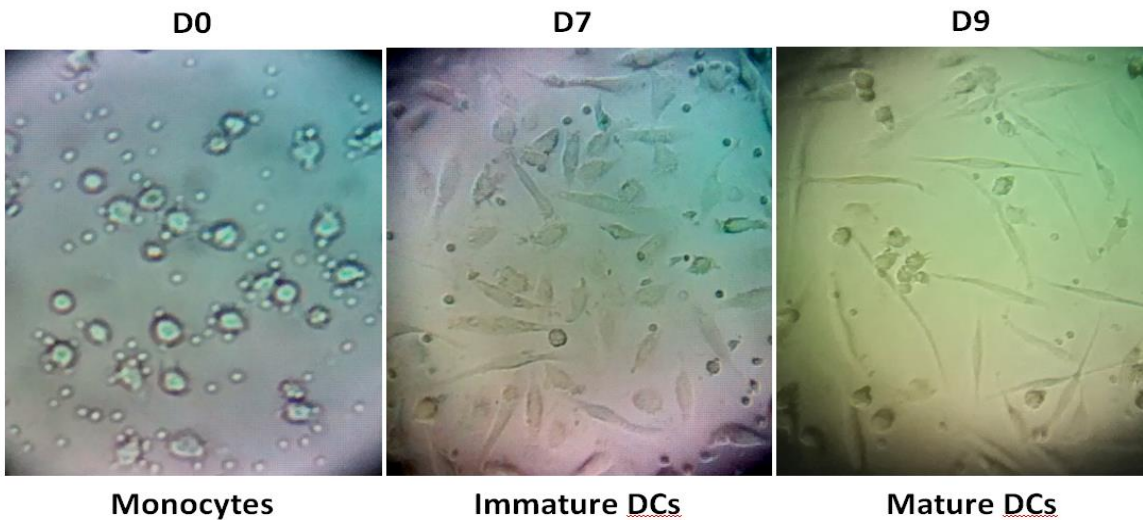


Figure 5: PD Restimulated PD cells respond to leukemic peptide WT-1

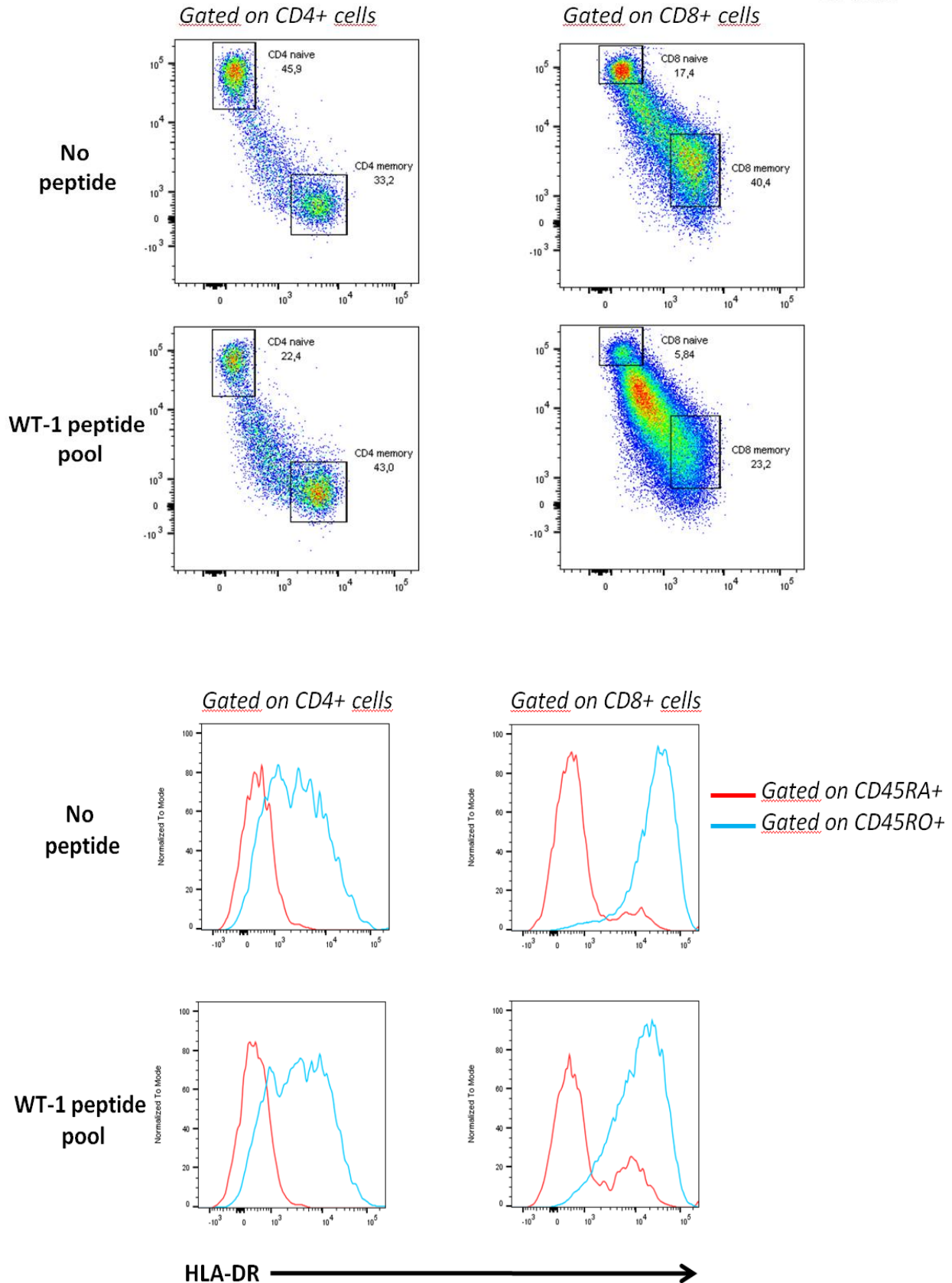


B

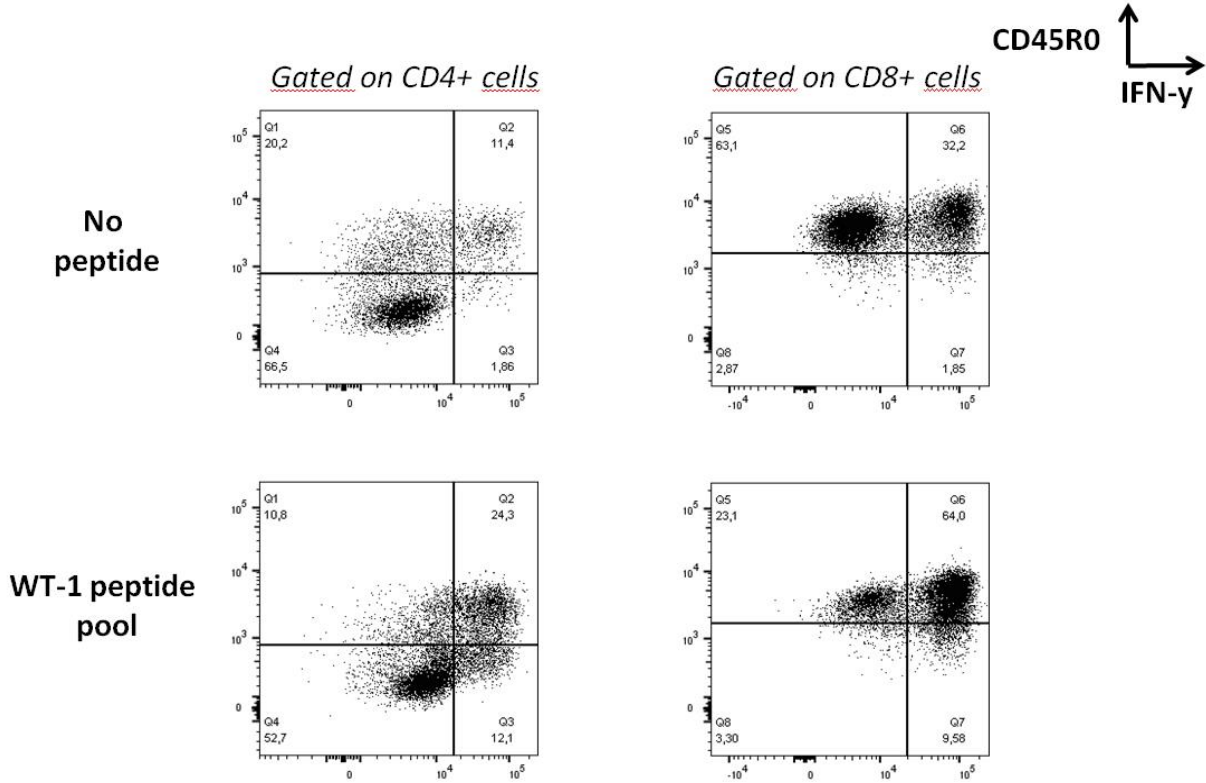


C

CD45RA ↑
CD45RO →



D



E

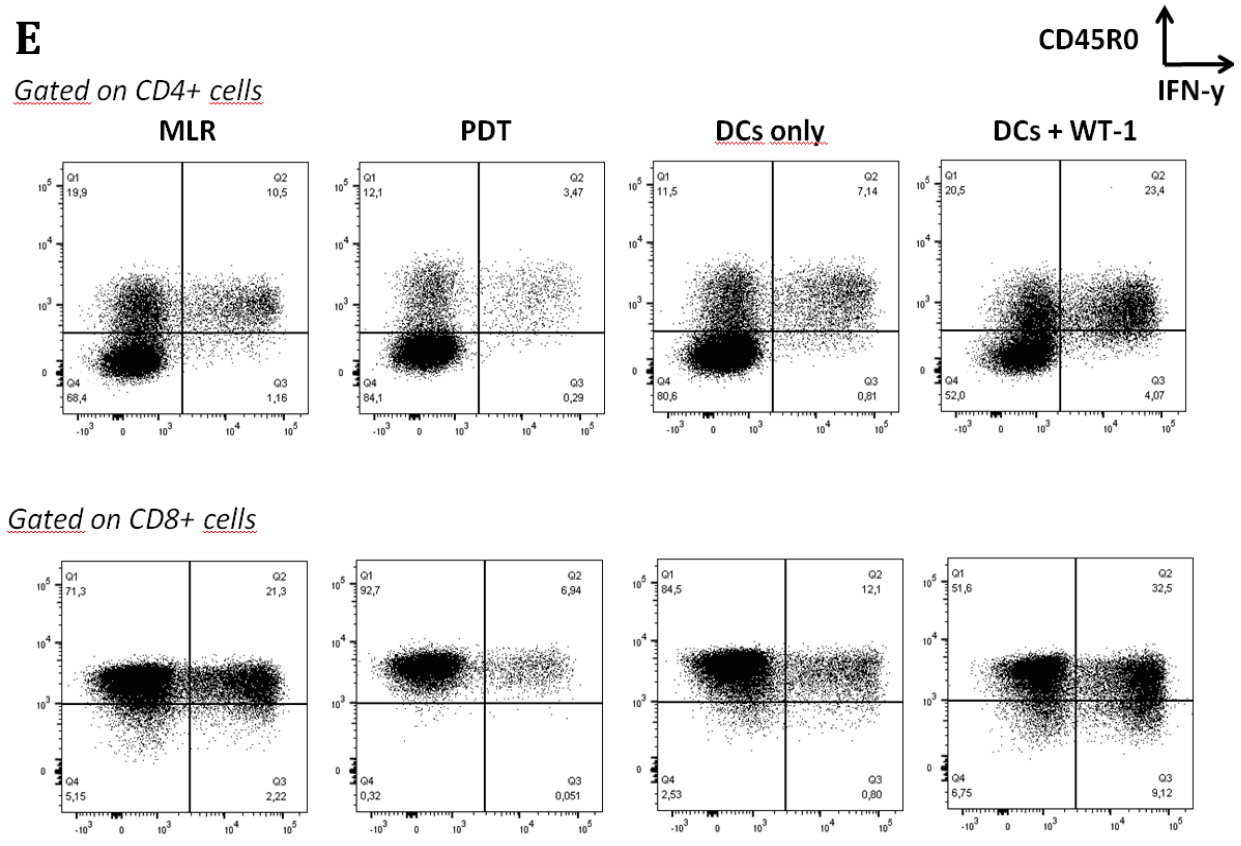
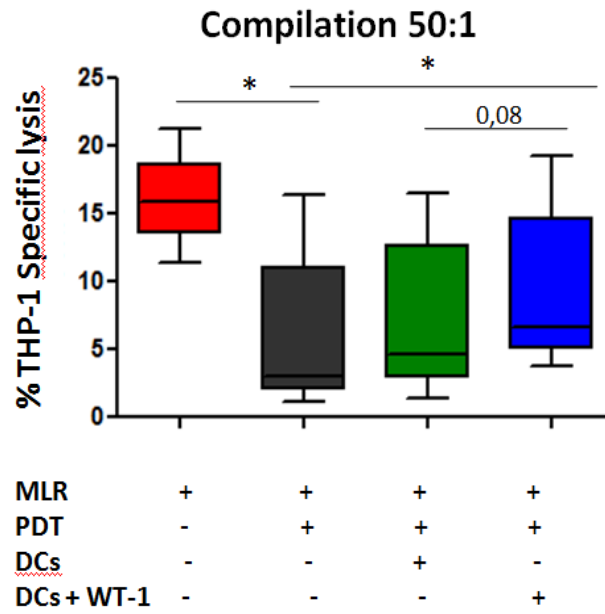


Figure 6: Restimulated PD cells have the potential to develop a specific response toward WT-1



Discussion

Dans cette étude, nous avons étudié différentes stratégies pour la génération de cellules T spécifiques aux cellules leucémiques. En effet, nous avons démontré que la photodéplétion utilisant le TH9402 menait à la préservation d'une population de lymphocytes ayant un potentiel de réactivité antigénique. Suivant le traitement de photodéplétion, les lymphocytes T CD4+ et CD8+ ont gardé un potentiel de réactivation suivant une exposition de novo aux mêmes cellules immunisantes. Nous avons cependant observé que ces cellules, suivant une exposition antigénique prolongée ont démontré des caractéristiques d'épuisement. Nous avons également démontré que la restimulation post PD ciblée avec une librairie de peptides dérivés de l'antigène leucémique WT1 conduisait à l'expansion de cellules T CD4+ et CD8+ mémoires fonctionnelles. Dans un dernier temps, nous avons trouvé que ces mêmes cellules WT1-spécifiques avaient le potentiel de développer une réponse cytotoxique contre une lignée leucémique WT1+ (THP-1).

La photodéplétion utilisant le TH9402, un dérivé de la rhodamine, représente une alternative de choix pour les patients leucémiques qui sont réfractaires aux traitements conventionnels. En effet, cette approche permet de réaliser des greffes haplo-identiques et de reinfuser des cellules du donneur qui sont dépourvues de réactivité contre les cellules normales du receveur, avec un faible taux de GVHD observé en clinique. De plus, ces cellules PD ont une réactivité anti-infectieuse préservée. La photodéplétion éliminant les cellules T alloréactives (les cellules responsables du développement de la GVHD), conjointement avec l'enrichissement des cellules Tregs permet aux patients d'avoir un meilleur pronostic et une espérance de vie plus longue, car ceux-ci bénéficient d'un double effet anti-inflammatoire¹¹⁹. De nombreuses études axées sur les thérapies anti-GVHD ont vu leur cohorte de patient rechuter plus fréquemment. De ce fait, l'effet GVL est essentiel dans la prévention de rechute de la leucémie. Or il est largement reconnu que la GVHD et l'effet GVL sont intimement liés. Il est donc essentiel d'approfondir notre compréhension de cette dualité fonctionnelle des cellules PD, à savoir leur capacité de

prévenir l'inflammation incontrôlée de la GVHD tout en démontrant une réactivité anti-leucémique. De plus, une étude réalisée dans un modèle murin a déjà souligné le potentiel de préservation de l'effet GVL des cellules PD avec le TH9402¹¹⁶. Afin d'investiguer ce phénomène avec des cellules humaines, nous avons utilisé des méthodes de restimulation post PD dérivée des protocoles cliniques élaborés au sein de notre laboratoire.

Notre premier objectif était de déterminer si les cellules PD sont capables de se réactiver après restimulation antigénique avec la même cellule que celle utilisée pour la réaction lymphocytaire mixte pré-PD. Ayant pour piste de départ que la photodéplétion élimine la quasi-totalité des cellules alloréactives et que nous conservons uniquement les cellules naïves ou au repos, nous avons tenté d'optimiser la restimulation en incluant les cellules provenant de 5 donneurs dans notre librairie d'antigènes. Lorsque les lymphocytes deviennent activés, leur cytoplasme grossit en raison de la production plus élevée de protéines. Cela peut se voir sur un profil de FACS où plus le FSC-A est élevé, plus la cellule est étendue. Nous avons analysé les lymphocytes activés après la restimulation à 3 et 6 jours post PD. Nous avons déterminé que les cellules PD ont le potentiel de se réactiver face à un second stimulus antigénique. Ceci dit, le stimulus doit être plus intense et plus long que le premier. De ce fait, la coculture de cellules stimulatrices (cellules irradiées de la librairie des 5 donneurs) versus des cellules effectrices (cellules PD) doit être de 4 :1 contrairement à 1 :1 pour la MLR de départ. Nous avons observé un phénomène semblable lors de stimulation initiale avec un seul donneur. Une explication à ce phénomène pourrait être que les lymphocytes T circulants ne sont pas tous au même stade d'activation. Les cellules effectrices ont davantage de TCR à leur surface, ce qui leur permet de s'activer plus rapidement que leurs analogues naïfs. De plus, le TCR de ces cellules activées pourrait avoir une plus grande affinité envers les antigènes auxquels ils sont exposés la première fois. De ce fait, la PD pourrait n'avoir éliminé que les cellules les plus alloréactives, ce qui permettrait aux autres cellules d'acquérir un phénotype activé après restimulation.

Afin de relier la recherche fondamentale avec la recherche clinique, nous avons utilisé un système de restimulation à deux parties constitué d'un donneur A ainsi que d'un sujet B. La restimulation a été faite en utilisant les cellules irradiées du donneur B (plutôt que d'utiliser 5 donneurs) et nous avons ajouté les cellules irradiées provenant de 5 donneurs comme contrôle positif. Similairement à ce que nous avons obtenu précédemment, nous avons observé une augmentation de près du double de cellules viables 6 jours suivant la restimulation avec les cellules irradiées du sujet B. Voyant que l'activation des cellules PD s'accroît de 3 à 6 jours post PD, nous avons prolongé la culture jusqu'à 9 jours de restimulation. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation du nombre de cellules viables entre 6 et 9 jours. Peut-être qu'un seul stimulus post PD ne permet pas d'activer les cellules PD au-delà de 6 jours de culture. Nous pourrions tester cette hypothèse en ajoutant une condition aux expériences menées. La condition serait d'ajouter de nouvelles cellules irradiées après 6 jours et de comparer le décompte cellulaire avec la condition à 1 stimulation à 9 jours de culture post PD. Également, nous avons observé que le nombre de cellules viables était plus élevé pour les conditions de restimulation comparativement à notre condition MLR. Avant de traitement de PD, nous avons gardé séparément quelques cellules de notre première MLR. Après la PD, nous avons remis séparément en culture celles-ci, les cellules PD et nos conditions de restimulation. De ce fait, il faut considérer ici que les cellules ont été en MLR pendant 10 ou 13 jours (4 jours de MLR initiale et 6 ou 9 jours après la PD). Même si ces cellules ont été remises en culture avec du nouveau milieu, celles-ci ont probablement été épuisées, ce qui expliquerait qu'une importante population était morte lors du décompte. Afin d'optimiser la comparativité de nos conditions, il serait préférable de partir une nouvelle MLR constitué des mêmes donneurs le jour de la PD.

Nous avons analysé les cellules T CD4+ et CD8+ en fonction de leur expression des marqueurs CD25 et HLA-DR. Ces deux marqueurs sont largement reconnus comme indicatifs de l'activation lymphocytaire. Nous avons constaté que la même restimulation cellulaire des cellules PD menait à une augmentation significative de l'expression de CD25 et de HLA-DR à la fois pour les lymphocytes CD4+ et CD8+. Cependant, nous avons noté

que le nombre absolu de cellules CD8+CD25+ et CD8+CD25+HLA-DR+ n'a pas subi la même augmentation, indiquant que ces cellules s'activent, mais ne prolifèrent pas. Nous avons encore une fois observé que l'augmentation de l'expression de CD25 débute entre 3 et 6 jours, et que celle-ci se prolonge jusqu'à 9 jours. Une population cellulaire pouvant potentiellement avoir un impact majeur sur l'interprétation de ces résultats sont les Tregs. En effet, ces cellules expriment également le CD25 et le HLA-DR¹³⁷. Nous avons démontré que nos cellules restimulées produisaient forte quantité d'IFN- γ . De ce fait, nous considérons que les populations de cellules CD4+CD25+ et CD8+CD25+ sont des cellules activées. Par contre, il serait préférable de caractériser davantage ces populations afin de s'assurer qu'une population de Tregs non négligeable ne s'y dissimule pas. Pour ce faire, il faudrait analyser des marqueurs connus de Tregs comme FOXP3, Helios et l'IL-10¹³⁸.

Comme il est important de déterminer non seulement si nos cellules PD peuvent s'activer, mais aussi qu'elle est la limite de cette activation, nous avons mesuré leur potentiel d'épuisement. Une restimulation trop importante et prolongée entraînerait une perte des fonctions effectrices et empêcherait nos cellules PD restimulées d'avoir une réponse cytotoxique contre la lignée leucémique visée. Dans le but de vérifier s'il y a épuisement, nous avons analysé l'expression de TIM-3, qui est un marqueur d'épuisement communément utilisé. Nous avons déterminé que le niveau d'expression de TIM-3 était relativement bas après 6 jours de restimulation. Cependant, cette expression a grandement augmenté entre 6 et 9 jours, tant chez les lymphocytes CD4+ et CD8+. À la lumière de ces résultats, il faudra répéter l'expérience quelques fois avant d'émettre une conclusion définitive sur l'épuisement cellulaire post PD. Néanmoins, ces résultats soulignent l'importance de déterminer l'activité fonctionnelle de ces cellules aux différents temps. Il est connu que l'épuisement cellulaire augmente avec la charge antigénique environnante. De ce fait, une stimulation avec une grande variété d'antigènes pourrait mener à un épuisement plus grand qu'avec un nombre limité de stimuli antigéniques. D'autres part, plus une cellule est épuisée, plus courte est sa durée de vie. Ces cellules perdent graduellement leurs fonctions effectrices. Si l'on transpose

aux résultats démontrés plus haut, nous pourrions dire qu'une stimulation post PD trop prolongée rendrait le développement d'une réponse GVL difficile. Au niveau clinique, l'épuisement lymphocytaire des cellules PD ne devrait pas mener à une aggravation de la GVHD. Cependant, nous pourrions peut-être observer une augmentation des infections opportunistes ou des rechutes due à la perte de fonction de ces cellules. Afin de pouvoir évaluer ces hypothèses et de caractériser davantage le niveau d'épuisement, il sera utile d'inclure l'étude d'autres marqueurs d'épuisement comme PD-1 et LAG-3.

Le second objectif de cette étude a été de trouver une méthode de restimulation nous permettant d'activer spécifiquement les cellules PD contre un antigène leucémique particulier. Ceci est dans le but de focaliser la réponse effectrice des cellules PD contre la leucémie et non contre les tissus sains du patient (pas de GVHD). Nous avons sélectionné la protéine WT1 qui est surexprimée dans 80% des LMA. Afin de promouvoir une restimulation WT1-spécifique, nous avons utilisé des cellules dendritiques générées des monocytes du sujet B et nous les avons pulsés avec une librairie de peptides provenant de WT1. Suivant une restimulation avec WT1, la première chose que nous avons constatée est la diminution de près de moitié de la population de cellules CD4+CD45RA+ naïves ainsi que l'augmentation de près du double des cellules CD4+CD45RO+ mémoires. Pour la population CD8, nous avons observé une augmentation de la population intermédiaire entre le phénotype naïf et mémoire, suggérant que les cellules T CD8+ naïves s'activent plus graduellement que leurs consœurs. L'augmentation de l'expression du HLA-DR sur la population CD8+CD45RA+ supporte cette hypothèse. Nous avons déterminé que la restimulation avec des DCs-WT1 entraîne une augmentation de près du double de l'expression d'IFN- γ comparativement à une restimulation avec des DC sans antigène WT1. Ceci nous indique que les cellules PD restimulées contre WT1 sont fonctionnelles et qu'elles ont potentiellement des fonctions cytotoxiques. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons effectué un essai cytotoxique de relâche au Chrome 51 contre la lignée THP-1, lignée qui exprime WT1. Les cellules PD restimulées contre WT1 ont le potentiel d'éliminer les cellules THP-1. Cependant, il semblerait que la PD seule ne permette pas de préserver l'effet GVL. Afin de confirmer cette hypothèse, il faudrait tout

d'abord répéter l'expérience de cytotoxicité. Au niveau clinique, nous pourrions donc penser que l'absence de rechute pourrait être attribuée à une persistance d'alloréactivité faible plutôt qu'à la préservation de la GVL. De ce fait, l'élimination *in vivo* des cellules leucémiques persistantes serait non spécifique. Malgré tout, nous ne pouvons pas affirmer à ce stage que la PD empêche l'effet GVL, car les conditions de cultures *in vitro* décrites dans l'article sont loin de refléter l'environnement extracellulaire retrouvé *in vivo*. Il faudrait expérimenter dans un système physiologiquement plus proche de l'humain comme par exemple dans un modèle murin. Ceci dit, il reste plusieurs possibilités de modification à notre approche afin d'optimiser la réponse cytotoxique. Les DCs pourraient être pulsés de façon répétitive afin d'augmenter la présentation de peptides, ou nous pourrions répéter la stimulation avec une seconde dose de DCs WT1. Une étude a également démontré qu'il était possible d'améliorer la présentation peptidique en électroporant les DCs avec de l'ARNm de WT1⁴⁵. Il est également envisageable de sélectionner des séquences peptidiques de WT1 ayant une plus forte affinité pour certains HLA, comme le HLA-A0201, le HLA-B7 et le HLA-DR.

En conclusion, la restimulation des cellules PD contre les mêmes cellules retrouvées dans la MLR nous permet de générer une population de lymphocytes CD4+ et CD8+ activés. Ces cellules restimulées démontrent un phénotype activé, comme l'indique leur expression plus importante de CD25 et HLA-DR. Par contre, les cellules PD ont besoin d'une stimulation plus intense et plus longue que la MLR initiale pour être activées. Nous avons démontré qu'une stimulation prolongée (9 jours) pouvait mener à un épuisement des cellules PD, ce qui nous suggère que la période d'activation optimale serait de 6 jours post PD. Néanmoins, il est nécessaire de caractériser plus en profondeur cette tendance. Nous avons également constaté que les cellules PD avaient la capacité de s'activer contre l'antigène leucémique WT1. Ces cellules PD ont démontré un potentiel cytotoxique, caractérisé par leur expression d'IFN- γ en réponse à l'exposition à l'antigène WT1. Nous avons observé que ces cellules PD ont le potentiel d'éliminer des cellules THP-1 (WT1+). Cependant, la lignée THP-1 exprime un grand nombre d'antigènes qui pourraient venir jouer un rôle dans l'essai de cytotoxicité. En ce sens, nous pourrions développer une lignée secondaire en utilisant un shRNA ou un CRISPR afin de bloquer l'expression de

WT1. Nous pourrions ainsi comparer à l'intérieur d'un même essai du pourcentage de lyse entre la lignée d'origine et celle n'exprimant pas WT1. Cela nous permettrait de déterminer si la cytotoxicité observée est réellement spécifique à l'antigène leucémique.

plusieurs modifications d'optimisation sont à prévoir afin de rendre cette réponse plus forte et plus spécifique. Somme toutes, ces résultats nous ont permis d'avancer l'hypothèse d'une certaine plasticité cellulaire découlant du traitement de photodéplétion par le TH9402, principalement au niveau des cellules T CD4+ et CD8+. En utilisant les conditions appropriées, ces cellules peuvent être dirigées soit vers un phénotype régulateur favorisant la tolérance ou un phénotype effecteur pouvant être personnalisé. Il serait à notre avantage d'utiliser le potentiel d'activation des cellules PD en focalisant celles-ci contre une cible leucémique. De ce fait, nous pourrions diminuer la GVHD et augmenter la GVL médiée par ces cellules. Ce double effet pourrait être exploité dans la thérapie cellulaire administrée aux patients suivant un protocole d'haplogreffe afin d'améliorer leur qualité de vie et leur survie.

Références bibliographiques

1. Canadian Cancer Society. Canadian Cancer Statistics Special topic : Predictions of the future burden of cancer in Canada. *Public Heal Agency Canada*. 2015;1-151.
2. Estey EH, Faderl SH, Kantarjian HM. Acute Leukemias. 2008;23:290. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
3. Juliusson G, Lazarevic V, Hörstedt A, et al. Acute myeloid leukemia in the real world : why population-based registries are needed Acute myeloid leukemia in the real world : why population-based registries are needed. 2013;119(17):3890-3899. doi:10.1182/blood-2011-12-379008.
4. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 2008;132(4):631-644. doi:10.1016/j.cell.2008.01.025.
5. Eaves C. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*. 2015;125(17):2605-2614. doi:10.1182/blood-2014-12-570200.Lessons.
6. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012;10(2):120-136. doi:10.1016/j.stem.2012.01.006.
7. Ho B, Leibermann DA. Hematopoiesis. *Oncogene*. 2002;3260-3261. doi:10.1038/sj/onc/1205401.
8. Roussy G. Information presse Identification d ' un nouveau gène suppresseur de tumeur Le sang est composé de nombreuses cellules qui assurent des fonctions vitales bien précises . Lorsque le fonctionnement de ce système s ' emballe , il différentes d ' hémopathies . 2011.
9. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730-737. doi:10.1038/nm0797-730.
10. Soulier J, Cortes J. Introduction to the review series on acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;125(26):3965-3966. doi:10.1182/blood-2015-05-635300.
11. Longo DL, Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-1152. doi:10.1056/NEJMra1406184.
12. Hasserjian RP. Acute myeloid leukemia: Advances in diagnosis and classification.

- Int J Lab Hematol.* 2013;35(3):358-366. doi:10.1111/ijlh.12081.
13. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, et al. DNA Methylation Signatures Identify Biologically Distinct Subtypes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell.* 2010;17(1):13-27. doi:10.1016/j.ccr.2009.11.020.
 14. Horton SJ, Huntly BJP. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. *Haematologica.* 2012;97(7):966-974. doi:10.3324/haematol.2011.054734.
 15. Zardo G, Cimino G, Nervi C. Epigenetic plasticity of chromatin in embryonic and hematopoietic stem/progenitor cells: therapeutic potential of cell reprogramming. *Leukemia.* 2008;22(8):1503-1518. doi:10.1038/leu.2008.141.
 16. Minculescu L, Sengeløv H. The Role of Gamma Delta T Cells in Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *Scand J Immunol.* 2015;81(6):459-468. doi:10.1111/sji.12289.
 17. Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP, et al. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: Immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood.* 2005;105(10):4135-4142. doi:10.1182/blood-2004-10-4113.
 18. Lindahl KF. Minor histocompatibility antigens. *Trends Genet.* 1991;7(7):219-224.
 19. Griffioen M, Van Bergen CAM, Falkenburg JHF. Autosomal minor histocompatibility antigens: How genetic variants create diversity in immune targets. *Front Immunol.* 2016;7(MAR):1-9. doi:10.3389/fimmu.2016.00100.
 20. Jones SC, Murphy GF, Friedman TM, Korngold R. Importance of minor histocompatibility antigen expression by nonhematopoietic tissues in a CD4 + T cell – mediated graft-versus-host disease model. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1880-1886. doi:10.1172/JCI200319427.Introduction.
 21. Vincent K, Roy D-C, Perreault C. Next-generation leukemia immunotherapy. *Blood.* 2011;118(11):2951-2959. doi:10.1182/blood-2011-04-350868.
 22. Mutis T, Blokland E, Kester M, Schrama E, Goulmy E. Generation of minor histocompatibility antigen HA-1-specific cytotoxic T cells restricted by nonself HLA molecules: A potential strategy to treat relapsed leukemia after HLA-mismatched

- stem cell transplantation. *Blood*. 2002;100(2):547-552. doi:10.1182/blood-2002-01-0024.
23. Anguille S, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Leukemia-associated antigens and their relevance to the immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012;26(10):2186-2196. doi:10.1038/leu.2012.145.
 24. Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: The combination matters an analysis of 3082 patients. *Blood*. 2008;111(5):2527-2537. doi:10.1182/blood-2007-05-091215.
 25. Fathi AT, Chen Y-B. Treatment of FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Am J Blood Res*. 2011;1(2):175-189.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3301423&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
 26. Levis M, Ravandi F, Wang ES, et al. Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse. *Blood*. 2011;117(12):3294-3301. doi:10.1182/blood-2010-08-301796.
 27. Knapper S, Burnett AK, Littlewood T, et al. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood*. 2006;108(10):3262-3270. doi:10.1182/blood-2006-04-015560.
 28. Snauwaert S, Vandekerckhove B, Kerre T. Can immunotherapy specifically target acute myeloid leukemic stem cells? *Oncoimmunology*. 2013;2(2):e22943. doi:10.4161/onci.22943.
 29. Rosenfeld C, Cheever M a, Gaiger A. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Leukemia*. 2003;17(7):1301-1312. doi:10.1038/sj.leu.2402988.
 30. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK*. 2007;21(5):868-876. doi:10.1038/sj.leu.2404770.
 31. Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum*

- Mol Genet.* 2006;15(SUPPL. 2). doi:10.1093/hmg/ddl196.
32. Brayer J, Lancet JE, Powers J, et al. WT1 vaccination in AML and MDS: A pilot trial with synthetic analog peptides. *Am J Hematol.* 2015;90(7):602-607. doi:10.1002/ajh.24014.
 33. O'Brien C, Flower DR, Feighery C. Peptide length significantly influences in vitro affinity for MHC class II molecules. *Immunome Res.* 2008;4(1). doi:10.1186/1745-7580-4-6.
 34. Barrett a J. Mechanisms of the graft-versus-leukemia reaction. *Stem Cells.* 1997;15(4):248-258. doi:10.1002/stem.150248.
 35. Park JH, Brentjens RJ. Are all chimeric antigen receptors created equal? *J Clin Oncol.* 2015;33(6):651-653. doi:10.1200/JCO.2014.57.5472.
 36. Long AH, Haso WM, Shern JF, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med.* 2015;21(6):581-590. doi:10.1038/nm.3838.
 37. Hombach AA, Heiders J, Foppe M, Chmielewski M, Abken H. OX40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4(+) T cells. *Oncoimmunology.* 2012;1(4):458-466. doi:10.4161/onci.19855.
 38. Ramos CA, Savoldo B, Dotti G. CD19-CAR Trials. *Cancer J.* 2014;20(2):112-118. doi:10.1097/PPO.0000000000000031.
 39. Dai H, Wang Y, Lu X, Han W. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(7):1-15. doi:10.1093/jnci/djv439.
 40. Wang Q, Wang Y, Lv H, et al. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Mol Ther.* 2015;23(1):184-191. doi:10.1038/mt.2014.164.
 41. Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T-cells. *Front Pharmacol.* 2014;5(OCT). doi:10.3389/fphar.2014.00235.
 42. Janelle V, Carli C, Taillefer J, Orio J, Delisle J-S. Defining novel parameters for the

- optimal priming and expansion of minor histocompatibility antigen-specific T cells in culture. *J Transl Med.* 2015;13:123. doi:10.1186/s12967-015-0495-z.
43. Gao L, Bellantuono I, Elsässer a, et al. Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood.* 2000;95(7):2198-2203.
 44. van den Ancker W, Ruben JM, Westers TM, et al. Priming of PRAME- and WT1-specific CD8(+) T cells in healthy donors but not in AML patients in complete remission: Implications for immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2013;2(4):e23971. doi:10.4161/onci.23971.
 45. de Haar C, Plantinga M, Blokland NJ, et al. Generation of a cord blood-derived Wilms Tumor 1 dendritic cell vaccine for AML patients treated with allogeneic cord blood transplantation. *Oncoimmunology.* 2015;4(11):e1023973. doi:10.1080/2162402X.2015.1023973.
 46. Hoepfner S, Haut PR, O’Gorman M, Kletzel M. Rapid immune reconstitution following autologous hematopoietic stem cell transplantation in children: a single institution experience. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31(4):285-290. doi:10.1038/sj.bmt.1703831.
 47. Butt NM, Clark RE. Autografting as a risk factor for persisting iron overload in long-term survivors of acute myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32(9):909-913. doi:10.1038/sj.bmt.1704244.
 48. Wolff SN. Second hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of graft failure, graft rejection or relapse after allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002. doi:10.1038/sj.bmt.1703389.
 49. Passweg JR, Halter J, Bucher C, et al. Hematopoietic stem cell transplantation: A review and recommendations for follow-up care for the general practitioner. *Swiss Med Wkly.* 2012;142. doi:10.4414/smw.2012.13696.
 50. Jenq RR, van den Brink MRM. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(3):213-221. doi:10.1038/nrc2804.

51. Reisner Y, Hagin D, Martelli MF. Review article Haploidentical hematopoietic transplantation : current status and future perspectives. 2011;118(23):6006-6017. doi:10.1182/blood-2011-07-338822.
52. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(10):1143-1238. doi:10.1016/j.bbmt.2009.06.019.
53. Marr K a. Delayed opportunistic infections in hematopoietic stem cell transplantation patients: a surmountable challenge. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2012;2012:265-270. doi:10.1182/asheducation-2012.1.265.
54. Battiwalla M, McCarthy PL. Filgrastim support in allogeneic HSCT for myeloid malignancies: a review of the role of G-CSF and the implications for current practice. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43(5):351-356. doi:10.1038/bmt.2008.443.
55. Paczesny S, Hanauer D, Sun Y, Reddy P. New perspectives on the biology of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(1):1-11. doi:10.1038/bmt.2009.328.
56. Ratanatharathorn V, Ayash L, Lazarus H, Fu J, Uberti J. Mini-review Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28:121-129. doi:10.1038/sj.bmt.1703111.
57. Tyndall A, Dazzi F. Chronic GVHD as an autoimmune disease. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008;21(2):281-289. doi:10.1016/j.beha.2008.03.003.
58. Markey K a, Macdonald KP a, Hill GR. The biology of graft-versus-host disease : experimental systems instructing clinical practice The biology of graft-versus-host disease : experimental systems instructing clinical practice. *Hematology.* 2014;124(3):354-362. doi:10.1182/blood-2014-02-514745.
59. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:35. doi:10.1186/1750-1172-2-35.
60. Couriel D, Caldera H, Champlin R, Komanduri K. Acute graft-versus-host disease: Pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Cancer.*

- 2004;101(9):1936-1946. doi:10.1002/cncr.20613.
61. Ball LM, Egeler RM. Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41 Suppl 2:S58-64. doi:10.1038/bmt.2008.56.
 62. Koyama M, Kuns RD, Olver SD, et al. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med.* 2012;18(1):135-142. doi:10.1038/nm.2597.
 63. Toubai T, Mathewson N, Reddy P. The role of dendritic cells in graft-versus-tumor effect. *Front Immunol.* 2014;5(FEB):17-19. doi:10.3389/fimmu.2014.00066.
 64. Toubai T, Tawara I, Sun Y, et al. Induction of acute GVHD by sex-mismatched H-Y antigens in the absence of functional radiosensitive host hematopoietic-derived antigen-presenting cells. *Blood.* 2012;119(16):3844-3853. doi:10.1182/blood-2011-10-384057.
 65. Chakraverty R, Sykes M. The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. *Blood.* 2007;110(1):9-17. doi:10.1182/blood-2006-12-022038.
 66. Pacheco R, Contreras F, Prado C. Cells, molecules and mechanisms involved in the neuro-immune interaction. *Cell Interact.* 2012. doi:10.5772/48367.
 67. Kidd P. Th1/Th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.* 2003;8(3):223-246.
 68. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:713-758. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.140942.
 69. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: Adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1183:211-221. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05133.x.
 70. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, et al. Inhibition of CD4 α CD25 α regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood.* 2006;108(1):390-399. doi:10.1182/blood-2006-01-0329.Supported.
 71. Singer BD, King LS, D'Alessio FR. Regulatory T cells as immunotherapy. *Front*

- Immunol.* 2014;5(FEB):1-10. doi:10.3389/fimmu.2014.00046.
72. Horch M, Nguyen VH. Regulatory T-cell immunotherapy for allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Ther Adv Hematol.* 2012;3(1):29-44. doi:10.1177/2040620711422266.
 73. Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, et al. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood.* 2014;124(4):638-644. doi:10.1182/blood-2014-03-564401.
 74. Soci G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2014;124(3):374-384. doi:10.1182/blood-2014-01-514752.
 75. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(5):371-380. doi:10.1038/nrc1365.
 76. Won EJ, Kim H-R, Park R-Y, et al. Direct confirmation of quiescence of CD34+CD38- leukemia stem cell populations using single cell culture, their molecular signature and clinicopathological implications. *BMC Cancer.* 2015;15:217. doi:10.1186/s12885-015-1233-x.
 77. Rambaldi A, Biagi E, Bonini C, Biondi A, Intronà M. Cell-based strategies to manage leukemia relapse: efficacy and feasibility of immunotherapy approaches. *Leukemia.* 2014;29(May):1-10. doi:10.1038/leu.2014.189.
 78. Barrett A J, Battiwalla M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol.* 2012;3(4):429-441. doi:10.1586/ehm.10.32.Relapse.
 79. Zúñiga-Pflücker JC. T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(1):67-72. doi:10.1038/nri1257.
 80. Malissen B, Grégoire C, Malissen M, Roncagalli R. Integrative biology of T cell activation. *Nat Immunol.* 2014;15:790-797. doi:10.1038/ni.2959.
 81. Wurster A L, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene.* 2000;19(2000):2577-2584. doi:10.1038/sj.onc.1203485.
 82. Mahmud S A, Manlove LS, Farrar M A. Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. *Jak-Stat.* 2013;2(1):e23154. doi:10.4161/jkst.23154.

83. Burchill M a, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2007;178(1):280-290. doi:178/1/280 [pii].
84. Vignali D. How many mechanisms do regulatory T cells need? *Eur J Immunol.* 2008;38:908-911. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200738114>.
85. Vignali D a, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2009;8(7):523-532. doi:10.1038/nri2343.How.
86. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol.* 2009;133(1):22-26. doi:10.1016/j.clim.2009.06.001.
87. Earle KE, Tang Q, Zhou X, et al. In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. *Clin Immunol.* 2005;115(1):3-9. doi:10.1016/j.clim.2005.02.017.
88. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al. An Antimicrobial Activity of Cytolytic T Cells Mediated by Granulysin. *Science (80-).* 1998;282(5386):121-125. doi:10.1126/science.282.5386.121.
89. Stenger S, Rosat JP, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL. Granulysin: A lethal weapon of cytolytic T cells. *Immunol Today.* 1999;20(9):390-394. doi:10.1016/S0167-5699(99)01449-8.
90. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* 2007;96(7):41-101. doi:10.1016/S0065-2776(07)96002-2.
91. Sato K, Fujita S. Dendritic Cells-Nature and Classification. *Allergol Int.* 2007;56(3):183-191. doi:10.2332/allergolint.R-06-139.
92. Jiao Y, Sun X, Huang X, Li W, Zhang T, Wu H. Compare mDCs and pDCs between two distinct patients groups in acute HIV-1 infection. *AIDS Res Ther.* 2014;11(1):22. doi:10.1186/1742-6405-11-22.
93. Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid

- leukemia. *Blood*. 2015;127(1):53-62. doi:10.1182/blood-2015-08-604520.
94. Fabricius WA, Ramanathan M. Review on Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation in Patients with Hematologic Malignancies. *Adv Hematol*. 2016;2016:1-8. doi:10.1155/2016/5726132.
95. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia*. 2007;21(7):1387-1394. doi:10.1038/sj.leu.2404683.
96. Luznik L, O'Donnell P V., Symons HJ, et al. HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(6):641-650. doi:10.1016/j.bbmt.2008.03.005.
97. Oevermann L, Handgretinger R. New strategies for haploidentical transplantation. *Pediatr Res*. 2012;71(4-2):418-426. doi:10.1038/pr.2011.60.
98. Teschner D, Distler E, Wehler D, et al. Depletion of naive T cells using clinical grade magnetic CD45RA beads: a new approach for GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transpl*. 2014;49(1):138-144. doi:10.1038/bmt.2013.114.
99. Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MTL, et al. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol*. 2009;10(5):489-500. doi:10.1016/S1470-2045(09)70074-9.
100. Di Stasi A, Tey S-K, Dotti G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1673-1683. doi:10.1056/NEJMoa1106152.
101. Jones BS, Lamb LS, Goldman F, Di Stasi A. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Front Pharmacol*. 2014;5:254. doi:10.3389/fphar.2014.00254.
102. Boumédine RS, Roy DC. Elimination of alloreactive T cells using photodynamic therapy. *Cytotherapy*. 2005;7(2):134-143. doi:10.1080/14653240510027109.
103. Zic JA. The treatment of cutaneous T-cell lymphoma with photopheresis. *Dermatol Ther*. 2003;16(4):337-346. doi:10.1111/j.1396-0296.2003.01646.x.

104. Geskin L. ECP versus PUVA for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Skin Therapy Lett.* 2007;12(5):1-4.
105. Roy D-C, Lachance S, Kiss T, et al. Haploidentical Stem Cell Transplantation: High Doses of Alloreactive-T Cell Depleted Donor Lymphocytes Administered Post-Transplant Decrease Infections and Improve Survival without Causing Severe Gvhd. *ASH Annu Meet Abstr.* 2009;114(22):512.
106. Child FJ, Ratnavel R, Watkins P, et al. Extracorporeal photopheresis (ECP) in the treatment of chronic graft-versus-host disease (GVHD). *Bone Marrow Transpl.* 1999;23(9):881-887. doi:10.1038/sj.bmt.1701733.
107. Foss FM, Gorgun G, Miller KB. Extracorporeal photopheresis in chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transpl.* 2002;29(9):719-725. doi:10.1038/sj.bmt.1703529.
108. Perfetti, P; Carlier, P; Strada, P; Gualandi, F; Van Lint, MT; Lampareli, AM; Raiola, AM, Grazia, S; Bregante, S; Pogliani, E; Bacigalupo A. Extracorporeal photopheresis for the treatment of steroid refractory acute GvHD. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42:609-617. doi:10.1038/bmt.2008.221.
109. Hospital N. ta Fo. *Trial.* 2004;89(May):1-5.
110. Futterleib JS, Feng H, Tigelaar RE, Choi J, Edelson RL. Activation of GILZ gene by photoactivated 8-methoxypsoralen: Potential role of immunoregulatory dendritic cells in extracorporeal photochemotherapy. *Transfus Apher Sci.* 2014;50(3):379-387. doi:10.1016/j.transci.2013.10.003.
111. Legitimo A, Consolini R, Failli A, et al. In vitro treatment of monocytes with 8-methoxypsoralen and ultraviolet A light induces dendritic cells with a tolerogenic phenotype. *Clin Exp Immunol.* 2007;148(3):564-572. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03372.x.
112. Gatzka E, Rogers CE, Clouthier SG, et al. Extracorporeal photopheresis reverses experimental graft-versus-host disease through regulatory T cells. *Blood.* 2008;112(4):1515-1521. doi:10.1182/blood-2007-11-125542.
113. Biagi E, Di Biaso I, Leoni V, et al. Extracorporeal photochemotherapy is

- accompanied by increasing levels of circulating CD4+CD25+GITR+Foxp3+CD62L+ functional regulatory T-cells in patients with graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2007;84(1):31-39. doi:10.1097/01.tp.0000267785.52567.9c.
114. Pal P, Zeng H, Durocher G, et al. Phototoxicity of some bromine-substituted rhodamine dyes: synthesis, photophysical properties and application as photosensitizers. *Photochem Photobiol.* 1996;63(2):161-168. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657730>.
 115. Guimond M, Balassy A, Barrette M, Brochu S, Perreault C, Roy DC. P-glycoprotein targeting: A unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood*. 2002;100(2):375-382. doi:10.1182/blood-2001-12-0353.
 116. Chen BJ, Cui X, Liu C, Chao NJ. 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*. 2002;99(9):3083-3088. doi:10.1182/blood.V99.9.3083.
 117. Pilarski LM, Paine D, McElhaney JE, Cass CE, Belch AR. 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*. 1995;49(4):323-335. doi:10.1002/ajh.2830490411.
 118. Mabed M, Coffe C, Racadot E, et al. Differential sensitivity of T lymphocytes and hematopoietic precursor cells to photochemotherapy with 8-methoxypsoralen and ultraviolet A light. *Ann Hematol*. 2006;85(1):17-24. doi:10.1007/s00277-005-0009-9.
 119. Bastien J, Kros G, Therien C, et al. cells from patients with chronic graft-versus-host disease Photodepletion differentially affects CD4⁺ Tregs versus CD4⁺ effector T cells from patients with chronic graft-versus-host disease. 2011;116(23):4859-4869. doi:10.1182/blood-2010-03-273193.
 120. Van Der Straaten HM, Fijnheer R, Dekker AW, Karel Nieuwenhuis H, Verdonck LF. Relationship between graft-versus-host disease and graft-versus-leukaemia in partial T cell-depleted bone marrow transplantation. *Br J Haematol*.

- 2001;114(1):31-35. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.02890.x.
121. Jones SC, Murphy GF, Korngold 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. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003;9(4):243-256. doi:10.1053/bbmt.2003.50027.
 122. Slavin S, Ackerstein A, Naparstek E, Or R, Weiss L. The graft-versus-leukemia (GVL) phenomenon: is GVL separable from GVHD? *Bone Marrow Transpl.* 1990;6(3):155-161. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2252954>.
 123. Zuniga EI, Harker JA. T-cell exhaustion due to persistent antigen: Quantity not quality? *Eur J Immunol.* 2012;42(9):2285-2289. doi:10.1002/eji.201242852.
 124. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: Characteristics, causes and conversion. *Immunology.* 2010;129(4):474-481. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03255.x.
 125. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):486-499. doi:10.1038/nri3862.
 126. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492-499. doi:10.1038/ni.2035.
 127. Grumont R, Lock P, Mollinari M, Shannon FM, Moore A, Gerondakis S. The mitogen-induced increase in T cell size involves PKC and NFAT activation of Rel/NF- κ B-dependent c-myc expression. *Immunity.* 2004;21(1):19-30. doi:10.1016/j.immuni.2004.06.004.
 128. Teague TK, Munn L, Zygourakis K, McIntyre BW. Analysis of lymphocyte activation and proliferation by video microscopy and digital imaging. *Cytometry.* 1993;14(7):772-782. doi:10.1002/cyto.990140710.
 129. Stone JD, Chervin AS, Kranz DM. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology.* 2009;126(2):165-176. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03015.x.
 130. Martinez RJ, Evavold BD. Lower affinity T cells are critical components and active participants of the immune response. *Front Immunol.* 2015;6(SEP). doi:10.3389/fimmu.2015.00468.

131. Caruso A, Licenziati S, Corulli M, et al. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry*. 1997;27(1):71-76. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19970101)27:1<71::AID-CYTO9>3.0.CO;2-O.
132. Ferris RL, Lu B, Kane LP. Too Much of a Good Thing? Tim-3 and TCR Signaling in T Cell Exhaustion. *J Immunol*. 2014;193(4):1525-1530. doi:10.4049/jimmunol.1400557.
133. Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis*. 1999;5(4):285-294. doi:10.1002/ibd.3780050410.
134. Bradley LM, Dalton DK, Croft M. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J Immunol*. 1996;157(4):1350-1358.
135. Weber G, Gerdemann U, Caruana I, et al. Generation of multi-leukemia antigen-specific T cells to enhance the graft-versus-leukemia effect after allogeneic stem cell transplant. *Leukemia*. 2013;27(7):1538-1547. doi:10.1038/leu.2013.66.
136. Rezvani K, Brenchley JM, Price DA, et al. T-cell responses directed against multiple HLA-A*0201-restricted epitopes derived from Wilms' tumor 1 protein in patients with leukemia and healthy donors: Identification, quantification, and characterization. *Clin Cancer Res*. 2005;11(24):8799-8807. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1314.
137. Schaier M, Seissler N, Becker LE, et al. The extent of HLA-DR expression on HLA-DR+ Tregs allows the identification of patients with clinically relevant borderline rejection. *Transpl Int*. 2013;26(3):290-299. doi:10.1111/tri.12032.
138. Elkord E, Abd Al Samid M, Chaudhary B. Helios, and not FoxP3, is the marker of activated Tregs expressing GARP/LAP. *Oncotarget*. 2015;6(24):20026-20036. doi:10.18632/oncotarget.4771.