



HAL
open science

La photophérèse extracorporelle (PCE) comme traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) aiguë et chronique : étude de performances biologiques in vitro de la PCE en système dissocié

Aurélie Ferry

► To cite this version:

Aurélie Ferry. La photophérèse extracorporelle (PCE) comme traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) aiguë et chronique : étude de performances biologiques in vitro de la PCE en système dissocié. Sciences pharmaceutiques. 2017. hal-01931882

HAL Id: hal-01931882

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01931882>

Submitted on 23 Nov 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

UNIVERSITE DE LORRAINE
2017

FACULTE DE PHARMACIE

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement le,
Vendredi 2 juin 2017

Sur un sujet dédié à :

**La photophérèse extracorporelle (PCE) comme traitement de la
maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) aiguë et chronique :**

**Etude de performances biologiques *in vitro*
de la PCE en système dissocié.**

Pour obtenir le

Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par **Aurélie FERRY**

Née le **6 juillet 1991**

Membres du Jury

Président et Co-directeur de thèse	Mme Danièle BENSOUSSAN	Professeur des universités, Praticien hospitalier, Unité de Thérapie cellulaire et Banque de tissus, CHU de Nancy, Faculté de Pharmacie Nancy.
Co-directeur de thèse	M. Bruno DELORME	Directeur Recherche et Développement, Macopharma Biothérapie, Mouvaux.
Juges	Mme Marie-Thérèse RUBIO	Professeur des universités, Praticien hospitalier, Service Hématologie, CHU de Nancy, Faculté de Médecine de Nancy.
	M. Loïc REPPÉL	Assistant hospitalo-universitaire, Docteur en Pharmacie, Unité de Thérapie cellulaire et Banque de tissus, CHU de Nancy.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2016-2017

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Responsables de la filière Industrie

Responsable de la filière Hôpital

Responsable Pharma Plus ENSIC

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Responsable Pharma Plus ENSGSI

Responsable de la Communication

**Responsable de la Cellule de Formation Continue
et individuelle**

**Responsable de la Commission d'agrément
des maîtres de stage**

Responsable ERASMUS

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Igor CLAROT

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Béatrice FAIVRE

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Alain MARSURA

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Christine PERDIAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique et Epidémiologie</i>

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique, Audioprothèse</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Alexandre HARLE	82	<i>Biologie cellulaire oncologique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>

François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

☒ *En attente de nomination*

***Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR
AUTEUR ».

« La perfección es una pulida colección de errores. »

Mario Benedetti

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury.

Au **Pr. Danièle Bensoussan** de m'avoir fait l'honneur d'être la présidente de mon jury et d'avoir accepté de co-diriger cette thèse. Je la remercie pour sa grande pédagogie scientifique, pour ses conseils avisés à mon égard et sa bienveillance.

Au **Dr. Bruno Delorme**, mon co-directeur de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant au sein du département R&D de Macopharma Biothérapie, pour m'avoir suivi pendant mon projet de fin d'étude d'ingénieur, et jusque dans l'aventure de la thèse.

Au **Pr. Marie-Thérèse Rubio** et au **Dr. Loïc Reppel**, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon manuscrit ainsi que ma soutenance. Je vous remercie pour l'attention que vous avez portée à ce travail.

Je remercie vivement **Marie Laulhé** et **Sylvie Lefebvre** de m'avoir accompagné tout au long de mon projet de fin d'étude au laboratoire de R&D de Macopharma Biothérapies, pour leurs conseils précieux, et leur investissement à me transmettre leurs compétences scientifiques.

Je remercie l'ensemble de l'équipe de R&D Biothérapie, pour leur accueil chaleureux et leur bonne humeur: **Pauline, Thomas, Maxime, Sandy, Lucie, Philippine, Sabrina, Justine, Veronica, Florian, Séréna, Magali** et **Alice**.

Je remercie mes amis de la faculté de pharmacie, d'avoir égayé ces années d'études.

Maud, à notre amitié qui perdure, à nos expériences partagées, Erasmus, Lunginnov, Lille, Carlos veille sur nous, soit en sûre.

Clémence, à notre soutien mutuel qui s'est renforcé pendant nos années sur les bancs de l'ENSAIA, merci pour ton oreille attentive.

Mathilde, même si certaines épreuves nous ont séparé, l'amitié sincère qui nous unit résiste et je m'en réjoui.

Merci à l'équipe des « indus », à chacune de vous pour votre caractère jovial : **Noémie, Justine, Hélène, Amaill** et **Stéphanie**.

Merci également à **Anne, Jean-Félix** et **Clothilde**, pour les moments que nous avons partagés ensemble.

Je remercie mes amis de l'ENSAIA, **Sara, Mathieu** et **Tanguy**, pour nos expériences partagées.

Mes remerciements iront ensuite aux personnes qui ont contribué à me faire évoluer au cours de mes études, **Nathalie, Hanane, Angela, Olivia, Tim** et **Julian**.

Une attention particulière à **Derry**, pour ses encouragements et son aide.

J'aimerais ensuite remercier mes amis de longue date, pour leur amitié authentique, pour leurs rires, pour être ce qu'ils sont.

Amélie, pour ton enthousiasme communicatif et notre soutien mutuel dans ces moments.

Caro, pour ton optimisme infaillible qui nous ravie tous et pour être une confidente chère à mes yeux.

Emefa, pour ta détermination et ta force intérieure qui nous émerveille.

Laure, pour ton écoute attentive et tes encouragements empreints de ton énergie.

Mouzon, pour ta folie singulière et à ta façon si particulière de croquer la vie.

Sarah, pour ton humeur pétillante et tes histoires cocasses.

Vince, pour ton sens de l'humour et ton affection.

Mes derniers remerciements vont à ma famille.

A ma mère, à mon père, pour leur patience et leur soutien incommensurable dans chaque étape de ma vie.

A mes deux grandes sœurs.

A Isabelle, « *le doute est le commencement de la sagesse* »*, pour l'exemple que tu es.

A Pauline, pour ton regard bienveillant et ton aide si précieuse à chaque moment.

*Aristote

TABLE DES MATIERES

Abréviations	5
Table des figures	8
Table des tableaux	11
Introduction générale	12
Partie I. La photophérèse extracorporelle, comme traitement de la maladie du greffon contre l'hôte, aiguë et chronique.	14
1 Généralités sur la PCE.....	15
1.1 Historique.....	15
1.2 Mise en œuvre de la PCE	17
1.2.1 Principe.....	17
1.2.2 Deux types de procédure PCE	17
1.3 Indications cliniques	19
2 La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD).....	20
2.1 Allogreffe de CSH : effets GVL et GVHD.....	20
2.2 Facteurs modulant la GVHD.....	21
2.2.1 Choix du protocole de conditionnement	21
2.2.2 Choix du donneur et rôle du système HLA	23
2.2.3 Source du greffon.....	25
2.3 Formes cliniques de la GVHD	27
2.4 GvHD aiguë (GVHDa).....	28
2.4.1 Physiopathologie de la GVHDa	28
2.4.2 Symptomatologie et classification de la GVHDa.....	30
2.4.3 Facteurs de risques de la GVHDa	32
2.4.4 Prise en charge thérapeutique de la GVHDa.....	33
2.5 GVHD chronique (GVHDc).....	36
2.5.1 Physiopathologie de la GVHDc	37

2.5.2	Symptomatologie et classification de la GVHDc	40
2.5.3	Facteurs de risques de la GVHDc	42
2.5.4	Prise en charge thérapeutique de la GVHDc	42
3	La PCE dans le traitement de la GVHD	46
3.1	Mécanismes d'action de la PCE	46
3.1.1	Induction de l'apoptose des leucocytes	48
3.1.2	Activation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) tolérogènes	49
3.1.3	Induction des cellules T régulatrices (Tregs)	49
3.1.4	Modification de la sécrétion en cytokines	50
3.2	La PCE dans le traitement de la GVHDa	51
3.2.1	Sélection du patient	52
3.2.2	Protocole de traitement	52
3.2.3	Evaluation de la réponse à la PCE	53
3.2.4	Analyse de la littérature et des essais cliniques	54
3.3	La PCE dans le traitement de la GVHDc	56
3.3.1	Sélection du patient	56
3.3.2	Protocole de traitement	57
3.3.3	Evaluation de la réponse	57
3.3.4	Analyse de la littérature et des essais cliniques	58
3.4	Intérêts de la PCE	60
4	La PCE en système dissocié : un produit de thérapie cellulaire autorisé	62

Partie II. Etude de performances biologiques *in vitro* de la PCE en système dissocié 65

1	La PCE en système dissocié	66
1.1	Aspects techniques	66
1.1.1	Rayonnement UV	66
1.1.2	Machine à irradiation UVA	66
1.1.3	Poche d'irradiation	67

1.1.4	Molécule photoactivable : 8-méthoxypsoralène (8-MOP)	68
1.2	Déroulement de la procédure PCE.....	69
2	Objectif.....	71
2.1	Critères de performance.....	71
2.2	Paramètres clés	73
3	Matériels et méthodes	75
3.1	Modèles cellulaires pour l'étude <i>in vitro</i>	75
3.1.1	Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC).....	75
3.1.2	Lignée de cellules T (JURKAT)	76
3.1.3	Comparaison des deux modèles cellulaires	77
3.2	Protocole expérimental.....	78
3.2.1	Culture des cellules	78
3.2.2	Préparation des poches d'irradiation	79
3.2.3	Isolement des cellules JURKAT	82
3.2.4	Mise en culture des cellules JURKAT isolées.....	83
3.2.5	Mesure de la prolifération cellulaire	83
3.2.6	Mesure de l'apoptose	83
3.3	Méthodes analytiques mises en œuvre	85
3.3.1	Analyse de l'inhibition de la prolifération cellulaire.....	85
3.3.2	Analyse de l'apoptose	85
3.3.3	Analyse statistique	88
4	Résultats	89
4.1	Influence de la concentration en 8-MOP.....	89
4.1.1	Etude de l'inhibition de la prolifération des JURKAT.....	89
4.1.2	Etude de l'apoptose des JURKAT	91
4.2	Influence du taux d'hématocrite.....	94
4.2.1	Etude de l'inhibition de la prolifération des JURKAT.....	94
4.2.2	Etude de l'apoptose	96
5	Discussion.....	99

Conclusion générale	104
Annexes	105
Bibliographie	121

ABREVIATIONS

ABM	Agence de la biomédecine
ACD-A	Anticoagulant citrate dextrose A
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament
ASFA	<i>American society for apheresis</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATG	Globulines anti-thymocytes
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
CCR5	Récepteur chimiokine 5
CFSE	Carboxy-fluorescéine succinimidyl ester
CGR	Concentré de globules rouges
CHU	Centre universitaire hospitalier
CMF	Cytométrie en flux
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMN	Cellule mononucléée
CMV	Cytomégalovirus
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CsA	Ciclosporine
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CSM	Cellule souche mésenchymateuse
CSP	Code de la santé publique
CXCL	Chimiokine
DC	Cellule dendritique
DLI	<i>Donor lymphocyte infusion</i> : Injection de lymphocytes du donneur
EDF	<i>European dermatology forum</i>
EFS	Etablissement français du sang
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EVA	Ethylène-acétate de vinyle
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GCSH	Greffe de cellules souches hématopoïétiques

GR	Globule rouge
GVHD	<i>Graft versus host disease</i> : maladie du greffon contre l'hôte
GVHDa	Maladie du greffon contre l'hôte aiguë
GVHDc	Maladie du greffon contre l'hôte chronique
GVL	<i>Graft versus leukemia</i> ou réaction du greffon contre la tumeur
HAS	Haute Autorité de Santé
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
Ht	Hématocrite
JEADV	<i>Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology</i>
JURKAT	Lignée cellulaire de lymphocytes T humains
IBMTR	<i>International Bone Marrow Transplant Research</i>
ICT	Irradiation corporelle totale
IFN-γ	Interféron gamma
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
IP	Iodure de propidium
LB	Lymphocyte B
LCCT	Lymphome cutané à cellules T
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
MMF	Mycophénolate mofétil
MP	Méthylprednisolone
MTX	Méthotrexate
NaCl	Chlorure de sodium
NFS	Numération formule sanguine
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NK	Cellule natural killer
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> : cellules mononuclées du sang périphérique
PCE	Photophérèse ou photochimiothérapie extracorporelle
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PHA	Phytohémagglutinine
PS	Phosphatidylsérine
PTA	Produit thérapeutique annexe
PUVA	Psoralène + rayonnements ultraviolets A

RCP	Résumé des caractéristiques du produit
SAL	Sérum anti-lymphocytaire
SFGM-TC	Société française de greffe de moelle et de thérapie cellulaire
TGF-β	<i>Transforming growth factor bêta</i>
Th1, Th2, Th17	Lymphocyte T helper
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Tregs	Lymphocyte T régulateurs
TTL	Test de transformation lymphoblastique
UTCT	Unité de thérapie cellulaire et banque de Tissus
UVA	Rayonnements ultraviolets A
8-MOP	8-méthoxypsoralène ou méthoxsalène

TABLE DES FIGURES

Figure 1 Plante <i>Ammi majus</i>	15
Figure 2 Appareillages des systèmes fermés (<i>on-line</i>) et dissociés (<i>off-line</i>).	18
Figure 3 Arbre décisionnel du choix du donneur pour une allogreffe de CSH (adapté de Michallet, 2011 et Fontbrune et al., 2016). (<i>mismatch</i> : différence entre 1 ou 2 antigènes HLA)	24
Figure 4 Répartition des allogreffes de CSH selon le type du donneur (non apparenté, apparenté HLA identique, apparenté mismatch) (ABM, 2015, source : <i>déclarations d'activité des centres de greffe</i>).	25
Figure 5 Evolution de la répartition des sources de greffon des CSH allogéniques (ABM, 2015, source <i>déclarations d'activité des centres de greffe</i>).....	26
Figure 6 Arbre décisionnel pour le diagnostic de la GVHD aiguë et chronique d'après le NIH (Jagasia et al., 2015a).	27
Figure 7 Physiopathologie de la GVHDa qui se déroule en 3 grandes phases (Harris 2013, Ferrara 2009).	28
Figure 8 Eruption maculopapuleuse sur le thorax d'un patient en GVHDa grade III (Villareal et al., 2016).	30
Figure 9 Arbre décisionnel lié au choix du traitement de la GVHDa (adapté de Dignan et al., 2012a).	36
Figure 10 Physiopathologie de la GVHDc (schéma adapté de Min, 2011).	37
Figure 11 Classement des traitements de 2 ^{ème} ligne de la GVHDc par ordre de fréquence d'utilisation d'après 60 études publiées entre 1990 et 2011 (Martin et al., 2011).	44
Figure 12 Arbre décisionnel du choix de traitement de la GVHDc modérée à sévère (Dignan, 2012).	45
Figure 13 (A) Mécanisme de photoréaction du 8-méthoxypsoralène activé par les UVA avec la thymine de l'ADN des CMN lors du traitement PCE (Jeantet, 2004). (B) Structure d'un crosslink entre le 8-MOP et l'ADN (Heshmati, 2003).	47
Figure 14 Différences morphologiques entre la nécrose et l'apoptose (Saikumar, 1999).	48
Figure 15 Mécanisme de maturation des cellules dendritiques immatures en CPA avec un phénotype de tolérance (Capuano et al., 2015).	49
Figure 16 Différenciation des sous-populations de lymphocytes T selon l'environnement cytokinique (adapté de Capuano et al., 2015).	50
Figure 17 Effets de la PCE chez un patient atteint de GVHD (adapté de Hart, 2013)	51
Figure 18 Machine à irradiation UVA (MacoGenic G2) utilisée pour la PCE en système dissocié.	66
Figure 19 (A) Architecture interne de la MacoGenic G2. (B) Spectre d'émission des lampes de la MacoGenic G2.	67
Figure 20 Schéma de la poche d'irradiation.	67
Figure 21 Structure du 8-méthoxypsoralène (8-MOP).	68

Figure 22 Les trois étapes de la procédure PCE en système dissocié de Macopharma.	69
Figure 23 Photo de cellules JURKAT à faible densité observée au microscope (site ATCC, JURKAT clone E6-1).	76
Figure 24 Principales étapes du déroulement d'un essai type de l'étude de performances biologique de la PCE sur les cellules JURKAT avec les indications temporelles.....	78
Figure 25 Composition de la poche d'irradiation pour le traitement PCE.....	79
Figure 26 Schéma des différentes phases contenant les composants du sang et les JURKAT après centrifugation sur Ficoll (GE Healthcare).	82
Figure 27 Principe du double marquage à l'annexine-V/FITC et à l'iodure de propidium (PI) en fonction de l'état de viabilité cellulaire (Dojindo).....	84
Figure 28 (A) Exemple de diagramme pour identifier la population de JURKAT selon la taille et la granularité. (B) Exemple de diagramme pour identifier les sous-populations cellulaires (monocytes, lymphocytes, globules rouges) présentés dans un buffy coat.....	86
Figure 29 Diagrammes du nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence de (A) l'Annexine-V et de (B) l'IP. (C) Diagramme de l'intensité du signal de l'IP en fonction de l'intensité du signal de l'Annexine-V.....	87
Figure 30 Diagramme de la répartition des JURKAT au CMF après marquage des cellules à l'annexine-V/FITC et à l'IP en fonction de leur état de viabilité (Wolnicka -Glubisz et al. 2002).....	87
Figure 31 (A) Comparaison du taux de prolifération des JURKAT sans (contrôle) et avec irradiation UVA pour les différentes concentrations de 8-MOP. (B) Comparaison du pourcentage d'inhibition de la prolifération des JURKAT.	90
Figure 32 Résultats de la répartition des cellules JURKAT au CMF après marquage Annexine-V/ IP pour un échantillon d'une expérience à J+1 après traitement PCE. Le quadrant droit (orange) représente le pourcentage de cellules apoptotiques dont la valeur est indiquée en rouge. Le quadrant supérieur gauche représente le pourcentage de cellules en nécrose ($\leq 0,4\%$).....	91
Figure 33 (A) Comparaison du pourcentage d'apoptose moyen des JURKAT marquées Annexine-V+ sans (contrôle) avec irradiation UVA pour les différentes concentrations de 8-MOP. (B) Comparaison du Δ apoptose des JURKAT. Les valeurs significatives sont marquées par un astérisque.....	92
Figure 34 (A) Comparaison du taux de prolifération des JURKAT sans (contrôle) et avec irradiation UVA pour les différents taux d'hématocrite. (B) Comparaison du pourcentage d'inhibition de la prolifération des JURKAT.....	95
Figure 35 Résultats de la répartition des cellules JURKAT au CMF après marquage Annexine-V/IP pour un échantillon d'une expérience à J+1 après traitement PCE. Le quadrant droit (orange) représente le pourcentage de cellules en apoptose dont la valeur est indiquée en rouge. Le quadrant supérieur gauche donne le pourcentage de cellules en nécrose ($\leq 0,2\%$).	96

Figure 36 (A) Comparaison du taux d'apoptose moyen des JURKAT marquées Annexine-V+ pour les cellules sans (contrôle) et avec irradiation UVA pour les différents taux d'hématocrite. (B) Comparaison du Δ apoptose des JURKAT.....	97
Figure 37 Gènes codant pour le système HLA situé sur le chromosome 6 chez l'être humain.	106
Figure 38 Complexes formés par les TCR des lymphocytes T CD8+ et CD4+ et les molécules HLA de classe I et classe II.	107

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I Protocoles de conditionnement (de Fontbrune, 2016, adapté de Bacigalupo et al., 2009).....	22
Tableau II Classification des stades, des grades et de la sévérité de la GVHDa d'après les critères de Glucksberg révisés et de l'IBMTR (Przepiorka et al., 1995 ; Rowlings et al., 1997).	32
Tableau III Cellules du système immunitaire impliquées dans la GVHDC et leurs rôles (Presland, 2016).	40
Tableau IV Principaux symptômes clinique associés à la GVHDC (Lee and Flowers, 2008 ; Presland, 2016).....	41
Tableau V Classification des stades de la GVHDC établi par le NIH, en fonction du nombre d'organes touchés et de leur sévérité d'atteinte (Filipovich et al., 2005; Jagasia et al., 2015b).	42
Tableau VI Définitions de la réponse clinique de la GVHDa au traitement PCE.....	53
Tableau VII Résumé de la démarche à suivre pour la prise en charge de la GVHDa par la PCE	54
Tableau VIII Taux de réponse globale (%) obtenus après PCE (tous organes confondus et par organe) donné par les guides pratiques à partir d'études cliniques réalisés sur la GVHDa (adapté de Jossart et., al 2016)	55
Tableau IX Résumé de la démarche à suivre pour la prise en charge de la GVHDC par la PCE	58
Tableau X Taux de réponse globale (%) obtenus après PCE (tous organes et par organe) donné par les guides pratiques à partir d'études cliniques réalisées sur la GVHDC (adapté de Jossart et., al 2016).....	58
Tableau XI Essais cliniques enregistrés sur Clinical Trials pour l'étude de l'efficacité de la PCE chez les patients atteints de GVHDC.	59
Tableau XII Critères de contrôle qualité et recommandations pour la préparation du produit de thérapie cellulaire PCE (ANSM, 2011).	63
Tableau XIII Composition de la solution de 8-MOP.....	68
Tableau XIV Domaine de variation des deux paramètres étudiés pour l'étude de performances de la PCE en système dissocié.	74
Tableau XV Proportions cellulaires des PBMC chez l'être humain (Miyahira, 2012).....	76
Tableau XVI Comparaison des caractéristiques des cellules prélevées chez un patient avec celles des PBMC de donneurs sains et des JURKAT	78
Tableau XVII (A) Caractéristiques des cellules (JURKAT et CGR) utilisées pour une expérience. (B) Conditions expérimentales avec calculs des volumes à utiliser pour la préparation des poches d'un essai avec variation du taux d'hématocrite.....	81
Tableau XVIII Conditions de culture du contrôle (cellules non irradiées) à partir de J+1 jusque J+4.....	83

INTRODUCTION GENERALE

Depuis plus de soixante ans, la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) a révolutionné le traitement des maladies du sang. Ces cellules, dites multi-potentes, ont l'extraordinaire capacité à régénérer les populations cellulaires du sang comprenant les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. La greffe de CSH où le donneur et le receveur sont différents est appelée **allogreffe** ou **greffe allogénique**. Elle est indiquée, d'après l'Agence de la Biomédecine (ABM), à 90% des cas dans le traitement des hémopathies malignes. Et, depuis une dizaine d'années, le nombre d'allogreffes de CSH ne cesse d'augmenter, avec 1252 allogreffes réalisées en 2006 contre 1964 en 2015 (ABM, 2015).

Cette immunothérapie de choix pour traiter les hémopathies malignes est basée sur la capacité de cellules immunocompétentes issues du greffon, appelées lymphocytes T, à détruire les cellules tumorales par un **effet GVL** (*graft versus leukemia*) qui signifie réaction du greffon contre la tumeur. Cependant, ces lymphocytes T reconnaissent également certains tissus sains du receveur comme étrangers et les détruisent, c'est ce que l'on nomme l'**effet GVHD** (*graft versus host disease*) ou la maladie du greffon contre l'hôte.

Le risque de survenue d'une GVHD est directement lié à une différence entre le système HLA du donneur et du receveur. Malgré une thérapie prophylactique immunosuppressive, environ 50% des patients développent une GVHD qui s'avère être mortelle dans 10% des cas (Jamil and Mineishi, 2015). C'est la principale cause de l'échec d'une allogreffe de CSH.

Dès les premiers signes cliniques qui évoquent une GVHD, généralement une atteinte cutanée, un traitement de première ligne, par **corticostéroïdes**, est mis en place. L'inconvénient majeur de la corticothérapie est la forte toxicité liée à son utilisation à long terme. Ce qui nécessite pour plus de 50% des patients, le recours à un traitement de deuxième ligne. De nombreuses options thérapeutiques existent, cependant, aucun consensus en faveur d'une thérapie n'a encore été adopté.

Parmi les thérapies de deuxième ligne, l'une d'entre elle se démarque, et semble être préférentiellement choisie par les cliniciens. C'est la technique de **thérapie cellulaire** appelée **photophérèse** ou **photochimiothérapie extracorporelle**, abrégée par **PCE**. Cette thérapie se déroule en trois étapes dans un centre de transplantation spécialisé. Les globules blancs ou leucocytes du patient sont prélevés, puis un agent intercalant photoactivable, le 8-MOP, est ajouté aux cellules qui sont ensuite irradiées aux

rayonnements ultraviolets A (UVA) avant d'être réinjectées au patient. Les propriétés d'**immunomodulation** attribuées à cette thérapie en font une alternative séduisante. En effet, la PCE agit par des mécanismes immunologiques complexes encore mal élucidés. La PCE se caractérise par l'**absence d'immunosuppression**, ce qui lui confère un avantage par rapport aux autres thérapies, qualifiées d'immunosuppressives, qui exposent le patient à un risque plus élevé de contracter une infection opportuniste.

Ces travaux de thèse se divisent en deux grandes parties, la première bibliographique et la seconde expérimentale. La première partie propose d'étudier la PCE comme traitement de la GVHD sous ses deux formes cliniques, aiguë et chronique. Il s'agit tout d'abord, d'analyser l'état des connaissances actuelles liées à la GVHD. Pour cela, une recherche et une synthèse bibliographique ont été réalisées. Les aspects physiopathologiques, cliniques, épidémiologiques et thérapeutiques sont traités. Il s'agit ensuite de comprendre, d'une part, comment la PCE fonctionne, et d'autre part d'évaluer son efficacité dans le traitement de la GVHD.

La seconde partie de cette thèse s'inscrit dans un projet de fin d'études réalisé au sein du département recherche et développement de la société Macopharma Biothérapie, qui a développé plusieurs produits de la technologie PCE. Un travail expérimental a été mené pour étudier les performances biologiques de la PCE en système dissocié (le prélèvement des leucocytes et l'irradiation UVA se fait avec deux dispositifs médicaux contrairement à la PCE en système fermé). Pour cela, une étude *in vitro* a été conduite pour évaluer l'influence de la variation des paramètres de la PCE sur un modèle cellulaire de lymphocytes T appelé JURKAT. Les résultats apportent des informations sur l'efficacité de la PCE sur le plan biologique.

PARTIE I.

LA PHOTOPHERESE EXTRACORPORELLE, COMME TRAITEMENT DE LA MALADIE DU GREFFON CONTRE L'HOTE, AIGUË ET CHRONIQUE.

Cette première partie se propose de définir brièvement en quoi consiste le traitement de photophérèse extracorporelle (PCE). Puis, de façon plus approfondie, nous développerons la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) à la fois sous sa forme aiguë et chronique, depuis l'origine de la cause de la maladie, en passant par le mécanisme physiopathologique. Enfin, nous verrons quelle est la stratégie thérapeutique classique mise en œuvre pour lutter contre la GVHD avant de se focaliser sur la prise en charge de cette pathologie par la PCE.

1 GENERALITES SUR LA PCE

La PCE est une technique que l'on qualifie de **biothérapie**. On entend par ce terme, une thérapie basée sur « l'emploi d'organismes vivants, comme par exemple les cellules, les tissus, les gènes ou des substances prélevées sur des organismes vivants comme les hormones ou encore des extraits d'organes ou de tissus » (Schwartz, 2011). La thérapie cellulaire est une branche de la biothérapie, elle consiste à manipuler des cellules souches ou des cellules différenciées. Son objectif est de réparer les cellules déficientes par des cellules saines pour reconstruire le tissu ou la fonction d'un organe. La PCE est une **thérapie cellulaire** originale où les cellules déficientes ne sont pas directement réparées. En effet, une partie des cellules de l'organisme humain est manipulée *ex vivo* avant d'être réinjectée au même organisme et d'agir par des **mécanismes immunologiques** encore à l'étude.

Afin de mieux cerner les différents aspects de cette thérapie, nous verrons comment cette technique a évolué au cours du temps et dans quelles situations pathologiques la PCE a fait ses preuves.

1.1 HISTORIQUE

Pour comprendre les origines de la PCE, un retour sur les premiers pas de la photothérapie (du grec *photôs*, lumière, *therapeia*, traitement) est nécessaire. Nous savons que la lumière est reconnue depuis l'antiquité pour ses vertus thérapeutiques notamment dans le traitement des maladies cutanées. Au temps de l'Egypte Antique, la lumière était vénérée et reconnue pour ses propriétés curatives. Ainsi, pour traiter certaines maladies comme le vitiligo¹, on préconisait de s'exposer au rayonnement solaire après avoir ingéré les feuilles d'une plante appartenant à la famille des Apiacées appelée *Ammi majus* poussant le long du Nil, illustrée ci-contre (Heshmati and Andreu, 2003).

A l'époque contemporaine, la première utilisation médicale d'un rayonnement électromagnétique non ionisant tel que les rayons ultraviolets a valu à Niels Ryberg Finsen en 1903 d'être récompensé par



Figure 1 Plante *Ammi majus*

¹ Maladie auto-immune caractérisée par une dépigmentation de la peau sous forme de taches blanches.

un Prix Nobel de médecine pour le traitement d'une maladie dermatologique le *lupus vulgaris*, c'est le commencement de la photothérapie (Wu et al., 2016).

En 1947, (Fahmy and Abu-Shady, 1947) isolent et caractérisent le **principe actif de la plante *Ammi majus*** qui est un composé chimique de type psoralène appelé **8-méthoxypsoralène (8-MOP)** ou encore nommé ammoïdine. El Mofty montre que l'exposition au rayonnement solaire après avoir ingéré du 8-MOP conduit bien à la repigmentation de la peau dans le traitement du vitiligo (Monem El Mofty, 1948). C'est à la suite des travaux de deux dermatologues américains, Lerner et Fitzpatrick, que les connaissances s'améliorent puisqu'ils démontrent d'une part, que la longueur d'onde d'activation optimale du 8-MOP est de 365 nm, et, d'autre part, que l'administration du 8-MOP à l'Homme peut se faire sans danger dans le traitement du vitiligo (Lerner et al., 1953). Sur la base de ces études, Parrish et al., en 1974, développe la « PUVA thérapie » qui correspond à l'association d'un composé chimique, le psoralène (P), aux rayonnements ultraviolets A (UVA) dans le traitement du psoriasis. Cette technique correspond à ce que l'on appelle la photochimiothérapie.

C'est à la suite des résultats probants publiés par Edelson et al., en 1987, dans la lutte contre les lymphomes cutanés à cellules T (LCCT) que se développe la thérapie cellulaire connue sous le nom de photochimiothérapie ou photophérèse extracorporelle, désigné par PCE. Le principe de ce traitement repose sur l'administration *per os* du 8-MOP au patient suivi par le prélèvement de ses leucocytes et de leur traitement *ex vivo* par irradiation aux UVA, avant de les réinjecter au patient. Grâce à la collaboration des scientifiques comme Edelson, Gasparro et Berger avec la société Johnson & Johnson, le premier dispositif de PCE voit le jour. Cette technique est rapidement approuvée en 1988 par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux, la *Food and Drug Administration (FDA)*, en charge de la sécurité sanitaire pour l'indication du LCCT au stade avancé. Cette autorisation est suivie par celle des autorités sanitaires européennes.

La PCE évolue en 1990, le 8-MOP est alors directement ajouté dans la poche d'irradiation contenant les leucocytes du patient (Andreu et al., 1994). Cela présente l'avantage de limiter les effets indésirables provoqués par le 8-MOP au niveau digestif et oculaire, et d'éviter la variation de concentration du 8-MOP dans le sang due à des différences d'absorption gastro-intestinale entre les patients (Knobler et al., 2009).

1.2 MISE EN ŒUVRE DE LA PCE

1.2.1 Principe

La Haute Autorité de Santé (HAS, 2010) a défini la PCE comme un acte thérapeutique effectué en 3 étapes qui consiste à prélever chez un patient les leucocytes ou les cellules mononucléées du sang (CMN) autologues, à les irradier aux UVA en présence d'un agent intercalant photoactivable, le 8-MOP, et à les réinjecter au patient.

1.2.2 Deux types de procédure PCE

La PCE peut se faire selon deux types de procédure qui se distinguent par l'appareillage utilisé comme représenté sur la Figure 2.

La première méthode dite « **fermée** » ou « **on-line** » est d'origine américaine. Elle repose sur l'utilisation d'un dispositif médical unique qui assure l'ensemble des 3 étapes en une seule opération et qui est lié au patient durant tout le temps de la procédure. Cette technologie a été développée par la société Therakos sous le nom d'UVAR XTS (2^{ème} génération) ou Therakos CELLEX Photoapheresis System (3^{ème} génération).

La seconde méthode dite « **dissociée** » ou « **off-line** » est d'origine française. Elle fonctionne en deux étapes. Elle associe deux dispositifs médicaux : un séparateur de cellules en flux continu pour la collecte des CMN et un appareil à irradiation UVA. Le séparateur de cellules utilisé est non spécifique, ce qui a l'avantage de réduire le coût de la procédure en utilisant l'appareillage déjà disponible dans l'établissement de santé. Parmi les séparateurs de cellules disponibles sur le marché, on retrouve les appareils : Cobe Spectra (Terumo BCT), Spectra Optia (Terumo, BCT), Amicus et ComTec (Fresenius Kabi). Quant aux appareils à irradiation UVA, il en existe plusieurs comme les systèmes MacoGenic G2 (Macopharma, France), UVA PIT (Med Tech Solution, Germany) ou encore PUVA Combi-Light UVA (Cellmax, Germany).

Ces deux procédures se distinguent par leurs caractéristiques techniques et leurs modalités réglementaires. Le choix de l'une ou l'autre des procédures dépend des établissements de santé, de l'accès aux appareillages et du choix des cliniciens.

Système fermé ou « on-line »

Dispositif médical avec séparateur cellulaire et irradiations UVA



Therakos UVAR XTS



Therakos CELLEX Photopheresis System

Système dissocié ou « off-line »

Séparateurs cellulaires



Cobe Spectra



Spectra Optia



Amicus



ComTec

Appareils à irradiations UVA



MacoGenic G2



UVA PIT



PUVA combi light

Figure 2 Appareillages des systèmes fermés (on-line) et dissociés (off-line).

1.3 INDICATIONS CLINIQUES

Les pathologies traitées par PCE sont « liées à un dysfonctionnement du système immunitaire soit en situation autologue (pathologies tumorales ou auto-immunes) ou soit en situation allogénique (greffe d'organe, maladie du greffon contre l'hôte) » (HAS, 2010). A la suite de consensus d'experts, plusieurs guides pratiques ont défini des recommandations relatives à l'utilisation de la PCE. L'efficacité de cette thérapie a été reconnue pour les trois indications suivantes :

- les **Lymphomes cutanés à cellules T (LCCT)** : qui comprennent le Mycosis Fongoïde et le Syndrome de Sézary et représentent la seule indication pour laquelle la PCE a été approuvée par la FDA ;
- la **Maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)** aiguë et chronique ;
- et, le **Rejet de greffe d'organes solides**, généralement suite à une transplantation cardiaque ou pulmonaire.

La PCE est une thérapie cellulaire hautement spécialisée qui agit en modulant le fonctionnement des lymphocytes T et d'autres cellules du système immunitaire. L'innocuité et l'efficacité obtenue avec cette thérapie poussent les cliniciens à élargir le champ d'application thérapeutique de la PCE au traitement des **pathologies auto-immunes** telles que la Maladie de Crohn, la sclérodermie ou la sclérose en plaques (Adamski et al., 2015).

Les trois principales indications de la PCE correspondent à des pathologies complexes sur les plans mécanistiques et thérapeutiques. C'est pourquoi, le choix de focaliser ce travail sur la prise en charge de la GVHD aiguë et chronique par la PCE a été retenu. En effet, l'une des indications cliniques où la PCE est la plus prescrite est la GVHD.

2 LA MALADIE DU GREFFON CONTRE L'HOTE (GVHD)

La maladie du greffon contre l'hôte ou *graft versus host disease* (GVHD) est une complication majeure survenant chez 50 à 80% des patients suite à une **greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)** (Funke et al., 2016). Lorsque les cellules du receveur et du donneur sont génétiquement différentes, on parle de greffe allogénique ou d'allogreffe. La GVHD représente le principal obstacle au succès d'une allogreffe de CSH.

Cette partie se propose de décrire dans un premier temps le contexte qui favorise la survenue d'une GVHD, puis, d'exposer les mécanismes physiopathologiques responsables en présentant les différents tableaux cliniques selon la forme de la GVHD. Nous verrons enfin la stratégie thérapeutique actuellement adoptée pour remédier à cette complication qui s'avère être mortelle dans 10% des cas (Jamil and Mineishi, 2015).

2.1 ALLOGREFFE DE CSH : EFFETS GVL ET GVHD

L'allogreffe de CSH est une **immunothérapie** de choix dans le traitement des **hémopathies malignes**. D'après les données recensées par l'Agence de la Biomédecine (ABM), en 2015, à partir de la Base ProMISe², les trois principales indications d'allogreffes sont la leucémie aiguë myéloblastique (34,1%), la myélodysplasie (15,4%) et la leucémie aiguë lymphoblastique (13,4%).

Le recours à ce type de traitement constitue la seule option thérapeutique pour ces pathologies (de Fontbrune et al., 2016). L'allogreffe de CSH permet d'apporter des cellules immunocompétentes, appelées **lymphocytes T**, d'un donneur qui vont réagir contre les cellules tumorales du receveur. Cet effet recherché est appelé **réaction du greffon contre la tumeur** ou en anglais *graft versus leukemia* (**GVL**). Ces lymphocytes T dits alloréactifs peuvent en plus de leur action anti-tumorale réagir contre les tissus et les organes du receveur par la reconnaissance de cellules porteuses d'antigènes étrangers. Cela peut conduire à une **réaction du greffon contre l'hôte (GVHD)** toxique pour le receveur. En 1966, (Billingham, 1966) a défini les trois conditions qui mènent à une GVHD :

- la présence de cellules immunocompétentes dans le greffon ;
- l'expression d'antigènes chez le receveur étrangers à ceux du greffon du donneur ;

² ProMISe est une base de données internationale, coordonnée par la Société Européenne de Greffe de moelle (EBMT). Elle permet de consigner et d'extraire les paramètres biologiques et médicaux par patient transplanté de moelle osseuse, de cellules souches ou de sang de cordon placentaire.

- l'immunodépression du receveur qui le rend incapable de déclencher une réaction immunitaire contre les cellules du greffon.

Le pouvoir curatif de l'allogreffe de CSH repose sur les effets immunologiques de la GVL, qui se trouvent étroitement liés aux effets néfastes de la GVHD.

Pour augmenter l'effet GVL, par exemple en cas de rechute après une allogreffe de CSH, une stratégie consiste à réaliser une ou plusieurs injections de lymphocytes du même donneur (DLI) (Guillaume et al., 2014). La Société française de Greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC) a émis des recommandations concernant l'utilisation des DLI, consultables sur leur site internet. Les DLI peuvent également être utilisés à titre prophylactique pour des patients avec une hémopathie maligne avec un risque élevé de rechute et ne présentant pas de GVHD aiguë avec un grade supérieur à I.

Une meilleure compréhension des mécanismes biologiques associés à l'allogreffe de CSH devrait permettre de mieux dissocier l'effet bénéfique anti-tumoral de l'effet toxique.

Actuellement, il est possible de **moduler l'intensité de la GVHD** par le choix méticuleux des différentes conditions de réalisation de l'allogreffe de CSH. Il est essentiel de tenir compte des facteurs suivants qui seront développés par la suite :

- le **choix du protocole de conditionnement** ;
- le **choix du donneur** ;
- et, la **source de CSH** appelée **greffon**.

2.2 FACTEURS MODULANT LA GVHD

2.2.1 Choix du protocole de conditionnement

En amont de l'allogreffe, le patient doit subir une phase de préparation appelée « **conditionnement** » pour être capable de recevoir les CSH du donneur. Cette phase a trois principales fonctions (Singh and McGuirk, 2016) :

1. détruire les cellules tumorales ;
2. détruire le système immunitaire du patient pour prévenir le rejet de greffe ;
3. créer une niche dans la moelle osseuse pour faciliter l'installation des CSH du donneur.

Le conditionnement est donc à la fois **immunosuppresseur** et **myélotoxique** (HAS, 2016). Il existe plusieurs protocoles de conditionnement présentés dans le Tableau I qui se distinguent par leur capacité myéloablative (Bacigalupo et al., 2009; de Fontbrune et al.,

2016). On différencie le régime standard, dit myéloablatif, et le régime non myéloablatif. Il existe également des conditionnements qualifiés d'intensité réduite.

Le **conditionnement myéloablatif** repose sur une chimiothérapie intensive avec l'emploi d'agents alkylants ou d'anti-métabolites (comme le Busulfan) pouvant être associés à une irradiation corporelle totale (ICT) chez les adultes. Son objectif principal est l'**éradication des cellules malignes résiduelles**.

Tandis que le **conditionnement non myéloablatif** n'a recours à aucune chimiothérapie myélotoxique. Il est basé sur l'utilisation d'immunosuppresseurs associés à de faibles doses de chimiothérapie ou d'irradiation (HAS, 2016). Son objectif principal est d'**induire une tolérance du receveur vis-à-vis du greffon**. Il n'a pas pour but d'éliminer les cellules malignes résiduelles, ce rôle est laissé aux lymphocytes T présents dans le greffon qui exercent un puissant effet immunologique contre les cellules leucémiques. Cela permet de préparer l'allogreffe, en utilisant moins d'immunosuppresseurs, l'effet de la GVL est plus important (de même que la GVHD). Ce type de conditionnement a permis aux patients âgés de plus de 55 ans de bénéficier d'une allogreffe jusqu'alors non recommandée avec le conditionnement myéloablatif.

Tableau I Protocoles de conditionnement (de Fontbrune, 2016, adapté de Bacigalupo et al., 2009).

Conditionnement myéloablatif
ICT ≥ 5 Gy dose unique ou ≥ 8 Gy fractionnée Busulfan > 8 mg/kg (dose orale ou équivalent intraveineux)
Conditionnement non myéloablatif
ICT ≤ 2 Gy +/- analogue des purines Fludarabine + Cyclophosphamide +/- SAL Cladribine + aracytine Irradiation lymphoïde totale + SAL
Conditionnement non myéloablatif
Autres conditionnement que myéloablatif ou non myéloablatif

ICT : Irradiation corporelle totale, Gy : Gray, quantité de rayonnement absorbé par un corps exposé à la radioactivité, SAL : Sérum anti-lymphocytaire.

Le choix du protocole de conditionnement dépend de l'**hémopathie maligne** à traiter ainsi que de l'**état de santé du patient** et de son **âge** (de Fontbrune et al., 2016).

De plus, il est possible de se référer aux recommandations émises par la Société française de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC) sur « l'harmonisation des conditionnements à la greffe » via leur site internet.

2.2.2 Choix du donneur et rôle du système HLA

La principale cause de survenue d'une GVHD est liée à l'**incompatibilité du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)** également appelé **Human Leukocyte Antigen** ou **système HLA** entre le donneur et le receveur. En effet, les lymphocytes T du greffon sont capables de reconnaître les différences entre les antigènes majeurs et mineurs du système HLA ce qui participe au développement de la GVHD. Dans la mesure du possible, une parfaite compatibilité HLA est recherchée entre le donneur et le receveur lors d'une allogreffe de CSH pour réduire le risque de GVHD. Le système HLA est davantage décrit en Annexe 1.

Lors de l'identification du donneur, en première étape, un **donneur apparenté** est recherché. C'est-à-dire un donneur au sein de la fratrie du patient, qui a 25% de probabilité d'être compatible. C'est le cas pour un tiers des patients, on parle de **greffe géno-identique**.

La seconde possibilité est de rechercher un **donneur volontaire de moelle osseuse inscrit sur un registre national ou international** compatible sur les gènes HLA-A/B/DQ/DR, donc 10/10 entre le système HLA du receveur et du donneur. On parle de **greffe non apparenté**.

Parallèlement, une recherche sur le **registre de sang de cordon placentaire** est initiée pour gagner du temps. Une disparité HLA est mieux tolérée avec une greffe de sang placentaire car les cellules du greffon sont encore immatures donc moins immunogènes.

Enfin, en cas de difficulté à trouver un donneur apparenté ou non apparenté HLA identique, l'alternative consiste à rechercher un **donneur familial** présentant **une différence entre un ou plusieurs antigènes HLA**. Ce type de greffe, dite **haplo-identique**, se développe beaucoup depuis 3 ans avec l'utilisation d'Endoxan (cyclophosphamide) post-greffe qui atténue considérablement les réactions de GVHD. Dans ce type de greffe, une déplétion médicamenteuse des lymphocytes T alloréactifs *in vivo* est réalisée.

L'arbre décisionnel concernant le choix du donneur est présenté ci-dessous (Figure 3) (de Fontbrune et al., 2016). Le choix final dépend également des pratiques du centre de transplantation concerné.

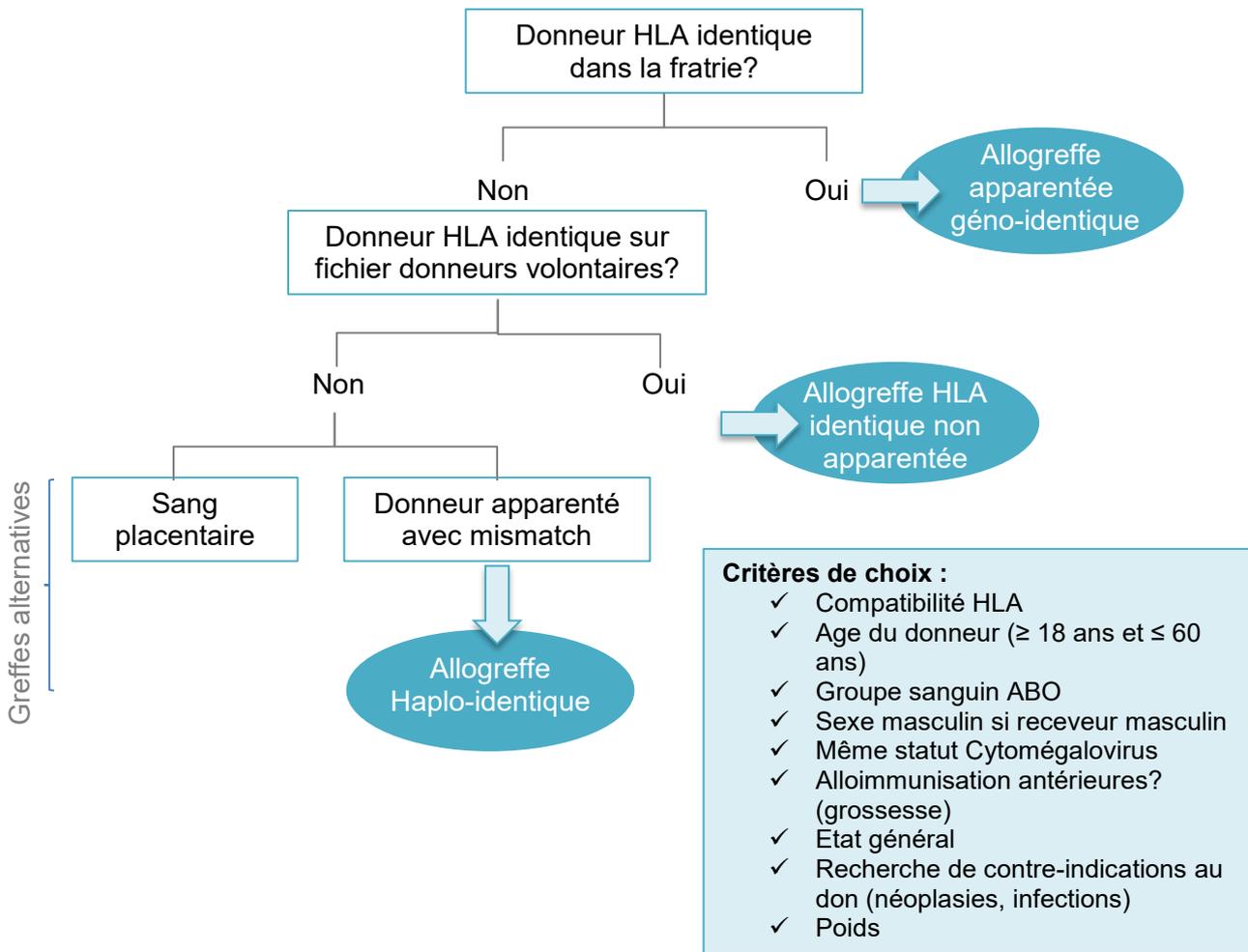


Figure 3 Arbre décisionnel du choix du donneur pour une allogreffe de CSH (adapté de Michallet, 2011 et Fontbrune et al., 2016). (*mismatch* : différence entre 1 ou 2 antigènes HLA)

D'après les données recueillies en 2015 par l'établissement français des greffes et l'ABM concernant l'activité nationale de greffe de CSH, 1964 greffes allogéniques de CSH ont été réalisées dont 921 avec un donneur apparenté et 1043 avec un donneur non apparenté (ABM, 2015). La majorité des allogreffes ont été réalisées à partir de donneurs non apparentés suivie par les donneurs apparentés HLA identique comme le montre la répartition ci-dessous (Figure 4).

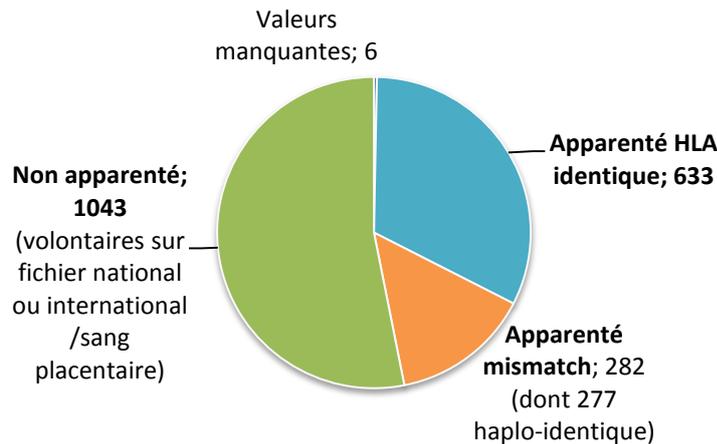


Figure 4 Répartition des allogreffes de CSH selon le type du donneur (non apparenté, apparenté HLA identique, apparenté mismatch) (ABM, 2015, source : *déclarations d'activité des centres de greffe*).

2.2.3 Source du greffon

La moelle osseuse est le tissu dans lequel résident les CSH et le lieu où elles se différencient en cellules sanguines matures. Historiquement, le prélèvement de CSH se faisait uniquement au niveau de la moelle osseuse. A présent, deux autres sources de CSH sont disponibles : le sang périphérique et le sang de cordon ombilical.

Pour extraire les **CSH de la moelle osseuse**, le donneur doit se faire hospitaliser pour une durée de 48h. Le prélèvement se fait par **ponction dans les os iliaques du bassin sous anesthésie générale**. Le volume prélevé est calculé en fonction du poids du donneur et de celui du receveur. Ce type de prélèvement permet de recueillir à la fois des CSH et leur milieu environnant. Il présente l'avantage d'inclure certaines sous-populations de cellules souches très peu fréquentes dans le sang.

La collecte de **CSH du sang périphérique** est moins contraignante pour le donneur. Celui-ci reçoit au préalable pendant 4 à 5 jours, par injection sous-cutanée, un médicament, le **G-CSF** (à 10 µg/kg/jour), qui est un facteur de croissance hématopoïétique. Il stimule la prolifération des CSH et favorise leur passage de la moelle osseuse vers le sang périphérique. Une opération d'aphérèse permet ensuite de récupérer les CSH présentes dans le sang.

Le **sang placentaire** ou encore appelé **sang de cordon** est également une source de choix de CSH. Il est prélevé à l'issue de l'accouchement au niveau du cordon ombilical qui contient du sang du tissu placentaire. Il a la particularité de présenter une quantité élevée de CSH. Ce prélèvement se fait avec l'autorisation de la mère et ne présente aucun risque ni pour elle, ni pour le nouveau-né. Si le sang de cordon répond aux critères de qualité³, il est congelé et conservé dans une banque de sang placentaire comme l'unité de thérapie cellulaire et banque de Tissu (UTCT) du CHU de Nancy. L'avantage de ce type de greffon est la disponibilité rapide et une incidence⁴ de GVHD inférieure malgré une compatibilité HLA moindre. Néanmoins, plusieurs unités de sang placentaire sont nécessaires pour greffer un adulte et le délai de reconstitution immunitaire est plus long comparé aux autres greffons.

En pratique, d'après les données de l'ABM, en 2015, le **sang périphérique est la principale source de CSH utilisée** (67%) suivie par la moelle osseuse (26%) et en dernière place le sang placentaire (6,4%). Cette répartition évolue lentement depuis dix ans comme le montre la Figure 5 ci-dessous.

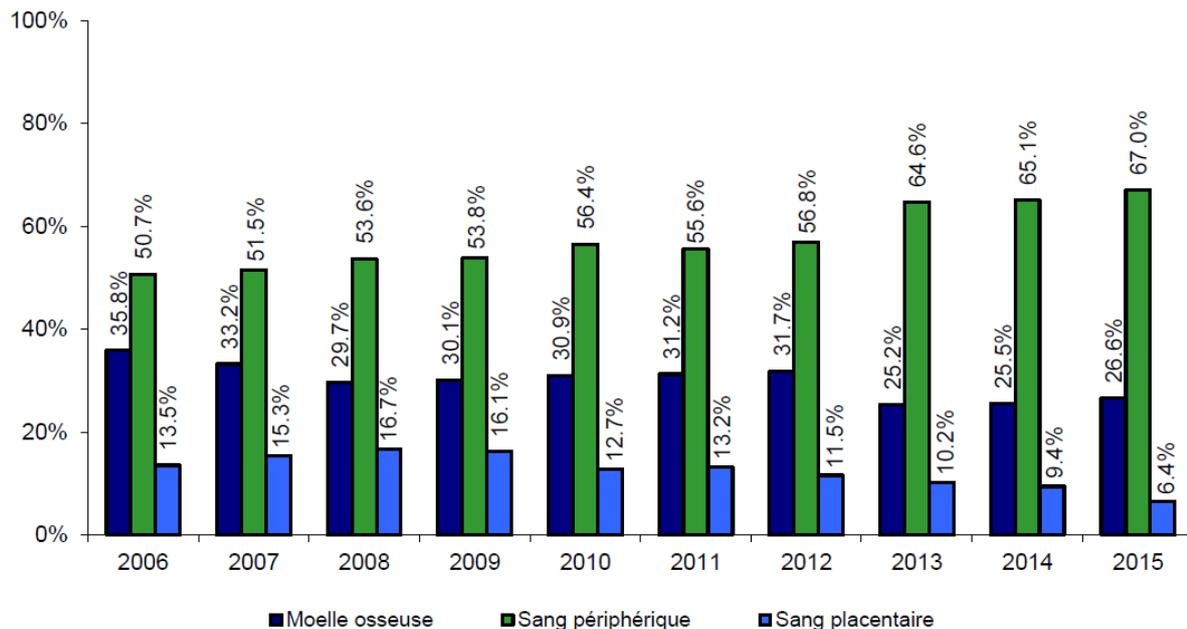


Figure 5 Evolution de la répartition des sources de greffon des CSH allogéniques (ABM, 2015, source déclarations d'activité des centres de greffe).

³ Volume > 70 ml et quantité de CSH > 2.10⁶ au total avant conservation.

⁴ Nombre de nouveaux cas d'une pathologie observés pendant une période donnée.

2.3 FORMES CLINIQUES DE LA GVHD

La GVHD peut se manifester sous une forme **aiguë** ou **chronique**. Initialement, la GVHD aiguë est définie comme survenant dans les 100 premiers jours après la greffe de CSH (GCSH) tandis que la GVHD chronique survient au-delà de 100 jours après la GCSH. Cette définition basée sur le temps n'est pas applicable pour l'ensemble des patients. Cela a conduit le **National Institutes of Health (NIH)**, institut de santé des Etats-Unis, à standardiser les critères de diagnostic de la GVHD en se basant essentiellement sur le tableau clinique du patient (Filipovich et al., 2005). La distinction entre la GVHD aiguë et chronique y est davantage précisée comme le montre l'arbre décisionnel ci-après (Figure 6).

La GVHD aiguë inclut la forme classique (cibles : peau, foie, tube digestif) qui survient dans les 100 jours post-GCSH et la forme dite persistante, récurrente ou retardée qui se développe au-delà de 100 jours post-GCSH.

Concernant la forme chronique, on différencie la GVHD chronique classique et le syndrome de chevauchement correspondant à une GVHD chronique avec la manifestation de signes cliniques typiques de la GVHD aiguë. Par ailleurs, il est important d'exclure d'autres causes éventuelles telles qu'une infection, une toxicité médicamenteuse ou une autre pathologie. Une biopsie ou un test en laboratoire permettra de confirmer le diagnostic établi.

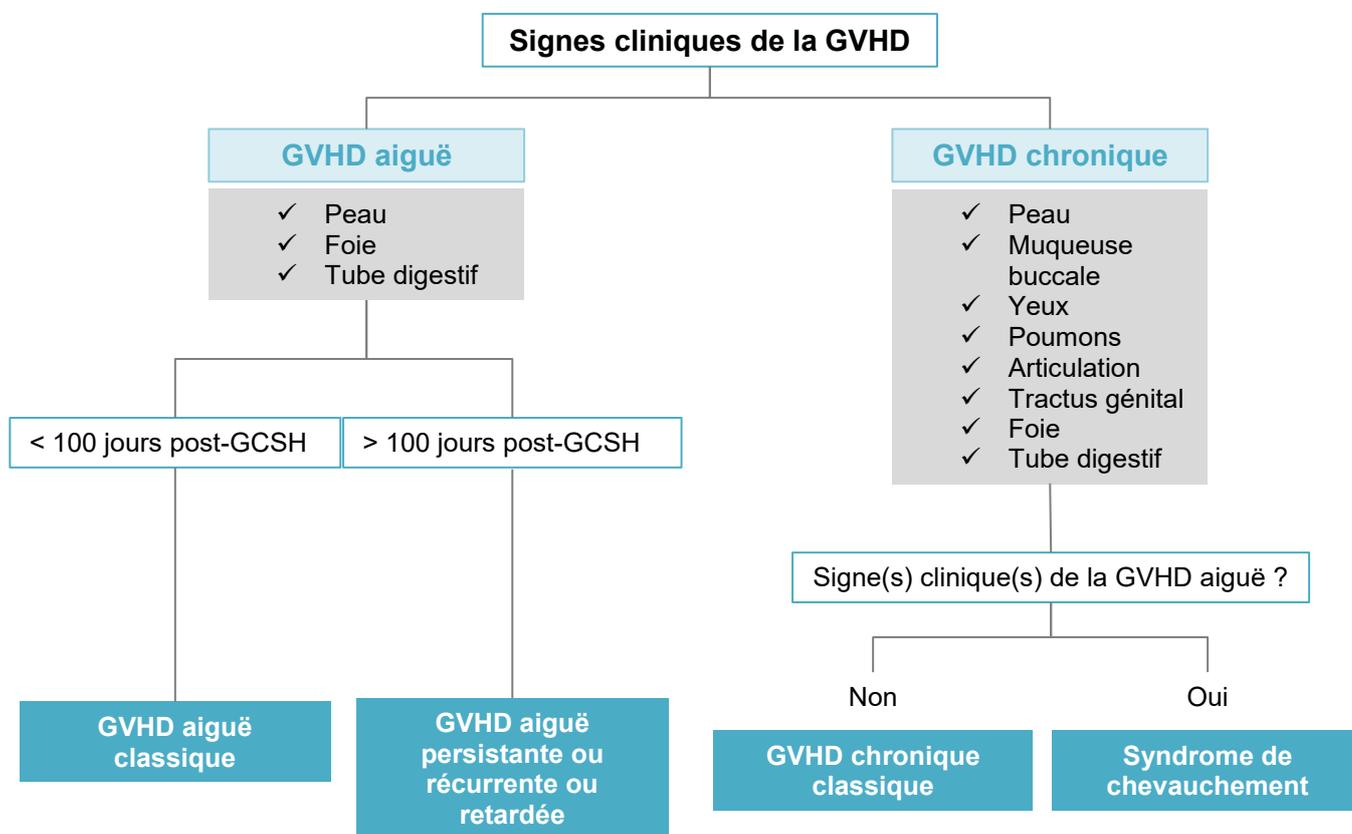


Figure 6 Arbre décisionnel pour le diagnostic de la GVHD aiguë et chronique d'après le NIH (Jagasia et al., 2015a).

2.4 GVHD AIGUË (GVHDa)

2.4.1 Physiopathologie de la GVHDa

La GVHDa est une réaction inflammatoire en réponse au conditionnement du patient avant l'allogreffe et survient chez 20 à 80% des patients après une transplantation allogénique de CSH malgré un traitement prophylactique (Martin et al., 2012). Le développement de la GVHDa se décline selon trois grandes phases schématisées sur la Figure 7 :

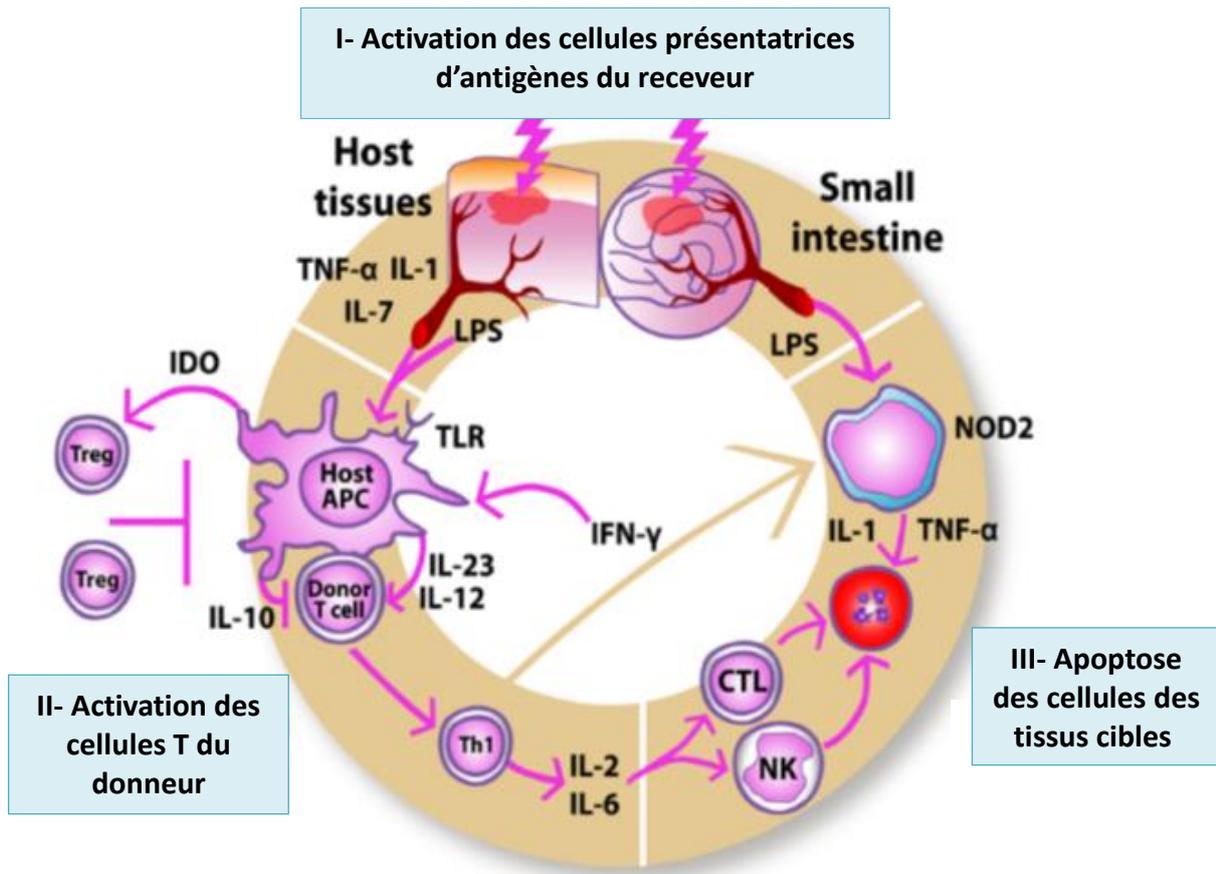


Figure 7 Physiopathologie de la GVHDa qui se déroule en 3 grandes phases (Harris 2013, Ferrara 2009).

Phase I : Activation des cellules présentatrice d'antigènes (CPA) du receveur

Elle débute en amont de l'allogreffe lors du traitement de **conditionnement** qui **endommage les tissus du receveur**, préférentiellement la **peau**, le **foie** et le **tube digestif**. Une réaction inflammatoire survient au niveau de ces tissus et se traduit par la libération de molécules signalant « un danger » qui sont des **cytokines pro-inflammatoires** telles que le *tumor necrosis alpha* (**TNF-α**) et les interleukines 1 et 6 (**IL-1**, **IL-6**) (Henden and Hill, 2015). Le niveau de sécrétion du **TNF-α** est directement lié au développement d'une GVHD (Zhang et al., 2016). De plus, les dommages causés à l'épithélium gastrique entraînent la libération de

produits bactériens au niveau systémique tel que le lipopolysaccharide (LPS) qui présente une affinité pour le récepteur TLR4 présent à la surface des cellules de l'immunité innée comme les macrophages. Cela induit également la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires jouant un rôle majeur dans l'amplification et la propagation de l'orage cytokinique qui caractérise la GVHDa. Ces cytokines pro-inflammatoires activent les CPA comme les cellules dendritiques et les macrophages du receveur qui présentent des antigènes issus de molécules du complexe mineur d'histocompatibilité (CMH) (Ferrara et al., 2009; Harris et al., 2013). Elles favorisent également l'expression des molécules d'adhésion à la surface des CPA améliorant leur capacité d'interaction avec les lymphocytes T.

Phase II : Activation des cellules T du donneur

La phase II se caractérise par l'**activation des cellules T du greffon lors de son injection**, suite à la reconnaissance des antigènes étrangers du receveur présentés par les CPA. Les cellules T naïves une fois activées vont ensuite se différencier et proliférer principalement en cellules T effectrices appelées lymphocytes T helper de type Th1 qui vont sécréter des **cytokines pro-inflammatoires** comme les **interleukines 2 et 6** (IL-2, IL-6), le TNF- α et l'interféron gamma (IFN- γ) (Carlson et al., 2009; Henden and Hill, 2015). Les cellules T naïves peuvent également se différencier en cellules Th2, Th17. Les manifestations cliniques et la sévérité de la GVHD sont très variables et dépendent de la proportion de cellules T naïves qui se sont différenciées en cellules Th1, Th2, Th17 ou Treg (Henden and Hill, 2015). Les cellules Th1 favorisent l'activation et la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques (LT CD8+) et des cellules Natural Killers (NK) qui migrent des organes lymphoïdes secondaires vers les tissus cibles (Wysocki, 2005).

Phase III : Destruction des tissus cibles du receveur.

Cette dernière phase, dite effectrice, vise à détruire les tissus cibles par les médiateurs cellulaires et inflammatoires. Ainsi, l'activité cytotoxique médiée par les LT CD8+ et les NK se traduit par **la mort cellulaire ou apoptose des cellules** au niveau de la peau, du foie et du tube digestif, selon deux grandes voies de signalisation : perforine/granzyme et Fas (Braun et al., 1996).

2.4.2 Symptomatologie et classification de la GVHDa

Comme décrit précédemment, la survenue d'une GVHDa se manifeste par des signes cliniques cutanés, digestifs et hépatiques.

L'**atteinte cutanée** est le premier et le plus commun des symptômes de la GVHDa, elle est retrouvée chez 90% des patients. Elle se traduit par une éruption maculopapuleuse (exemple Figure 8 ci-contre) et prurigineuse qui apparaît 2 à 3 semaines après l'allogreffe généralement au niveau des paumes des mains, de la plante des pieds, du cou, du tronc supérieur (Villarreal et al., 2016). Dans les cas sévères, des vésicules et des bulles peuvent apparaître et l'éruption cutanée peut s'étendre à l'ensemble du corps et aboutir à une érythrodermie généralisée. L'évaluation du pourcentage d'atteinte de la surface corporelle est l'un critère de sévérité de la GVHDa, la réalisation d'une biopsie permet de confirmer le diagnostic (Glucksberg et al., 1974).



Figure 8 Eruption maculopapuleuse sur le thorax d'un patient en GVHDa grade III

L'**atteinte digestive** peut se manifester au niveau supérieur et/ou inférieur du système digestif. Les signes cliniques comprennent des nausées, des vomissements, de l'anorexie, des diarrhées et des douleurs abdominales. Lorsque la partie inférieure est touchée, les manifestations peuvent être extrêmement sévères avec des diarrhées plus ou moins abondantes accompagnées parfois d'hématochémie⁵ pouvant nécessiter des transfusions sanguines. Le diagnostic doit exclure toutes infections à *Clostridium difficile colitis*, à *cytomégalovirus (CMV) enteritis*, à *herpès simplex virus* ou *candida esophagitis* ou d'autres causes comme une gastrite, un ulcère ou un effet post conditionnement (Sung and Chao, 2013). L'évaluation du volume de diarrhée par jour est l'un des critères utilisés pour déterminer la sévérité de la GVHDa.

L'**atteinte hépatique** est moins fréquente que les deux précédentes manifestations mais elle est associée à un plus mauvais pronostic (Robin et al., 2009). Elle se caractérise par une destruction des canalicules biliaires provoquant une cholestase⁶ et entraînant une hyperbilirubinémie et un taux élevé de phosphatases alcalines dans le sang. Le dosage de la bilirubine permet d'évaluer la sévérité de l'atteinte hépatique. Une biopsie peut aider à la confirmation du diagnostic qui doit exclure un syndrome d'obstruction sinusoïdale, une toxicité médicamenteuse ou une infection virale (Sung and Chao, 2013).

⁵ Emission par l'anus de sang rouge non digéré.

⁶ Diminution de la fonction hépatique caractérisée par une diminution de la sécrétion biliaire.

En résumé, l'évaluation des trois paramètres suivants,

- **pourcentage d'atteinte cutanée de la surface corporelle,**
- **volume de diarrhée par jour,**
- **taux de bilirubine dans le sang,**

a permis l'élaboration de la première classification par Glucksberg et al., en 1974, des stades et des grades de la GVHDa. Chaque organe est évalué séparément selon des critères cliniques et biologiques. Révisée lors du Consensus de Keystone, cette classification reste la référence (Przepiorka et al., 1995). Par la suite, un centre de recherche international spécialisé dans l'étude de la greffe de cellules souches hématopoïétiques appelé *International Bone Marrow Transplant Research* (IBMTR) a apporté un index de sévérité supplémentaire pour le diagnostic de la GVHDa. La classification de la GVHDa est donnée dans le Tableau II (Glucksberg et al., 1974; Rowlings et al., 1997). L'avancée des connaissances relatives à cette pathologie peut amener à faire évoluer cette classification.

Tableau II Classification des stades, des grades et de la sévérité de la GVHDa d'après les critères de Glucksberg révisés et de l'IBMTR (Przepiorka et al., 1995 ; Rowlings et al., 1997).

Classification de Glucksberg			
Stades	Peau	Foie	Tube digestif
1	Eruption maculo-papuleuse < 25% surface corporelle	Billirubine 2 à 3 mg/dl	Diarrhée 500-1000 ml/jour ou nausées persistantes
2	Eruption maculo-papuleuse 25%-50% surface corporelle	Billirubine 3 à 6 mg/dl	Diarrhée 1000-1500 ml/jour
3	Erythrodermie généralisée	Billirubine 6 à 15 mg/dl	Diarrhée > 1500 ml/jour
4	Érythrodermie généralisée avec vésicules dermatologiques et desquamation	Billirubine >15 mg/dl	Douleur abdominale sévère avec ou sans lléus
Grades	Peau	Foie	Tube digestif
I	Stade 1-2	Non atteint	Non atteint
II	Stade 3 ou	Stade 1 ou	Stade 1
III	-	Stade 2-3 ou	Stade 2-4
IV	Stade 4 ou	Stade 4	-
IBMTR Index			
Sévérité	Peau	Foie	Tube digestif
A	Stade 1	Non atteint	Non atteint
B	Stade 2	Stade 1-2	Stade 1-2
C	Stade 3	Stade 3	Stade 3
D	Stade 4	Stade 4	Stade 4

2.4.3 Facteurs de risques de la GVHDa

De nombreux facteurs sont associés à l'augmentation de l'incidence ou de la sévérité de la GVHDa. Le principal facteur de risque est la **disparité HLA entre le donneur et le receveur**. En effet, la reconnaissance d'antigènes majeurs ou mineurs d'histocompatibilité étrangers par les cellules T du donneur initie la GVHD. Ainsi, elle se développe dans 30% des cas lorsque les donneurs HLA identiques sont apparentés, et jusqu'à 90% des cas pour des donneurs HLA compatibles non apparentés (Berger et al., 2015). L'**âge avancé** du donneur et du receveur, ainsi que l'**irradiation corporelle totale** effectuée lors de la phase de conditionnement, sont également des facteurs liés au développement d'une GVHDa (Ram and Storb, 2013).

2.4.4 Prise en charge thérapeutique de la GVHDa

2.4.4.1 Prophylaxie

La stratégie de prévention de la GVHDa est basée sur une **thérapie immunosuppressive** qui vise à **stopper l'activation et la prolifération des cellules T**. Généralement, le traitement prophylactique est basé sur la combinaison d'inhibiteurs de la calcineurine tels que la **ciclosporine** (CsA) ou le **tacrolimus** et d'un agent anti-métabolite comme le **méthotrexate** (MTX) (Qian et al., 2013). Les effets secondaires associés au MTX sont nombreux et d'autres agents alternatifs ont par conséquent été développés comme le **mycophénolate mofétil** ou le **sirolimus** (Cutler and Antin, 2010; Nash et al., 2005).

D'autres approches thérapeutiques ont été étudiées. L'une d'elle cherche à éliminer ou atténuer l'alloréactivité des cellules T du greffon étant donné leur rôle majeur dans la GVHD. Cette opération peut s'effectuer soit par des méthodes physiques telles que la centrifugation en gradient de densité soit par des méthodes immunologiques, avec l'administration de globulines antithymocytes (ATG) ou d'anticorps monoclonaux ou la sélection positive des cellules CD34+ (Sung and Chao, 2013). La déplétion des cellules T limite l'effet thérapeutique GVL recherché et diminue l'efficacité de l'allogreffe de CSH. Cela retarde la reconstitution immunitaire ce qui favorise les complications infectieuses et augmente le risque de rechute (Qian et al., 2013). En revanche, la déplétion partielle des cellules T diminue l'incidence de la GVHDa. Elle est réalisée par l'administration *in vivo* d'anticorps anti-CD52 (alemtuzumab).

Une autre stratégie cible les récepteurs des cytokines et chimiokines qui sont impliqués dans le développement de la GVHDa. Une équipe a publié des résultats prometteurs d'un traitement prophylactique, l'étude a été menée sur 38 patients présentant un haut risque de développer une GVHDa (patients âgés, donneurs non apparentés). Ce traitement associé à la thérapie standard (tacrolimus et MTX) un antagoniste du récepteur CCR5 ayant un rôle dans le recrutement des lymphocytes T lors d'une GVHDa. Cet antagoniste du récepteur CCR5, appelé maraviroc, bloque la sécrétion de chimiokines des cellules T. Il semble réduire l'incidence de la GVHDa au niveau gastro-intestinal et hépatique (Reshef et al., 2012).

Par ailleurs, l'immunosuppression du traitement prophylactique augmente le risque d'infections et doit donc être accompagné d'une **thérapie anti-infectieuse** (anti-fongique, anti-bactérienne, anti-virale). Cette thérapie devra être poursuivie en cas de diagnostic de GVHDa.

2.4.4.2 Traitement de la GVHDa

En première ligne

La stratégie thérapeutique de la GVHDa est adaptée en fonction du grade de la maladie.

GVHDa de Grade I

Le traitement est basé sur l'utilisation de **corticostéroïdes par voie topique**. Le recours à un traitement systémique n'est généralement pas nécessaire. Chez l'adulte, une dose initiale de **0,1% de tacrolimus** est recommandée jusqu'à résolution de l'atteinte cutanée (Dignan et al., 2012a). La CsA utilisée en prophylaxie peut également être prolongée. Une thérapie adjuvante comme l'emploi d'anti-histaminique peut être utilisée pour contrôler le prurit cutané.

GVHDa de Grade II à IV

Le traitement standard repose sur l'administration de **corticostéroïdes par voie systémique**. La dose initiale recommandée est de **2 mg/kg/jour de méthylprednisolone** ou **prednisone** (Van Lint et al., 1998). Lorsque le système gastro-intestinal est atteint avec présence de nausées, anorexie ou dyspepsie, la dose est réduite à 1 mg/kg/jour. Puis, la dose peut être augmentée graduellement jusqu'à la disparition des symptômes (Qian et al., 2013). En parallèle, les immunosuppresseurs administrés en prophylaxie comme la CsA ne doivent pas être interrompus. Lorsque des signes de rémission de la GVHDa apparaissent, il convient de diminuer progressivement les doses de stéroïdes, notamment, en raison des nombreux effets indésirables⁷ provoqués par la corticothérapie. **L'arrêt brutal de la corticothérapie peut entraîner une exacerbation de la GVHDa avec de fortes complications**. C'est pourquoi, un **sevrage avec une diminution progressive** de 0,2 mg/kg/jour de la dose de corticostéroïdes est recommandée (Qian et al., 2013).

Si aucune amélioration n'est observée après 5 jours de traitement ou que les symptômes progressent après 72h, une thérapie de deuxième ligne doit être envisagée (Dignan et al., 2012a). Seul 50% des patients répondent au traitement standard. La survie du patient est directement liée à la réponse au traitement de 1^{ère} ligne. Le traitement de 2^{ème} ligne est associé à un taux d'échec élevé, une toxicité importante et une durée de survie plus faible (Martin et al., 2012).

Un arbre décisionnel est présenté dans la (Figure 9) (Dignan et al., 2012a).

⁷ Hyperglycémie, psychose, infections, myopathie, ostéoporose, ostéonécrose, cataracte, accumulation de tissus adipeux

En deuxième ligne

Un traitement de deuxième ligne est mis en place lorsque le patient présente un profil cortico-réfractaire, cortico-dépendant ou intolérant aux corticostéroïdes comme défini ci-après (Das-Gupta et al., 2014).

Le sujet est dit **cortico-réfractaire** lorsque le tableau clinique de la GVHDA s'aggrave après 3 jours de traitement systémique aux corticostéroïdes, ou lorsque aucune amélioration est observée après 7 jours de traitement systémique. Dans les deux cas à une dose minimum de corticostéroïde de 1mg/kg/jour.

Le sujet est dit **cortico-dépendant** lorsque qu'une rechute de la GVHDA en grade II-IV est observée lors de la période de sevrage des corticostéroïdes et avant d'atteindre 50% de la dose initiale de corticostéroïdes.

Le sujet est dit **intolérant aux corticostéroïdes** lorsque les effets secondaires provoqués à de faibles doses de corticostéroïdes ne peuvent être supportés par le patient.

Le traitement de 2^{ème} ligne doit être initié le plus tôt possible après échec du traitement standard. **Actuellement, il n'existe pas de traitement de 2^{ème} ligne standard pour la GVHDA.** Les agents thérapeutiques utilisés sont nombreux et les études publiées ne démontrent pas une efficacité supérieure pour l'un d'entre eux (Knobler et al., 2014). Les options thérapeutiques incluent :

- la photophérèse extracorporelle (PCE) ;
- le mycophénolate mofétil (MMF) ;
- les globulines antithymocytes (ATG) ;
- les anticorps dirigés contre : le TNF- α (étanercept), l'antigène lymphocytaire CD52 (alemtuzumab), le récepteur de l'interleukine-2 (basiliximab) ;
- les inhibiteurs de la voie de signalisation mTOR (sirolimus) ;
- l'administration de cellules souches mésenchymateuses (CSM).

Une description de l'ensemble de ces agents thérapeutiques (classe pharmacologique, mécanisme d'action, toxicités principales) est détaillée en Annexe 4.

L'*American Society of Blood and Marrow Transplantation* (ASBMT) a analysé les résultats de 67 études portant sur le traitement de 2^{ème} ligne de la GVHDA publiés entre 1990 et 2011 et rapporte l'utilisation de 19 agents thérapeutiques (Martin et al., 2012). Hormis, les globulines antithymocytes, la PCE représente le traitement le plus fréquemment utilisé.

La démarche à suivre pour la prise en charge thérapeutique de la GVHDa selon le grade de la maladie est présentée dans l'arbre décisionnel ci-dessous (Figure 9) (Dignan et al., 2012a).

Le choix de la thérapie dépend également de l'état de santé du patient, des interactions médicamenteuses, d'aspects logistiques, du coût, des préférences de l'équipe médicale et du patient.

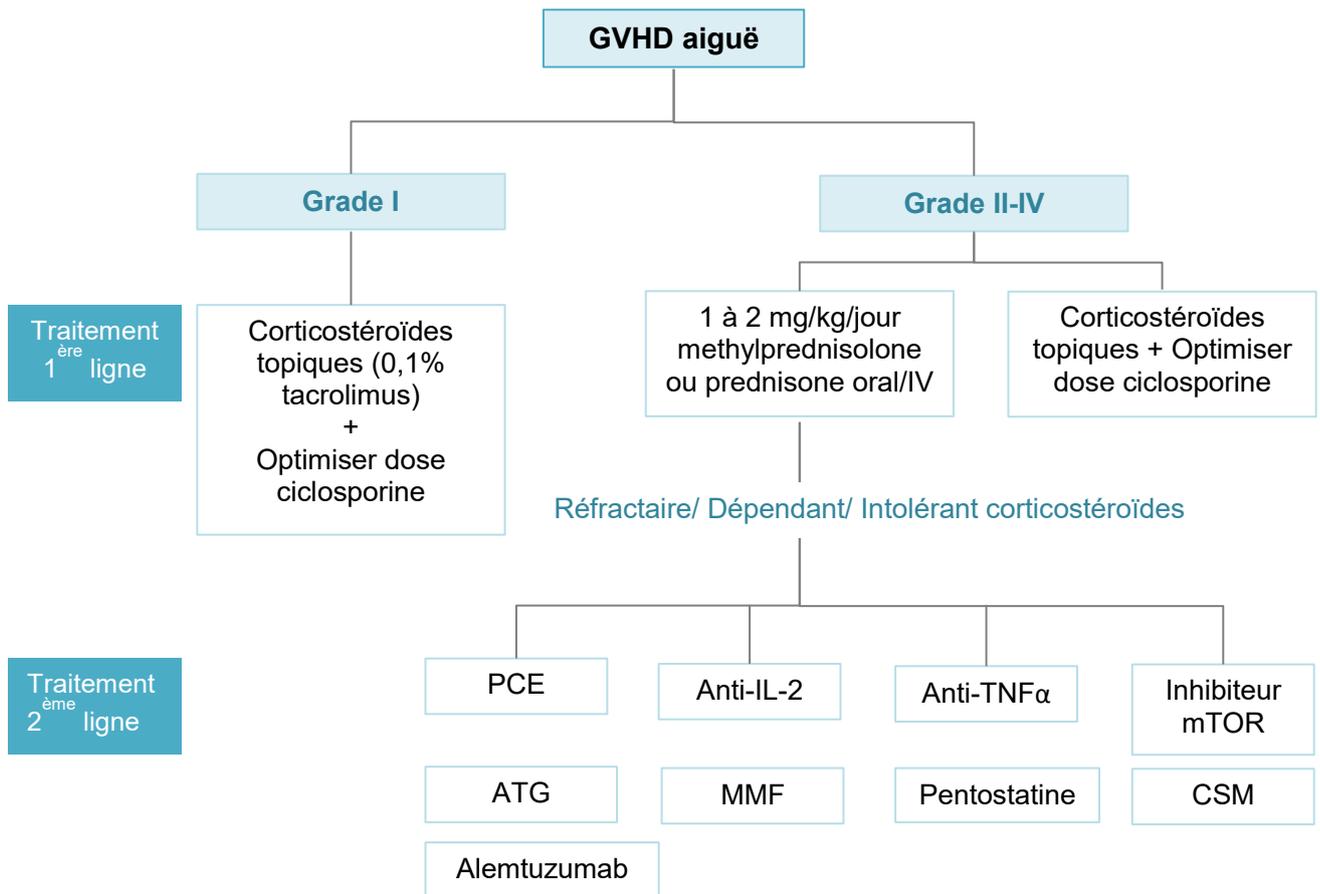


Figure 9 Arbre décisionnel lié au choix du traitement de la GVHDa (adapté de Dignan et al., 2012a)

2.5 GVHD CHRONIQUE (GVHDc)

La GVHDc représente la première cause de morbidité et de mortalité à la suite d'une transplantation allogénique de CSH et survient chez 30 à 70% des patients (Lee and Flowers, 2008). C'est une complication majeure dont le tableau clinique rappelle certaines maladies auto-immunes ou dysfonctionnement du système immunitaire comme la sclérodermie, le syndrome de Sjögren, la cirrhose biliaire primitive, la bronchiolite oblitérante, la cytopénie immune et l'immunodéficience chronique (Jagasia et al., 2015a). Elle se caractérise par une inflammation chronique et une fibrose des tissus cibles qui altèrent considérablement la qualité de vie des patients. La GVHDc peut se développer soit

progressivement à la suite d'une GVHDa, soit après résolution complète d'une GVHDa ou soit *de novo* (Ferrara et al., 2009). **Près de 50% des patients atteints de GVHDa progressent vers une forme chronique.**

2.5.1 Physiopathologie de la GVHDc

Le mécanisme physiopathologique de la GVHDc contrairement à celui de la GVHDa n'est pas encore clairement élucidé. La mise en place d'études cliniques sur l'Homme et de nouveaux modèles murins ont permis d'améliorer la compréhension de la physiopathologie. L'atteinte **multi-organes** qui caractérise cette réaction résulte de mécanismes immunologiques complexes impliquant les **sous-populations des cellules T** ainsi que les **cellules B du donneur** (Presland, 2016).

La GVHDc résulterait des dommages causés au thymus lors du conditionnement, entraînant un dysfonctionnement des cellules T, une activation anormale des cellules B avec une production d'allo- et d'auto-anticorps et une fibrose des tissus cibles comme schématisé ci-dessous (Figure 10) (Min, 2011).

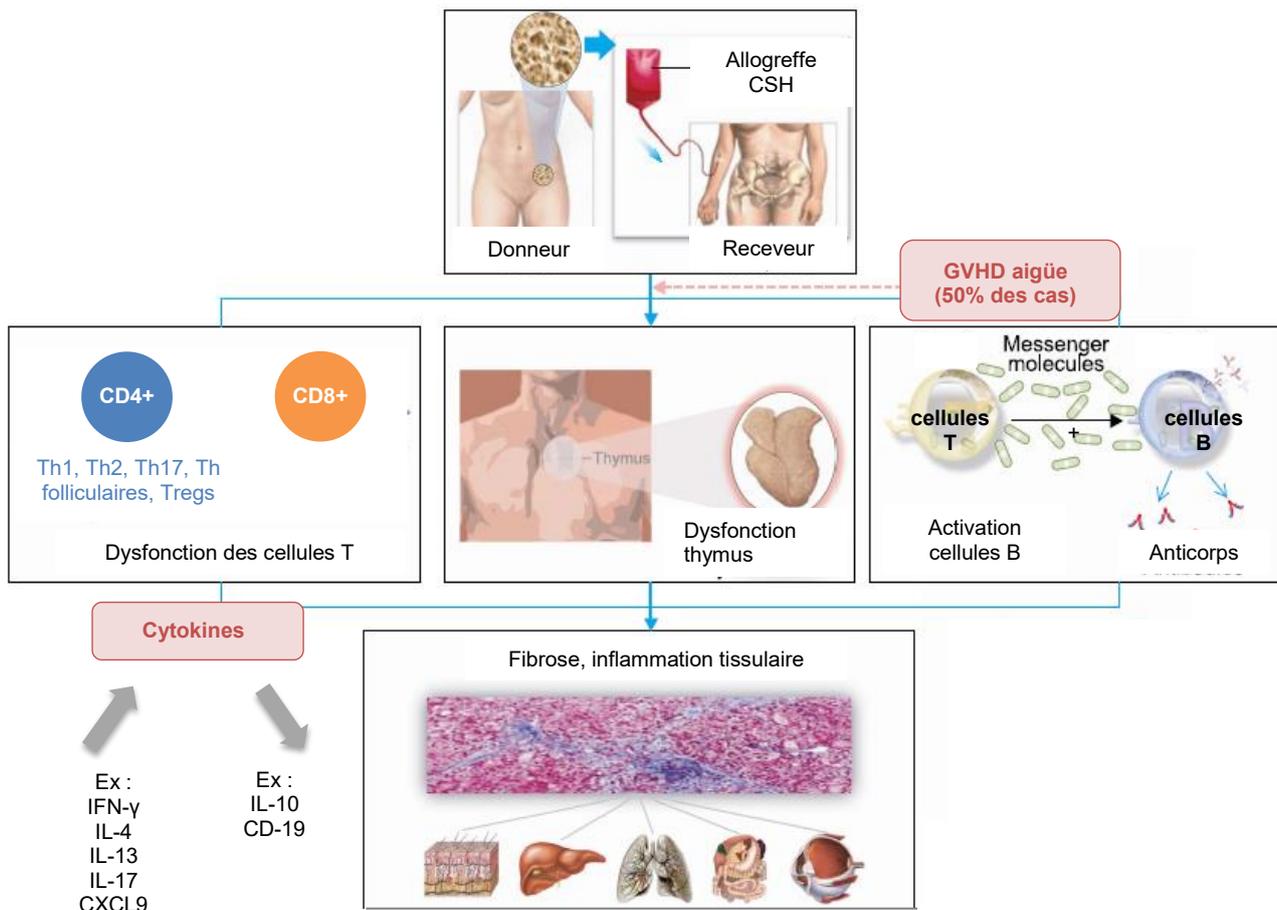


Figure 10 Physiopathologie de la GVHDc (schéma adapté de Min, 2011).

Les **cellules T du donneur ont un rôle important dans le développement de la GVHDc** puisque leur déplétion *in vivo* réduit l'incidence de la GVHDc (Socié and Ritz, 2014). Les cellules T impliquées lors d'une GVHDc sont les cellules CD4+ (Th1, Th2, Th17, Th folliculaires, Tregs), et les cellules CD8+.

Le rôle des **cellules Th1** est déduit de la présence des cytokines Th1 comme l'IFN- γ retrouvé dans la peau et dans les glandes salivaires chez les patients en GVHDc (Nishimori et al., 2012).

Les **cellules Th2** enclenchent la réponse humorale par interaction (CD40-CD40L) avec les cellules B. Cela stimule la production d'anticorps par les cellules B *via* également la sécrétion des interleukines 4 et 13 (IL-4, IL-13) que l'on retrouve chez les patients en GVHDc.

Les **cellules Th17** produisent les interleukines IL-17, IL-21 et IL-22 qui contribuent à l'inflammation des tissus qui caractérise la GVHDc.

Les **cellules Th folliculaires** stimulent la différenciation des cellules B naïves en cellules B mémoires. Une étude a montré que ces cellules Th folliculaires sont anormalement actives chez les patients en GVHDc ce qui expliquerait en partie la survie aberrante des cellules B et leur hypersécrétion d'immunoglobulines (Forcade et al., 2016).

Les **cellules T régulatrices** (Tregs) expriment les marqueurs CD4+, CD25+ et le facteur de transcription FOXP3. Ces cellules ont un rôle essentiel dans la mise en place et le maintien de la tolérance après une allogreffe de CSH. Or, le nombre de Tregs diminue lors d'une GVHDc ce qui indique leur importance dans la suppression de l'inflammation (Presland, 2016). L'altération de la production et de la fonction des Tregs lors d'une GVHDc est liés aux dommages causés au thymus lors de l'étape du conditionnement avant l'allogreffe.

Les **cellules CD8+** ont également un rôle dans le développement de la GVHDc. En effet, on observe une infiltration de LT CD8+ au niveau de la peau, de l'intestin et de la muqueuse buccale chez les patients atteint de GVHDc (Mays et al., 2013). Parmi les cytokines produites par ces cellules, on retrouve la chimiokine CXCL9, qui est présente à des taux élevés dans le sérum des patients GVHDc. Sa présence est corrélée avec la sévérité de la maladie (Kitko et al., 2014).

En plus des cellules T, il apparaît évident que les **cellules B** ont un rôle important dans la physiopathologie de la GVHDc (Nakasone et al., 2015; Sarantopoulos et al., 2015). On observe une **persistance anormale** et un **nombre élevé de cellules B activées**. Cela est à corréler à la surexpression du facteur d'activation des cellules B, appelé BAFF, (*B-cell activating factor*) qui stimule leur prolifération (Zhang et al., 2016).

De plus, le **nombre de cellules B naïves** et de **cellules B régulatrices**, responsable de la sécrétion de l'IL-10, **diminuent** lors d'une GVHDc. On observe donc une **déficience de la sécrétion d'IL-10** qui normalement permet le maintien de la tolérance. Les patients en GVHDc sont particulièrement sensibles aux infections en raison du profil anormal de leurs cellules B et de la diminution du nombre de cellules B mémoires qui permettent de générer une réponse humorale.

Le dysfonctionnement des cellules B se traduit par la **production d'allo- et d'auto-anticorps**. Les allo-anticorps sont dirigés contre les protéines codées par le chromosome Y (HY) retrouvés dans 80% des cas où le receveur est un homme et le donneur est une femme. Les auto-anticorps sont dirigés contre les récepteurs du facteur de croissance PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) des cellules mésenchymateuses. Le rôle de ces anticorps n'est pas complètement élucidé mais ils contribuent au développement de la GVHDc (Socié and Ritz, 2014).

Les populations cellulaires du système immunitaire impliquées dans la GVHDc sont décrites dans le Tableau III ci-après avec le rôle qu'elles jouent dans la maladie (Presland, 2016).

Tableau III Cellules du système immunitaire impliquées dans la GVHDc et leurs rôles (Presland, 2016).

Types cellulaires	Sous-populations cellulaires	Cytokines / Chymiokines/ Marqueurs clés	Rôle dans la GVHDc
LT CD4+	Th1	IFN- γ , TNF- α	Pro-inflammatoire. Rôle non défini.
	Th2	IL-4, IL-13	Stimulation des cellules B et de la production d'anticorps. Rôle clinique non défini.
	Th17	IL-17, IL-21, IL-22, TNF- α	Pro-inflammatoire. Corrélation IL-17 et sévérité maladie. Sclérodémie (peau et poumons) induite par IL-17.
	Tregs	TGF- β	Produit dans le thymus ou induit en périphérie. Suppression de l'alloréactivité des cellules T. Faible niveau de Tregs chez les patients GVHDc dû aux dommages du thymus.
	Th folliculaire	CCR5, PD-1, ICOS	Maturation anormales des cellules B avec une hypersécrétion d'IgG.
LT CD8+		CXCL9, CXCL10	Médiation effet GVL lié à l'allogreffe. Niveau CXCL9 élevé chez les patients GVHDc.
LB (total)		BAFF	Taux anormalement élevé. Activation anormale des cellules B qui résistent à l'apoptose.
LB naïfs		CD19	Diminution dans la GVHDc active.
LB mémoires (total)		CD19, CD27	Diminution dans la GVHDc active. Cellules essentielles dans la réponse immunitaire normale contre les infections opportunistes ou pathogènes bactériens.
LB régulateurs		IL-10	Diminution dans la GVHDc active. Rôle dans le maintien de la tolérance et la prévention des maladies auto-immunes.
Cellules plasmatiques		CD27, CD38	Augmentation dans la GVHDc active. Sécrétion IgG. Résistance à l'apoptose.

BAFF : facteur d'activation cellules B ; CD : Cluster de différenciation ; CCR5 : Récepteur chimiokine 5 ; CXCL : Chimiokine ; ICOS : Co-stimulateur cellule T inducible ; PD-1 : Mort cellulaire programmée.

2.5.2 Symptomatologie et classification de la GVHDc

Le NIH a publié en 2005 (Filipovich et al., 2005) un consensus définissant les **critères de diagnostic** et de **classification de la GVHDc**. Ce document a été actualisé en 2015 (Filipovich et al., 2005; Jagasia et al., 2015a). Cela a permis de mieux caractériser et distinguer les différentes formes de GVHDc. Généralement, une GVHDc survient au cours de la première année suivant la greffe. Néanmoins, certains patients sont diagnostiqués plusieurs années après. Les manifestations cliniques de la GVHDc peuvent se restreindre à

l'atteinte d'un seul organe ou tissu, mais peuvent aussi **s'étendre largement**. Les huit organes ou tissus suivants sont préférentiellement ciblés lors d'une GVHDc : peau, muqueuse buccale, yeux, système gastro-intestinal, foie, poumons, articulations et tractus génital (Jagasia et al., 2015b). Les principaux symptômes cliniques pour chacun de ces organes sont décrits dans le Tableau IV ci-après.

Tableau IV Principaux symptômes clinique associés à la GVHDc (Lee and Flowers, 2008 ; Presland, 2016).

Organe ou tissus	Prévalence ⁸ (%)	Symptômes cliniques
Peau	75%	Dépigmentation, alopecie, poikilodermie, lichen plan, scléroses
Muqueuse buccale	51-63%	Lichen-plan
Yeux	22-33%	Sécheresse, Syndrome de Sicca, conjonctivite
Muscles, articulations, tendons	6%	Fasciite, myosite, contractures, scléroses
Tract génitale	1%	Lichen-plan, sclérose vaginale, ulcérations
Système gastro-intestinal	7-45%	Anorexie, perte de poids, rétrécissement de l'œsophage
Foie	29-51%	Jaunisse, taux enzyme hépatique élevé
Poumons	4-19%	Bronchiolite oblitérante, épanchement pleural

La classification de la GVHDc est réalisée à partir d'un score clinique qui s'appuie sur le **nombre d'organes touchés** et sur la **sévérité d'atteinte** de ces organes. Un score de 0 à 3 est donné pour chaque organe :

- **0** : l'organe n'est pas touché ;
- **1** : l'organe est légèrement touché ;
- **2** : l'organe est modérément touché ;
- **3** : l'organe est sévèrement touché.

Le NIH a élaboré une fiche d'évaluation présentée en Annexe 2 qui reprend l'ensemble des organes pouvant être touchés et le score à attribuer selon les symptômes cliniques (Jagasia et al., 2015a). Le score clinique obtenu reflète la sévérité de la GVHDc et permet de la classer comme : **légère, modérée ou sévère** comme ci-après (Tableau V).

⁸ Fréquence à laquelle l'organe ou le tissu est touché lors du diagnostic de la GVHDc.

Tableau V Classification des stades de la GVHDc établi par le NIH, en fonction du nombre d'organes touchés et de leur sévérité d'atteinte (Filipovich et al., 2005; Jagasia et al., 2015b).

Stades de la GVHDc	Caractéristiques
Légère	1 ou 2 organes touchés (sauf les poumons) avec un score ≤ 1
	Au moins 3 organes touchés avec un score ≤ 1
	Ou
Modérée	Au moins 1 organe touché (sauf poumons) avec score à 2
	Ou
	Poumons touchés avec un score à 1
Sévère	Au moins 1 organe avec un score à 3
	Ou
	Poumons touchés avec un score à 2 ou 3

Organes :

Peau, yeux, système gastro-intestinal, foie, poumons, articulations/muscles, tractus génital.

2.5.3 Facteurs de risques de la GVHDc

Plusieurs facteurs sont reconnus pour favoriser le développement d'une GVHDc. Comme pour la GVHDa, la **disparité HLA** entre le donneur et le receveur est le facteur de risque majeur. L'**âge avancé** du donneur et du receveur, la **source du greffon** sont également des facteurs associés à la GVHDc. Une étude récente publiée par le *Center for International Blood and Marrow Transplant Research* rapporte une augmentation de l'incidence de la GVHDc entre 1995 et 2007 due à l'utilisation plus fréquente de CSH de sang périphérique par rapport au cellules de moelle osseuse (Arai et al., 2015). De plus, le risque est augmenté lorsque le donneur est de sexe féminin et le receveur de sexe masculin (Flowers et al., 2011).

2.5.4 Prise en charge thérapeutique de la GVHDc

La prise en charge thérapeutique de la GVHDc est **multidisciplinaire** en raison de la variabilité des manifestations cliniques, des complications infectieuses et de la toxicité induite par le traitement. L'intervention d'une expertise médicale comprenant les spécialités telles que la dermatologie, l'ophtalmologie, la gastroentérologie, la gynécologie et la rhumatologie est requise afin de limiter l'impact sur la qualité de vie des patients (Dignan et al., 2012b). La **thérapie doit être adaptée au cas par cas** en fonction de l'organe ou du tissu impliqué. La réponse au traitement doit être documentée et chacun des organes cibles doit être évalué selon les critères du NIH (Jagasia et al., 2015a). La durée de traitement est longue et la réponse du patient au traitement est imprévisible (Jamil and Mineishi, 2015). Diagnostiquer le plus tôt possible la GVHDc permet de mieux gérer l'évolution de la maladie.

2.5.4.1 Prophylaxie

Les patients en GVHDc sont fortement immunodéprimés et par conséquent sont très vulnérables aux infections. Un traitement prophylactique pour lutter contre les infections bactériennes, fongiques, parasitaires et virales doit être mis en place (Dignan et al., 2012c). En raison du rôle important joué par les cellules B, de nouvelles thérapies prophylactiques qui ciblent les cellules B sont développées (Nakasone et al., 2015).

2.5.4.2 Traitement de la GVHDc

En première ligne

GVHCc légère

Le recours à un **traitement local à base de corticostéroïdes** est généralement suffisant. Néanmoins, en cas d'atteinte hépatique ou de fasciite, une approche systémique est recommandée (Knobler et al., 2014).

GVHCc modérée à sévère

Une **corticothérapie systémique** est le traitement de 1^{ère} ligne (Filipovich et al., 2005). La thérapie débute par une dose de **1 mg/kg/jour de prednisone**. Les corticostéroïdes peuvent être utilisés seuls ou en association avec un inhibiteur de la calcineurine, comme la CsA, pour améliorer la réponse clinique et réduire les effets indésirables des corticostéroïdes (Dignan et al., 2012b). La durée du traitement dépend de la réponse du patient, la durée médiane est de 2 à 3 ans (Jamil and Mineishi, 2015). Environ 50% des patients répondent à la corticothérapie. Une alternative thérapeutique doit être envisagée dans les autres cas.

D'après le NIH, si la GVHDc progresse suite à 2 semaines de traitement avec une dose de 1 mg/kg/jour de prednisone ou si les symptômes ne s'améliorent pas après 4 à 8 semaines de thérapie en continue, le patient est considéré comme réfractaire et un traitement de 2^{ème} ligne doit donc être mis en place (Jagasia et al., 2015b).

En deuxième ligne

Il n'existe pas de thérapie standard pour les patients réfractaires aux corticostéroïdes en GVHDc. De nombreux agents thérapeutiques ont été développés. Cependant aucun consensus en faveur d'une thérapie n'a été établi à ce jour. Selon le type de manifestation clinique, la stratégie thérapeutique est adaptée.

L'équipe de Martin et al., en 2011, a analysé les résultats de 60 études rétrospectives et prospectives portant sur le traitement de 2^{ème} ligne de la GVHDc publiées entre 1990 et 2011 et rapporte l'utilisation de 17 agents thérapeutiques. Parmi eux, la PCE a été identifiée comme le traitement le plus fréquemment utilisé comme le montre le graphique ci-dessous (Figure 11).

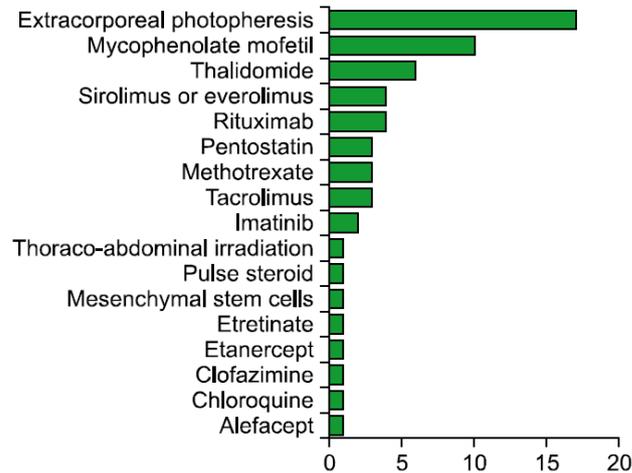


Figure 11 Classement des traitements de 2^{ème} ligne de la GVHDc par ordre de fréquence d'utilisation d'après 60 études publiées entre 1990 et 2011 (Martin et al., 2011).

Une description des agents thérapeutiques les plus fréquents (classe pharmacologique, mécanisme d'action, toxicités principales) est fournie en Annexe 4.

La PCE est donc une approche thérapeutique de plus en plus préférée par les cliniciens. Le choix du traitement à adopter est résumé dans l'arbre décisionnel ci-dessous (Figure 12) (Dignan et al., 2012b).

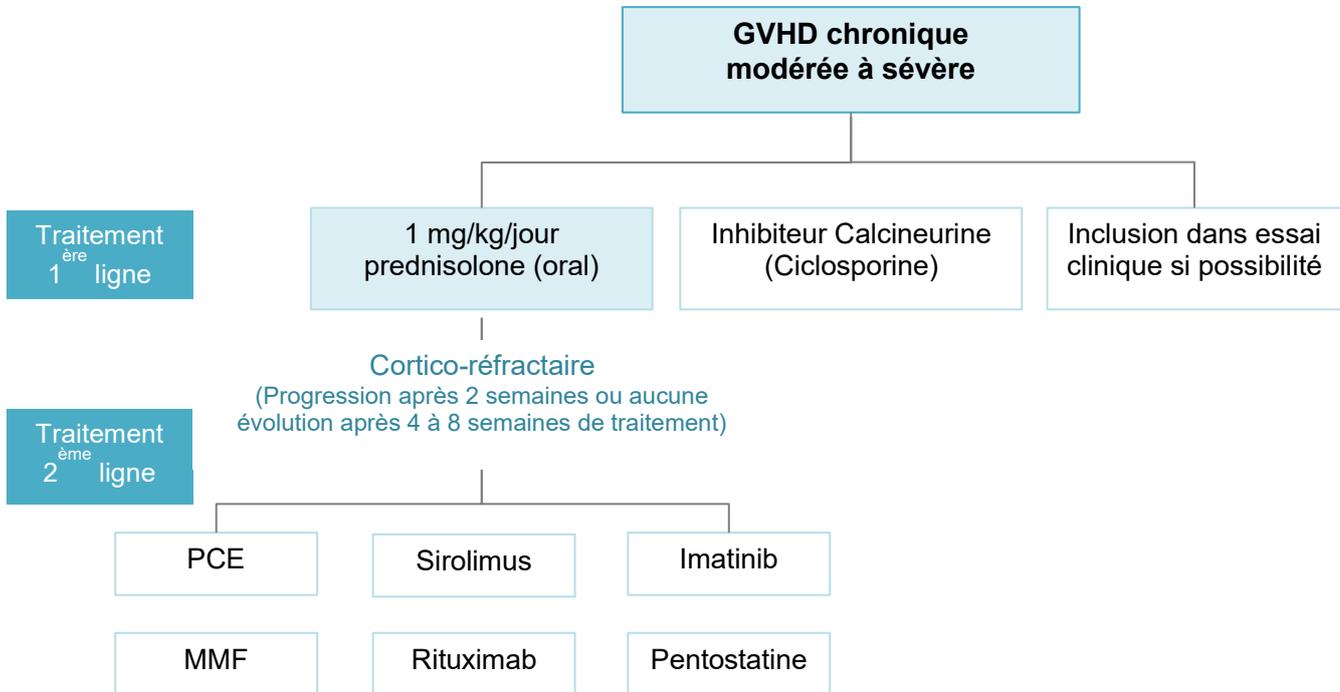


Figure 12 Arbre décisionnel du choix de traitement de la GVHDc modérée à sévère (Dignan, 2012).

Le potentiel de la thérapie PCE en traitement de 2^{ème} ligne pour la prise en charge thérapeutique de la GVHD aiguë et chronique fait l'objet de la suite des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit.

3 LA PCE DANS LE TRAITEMENT DE LA GVHD

Les conditions d'utilisation de la thérapie cellulaire par PCE sont hétérogènes selon les centres de transplantation. C'est pourquoi plusieurs guides de pratiques cliniques ont tenté d'harmoniser les conditions d'utilisation par le biais de recommandations sur la PCE. Il est admis que la PCE peut être utilisée en tant que traitement de 2^{ème} ligne de la GVHD aiguë ou chronique chez des patients réfractaires, dépendants ou intolérants aux traitements immunosuppresseurs (Knobler et al., 2014; Schwartz et al., 2016). La première utilisation de la PCE dans le traitement de la GVHD remonte à 1994.

Le mécanisme d'action de la PCE reste un thème de recherche au sein de la communauté scientifique. En effet, nous verrons que si les effets biologiques directs de la PCE sont connus, les mécanismes qui conduisent aux effets thérapeutiques *in vivo* chez l'Homme ne sont pas clairement établis. Les diverses hypothèses de mécanisme d'action seront donc développées. De plus, nous verrons que les modalités thérapeutiques (choix des patients éligibles, durée, fréquence de traitement) de la PCE varient selon les groupes d'experts et entre les deux formes de GVHD. L'efficacité obtenue avec la PCE pour la GVHD sera ensuite étudiée par une analyse de la littérature et des différents essais cliniques en cours.

3.1 MECANISMES D'ACTION DE LA PCE

Le mécanisme cellulaire immédiat de la PCE après irradiation est connu et décrit dans la littérature. Lorsque la molécule photoactivable, le 8-MOP, entre en contact avec les cellules, il traverse la membrane cellulaire par diffusion passive et atteint l'équilibre en 2 minutes (Aubin et al., 1999). Puis, le 8-MOP s'intercale entre les deux brins d'ADN grâce à ses propriétés aromatiques et hydrophobes. Après exposition aux UVA, le 8-MOP est activé entraînant un processus de **photo-réaction** tel que la **photo-addition** dont le mécanisme est présenté dans la Figure 13.A (Jeantet, 2004). Ainsi, un premier photon UVA est absorbé par le 8-MOP formant une liaison covalente entre le 8-MOP et une base pyrimidique, la **thymine**. Cela conduit à la formation d'un produit de mono-addition sur la liaison 4',5' du noyau furane ou sur la liaison 3,4 du noyau coumarine. L'absorption d'un second photon UVA par le produit de mono-addition 4'5' forme une deuxième liaison covalente entre le 8-MOP et une thymine du second brin d'ADN donnant un **produit de bi-addition ou un cross-link** (Gasparro et al., 1989). Un pont formé par le 8-MOP relie les deux brins d'ADN comme le montre la Figure 13.B (Heshmati, 2003).

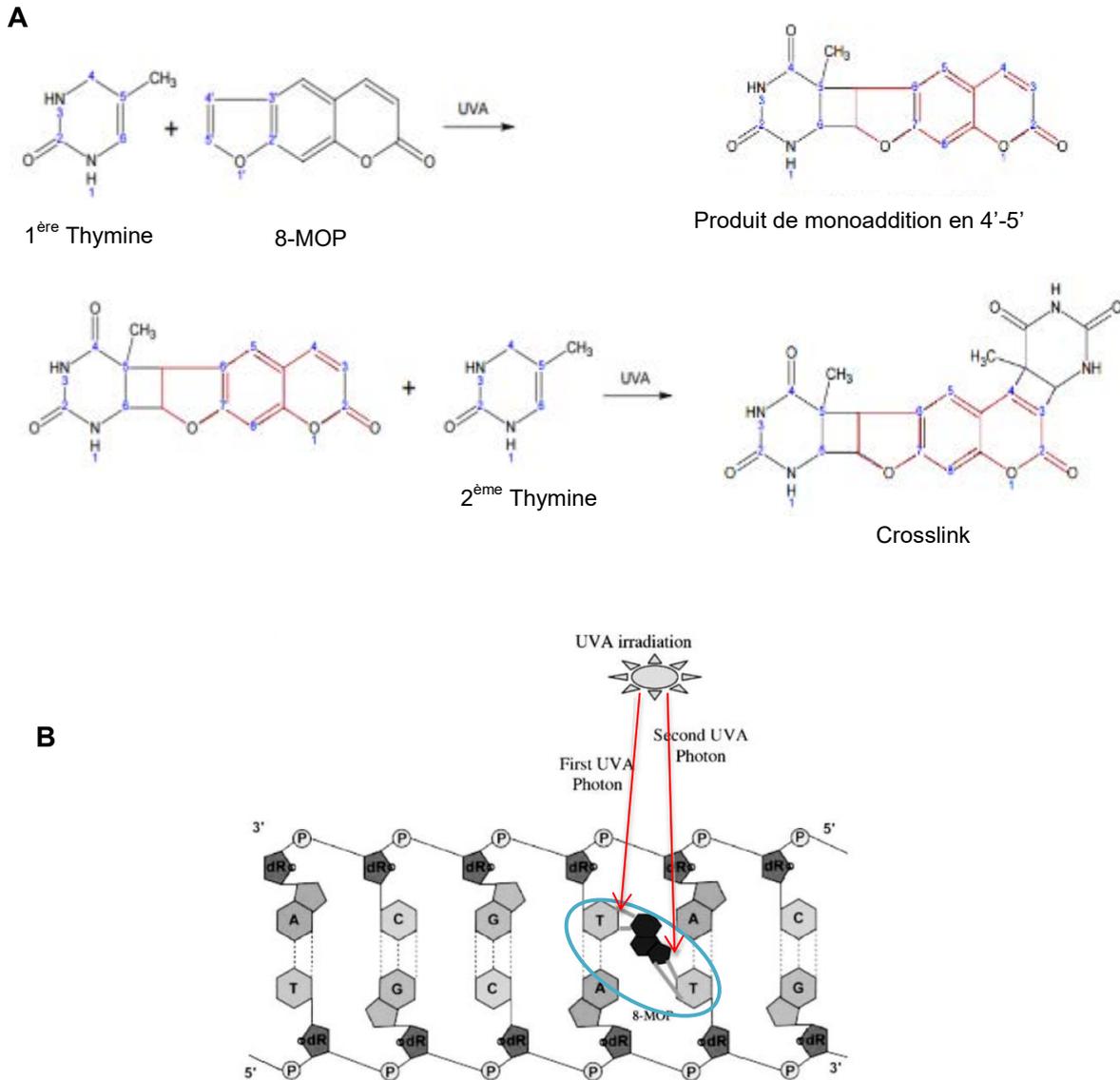


Figure 13 (A) Mécanisme de photoréaction du 8-méthoxypsoralène activé par les UVA avec la thymine de l'ADN des CMN lors du traitement PCE (Jeantet, 2004). (B) Structure d'un crosslink entre le 8-MOP et l'ADN (Heshmati, 2003).

Le processus de photo-réaction du 8-MOP avec l'ADN des leucocytes peut être diminué car, le produit de PCE contient une portion de globules rouges plus ou moins élevée (lors de l'étape d'aphérèse, l'isolement des leucocytes n'est pas total). Or, les **globules rouges ont la capacité d'absorber les UVA en limitant ainsi la photo-réaction** (Lee and Garro, 1989). L'interaction du 8-MOP avec les UVA impacte également la membrane cellulaire, le cytoplasme, les protéines (albumine, lysozyme, etc.), l'ARN et les lipides des cellules (Hannani, 2010).

La PCE agirait sur plusieurs populations cellulaires du système immunitaire par un phénomène d'**immunomodulation** dont les effets sont décrits dans la suite de cette partie et dont l'**avantage majeur est d'éviter l'immunosuppression chez le patient**.

3.1.1 Induction de l'apoptose des leucocytes

L'apoptose est une mort cellulaire programmée hautement régulée par l'organisme. Elle se caractérise par la condensation de la chromatine avec la formation de corps apoptotiques et par une conservation de l'intégrité de la membrane plasmique tout au long du processus, elle n'induit pas d'inflammation. L'autre type de mort cellulaire est la nécrose, mort dite « accidentelle » survenant après une perturbation de l'environnement. C'est un processus passif, qui se traduit par une rupture de la membrane plasmique et le déversement du contenu intracellulaire provoquant une inflammation (Saikumar et al., 1999). La comparaison morphologique des deux types de mort cellulaires est représentée ci-dessous (Figure 14).

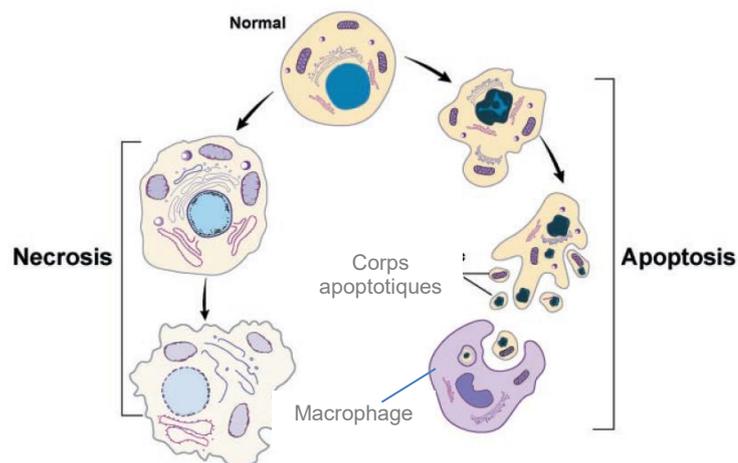


Figure 14 Différences morphologiques entre la nécrose et l'apoptose (Saikumar, 1999).

A la suite du traitement des leucocytes par PCE, la formation de crosslink entre le 8-MOP et l'ADN des cellules décrite précédemment a pour conséquence majeure de bloquer la réplication et la transcription de l'ADN. Cela provoque l'arrêt de la prolifération et l'**apoptose des leucocytes dans les 24h à 48h après la PCE** (Gorgun, 2002; Lamioni et al., 2005). Parmi les leucocytes traités par PCE, la population des **lymphocytes T** est la plus touchée. De plus, la proportion de lymphocytes T traités est faible, de l'ordre de **5 à 10%**, ce n'est donc pas uniquement l'apoptose de ces cellules qui explique la modulation de la réponse immunitaire lors du traitement par PCE (Goussetis et al., 2012). Il semble que les **monocytes** soient également touchés par l'apoptose mais comme cette population cellulaire ne prolifère pas, l'apoptose est plus faible et plus lente donc moins détectable (Lamioni et al., 2005).

Les cellules T apoptotiques auraient indirectement un effet immunomodulateur sur les cellules immunocompétentes du greffon (Knobler et al., 2009). Le mécanisme sur lequel repose cette immunomodulation demeure encore mal connu. Il semble que les points essentiels soient la **modulation de l'activité des cellules dendritiques (DC)**, la **production de lymphocytes T régulateurs (Tregs)** et la **modification de la sécrétion cytokinique** (Flinn and Gennery, 2016).

3.1.2 Activation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) tolérogènes

Une fois réinjecté au patient, les cellules apoptotiques sont retenues dans la rate et le foie où elles vont être phagocytées par les DC immatures via la reconnaissance de récepteurs de la famille TAM (Xia et al., 2009). Après phagocytose des cellules apoptotiques, les DC immatures présentent à la surface de leur membrane les antigènes qui dérivent des cellules apoptotiques et se différencient en CPA dits « **tolérogènes** » comme présenté dans la Figure 15 (Capuano et al., 2015). Ces cellules ont la particularité d'exprimer des molécules CMH II de façon plus élevée et d'avoir une expression réduite des molécules de co-stimulation CD80, CD86, CD83 (Lamioni et al., 2005). Cela **diminue leur capacité à stimuler la réponse immunitaire**. Il semble que ce mécanisme ait un rôle important dans l'effet de tolérance induit par la PCE (Bruserud et al., 2014).

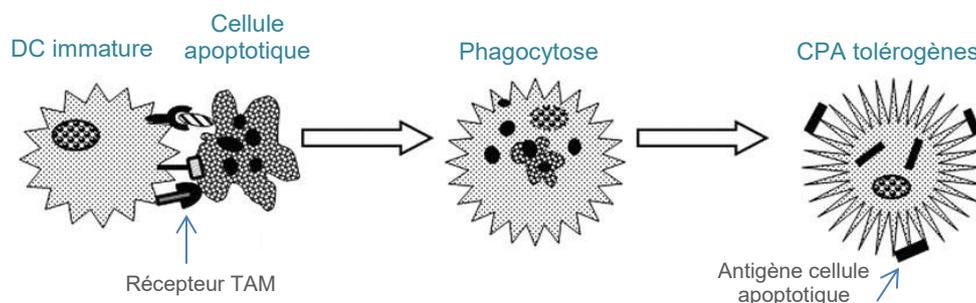


Figure 15 Mécanisme de maturation des cellules dendritiques immatures en CPA avec un phénotype de tolérance (Capuano et al., 2015).

3.1.3 Induction des cellules T régulatrices (Tregs)

Lorsque les CPA tolérogènes présentent les antigènes des cellules apoptotiques aux cellules T CD4⁺ naïves, cela induit leur différenciation en cellules T régulatrices (Tregs) (Biagi et al., 2007; Lamioni et al., 2005). Ces cellules sont identifiées grâce à l'expression des marqueurs de surface **CD4⁺**, **CD25⁺** et de l'expression intracellulaire du facteur de transcription **FoxP3** (Kuby et al., 2014). La génération, la survie et l'activité des Tregs sont sous le contrôle de l'interleukine 2 (IL-2) et du facteur de croissance TGF Bêta (TGFβ). Les Tregs ont la capacité

de **stopper la réaction immunitaire** et d'**induire un phénomène de tolérance** (Heshmati, 2014). Ainsi, l'activation des Tregs entraîne la phosphorylation des protéines intracytoplasmiques STAT-3 et STAT-5 qui activent l'expression de FoxP3. Celui-ci a pour rôle de réprimer la transcription des gènes codant pour les cytokines impliquées dans la prolifération des lymphocytes T (Biagi et al., 2007). Les Tregs inhibent donc la prolifération et l'activité des lymphocytes Th1 et Th17. La comparaison des sous populations de lymphocytes T avant et après PCE montre une augmentation du nombre de Tregs circulant (de 8,9% à 29,1% (Biagi et al., 2007) accompagnée d'une diminution du nombre de cellules Th1 et Th17 (Di Biaso et al., 2009; Schmitt et al., 2009). Il semble que le bénéfice apporté par la PCE soit fortement lié à sa capacité à stimuler les Tregs.

3.1.4 Modification de la sécrétion en cytokines

Les effets de la PCE se traduisent également par un changement dans la sécrétion des protéines qui régulent l'activité des cellules immunitaires appelées **cytokines**. La principale cytokine anti-inflammatoire sécrétée après PCE est l'**interleukine-10 (IL-10)** qui est libérée par les Tregs. L'IL-10 est capable d'inhiber la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, l'IFN- γ et le TNF- α . Cela contribue au basculement de la réponse cellulaire Th1 vers Th2 comme on peut l'observer chez les patients en GVHDc traités par PCE (Gorgun, 2002). Ce qui a pour conséquence de diminuer l'IL-12 (pro-inflammatoire) produite par les cellules Th1, d'augmenter la sécrétion en cytokine anti-inflammatoires IL-10 et IL-4 par les cellules Th2 et bloquer la réponse cytotoxique de la GVHD. La différenciation des sous-populations de lymphocytes T selon l'environnement cytokinique et l'effet modulateur des Tregs après PCE sont schématisés ci-après (Figure 16).

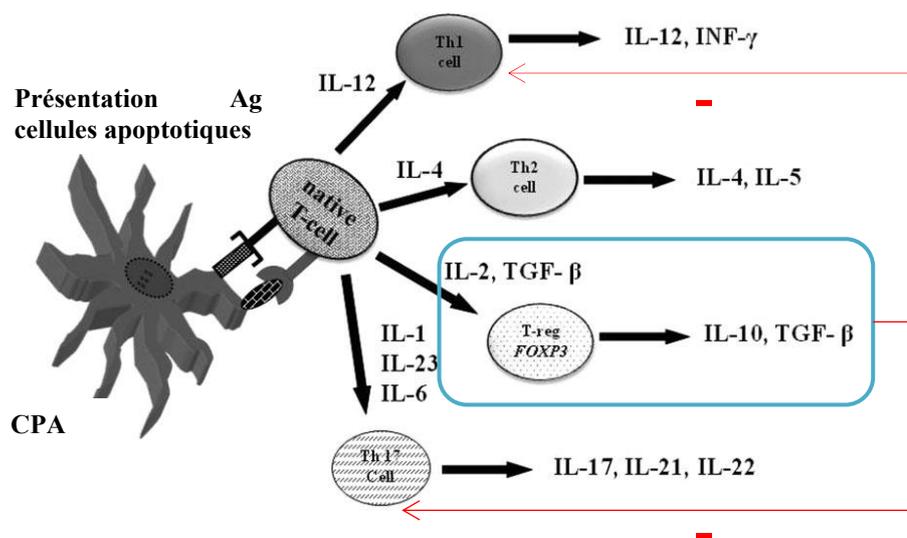


Figure 16 Différenciation des sous-populations de lymphocytes T selon l'environnement cytokinique (adapté de Capuano et al., 2015).

Les différents effets de la PCE sont schématisés ci-dessous (adapté de (Hart et al., 2013) (Figure 17):

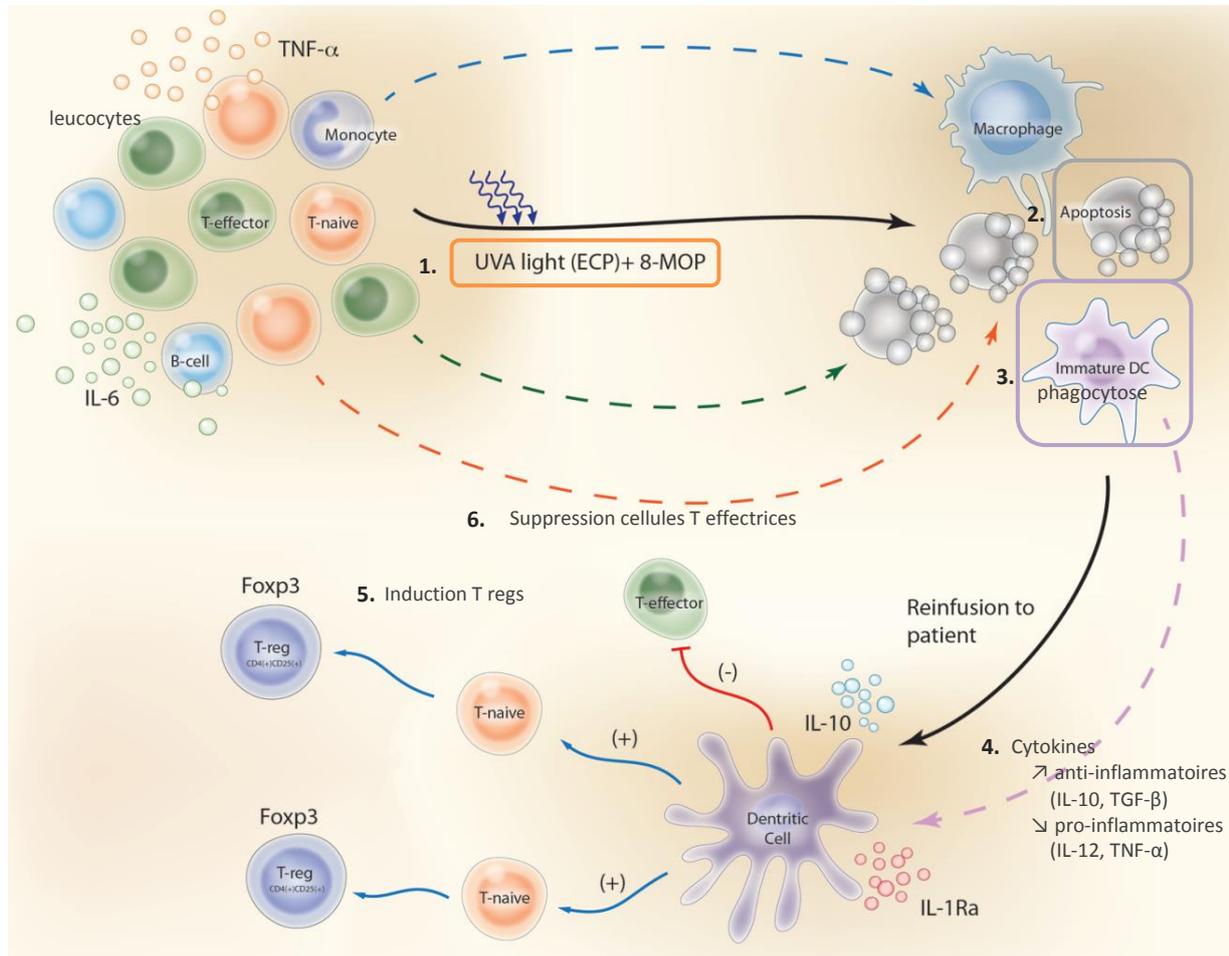


Figure 17 Effets de la PCE chez un patient atteint de GVHD (adapté de Hart, 2013)

3.2 LA PCE DANS LE TRAITEMENT DE LA GVHDa

Il n'y a pas de consensus concernant un traitement PCE standard pour la prise en charge de la GVHDa. Toutefois, il existe des directives de plusieurs guides pratiques sur les conditions d'utilisation de la PCE. Ils précisent le choix du nombre de séances et la fréquence en fonction des manifestations cliniques, de l'évolution, et de la réponse du patient au traitement. **La PCE doit être considérée comme une thérapie en association avec d'autres agents thérapeutiques.**

Les guides pratiques auxquels font référence les données présentées dans ce manuscrit sont d'origine européenne et américaine ; ces guides ont été publiés entre 2010 et 2016, en voici la liste :

- Haute autorité de santé (HAS, 2010) ;
- *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* (JEADV) (Knobler et al., 2014) ;
- *European dermatology forum* (EDF, 2013) ;
- *UK consensus statement* (Das-Gupta et al., 2014) ;
- *American Society for Apheresis* (AFSA) (Schwartz et al., 2016) ;
- *Italian Society of Hemapheresis and Cell Manipulation (SIdEM) & Italian Group for Bone Marrow Transplantation* (GITMO) (Pierelli et al., 2013).

3.2.1 Sélection du patient

Les patients éligibles à la PCE pour un traitement de 2^{ème} ligne sont ceux présentant les cas de figure suivant (Kitko et al., 2016; Martin et al., 2012):

- GVHDA **en progression après 3 jours** de traitement standard de 1^{ère} ligne avec 2 mg/kg/jour de méthylprednisolone ;
- GVHDA de **grade II** ne présentant **aucune amélioration après 2 semaines** de traitement standard ;
- GVHDA de **grade III/IV** ne présentant **aucune amélioration après 1 semaine** de traitement standard.

3.2.2 Protocole de traitement

Le protocole de traitement PCE peut varier selon les centres (nombre de séances et durée de traitement). De façon générale, il est recommandé de débiter le traitement PCE par **2 séances sur 2 jours consécutifs par semaine** ce qui correspond à **1 cycle** et le traitement doit être poursuivi **au minimum pendant 8 semaines** (Das-Gupta et al., 2014; EDF, 2013; HAS, 2010; Knobler et al., 2014; Schwartz et al., 2016). Le guide pratique américain AFSA préconise d'espacer à 1 cycle toutes les 2 semaines dès l'obtention d'une réponse clinique (Schwartz et al., 2016). En cas de GVHDA en progression, la *UK consensus statement* ajoute qu'il est possible d'associer un traitement de 3^{ème} ligne. Pour les GVHDA de grade III/IV, une augmentation de 2 à 3 cycles par semaine pendant le 1^{er} mois de traitement est recommandée (Das-Gupta et al., 2014; EDF, 2013).

Sevrage corticostéroïdes

Selon le profil du patient vis-à-vis de la corticothérapie, il convient d'adapter la stratégie pour le sevrage des corticostéroïdes (Das-Gupta et al., 2014).

Chez les **patients cortico-dépendants** et répondant à la PCE, il est suggéré de débiter le sevrage des corticostéroïdes pendant la 2^{ème} semaine de traitement PCE, et de réduire progressivement la dose de stéroïdes chaque semaine. L'objectif est de réduire de 50% la dose initiale de stéroïdes à l'issue des 4 premières semaines de traitement PCE, puis de réduire complètement les stéroïdes entre la 4^{ème} et la 8^{ème} semaine de traitement.

Chez les **patients cortico-réfractaires**, où les effets secondaires dépassent les bénéfices attendus, il est recommandé de commencer le sevrage des stéroïdes sans attendre une réponse du traitement PCE.

Le dosage des corticostéroïdes peut varier selon les patients au début du traitement PCE. Généralement, la dose est comprise entre 1 et 2 mg/kg/jour, et le traitement est poursuivi pendant 1 à 2 semaines jusqu'à obtention d'une réponse à la PCE. Dès que le patient répond, la dose de corticostéroïdes peut être diminuée de 5 à 10% par semaine.

3.2.3 Evaluation de la réponse à la PCE

Selon le JEADV et la *UK consensus statement*, l'évaluation de la réponse du patient au traitement devrait être réalisée 1 fois par semaine en surveillant l'évolution des organes atteints et en se basant sur les critères de la classification révisée de Glucksberg décrite précédemment (Das-Gupta et al., 2014; Knobler et al., 2014).

La *UK consensus statement* recommande au moins 8 semaines de traitement PCE avant d'évaluer la réponse clinique du patient au traitement qui est définie de la manière suivante : (Tableau VI) (Berger et al., 2015):

Tableau VI Définitions de la réponse clinique de la GVHDa au traitement PCE.

Réponse complète	Réponse partielle	Réponse mineure	Maladie stable	Maladie en progression
Résolution de l'atteinte de l'organe	Amélioration d'au moins 50% de l'atteinte de l'organe	GVHD stable avec diminution des agents immunosuppresseurs	Aucune évolution de l'atteinte de l'organe touché malgré une diminution d'au moins 50% de la dose d'agents immunosuppresseurs	Evolution de l'atteinte de l'organe touché ou nouveaux signes/symptômes de la GVHD

L'évaluation de la réponse du patient à la PCE et le choix de l'arrêt, la diminution ou le maintien de la thérapie s'appuient sur la réponse clinique et se définissent comme suit (Das-Gupta et al., 2014) :

- **arrêt du traitement** : si obtention d'une **réponse clinique complète** avec une dose de corticostéroïdes inférieure à 20 mg/jour de méthylprednisolone ou inférieure à 25 mg/jour de prednisolone après 8 semaines de traitement ;

- **diminution du traitement** : chez les patients en **GVHDa gastrique** qui répondent généralement plus lentement au traitement, assurer 1 cycle toutes les 2 semaines, suivi de 1 cycle par mois selon la réponse du patient ;
- **maintien du traitement** : si obtention d'une **réponse clinique partielle** tout en nécessitant des doses de corticostéroïdes supérieure à 20 mg/jour de méthylprednisolone ou supérieure à 25 mg/jour de prednisolone. Il est recommandé de continuer 1 cycle par semaine et de réévaluer la réponse chaque semaine ;
- **alternative à la PCE** : chez les patients n'ayant pas présenté au moins une réponse clinique partielle après 8 semaines de traitement.

La poursuite du traitement après l'obtention d'une réponse clinique complète n'a pas montré de bénéfice supplémentaire (Knobler et al., 2014). La démarche globale du traitement PCE est récapitulée dans le Tableau VII ci-après.

Tableau VII Résumé de la démarche à suivre pour la prise en charge de la GVHDa par la PCE

Sélection patient	Protocole	Maintenance	Evaluation de la réponse
Résistants/ réfractaire/ intolérants aux corticostéroïdes (2mg/kg/jour) + inhibiteurs calcineurine	Base de 2 à 3 séances/semaine pendant au moins 2 mois	Arrêt PCE si réponse complète ; pas de bénéfices supplémentaires en cas de maintenance	Evaluation 1 fois/semaine selon les critères (classification Glucksberg)

3.2.4 Analyse de la littérature et des essais cliniques

L'efficacité de la PCE a été évaluée à partir des résultats cliniques publiés ; les études réalisées sont non comparatives, rétrospectives et prospectives. Les taux de réponse globaux obtenus pour tous les organes confondus (peau, tube digestif, foie) et par organe d'après l'analyse des études par les guides pratiques et les méta-analyses sont résumés dans le Tableau VIII ci-dessous.

Tableau VIII Taux de réponse globale (%) obtenus après PCE (tous organes confondus et par organe) donné par les guides pratiques à partir d'études cliniques réalisés sur la GVHDa (adapté de Jossart et., al 2016)

Guides pratiques/ méta-analyses	Nombre d'études (patients)	Taux de réponse Globale (%)			
		Tous organes	Peau	Tube digestif	Foie
Guides pratiques					
(HAS, 2010)	6 (n=128)	63-68	83	75	35
UK Consensus (Das-Gupta et al., 2014)	10 (n=213)	53	67	54	38
JEADV (Knobler et al., 2014)	10 (n=235)	-	75 (50-100)	58 (0-100)	47 (0-100)
AFSA (Schwartz et al., 2016)	15 (n=305)	52-100	66-100	40-83	27-71
SIdEM et GITMO (Pierelli et al., 2013)	11 (n=293)	-	81	62	66
Méta-analyses					
(Zhang et al., 2015)	7 (n=121)	71 (54-89)	86 (79-93)	68 (55-82)	60 (44-76)
(Abu-Dalle et al., 2014)	-	69 (34-95)	84 (75-92)	65 (52-78)	55 (35-74)

A partir du tableau précédent, on remarque que le **taux de réponse globale** obtenu pour **tous les organes confondus** suite au traitement PCE est **supérieur à 50%** pour l'ensemble des études.

D'après le guide pratique italien, de **meilleurs résultats** sont obtenus avec la PCE chez des patients en GVHDa avec une **atteinte cutanée isolée** (Pierelli et al., 2013). Si on compare l'ensemble des résultats, il semble en effet que la PCE soit plus efficace dans la résolution de la forme cutanée de la GVHDa avec des taux de réponse globale supérieurs par rapport aux autres atteintes. Selon les méta-analyses, jusqu'à **85% de réponse globale** est obtenue pour la forme cutanée.

Par ailleurs, selon la méta-analyse de Zhang et al., en 2015, l'absence d'uniformité dans les critères d'évaluation des patients en GVHDa réfractaires aux stéroïdes et la variabilité dans la définition du profil GVHDa réfractaires aux stéroïdes sont des biais dans l'interprétation de la méta-analyse. Ceci ne leur permet pas de définir des recommandations générales sur le protocole de traitement PCE. En effet, d'une étude à l'autre, les critères d'éligibilité des patients et les conditions d'utilisation de la PCE varient. L'absence d'essais randomisés et contrôlés limite également les conclusions quant à l'efficacité réelle de la PCE par rapport aux autres thérapies.

La réalisation d'essais cliniques randomisés et contrôlés est primordiale pour améliorer la prise en charge. En effet, cela permettrait de confirmer l'efficacité et la sécurité d'utilisation de la PCE dans le traitement de 2^{ème} ligne de la GVHDa.

Essais cliniques

Selon le site Clinical trials, une étude randomisée et contrôlée de Phase II (NCT00609609) a été menée entre 2008 et 2016 par le *MD Anderson Cancer Center* (USA). L'objectif de cette étude a été d'évaluer, si en traitement de 1^{ère} ligne de la GVHDa, l'association de la PCE à la corticothérapie améliore par rapport à la corticothérapie seule la réponse, la durée du traitement et la survie du patient. Cet essai clinique vient d'être achevé et la comparaison des résultats des deux groupes de patients est actuellement en cours. De plus, une étude prospective (NCT02151539) est en cours de réalisation par le *Vanderbilt-Ingram Cancer Center*. Elle vise à comparer les résultats de différentes thérapies de 2^{ème} ligne de la GVHDa incluant la PCE. Les résultats de ces études devraient permettre d'affiner la stratégie thérapeutique.

3.3 LA PCE DANS LE TRAITEMENT DE LA GVHDc

Les données présentées s'appuient sur les mêmes guides pratiques cités précédemment pour la GVHDa. En prenant en considération le profil sécuritaire de la PCE, cette thérapie devrait être administrée le plus tôt possible lorsque le patient ne répond pas au traitement de 1^{ère} ligne pour éviter des dommages tissulaires irréversibles et la mortalité causée par les infections contractées dans le contexte d'immunosuppression liée en partie aux traitements.

3.3.1 Sélection du patient

Les patients éligibles à la PCE en traitement de 2^{ème} ou 3^{ème} ligne sont ceux qui sont caractérisés comme (Berger et al., 2015; Pierelli et al., 2013):

- **cortico-réfractaires:** qui présentent, une réponse **minimale** ou une **absence** de réponse avec 1mg/kg de prednisolone et au moins 4 semaines de traitement ;
- **cortico-dépendants** : qui présentent, une incapacité à recevoir une dose inférieure à 10 mg de prednisolone par jour ou autre équivalent sans avoir une rechute de la GVHD.

3.3.2 Protocole de traitement

Le protocole de traitement par PCE donné par les guides pratiques dans la prise en charge de la GVHDc est basé sur **1 cycle⁹ par semaine** ou **toutes les 2 semaines**. Le traitement doit être poursuivi jusqu'à l'obtention d'une réponse ou pour une **durée minimum de 8 à 12 semaines** (HAS, 2010; Knobler et al., 2014; Schwartz et al., 2016).

Au-delà de 12 semaines de traitement, différentes recommandations sont données. Pour l'ASFA, il est recommandé de réduire à 1 cycle toutes les 2 à 4 semaines jusqu'à obtenir une réponse maximale (Schwartz et al., 2016). Tandis que le JEADV recommande de diminuer à 1 cycle tous les 3 mois en fonction du type de lésions, de l'étendue de la GVHDc et de la réponse clinique du patient (Knobler et al., 2014). L'HAS conseille après avis d'experts de poursuivre par un traitement d'entretien avec maintien ou espacement progressif du nombre de cycles. Pour les patients qui présentent une GVHDc en progression ou ne manifestant aucune réponse un changement dans la stratégie thérapeutique doit être opéré.

Un abord **veineux périphérique** doit être préférentiellement ciblé pour diminuer le risque d'infections généralisées et de thromboses qui sont souvent associées à l'utilisation d'un abord veineux central (Knobler et al., 2014). La longue durée et la fréquence du nombre d'aphérèses des séances de PCE nécessitent d'avoir un bon accès veineux.

3.3.3 Evaluation de la réponse

D'après l'ASFA, une réponse maximale dans le cas d'une GVHDc requiert 2 à 6 mois de traitement par PCE (Schwartz et al., 2016). La réponse doit être évaluée pour chaque organe selon les critères du NIH (Jagasia et al., 2015a). Une attention particulière au risque d'anémie et de thrombocytopénie doit être portée à la suite des séances de PCE. L'évolution associée à chaque organe est le principal indicateur de réponse au traitement par PCE.

Une évaluation de la réponse doit être réalisée **après 3 mois et 6 mois de traitement**.

La démarche globale à suivre dans la prise en charge de la GVHDc par la PCE est résumée dans le Tableau IX.

⁹ Deux séances sur 2 jours consécutifs.

Tableau IX Résumé de la démarche à suivre pour la prise en charge de la GVHDc par la PCE

Sélection	Protocole	Maintenance	Evaluation de la réponse
Progression GVHDc avec 1mg/kg/jour prednisolone pendant 2 semaines	1 cycle/semaine pendant au moins 12 semaines	Après 12 semaines de traitement, intervalle de 1 cycle/3 mois	Evaluation de chaque organe selon les critères de la NIH

3.3.4 Analyse de la littérature et des essais cliniques

Les résultats d'un seul essai clinique contrôlé randomisé de phase II (évaluation en aveugle) sur 95 patients GVHDc réfractaires ou dépendants ou intolérants aux corticostéroïdes ont été publiés (Flowers et al., 2008). L'étude a comparé l'efficacité et la sécurité d'utilisation de la **PCE en association avec le traitement standard** par rapport au **traitement standard seul** chez des patients avec une **forme cutanée de GVHDc**. Les résultats montrent une **amélioration de la qualité de vie** des patients pour le groupe ayant reçu la PCE en association à la corticothérapie. Néanmoins, aucune différence significative statistique n'a été mise en évidence entre les deux groupes après 12 semaines de traitement en se basant sur l'amélioration du score cutané.

L'efficacité de la PCE donnée par les résultats des études publiées a été analysée par les guides pratiques. Les taux de réponse globale obtenus pour tous les organes confondus et par organe d'après le résumé des études par les guides pratiques et les méta-analyses sont présentés dans le Tableau X ci-dessous.

Tableau X Taux de réponse globale (%) obtenus après PCE (tous organes et par organe) donné par les guides pratiques à partir d'études cliniques réalisées sur la GVHDc (adapté de Jossart et., al 2016).

Guides pratiques	Nombre d'étude et de patients	Taux de réponse globale (%)							
		Tous organes	Peau	Oral	Yeux	GI	Foie	Poumons	Art
(HAS, 2010) AFSA	16 (n=335)	-	72 (40-100)	-	-	74 (0-95)	63 (0-100)	-	-
(Schwartz et al., 2016)	23 (n=825)	-	48-100	21-90	-	-	0-90	-	-
(Pierelli et al., 2013)	23 (n=735)	64	56	47	50	57	27	-	-
Méta-analyses									
(Abu-Dalle et al., 2014)	-	64 (47-79)	71 (57-84)	63 (43-81)	-	62 (21-94)	58 (27-86)	15 (0-50)	45 (18-74)
(Malik et al., 2014)	18 (n=595)	64	74	72	60	53	68	48	64

D'après les données du tableau, on observe que le taux de réponse globale à la PCE obtenu pour tous les organes confondus est de 64%. Les données de réponse clinique ne sont pas renseignées pour tous les organes. L'analyse de la réponse pour certains organes peut s'avérer compliquée et il devient difficile d'évaluer l'effet de la PCE. De plus, comme pour la GVHDa, la PCE paraît particulièrement efficace dans la prise en charge de la forme cutanée de la GVHDc.

Essais cliniques

Plusieurs essais cliniques sont enregistrés sur le site Clinical Trials et devraient permettre d'améliorer la prise en charge de la GVHDc par la PCE. Certains essais ont été finalisés et les résultats sont en cours de traitement, d'autres essais sont en cours de réalisation. Il sont tous réalisés en Phase II, cela signifie qu'ils sont effectués sur un nombre restreint de malades en GVHDc. Généralement, deux groupes sont comparés, l'un recevant le traitement standard et l'autre le nouveau traitement afin d'observer les différences d'efficacité et de sécurité. Le Tableau XI décrit les essais en cours avec leur n° d'enregistrement et leur statut actuel.

Tableau XI Essais cliniques enregistrés sur Clinical Trials pour l'étude de l'efficacité de la PCE chez les patients atteints de GVHDc.

N° enregistrement Clinical Trials, Phase, statut actuel	Description des essais cliniques
NCT00048789 Phase II Finalisé	Evaluation de l'efficacité en mesurant le taux de réponse des patients traités et la sécurité en contrôlant les effets secondaires de la procédure par PCE. Les objectifs sont également d'analyser l'effet du sevrage des corticostéroïdes, et de déterminer quel type de GVHDc répond le mieux à la PCE.
NCT02340676 Phase II En cours	Evaluation de l'efficacité de la PCE en association avec de l'interleukine 2 (IL-2).
NCT00054613 Phase II Contrôlé et randomisé Finalisé	Evaluation de l'efficacité de l'association de la PCE au traitement standard.
NCT01380535 Phase II Contrôlé et randomisé En cours	Comparaison de deux groupes de patients atteints de GVHDc modéré à sévère, l'un recevant le traitement standard (corticothérapie, ciclosporine ou tacrolimus) et l'autre recevant le traitement standard en association à la PCE.

Par ailleurs, il est difficile d'évaluer la réponse à la PCE pour tous les organes et de prédire la réponse du patient. La recherche de biomarqueurs est l'un des défis actuels, les objectifs étant d'une part de mieux diagnostiquer les patients en GVHDc et d'autre part de réussir à prédire la réponse au traitement. Identifier les patients susceptibles de mieux répondre à la PCE permettrait d'obtenir de meilleurs résultats.

Dans ce cadre, le NIH a tenté de définir les caractéristiques des biomarqueurs candidats de la GVHDc à rechercher (Paczesny et al., 2015). Plusieurs équipes ont d'ailleurs publié des études sur les potentiels biomarqueurs (Greinix et al., 2014; Presland, 2016). Actuellement, un essai clinique (NCT01324908) est mené par l'équipe de Jagasia au *Vanderbilt-Ingram Cancer Center* afin d'évaluer le taux de Tregs comme biomarqueur potentiel de la réponse clinique après PCE chez des patients en GVHDc. L'objectif de cette étude est de déterminer s'il existe une corrélation entre le taux de Tregs dans la peau et le tube digestif, et la réponse du patient au traitement par PCE.

3.4 INTERETS DE LA PCE

Au vu des résultats cliniques et de la bonne tolérance du traitement par les patients, la PCE est une technique très intéressante. Par comparaison aux thérapies usuelles utilisées contre la GHVD, la toxicité induite par la PCE est faible et l'**absence d'effet immunosuppresseur** a l'avantage de réduire le risque d'infections opportunistes. L'ensemble des guides pratiques sont unanimes quant à la sécurité d'utilisation de la PCE. De plus, la PCE permet de **conserver la réaction du greffon contre la tumeur (GVL) visant à détruire les cellules tumorales dans le cas d'hémopathies malignes**. Les patients qui répondent à la PCE ont une probabilité de survie plus élevée à la fois chez les enfants (96 % versus 58%, survie de 5 ans) et chez les adultes (88% versus 18%, survie de 2 ans) (Couriel et al., 2006; Kanold et al., 2005).

Quelques effets indésirables sont rapportés, parmi lesquels on compte : une hypotension lors de l'aphérèse généralement asymptomatique ; une diminution du niveau d'hémoglobines (risque d'anémie) et des plaquettes pouvant nécessiter des transfusions ; des douleurs abdominales légères à la suite de la procédure présentées chez 20% des patients (Bruserud et al., 2014). D'autres symptômes plus rares sont retrouvés comme de la fièvre, des frissons, des nausées, une surcharge liquidienne. Moins de 5% des patients présentent une infection au niveau du site d'insertion du cathéter et de façon très rare certains peuvent développer une thrombose à ce niveau (Dignan et al., 2012d).

Contre-indications

Par ailleurs, la PCE est contre-indiquée dans certains cas où l'opération d'aphérèse est à risque ou en raison du caractère photo-sensibilisant du 8-MOP. Les contre-indications liées à l'utilisation de la PCE sont divisées en deux catégories : liées ou non liées au statut hématologique du patient (HAS, 2010; Pierelli et al., 2013) (Annexe 3):

Contre-indications de la PCE liées au statut hématologique du patient :

- En cas d'**anémie sévère** ou de **thrombocytopénie**, le patient ne peut subir un traitement PCE à moins d'être transfuser par des produits sanguins en parallèle. Le patient doit atteindre une concentration d'hémoglobine d'au moins 8 g/dl et une concentration plaquettaire d'au moins $20 \cdot 10^9$ cellules/L (Pierelli et al., 2013).
- En cas de **concentration en leucocytes inférieure à $1 \cdot 10^9$ cellules/L**, la PCE est contre-indiquée. Une solution consiste à utiliser du G-CSF pour augmenter la concentration en leucocytes. Actuellement, il n'existe pas d'étude qui établisse une relation d'efficacité entre la PCE et la concentration minimale de CMN à traiter. Néanmoins, les cliniciens préfèrent débiter la thérapie lorsque la concentration en CMN est d'au moins $2 \cdot 10^9$ cellules/L (Berger et al., 2015; Pierelli et al., 2013).
- Les patients suspectés ou diagnostiqués avec un **trouble de thrombopénie induite par l'héparine** (TIH).

Contre-indications non liées au statut hématologique du patient :

- les enfants présentant un **poids faible** avec un risque d'instabilité hémodynamique et d'hypovolémie (surveillance accrue lors de l'aphérèse) ;
- un **accès veineux difficile** ;
- les femmes **enceintes** ou allaitantes ;
- les patients atteints de **maladies photosensibles** comme le lupus érythémateux, la porphyrie cutanée tardive, la protoporphyrie érythropoïétique, la porphyrie variégate, le xeroderma pigmentosum, l'albinisme ;
- les patients atteints d'**aphakie** présentent un risque de dommages réiniens en raison de l'absence de cristallins (le protocole peut être discuté) ;
- les patients utilisant d'autres traitements pouvant interagir avec le 8-MOP doivent être étudiés. En effet, le méthoxsalène peut potentialiser l'activité de **médicaments photo-sensibilisants** comme par exemple les sulfamides, les tétracyclines, etc. ;
- les patients **allergiques aux psoralènes** ;
- les patients en **insuffisance cardiaque ou rénale**.

4 LA PCE EN SYSTEME DISSOCIE : UN PRODUIT DE THERAPIE CELLULAIRE AUTORISE

Les modalités réglementaires associées à la PCE en système dissocié sont liées au statut réglementaire de la molécule photoactivable utilisée dans cette technique. Ainsi, la solution de 8-MOP (20 µg/ml Macopharma) est inscrite sur la liste des **produits thérapeutiques annexes (PTA)** autorisés en France par l'Agence nationale de sécurité du médicament depuis 2007 et renouvelée en 2012 (Annexe 3).

Un PTA se définit comme « tous produits qui, avant son utilisation thérapeutique chez l'homme entrent en contact avec des organes, tissus, cellules ou produits issus du corps humain ou d'origine animale au cours de leur conservation, de leur préparation, de leur transformation, de leur conditionnement ou de leur transport. Avant leur mise sur le marché, ils font l'objet d'une autorisation délivrée par l'ANSM [...] » (ANSM, 2016). Le 8-MOP est un produit utilisé dans le cadre de la transformation des cellules du patient avant leur usage clinique. D'après le résumé des caractéristiques du produit (RCP), le 8-MOP est enregistré sous l'indication de « photosensibilisation des cellules nucléées issues d'un prélèvement d'aphérèse, dans le cadre d'une procédure de photochimiothérapie extracorporelle, selon la technique dite en système dissocié » (Annexe 3).

De plus, la loi n°2004-800 du 6 août 2004 du Code de la santé publique relative à la **bioéthique** donne le cadre réglementaire par rapport à la « préparation, conservation et utilisation des tissus, des cellules et de leurs dérivés ». Ainsi, d'après l'article L1243-1 « sont des produits cellulaires à finalité thérapeutique les cellules humaines utilisées à des fins thérapeutiques autologues ou allogéniques, quel que soit leur niveau de transformation », cela indique que **le produit de PCE correspond à une préparation de thérapie cellulaire**. A ce titre, les articles L1243-2 et L1243-5 spécifient que « [...] les préparations de thérapie cellulaire font l'objet d'une autorisation de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé après évaluation de leurs procédés de préparation et de conservation ainsi que de leurs indications thérapeutiques ». Par conséquent, seuls les établissements de santé auxquels une **autorisation de l'ANSM** a été délivrée peuvent entreprendre la **réalisation des procédures PCE en système dissocié**.

L'évaluation de la procédure de PCE nécessite la mise en place d'un **contrôle qualité** lors de la préparation du produit de thérapie cellulaire afin d'**assurer la sécurité d'utilisation** du produit. Pour cela, l'ANSM a établi un **référentiel d'évaluation** des préparations pour photochimiothérapie extracorporelle qui spécifie la réalisation de trois contrôles sur le produit fini définis ci-après.

- **Test bactériologique** : à réaliser obligatoirement car le risque de contamination bactériologique des produits d'aphérèse pour PCE est plus élevé en raison de l'immunodépression des patients. Les résultats sont connus 48h à 72h après la procédure, ce n'est donc pas un critère libérateur.
- **Test de viabilité cellulaire** : après traitement par PCE, les cellules entrent dans un processus de mort cellulaire apoptotique. Le comptage et la mesure de la viabilité cellulaire sont à connaître mais aucune spécification n'est précisée et requise.
- **Test de transformation lymphoblastique (TTL)** : ce test permet de s'assurer de l'effet antiprolifératif de la PCE sur les lymphocytes T et de déterminer si le patient répond au traitement. Il doit être réalisé pour chaque nouveau lot de 8-MOP et pour chaque nouveau patient. Il consiste à mesurer le pourcentage d'inhibition de la prolifération des cellules nucléées en utilisant la thymidine tritiée¹⁰ et doit être supérieur à 70%. Ce n'est pas un critère libérateur car les résultats sont connus après administration du produit mais c'est un critère de validation du produit et la seule spécification définie à ce jour.

Le résumé des critères et des recommandations associés à la préparation du produit de thérapie cellulaire PCE est donné dans le Tableau XII ci-dessous (ANSM, 2011).

Tableau XII Critères de contrôle qualité et recommandations pour la préparation du produit de thérapie cellulaire PCE (ANSM, 2011).

Critères de contrôles qualité sur produit fini	Recommandations
Test de transformation lymphoblastique (TTL)	Pourcentage inhibition de la prolifération avec agent mitogène > 70 %
Contrôle bactériologique	A connaître obligatoirement
Comptage cellulaire	A connaître
Viabilité cellulaire	A connaître
Délai entre prélèvement et administration	6 heures maximum
Température de transport	20-24°C

¹⁰ Marqueur radioactif, analogue de la thymine, qui s'intègre dans l'ADN et permet la quantification de la prolifération des lymphocytes T.

Les critères de contrôle qualité du produit fini ne renseignent pas sur l'efficacité du traitement. Le manque de connaissances à la fois sur le mécanisme d'action de la PCE et sur la technique complexifie la définition de spécifications pour le contrôle qualité du produit. Une meilleure compréhension de la technique permettrait de standardiser la pratique. En effet, il s'agit de bien maîtriser les différents paramètres de réalisation de la PCE pour s'assurer de l'obtention de résultats reproductibles.

La seconde partie de ces travaux consiste à étudier l'influence des paramètres de la PCE en système dissocié par la réalisation d'une étude de performances sur la technologie développée par la société Macopharma.

PARTIE II.

ETUDE DE PERFORMANCES BIOLOGIQUES *IN VITRO* DE LA PCE EN SYSTEME DISSOCIE

Depuis une trentaine d'années, la pratique de la PCE en système dissocié a peu évolué dans l'ensemble des établissements de santé spécialisés dans la transplantation. Les limites des connaissances actuelles sur le mécanisme d'action *in vivo* et *in vitro* de la PCE sont un frein dans l'évolution de cette technique.

Pour améliorer la compréhension du fonctionnement biologique de la PCE, l'une des stratégies consiste à évaluer les effets de la variation des différents paramètres de réalisation de la PCE à l'échelle de la cellule. Cela permet de recueillir des informations quant à l'efficacité de la thérapie *in vitro* et donne des indications sur la maîtrise des différents paramètres pour obtenir des résultats reproductibles.

La PCE en système dissocié offre l'avantage de pouvoir contrôler la qualité du produit final. Pour cela, les tests à mettre en œuvre doivent répondre à des critères de reproductibilité, de fiabilité et de standardisation. L'approche qualité à adopter vis-à-vis de la PCE est multidisciplinaire, elle doit englober un contrôle bactériologique, hématologique et immunologique.

La société Macopharma a développé plusieurs produits de la technologie PCE en système dissocié sous le nom de Theraflex ECP, notamment la poche d'irradiation, la machine à irradiation UVA et le 8-MOP. Au sein de cette société, c'est à travers une étude de performances menée par une équipe à laquelle j'ai été associée pendant un projet de fin d'étude, que ces travaux expérimentaux ont été réalisés.

Une description de la PCE en système dissocié sera donnée dans un premier temps. Cela permettra de traiter des différents aspects techniques, essentiels à la compréhension de la procédure PCE. Les paramètres que nous avons ciblés lors de l'étude de performances seront ensuite explicités. Cela nous amènera à décrire la démarche expérimentale retenue lors de cette étude, avec un point sur les méthodes analytiques auxquelles nous avons eu recours. Enfin, les résultats obtenus seront présentés et discutés.

1 LA PCE EN SYSTEME DISSOCIE

1.1 ASPECTS TECHNIQUES

1.1.1 Rayonnement UV

Le rayonnement UV a un spectre qui se subdivise en trois bandes de longueurs d'ondes en fonction des effets biologiques induits (Andreu et al., 1994):

- Les UVC (200-280 nm) sont hautement toxique pour les cellules,
- Les UVB (280-320 nm) inhibent la synthèse de l'ADN et sont toxiques pour les cellules à division rapide,
- Les UVA (320-400 nm) ont besoin d'être associés à une molécule photoactivable pour être actifs.

La technologie PCE est basée sur l'irradiation des cellules aux **UVA**. L'activité biologique des UVA est due à l'association des cellules à un agent intercalant photoactivable tel que le 8-MOP dont la longueur d'onde optimale d'activation est définie à 365 nm (Lerner et al., 1953). La dose d'UVA qui atteint les cellules dépend du taux d'hématocrite dans la poche d'irradiation. En effet, **les globules rouges ont la propriété d'absorber les rayons UVA** et ainsi de limiter l'exposition des cellules aux UVA (Lee and Garro, 1989).

1.1.2 Machine à irradiation UVA

La machine à irradiation UVA, appelée MacoGenic G2 est illustrée ci-dessous (Figure 18). Elle a été développée par la société Macopharma.



Figure 18 Machine à irradiation UVA (MacoGenic G2) utilisée pour la PCE en système dissocié.

Ce dispositif médical a une double fonction, d'une part, il délivre des radiations UVA et d'autre part, il agite la poche à 60 tours/minute pour assurer l'homogénéité du contenu. L'appareil se compose de six lampes fluorescentes sous forme de tubes disposées de chaque côté de la poche afin d'irradier uniformément la suspension cellulaire. La poche est positionnée sur le plateau composé de quartz, connu pour avoir un coefficient d'absorption dans l'UV très réduit.

L'architecture interne est schématisée ci-après (Figure 19.A). Les lampes émettent des radiations UVA dont les longueurs d'ondes sont comprises entre 315 et 400 nm avec un pic d'émission à 350 d'après la notice d'instruction de la MacoGenic G2 et un autre à 365 nm (Figure 19.B).

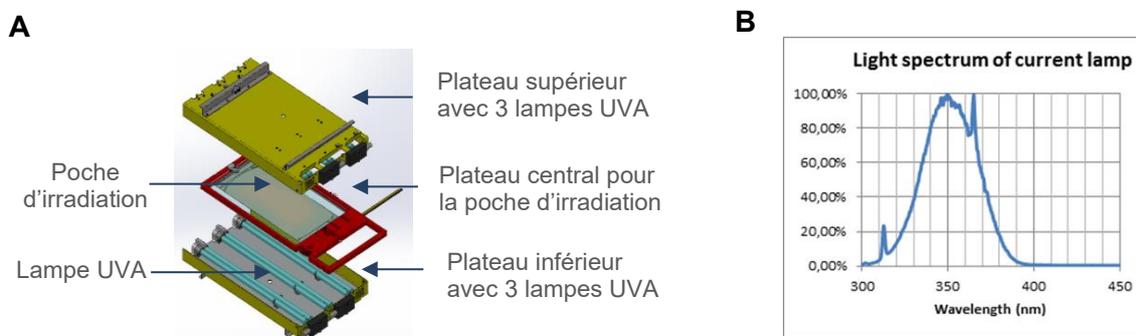


Figure 19 (A) Architecture interne de la MacoGenic G2. (B) Spectre d'émission des lampes de la MacoGenic G2.

Toutes les données relatives au cycle (durée, énergie délivrée, intensité, température, vitesse d'agitation, numéro de lot de la poche) sont enregistrées pour assurer la traçabilité de la poche irradiée.

1.1.3 Poche d'irradiation

Une poche d'irradiation stérile (réf. XUV8501Q) fabriquée par Macopharma est utilisée lors du traitement par PCE avec la MacoGenic G2 (Figure 20). Le matériau de la poche est l'éthylène-acétate de vinyle (EVA), dont une des propriétés est de transmettre les UVA (Keskin, 2007). L'épaisseur de la poche une fois remplie doit être inférieure à 3 mm pour que l'action des rayons UVA soit effective (Heshmati, 2008).

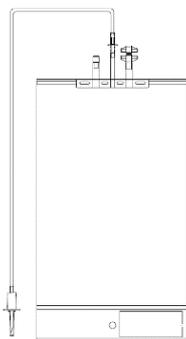


Figure 20 Schéma de la poche d'irradiation.

1.1.4 Molécule photoactivable : 8-méthoxypsoralène (8-MOP)

Le 8-MOP est un composé aromatique appartenant à la famille des furocoumarines issue de la fusion d'un cycle furane et d'un noyau coumarine (Figure 21). Ce principe actif est naturellement présent dans les graines de la plante *Ammi majus* et dans les racines de *Heracleum candicans* (FDA). Sa structure lui confère des propriétés lipophiles qui lui permettent d'adhérer aux matières plastiques (Shephard et al., 1999).

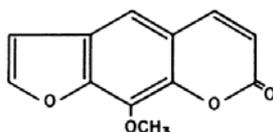


Figure 21 Structure du 8-méthoxypsoralène (8-MOP).

Le 8-MOP traverse la membrane plasmique et s'insère entre les brins d'ADN en moins de 2 minutes et se lie de façon covalente dans l'ordre de la milliseconde après exposition aux UVA (Karolak et al., 1992). Le 8-MOP non fixé est rapidement métabolisé et excrété par voie rénale dans les 24 heures (Shephard et al., 1999).

Le 8-MOP se présente sous une formulation liquide et stérile à une concentration de 20 µg/ml qui doit être conservée à l'abri de la lumière. La composition qualitative et quantitative de la solution de 8-MOP développée par Macopharma est donnée ci-dessous (Tableau XIII).

Tableau XIII Composition de la solution de 8-MOP.

Composants pour 100 ml de solution	Quantités
Méthoxsalène	2 mg
Ethanol	3230 mg
Acide acétique glacial	230 mg
Acétate de sodium trihydraté	860 mg
Chlorure de sodium	400 mg
Eau pour préparations injectables	qsp 100 ml

Il existe plusieurs solutions de 8-MOP sur le marché. Seule la solution UVADEX® fabriqué par Therakos a été approuvée par la FDA et a le statut de médicament pour l'indication du lymphome cutané à cellules T au stade avancé. De plus, l'Agence européenne des médicaments (*European Medicines Agency EMA*) par son comité des médicaments orphelins (*Committee for Orphan Medicinal Products*) a émis un avis favorable pour désigner le 8-MOP comme médicament orphelin dans le traitement de la GVHD (EMA, 2009). Cette solution est à usage exclusif du système on-line développé par la société Therakos. Macopharma a également développé une solution de 8-MOP qui a le statut de produit thérapeutique annexe (cf. Partie I.4). Cette solution n'est pas spécifique d'un système.

1.2 DEROULEMENT DE LA PROCEDURE PCE

Pour rappel, la PCE avec le système dissocié de Macopharma se déroule en trois grandes étapes représentées ci-dessous (Figure 22).

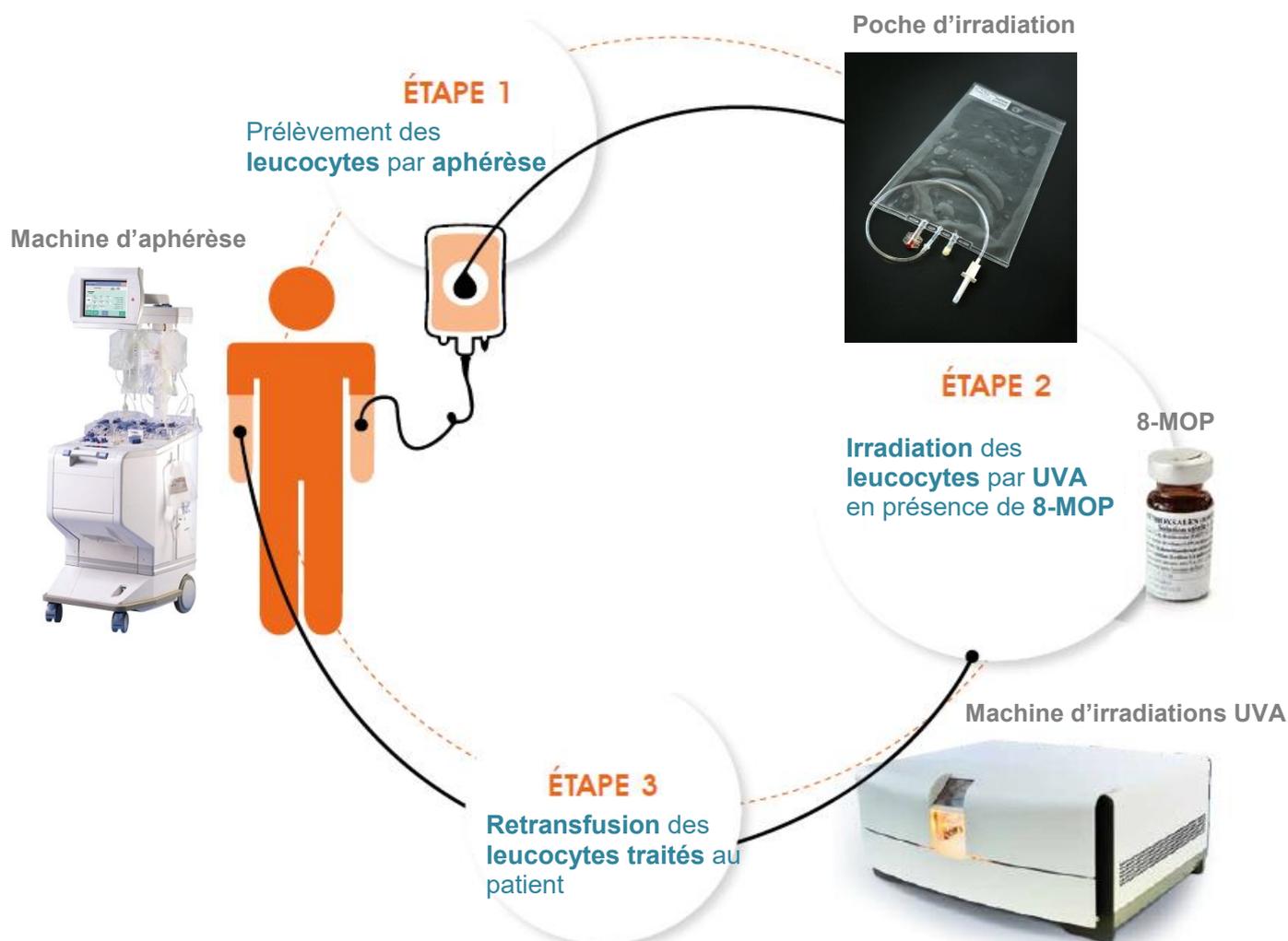


Figure 22 Les trois étapes de la procédure PCE en système dissocié de Macopharma.

Etape 1 Prélèvement des leucocytes par aphérèse

Le patient subit une opération d'aphérèse qui consiste à « prélever son sang, à en soustraire soit du plasma, soit des cellules sanguines au moyen d'un séparateur de cellules et à restituer à cette personne les composants sanguins non retenus » (HAS, 2010). Dans le cas de la PCE, ce sont les leucocytes que l'on souhaite soustraire, on parle alors de cytaphérèse et plus spécifiquement de leucaphérèse. A l'issue de cette opération, on obtient du **sang concentré en leucocytes** appelé **produit de leucaphérèse**. Le volume de sang total traité est de 7 à 10 L et le volume extracorporel est généralement compris entre 150 à 200 ml

(Brosig et al., 2016; HAS, 2010). La procédure dure entre 120 et 275 minutes. Le nombre de leucocytes collectés (de 57.10^8 à 66.10^8 cellules) est comparable entre les différents systèmes d'aphérèse présents sur le marché (Amicus, Cobe spectra et Spectra Optia) selon une étude publiée par Brosig et al., en 2016. De plus, ils montrent que le taux d'hématocrite varie entre 1,3% et 3,7% sachant que le taux d'hématocrite souhaité est inférieur à 2%.

Etape 2 Irradiation des leucocytes par UVA en présence de 8-MOP

Le produit de leucaphérèse est ensuite traité sous atmosphère contrôlée pour assurer la stérilité du produit et sa sécurité d'utilisation. Dans la technologie de Macopharma, le produit de leucaphérèse est d'abord dilué dans une solution de chlorure de sodium (0,9% NaCl) pour obtenir un volume finale standardisé de 300 ml. Cette dilution permet de réduire le taux d'hématocrite pour réduire l'absorption des UVA par les globules rouges. Cette suspension cellulaire est transférée dans une poche d'irradiation conçue pour transmettre les UVA. Un volume de 3 ou 5 ml de 8-MOP (20 $\mu\text{g/ml}$ Macopharma) est ajouté pour obtenir une concentration finale de 200 ou 333 ng/ml. La poche d'irradiation est ensuite placée dans la machine d'irradiation qui délivre une énergie de 2 J/cm^2 si le taux d'hématocrite est inférieur à 2% ou une énergie de 2,5 J/cm^2 si le taux d'hématocrite est supérieur à 2%. Le cycle d'irradiation dure environ 10 à 12 minutes, il est calculé automatiquement par la machine d'irradiation en fonction du taux d'hématocrite de la suspension cellulaire. On obtient ainsi le produit final de thérapie cellulaire.

Etape 3 Retransfusion des leucocytes traités au patient

Le produit final de thérapie cellulaire est transféré dans une poche adaptée afin de réinjecter le produit au patient. La procédure entière se déroule sur une période de 3h30 en moyenne.

Au cours de cette étude de performances, nous avons cherché à caractériser la technologie développée par Macopharma. Pour cela, nous avons reproduit ces différentes étapes au laboratoire de recherche et développement de biothérapies en utilisant les différents composants de la poche (plasma, ACD-A, GR, NaCl et 8-MOP) et une lignée cellulaire en vue de la standardisation de la méthode.

2 OBJECTIF

L'objectif de ces travaux expérimentaux est d'identifier quels sont les paramètres susceptibles d'influencer les performances du système.

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé une lignée cellulaire de lymphocytes T humains appelée JURKAT. Les expériences ont été menées en faisant varier un seul paramètre à la fois. Cela devrait contribuer à définir l'influence des paramètres clés sur l'efficacité de la technique.

2.1 CRITERES DE PERFORMANCE

Un critère de performance ou de validation se définit comme « une valeur limite spécifiée pour une caractéristique de performance » (ANSES, 2015). D'après le comité français d'accréditation, les critères de performances d'une méthode sont établis par le laboratoire et doivent être comparés aux données de référence issues de la bibliographie, des sociétés savantes, etc. (COFRAC, 2012). D'après l'analyse de la littérature, le critère de performance le plus décrit et le plus utilisé en routine pour s'assurer de l'efficacité du traitement est l'évaluation de la capacité proliférative des lymphocytes T. Le choix de suivre cette population cellulaire pour valider la procédure PCE est motivé par le rôle essentiel tenu par les lymphocytes T dans la GVHD. Trois études donnent **pour principal critère de contrôle qualité la mesure de l'inhibition de la prolifération des cellules T** pour valider la procédure PCE (Evrard et al., 2010; Faivre et al., 2015; Jacob et al., 2003).

La méthode de référence pour mesurer l'inhibition de la prolifération consiste à quantifier la thymidine tritiée incorporée dans l'ADN nouvellement synthétisé des cellules T en phase de prolifération. Pour cela, les cellules T doivent préalablement être stimulées *in vitro* par un agent mitogène comme la phytohémagglutinine (PHA) car ces cellules n'ont pas la capacité de proliférer spontanément. En utilisant cette méthode, Jacob et al., en 2003, définissent un **seuil minimum, de 70% d'inhibition de la prolifération des cellules T, 3 jours après le traitement PCE, pour valider la procédure PCE.**

Pour limiter l'utilisation de substance radioactive, un test alternatif pour l'évaluation de la prolifération cellulaire a été développé par Evrard et al., en 2010. Ce test est basé sur le marquage des cellules par un fluorochrome vert appelé carboxy-fluorescéine diacétate succinimidyl ester (CFSE). Le CFSE se diffuse dans la cellule et se lie de manière covalente à des protéines intra-cytoplasmiques, il est alors clivé par des estérases intracellulaires et se retrouve piégé à l'intérieur du cytoplasme. La quantité de fluorescence émise diminue de moitié à chaque division cellulaire ce qui permet de suivre la prolifération cellulaire par

cytométrie en flux (cf. section 3.3.2). Les cellules T sont préalablement stimulées *in vitro* par un agent mitogène. Cette méthode a récemment été validée selon la norme EN ISO 15189:2007¹¹ (Faivre et al., 2015).

Lorsque la PCE est réalisée en conditions optimales, c'est-à-dire avec un taux d'hématocrite inférieur à 2%, alors le taux d'inhibition de la prolifération est supérieur à 90%. Lorsque le taux d'hématocrite est équivalent à 2%, le taux d'inhibition de la prolifération est compris entre 70 et 90% (Evrard et al., 2010; Jacob et al., 2003). L'ANSM recommande l'obtention de 70% d'inhibition de prolifération à J+3 pour valider une procédure PCE (ANSM, 2011).

Par ailleurs, d'autres travaux montrent que le suivi du **taux d'apoptose des cellules T traitées** peut également être utilisé comme un **critère de performance de la procédure PCE** (Gerber et al., 2000; Schmid et al., 2015; Taverna et al., 2015).

L'équipe de Taverna et al. (2015) a mesuré le taux d'apoptose des CMN traitées par PCE chez des patients atteints de GVHDc. Pour cela, l'équipe a prélevé deux échantillons sur produit de PCE provenant d'un même patient : le premier est prélevé dans la poche avant irradiation UVA, le second après le traitement des cellules par 200 ng/ml de 8-MOP et 2 J/cm² d'UVA. Puis, ces deux échantillons sont cultivés jusqu'à 2 jours dans les mêmes conditions. Le taux d'apoptose des cellules a ensuite été évalué par cytométrie en flux après le double marquage des cellules à l'annexine-V et à l'iodure de propidium (IP). L'équipe a défini le paramètre Δ apoptose qui correspond à la soustraction du pourcentage d'apoptose des cellules traitées au pourcentage d'apoptose des cellules non traitées (contrôle). Le Δ apoptose est calculé chaque jour après traitement des cellules. Le Δ apoptose est calculé en soustrayant le pourcentage d'apoptose des cellules traitées aux cellules contrôles après chaque jours de cultures post irradiation. Ce paramètre permettrait de montrer l'efficacité biologique du traitement. En effet, pour 88,6% des 31 procédures PCE réalisées, le traitement semble être efficace chez le patient. Ils font donc une corrélation entre l'efficacité du traitement et la variation du Δ apoptose. **Si la valeur de Δ apoptose est supérieure à 15%, 24h après le traitement PCE, cela prédit le bon fonctionnement de la thérapie.** De plus, ils précisent que le test d'évaluation de l'apoptose a l'avantage d'être plus facile et rapide à mettre en œuvre (24h pour obtenir le résultat) pour le contrôle qualité de la PCE par rapport au test d'évaluation de la prolifération cellulaire qui nécessite 3 jours de culture.

Au cours de cette étude de performances, l'influence des paramètres clés a été évaluée en mesurant le **pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire**, et le **taux de Δ**

¹¹ Norme concernant le contrôle qualité des laboratoires d'analyses de biologie médicale.

apoptose des cellules puisque ce sont les critères de performances recommandés par l'ANSM ou décrits dans la littérature.

2.2 PARAMETRES CLES

Les paramètres suivants sont susceptibles d'influencer les performances de la technologie PCE en système dissocié :

- la concentration en agent photoactivable, le 8-MOP ;
- le taux d'hématocrite du contenu de la poche d'irradiation (Ht) ;
- la dose d'irradiation UVA délivrée ;
- le volume de plasma ;
- et, la quantité de cellules à traiter.

Plusieurs questions sont associées à la variation de chacun de ces paramètres. Cette étude de performances tente d'y répondre.

Concernant la **concentration de 8-MOP**, le résumé des caractéristiques du produit (RCP), donné en Annexe 3, qui est un document destiné aux professionnels de santé publié par l'ANSM, mentionne que le 8-MOP (20 µg/ml Macopharma) doit être utilisé à un volume de 5 ml dans une poche de 300 ml, ce qui correspond à une concentration finale dans la poche d'irradiation de 333 ng/ml. Cependant, la plupart des études répertoriées dans la littérature utilisent une concentration de 200 ng/ml (Andreu et al., 1994; Berger et al., 2015; Cervio et al., 2015; Hähnel et al., 2017; Perseghin, 2007; Schmid et al., 2015; Taverna et al., 2015). La (HAS, 2010), recommande également la concentration de 200 ng/ml dans l'utilisation de la technique. Dans cette étude, nous avons testé les deux concentrations en 8-MOP pour déterminer si cela influence les performances du système.

Le **taux d'hématocrite**, c'est-à-dire la proportion de globules rouges présents dans le produit d'aphérèse peut varier selon le patient. Le contenu de la poche d'irradiation ne doit pas selon les recommandations dépasser 2% d'hématocrite (HAS, 2010). Il s'agit dans cette étude de faire varier le taux d'hématocrite afin de préciser l'impact de ce paramètre sur les performances du système.

La **dose d'irradiation UVA** est fixée à 2 J/cm² lorsque le taux d'hématocrite est à 2% et une augmentation à 2,5 J/cm² est recommandée lorsque le taux d'hématocrite est supérieur à 2% (HAS, 2010). La dose d'irradiation UVA est donc un paramètre à étudier mais il n'a pas été évalué au cours de ces travaux.

Enfin, le **volume de plasma** et la **quantité de cellules à traiter** pour que la PCE soit efficace sont des paramètres à étudier mais ils ne sont pas traités dans cette étude.

Cette étude de performances s'est concentrée sur l'influence des deux paramètres présentés ci-dessous (Tableau XIV) :

Tableau XIV Domaine de variation des deux paramètres étudiés pour l'étude de performances de la PCE en système dissocié.

Paramètres analysés	Domaine de variation
Concentration en 8-MOP	0, 200, 333 ng/ml
Taux d'hématocrite	1%, 2%, 4%, >5%

La partie suivante expose la démarche expérimentale suivie. Le modèle cellulaire utilisé pour l'étude de performances in vitro sera développé, et le déroulement d'un essai expérimental type sera détaillé en décrivant les méthodes analytiques mises en œuvre.

3 MATERIELS ET METHODES

Cette partie présente les aspects techniques et expérimentaux qui ont permis de conduire l'étude de performances biologiques sur la PCE en système dissocié.

3.1 MODELES CELLULAIRES POUR L'ETUDE *IN VITRO*

L'étude biologique de la PCE nécessite de travailler sur des modèles cellulaires. En effet, n'ayant pas accès à des produits d'aphérèse issus de patients, des modèles cellulaires doivent donc être envisagés. Deux modèles cellulaires constitués soit, majoritairement des cellules T, soit, uniquement des cellules T, présentent l'intérêt d'être à la fois disponibles et ciblés par la PCE. Ces deux modèles cellulaires sont les cellules mononuclées du sang périphériques (PBMC) et les cellules immortalisées de lymphocytes T humains appelées JURKAT. Ces deux modèles cellulaires ont des caractéristiques différentes comme décrit par la suite.

3.1.1 Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC)

Les cellules PBMC sont issues de sang de **donneurs sains**. Elles sont obtenues auprès de l'EFS sous forme de poche de sang total ou de concentré leuco-plaquettaire appelé **buffy coat**¹². D'après l'analyse de la littérature, plusieurs études utilisent les PBMC pour comprendre le mécanisme d'action de la PCE (Becherucci et al., 2016; Legitimo et al., 2007; Schmid et al., 2015). Ces études démontrent que les cellules T meurent par apoptose suite au traitement PCE et que la prolifération des cellules T après 3 jours de culture est inhibée (en moyenne de 92,6% +/- 1,4% d'après Schmid et al., 2015).

Les PBMC issues d'un buffy coat d'un donneur sain sont semblables aux cellules issues du prélèvement de leucaphérèse d'un patient, elles constituent donc un modèle cellulaire optimal pour valider une procédure PCE en système dissocié (Schmid et al., 2015). On retrouve les cellules du système immunitaires telles que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules Natural Killers (NK), les monocytes et les cellules dendritiques. La proportion de ces sous-populations cellulaires chez un être humain sain est donnée dans le Tableau XV (Miyakira, 2012). Cette proportion de cellules diffère chez une personne malade. Par conséquent, il faut tenir compte que les PBMC de donneurs sains peuvent ne pas refléter exactement les mêmes effets *in vivo* de la PCE que l'on obtiendrait chez un patient.

¹² Suite au prélèvement d'une poche de sang total, les différents constituants du sang sont séparés pour ne garder que la fraction de globules blancs (=buffy coat) grâce à des opérations de centrifugation et de séparation à l'aide d'un automate de type MacoPressSmart.

Tableau XV Proportions cellulaires des PBMC chez l'être humain (Miyahira, 2012)

Types cellulaires		Proportions de PBMC (%)
Lymphocytes	Cellules T	45 – 70 %
	Cellules B	5 – 20 %
	Natural Killers	5 – 20 %
Monocytes		10 – 30 %
Cellules dendritiques		1 – 2 %

Il existe quelques limites dans l'utilisation des PBMC. C'est un modèle complexe à manipuler en raison de l'incapacité des cellules à proliférer spontanément. Il est nécessaire d'ajouter un agent mitogène comme la phytohémagglutinine (PHA). De plus, lorsque nous souhaitons travailler avec des PBMC au laboratoire de Biothérapie, les cellules ne peuvent provenir que d'un seul donneur, ce qui limite le nombre de cellules (généralement moins de 1,5 milliard de leucocytes) et par conséquent, le nombre de conditions à tester.

3.1.2 Lignée de cellules T (JURKAT)

Le second modèle cellulaire est une lignée immortalisée de lymphocytes T CD4+ issue de lymphomes humains appelée JURKAT (ATCC¹³, E6-1) et photographiée ci-dessous (Figure 23). Cette lignée a été établie à partir du sang périphérique d'un garçon âgé de 14 ans et atteint d'une leucémie (Schneider et al., 1977). S'agissant d'une lignée cellulaire, les cellules sont homogènes : ce modèle se compose uniquement de lymphocytes T issues qui sont la cible principale de la PCE.

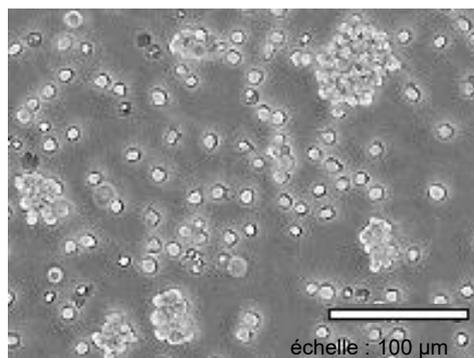


Figure 23 Photo de cellules JURKAT à faible densité observée au microscope (site ATCC, JURKAT clone E6-1).

Ce modèle cellulaire a permis d'améliorer les connaissances liées au fonctionnement des cellules T sous l'influence de certaines cytokines (Manger et al., 1986). Les JURKAT se sont

¹³ *American Type Culture Collection* : Société américaine privée expert pour l'identification, la production, la conservation et la distribution de norme de référence sur les lignées cellulaires et autres matériaux biologiques.

également révélées être un outil de choix pour l'étude de la voie de signalisation des cellules T et de leur récepteur TCR (Abraham and Weiss, 2004).

Cette lignée cellulaire présente des similitudes avec les cellules d'intérêt, ce qui en fait un modèle pertinent pour l'étude biologique *in vitro* de la PCE. En effet, cette lignée a déjà été utilisée pour l'étude de la mort cellulaire induite en présence de 8-MOP et d'irradiation aux UVA (Čunderlíková et al., 2014). Elle a également été utilisée pour tester des molécules photoactivables alternatives au 8-MOP (Wolnicka-Glubisz et al., 2002; Wolnicka-Glubisz et al., 2005). Les résultats de l'une de ces études montrent que le nombre de cellules apoptotiques augmente significativement 24 heures après avoir été traitées par PCE (Wolnicka-Glubisz et al., 2002).

Les JURKAT sont également capables de proliférer spontanément, ce qui permet de générer une quantité importante de cellules sur une période de temps courte avec un temps de doublement d'environ 30 heures. Ce modèle connu est donc facilement manipulable. Il permet d'obtenir des résultats standardisés et reproductibles.

3.1.3 Comparaison des deux modèles cellulaires

Les PBMC et les JURKAT sont deux modèles cellulaires complémentaires pour étudier la PCE. C'est pourquoi, il est intéressant de les utiliser dans le cadre de l'étude de performances *in vitro* de la PCE en système dissocié. **Les JURKAT sont utilisées dans un premier temps car c'est un modèle standardisé, ceci va permettre la comparaison des résultats des expériences entre elles et la détermination des facteurs limitant l'efficacité du système.** Cette stratégie permet de générer plus facilement des données standardisées et permet de mieux **cibler les essais qui devront ensuite être mis en place sur les PBMC.** Les caractéristiques des cellules issues d'un prélèvement de leucaphérèse d'un patient sont comparées à celles des PBMC de donneurs sains et des JURKAT (Tableau XVI).

Tableau XVI Comparaison des caractéristiques des cellules prélevées chez un patient avec celles des PBMC de donneurs sains et des JURKAT

	Cellules traitées par PCE chez un patient	PBMC	JURKAT
Définition	Cellules du produit de leucaphérèse	Cellules mononuclées du sang périphérique	Lymphocytes T Humains
Source	Sang périphérique de patient	Sang de donneurs sains (EFS)	Lignée cellulaire (clone E61 ATCC) issue de lymphome à cellules T
Composition cellulaire	Lymphocytes T Lymphocytes NK Monocytes Cellules dendritiques	Lymphocytes T Lymphocytes B NK Monocytes Cellules dendritiques	Lymphocytes T
Statut biologique	Pathologique	Non pathologique	Pathologique
Capacité proliférative	Cellules primaires = non prolifératives (activées par PHA)	Cellules primaires = non prolifératives (activées par PHA)	Cellules cancéreuses = prolifératives
Modèle	Non standardisé	Non standardisé	Standardisé

Cette thèse présente les résultats des premiers essais réalisés sur les JURKAT.

3.2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La réalisation d'un essai sur les JURKAT pour l'étude de performances de la PCE se déroule sur une journée et le suivi des paramètres se fait jusqu'à sept jours après le traitement (Figure 24). Chacune des étapes est développée dans la suite de cette partie.

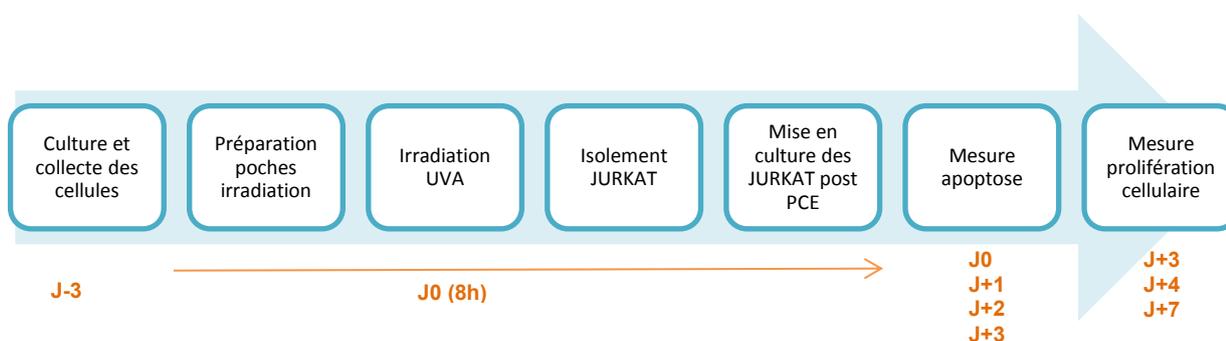


Figure 24 Principales étapes du déroulement d'un essai type de l'étude de performances biologique de la PCE sur les cellules JURKAT avec les indications temporelles.

3.2.1 Culture des cellules

Les cellules JURKAT (Sigma) sont issues d'une lignée cellulaire cancéreuse de lymphocytes T humains non adhérents. Elles sont cultivées en milieu RPMI 1640 supplémenté en sérum de veau fœtal (10% v/v) avec 1 % de L-Glutamine (Lonza) et 1% de Pénicilline-

Streptomycine (Lonza). Les cellules sont cultivées en flacons de culture de 25 ou 75 cm² (T25, T75) puis elles sont transférées dans une chambre de culture cellulaire de plus grand volume de 636 à 1272 cm² (CellSTACK, Culture Chambers, Corning) pour obtenir un nombre élevé de cellules. Les cellules sont mises en culture dans un incubateur à 37°C + 5% CO₂. Ainsi, dans un flacon de culture de 636 cm², 40 millions de cellules sontensemencées dans 200 ml de milieu de culture afin d'avoir une densité de 0,2 millions de cellules/ml. Après 3 jours de culture, on obtient environ 250 millions de cellules.

3.2.2 Préparation des poches d'irradiation

Lors des essais associés à l'étude de performances, les cellules JURKAT sont traitées dans les mêmes conditions que le produit de leucaphérèse d'un patient comme décrit dans la section 1.2. Les différents éléments contenus dans la poche d'irradiation sont schématisés ci-dessous (Figure 25).

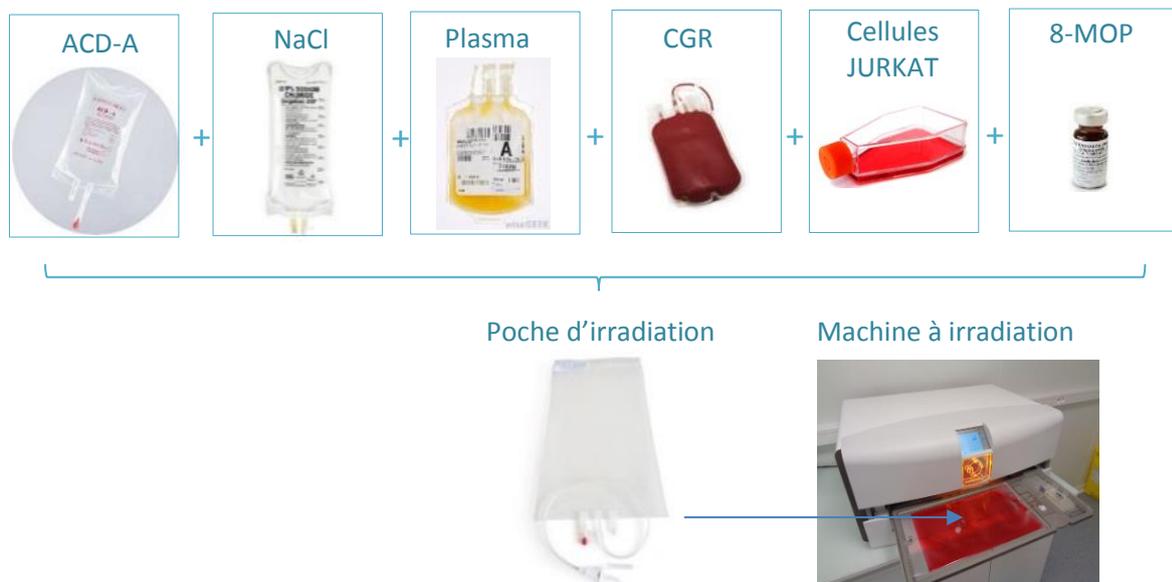


Figure 25 Composition de la poche d'irradiation pour le traitement PCE.

La première étape consiste à collecter les cellules après les avoir cultivées. Pour cela, on détermine par comptage cellulaire au Vi-cell (Beckman Coulter) le nombre de cellules par unité de volume (ml). Pour chaque expérience, plusieurs poches d'irradiation sont donc préparées en parallèle pour pouvoir comparer plusieurs conditions. Pour les poches où les cellules sont traitées, on a fixé arbitrairement un nombre de 300 millions de cellules par poche et 100 millions de cellules pour le contrôle (cellules non irradiées).

On ajoute aux cellules, la solution d'ACD-A et un certain volume de globules rouges pour atteindre le taux d'hématocrite souhaité en poche par rapport au taux d'hématocrite initial de la poche de concentré de globules rouges (CGR) provenant de l'EFS. La suspension cellulaire doit également être diluée dans une solution moitié NaCl à 0,9 % et moitié plasma (issue d'un mélange de plusieurs plasmas provenant de l'EFS).

Les calculs des différents volumes des solutions à ajouter se fait selon les formules suivantes :

$$\text{Volume de cellules JURKAT (ml)} = \frac{\text{Nombre de cellules souhaité (100 ou 300 millions)}}{\text{Concentration cellulaire (nombre cellules compté/ml)}}$$

$$\text{Volume de GR (ml)} = \frac{\text{Volume total de la poche} \times \text{Taux Ht souhaité}}{\text{Taux Ht poche de CGR}}$$

$$\text{Volume NaCl ou plasma} = \frac{\text{Volume}_{\text{poche totale}} - \text{Volume}_{\text{ACDA}} - \text{Volume}_{\text{GR}} - \text{Volume}_{\text{cellules}}}{2}$$

Un exemple de tableaux utilisés lors de la réalisation d'un essai où l'on a fait varier le taux d'hématocrite est donné ci-après avec les caractéristiques des cellules utilisées pour l'expérience et les calculs des volumes utilisés pour la préparation des poches d'irradiation (Tableau XVII).

Tableau XVII (A) Caractéristiques des cellules (JURKAT et CGR) utilisées pour une expérience. (B) Conditions expérimentales avec calculs des volumes à utiliser pour la préparation des poches d'un essai avec variation du taux d'hématocrite.

Caractéristiques des cellules utilisées pour l'expérience:

type de cellules	Passage	Numéro ampoule ou don	Groupe sanguin	Volume (ml)	ABX	Vicell		
					Hématocrite (%)	Viabilité	Nombre de cellules (x10 ⁶)/ml	Nombre de cellules (x10 ⁶) TOTAL
JURKAT	p26	43				97,9	32,77	1900,66
Concentré GR		69162703848	A+	292	57,4			

Conditions expérimentales:

Conditions		Nombre de cellules (x10 ⁶)	Volume cellules (ml)	8-MOP (ml)	NaCl (ml)	Plasma (ml)	ACD-A (ml)	Volume GR (ml)	Volume total (ml)	Hématocrite	Irradiation (2 J/cm ²)
Contrôle	4% Ht	100	3,05	0,50	11,4	11,4	2,1	2,09	30,5	4,0%	-
poche 1	1% Ht	300	9,15	5,00	132,3	132,3	21	5,23	305	1,0%	+
poche 2	2% Ht	300	9,15	5,00	129,7	129,7	21	10,45	305	2,0%	+
poche 3	4% Ht	300	9,15	5,00	124,5	124,5	21	20,91	305	4,0%	+
poche 4	>5% Ht	300	9,15	5,00	119,2	119,2	21	31,36	305	6,0%	+

A l'issue de la préparation des poches, un échantillon est prélevé dans la poche d'irradiation pour vérifier que le taux d'hématocrite et la quantité de JURKAT correspondent aux conditions souhaitées. Le contrôle du taux d'hématocrite se fait au moyen d'un automate d'hématologie cellulaire (ABX MicroES601) qui fournit la numération de la formule sanguine (NFS). La solution de 8-MOP (20 µg/ml, Macopharma) est alors injectée à l'abri de la lumière et la poche est placée dans la machine à irradiation UVA tout en agitant la poche.

3.2.3 Isolement des cellules JURKAT

A l'issue de l'étape d'irradiation, l'objectif est de récupérer un maximum de cellules JURKAT de la poche tout en ayant une faible contamination par les globules rouges pour mettre les cellules T en culture. Pour cela, on réalise une séparation des composants par gradient de densité en utilisant une solution de Ficoll (GE Healthcare), polymère dont la densité est égale à 1,077. Grâce à la différence de densités des éléments figurés du sang, la séparation peut se faire comme schématisée ci-dessous (Figure 26). Le plasma, les lymphocytes, les monocytes et les plaquettes ont une densité inférieure à 1,077 et se retrouvent donc au-dessus du milieu Ficoll, tandis que les globules rouges et les granulocytes ont une densité supérieure à 1,077, ce qui les fait sédimenter au fond du tube. Les cellules mononucléées (JURKAT) se situent à l'interface plasma-Ficoll sous la forme d'un anneau opalescent.

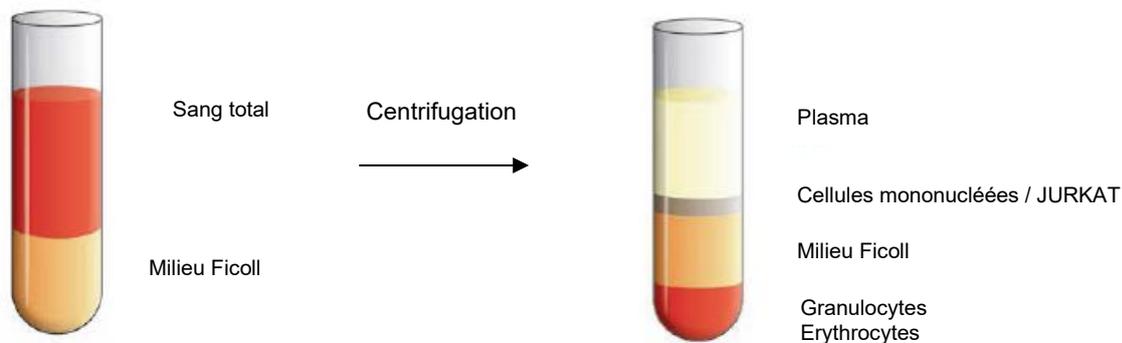


Figure 26 Schéma des différentes phases contenant les composants du sang et les JURKAT après centrifugation sur Ficoll (GE Healthcare).

Les JURKAT sont collectées dans 4 tubes de centrifugation de 50 ml contenant 15ml de Ficoll pour obtenir la quantité de cellules souhaitée. Après isolement des JURKAT, trois lavages sont réalisés afin d'éliminer la solution de Ficoll qui est toxique pour les cellules. Les deux premiers sont réalisés dans une solution de PBS (Lonza) avec 2 mM d'EDTA (Thermo Fisher) et le troisième dans une solution de PBS. Les cellules sont ensuite suspendues dans du milieu RPMI supplémenté et sont comptées aux Vi-cell et à l'ABX afin d'estimer le nombre de JURKAT qui ont pu être isolées et d'évaluer la quantité de globules rouges résiduelle.

3.2.4 Mise en culture des cellules JURKAT isolées

Pour suivre les paramètres d'intérêts à la suite du traitement PCE (inhibition de la prolifération et apoptose des JURKAT), les cellules sont mises en culture. Pour cela, 5.10^6 de cellules traitées sontensemencées dans un volume de 10 ml de milieu de culture dans des flacons de culture de 25 cm² soit à une densité cellulaire de $0,5.10^6$ cellules/ml. Comme les cellules après avoir subi le traitement PCE entrent en apoptose, on augmente la densité cellulaire. Chaque condition est préparée en double pour chacun des jours étudiés.

Les cellules non irradiées sont utilisées comme contrôle. La forte capacité de prolifération des JURKAT implique des conditions de culture différentes par rapport aux cellules traitées. Pour cela, du milieu de culture est ajouté au fil des jours comme indiqué dans le Tableau XVIII. L'objectif est de maintenir la densité cellulaire à $0,2.10^6$ cellules/ml.

Tableau XVIII Conditions de culture du contrôle (cellules non irradiées) à partir de J+1 jusque J+4

Jours	Conditions de culture
J+1	Culture de 5.10^6 de cellules en flasque de 75 cm ² avec volume initial de 25 ml.
J+2	Ajout de 25 ml de milieu de culture (Vf= 50 ml).
J+3	Passage en Cellstack de 636 cm ² + Ajout de 100 ml de milieu de culture (Vf= 150 ml).
J+4	Ajout de 100 ml de milieu de culture (Vf=250 ml).

Vf : Volume final

3.2.5 Mesure de la prolifération cellulaire

La population initiale des JURKATensemencée est de 5.10^6 cellules par flacon. Le nombre de cellules par flacon est ensuite compté à J+3, J+4 et J+7 au Vi-cell. Pour cela, le milieu de culture contenant les cellules est centrifugé à 1500 rpm pendant 5 minutes et le culot est suspendu dans du milieu de culture RPMI supplémenté. Selon la densité cellulaire, une dilution au 1/10ème dans du PBS peut être effectuée pour le comptage.

3.2.6 Mesure de l'apoptose

L'étude de la mort cellulaire programmée également appelée apoptose est mise en évidence à l'aide d'un double marquage des cellules à l'annexine-V couplée à un fluorophore, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), et à l'iodure de propidium (IP). L'analyse des cellules marquées s'effectue par cytométrie en flux (CMF).

L'annexine-V est une protéine qui présente une forte affinité pour des protéines membranaires, des cellules appelées phosphatidylsérines (PS). Lorsque la cellule est viable, les PS membranaires se situent du côté intracellulaire ce qui empêche la fixation de l'annexine-V. Dès que la cellule entre en apoptose, ces protéines s'externalisent, et

s'expriment de part et d'autre de la membrane plasmique. Les cellules apoptotiques sont donc marquées positivement par l'annexine-V. L'utilisation conjointe de l'IP qui est un agent intercalant de l'ADN permet de détecter les cellules en apoptose tardive et en nécrose. En effet, l'intégrité de la membrane est perturbée chez une cellule en apoptose tardive, tandis que la nécrose des cellules s'accompagne de la perte d'intégrité de la membrane. Cela permet à l'IP de pénétrer dans la cellule et de s'intercaler à l'ADN. Ce double marquage permet de distinguer les cellules en fonction de leur état de viabilité. Le principe du double marquage est donné dans le schéma ci-après (Dojindo) (Figure 27).

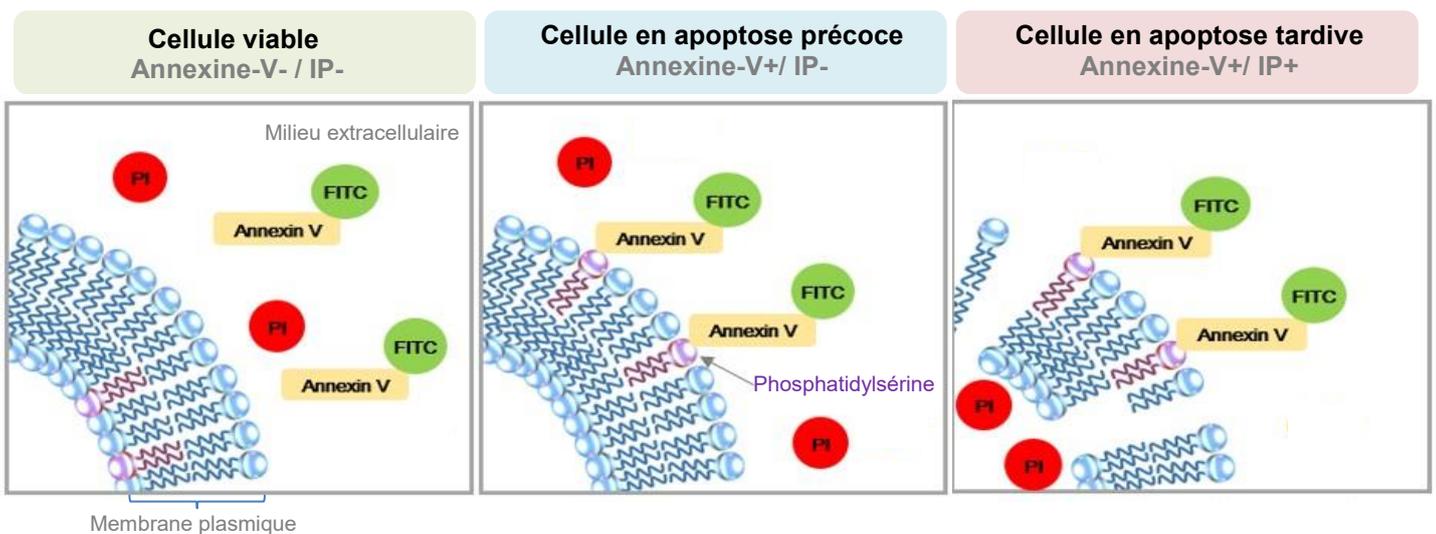


Figure 27 Principe du double marquage à l'annexine-V/FITC et à l'iodure de propidium (PI) en fonction de l'état de viabilité cellulaire (Dojindo).

La mesure de l'apoptose est réalisée à l'aide du kit de détection FITC *Annexin-V Apoptosis II* (BD Pharmigen) en suivant les recommandations du fabricant. Les cellules subissent deux lavages. Pour cela, elles sont centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes puis le surnageant est retiré, tandis que le culot est resuspendu dans du PBS. Cette opération de lavage est répétée une seconde fois. Une étape de comptage cellulaire au Vi-cell permet d'isoler 1.10^6 cellules/ml dans un tube de 5 ml. Après centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes, les cellules sont suspendues dans 1 ml de Binding Buffer 1X du kit. A partir de cette suspension cellulaire, 100 μ l sont prélevés auxquels sont ajoutés 5 μ l d'annexine-V couplée FITC et 5 μ l de IP, une étape d'incubation de 15 minutes est alors réalisée à l'obscurité et à température ambiante. Puis, 400 μ l de Binding Buffer 1X sont ajoutés avant d'analyser la suspension cellulaire au cytomètre en flux (BD, AccuriC6).

3.3 METHODES ANALYTIQUES MISES EN ŒUVRE

Les méthodes analytiques qui nous ont permis de mesurer l'influence des paramètres d'intérêt (% inhibition de la prolifération cellulaire et % cellules apoptotiques) sont décrites ci-après.

3.3.1 Analyse de l'inhibition de la prolifération cellulaire

Le nombre total de cellules est compté pour chaque échantillon et chaque jour. La population initiale est de 5.10^6 cellules par flacon de culture. A partir du comptage cellulaire, les paramètres suivants sont déterminés pour un jour donné (J_x):

- le **taux de prolifération cellulaire** calculé par rapport à la population initiale ;
- le **pourcentage de prolifération cellulaire** ;
- le **pourcentage d'inhibition cellulaire** qui est l'un des paramètres sur lequel nous sommes basés dans nos expériences pour évaluer l'efficacité *in vitro* du traitement par PCE.

Les paramètres étudiés sont calculés selon les formules suivantes :

$$\text{Taux de prolifération cellulaire}_{(J_x)} = \frac{\text{Nombre de cellules de l'échantillon}_{(J_x)}}{\text{Nombre de cellulesensemencées}_{(J_0)}}$$

$$\% \text{ Prolifération cellulaire}_{(J_x)} = \frac{\text{Taux de prolifération de l'échantillon}_{(J_x)}}{\text{Taux de prolifération du contrôle}_{(J_x)}} \times 100$$

$$\% \text{ Inhibition de la prolifération cellulaire}_{(J_x)} = 100 - \% \text{ Prolifération cellulaire}_{(J_x)}$$

3.3.2 Analyse de l'apoptose

La **cytométrie en flux** (CMF) est une technique qui permet d'analyser les caractéristiques physiques et biologiques de chaque cellule et donc de différencier les populations cellulaires. L'analyse morphologique des cellules par CMF permet de distinguer des populations cellulaires selon deux paramètres, la granularité (en abscisse) et la taille (en ordonnée), qui sont dépendants de l'état de viabilité de la cellule (Figure 28). Par exemple, lorsqu'une cellule est apoptotique, sa taille rétrécit alors qu'une cellule nécrotique s'élargit et sa taille augmente.

Après analyse des cellules au CMF, on obtient un diagramme en nuage de points où chaque point correspond à une cellule. Les zones denses et homogènes correspondent à une population, ces zones peuvent ensuite être délimitées par le logiciel BD AccuriC6. Cela permet d'identifier et d'analyser la population cellulaire souhaitée.

Pour l'étude des JURKAT, la **population est identifiée à partir d'un échantillon de cellules non traitées** représenté sur la Figure 28.A On a délimité une région P2 où se trouve l'ensemble des JURKAT dans laquelle on peut observer une zone dense qu'on a également délimité et qui correspond aux JURKAT viables (région P1). En dehors de la région P2, au niveau de l'origine de l'intersection des deux axes, on observe soit des débris cellulaires, soit des globules rouges.

Un second exemple est donné pour l'identification des sous-populations présentes dans un buffy coat ou concentré leuco-plaquettaire avec les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) comprenant des lymphocytes, des monocytes et des globules rouges (Figure 28.B).

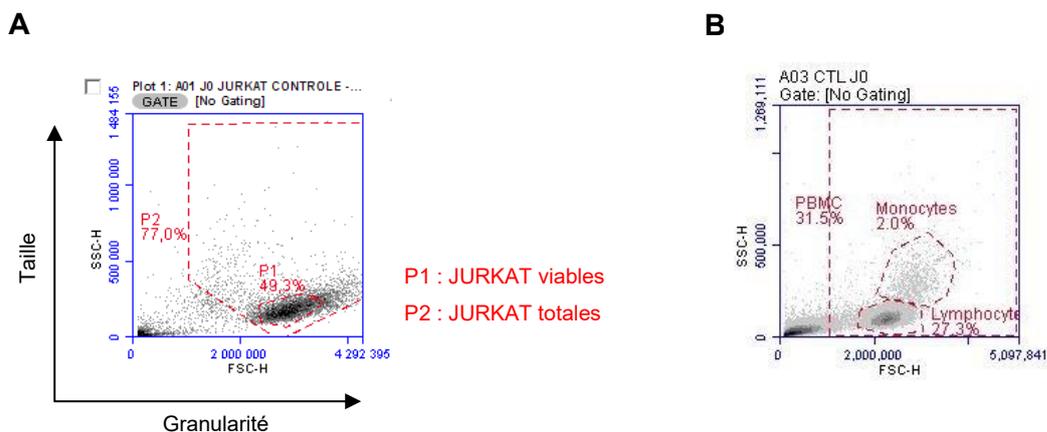


Figure 28 (A) Exemple de diagramme pour identifier la population de JURKAT selon la taille et la granularité. (B) Exemple de diagramme pour identifier les sous-populations cellulaires (monocytes, lymphocytes, globules rouges) présentés dans un buffy coat.

Après avoir identifié la population d'intérêt, les échantillons avec les cellules traitées peuvent être analysés par CMF.

On obtient un premier diagramme monoparamétrique qui représente le nombre de cellules (en ordonnée) en fonction de l'intensité de la fluorescence (en abscisse). Ici, deux signaux de fluorescence sont étudiés : l'annexine-V et l'IP, les diagrammes correspondants sont représentés ci-dessous (Figure 29 A et B). Pour chacun des diagrammes, on observe un pic

de fluorescence, une barre est placée pour délimiter la population fluorescente marquée positive.

Un second diagramme dit biparamétrique représente les deux signaux de fluorescence l'un par rapport à l'autre, ici l'IP est en ordonnée et l'annexine-V est en abscisse (Figure 29.C). Les deux barres de positivité de fluorescence obtenues sur les diagrammes A et B sont projetées sur le diagramme C.

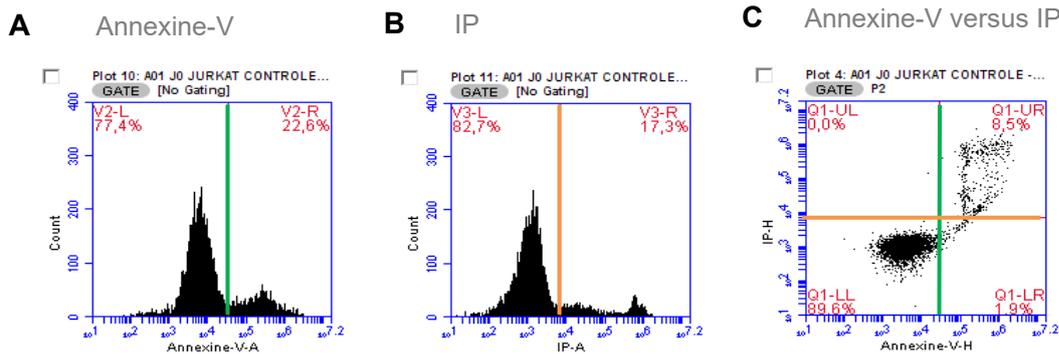


Figure 29 Diagrammes du nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence de (A) l'Annexine-V et de (B) l'IP. (C) Diagramme de l'intensité du signal de l'IP en fonction de l'intensité du signal de l'Annexine-V.

Le diagramme final obtenu, illustré Figure 30, se divise en quatre quadrants où se répartissent les sous-populations cellulaires en fonction de leur état de viabilité (viables, apoptotiques, nécrotiques) donné par le double marquage à l'annexine-V et à l'IP.

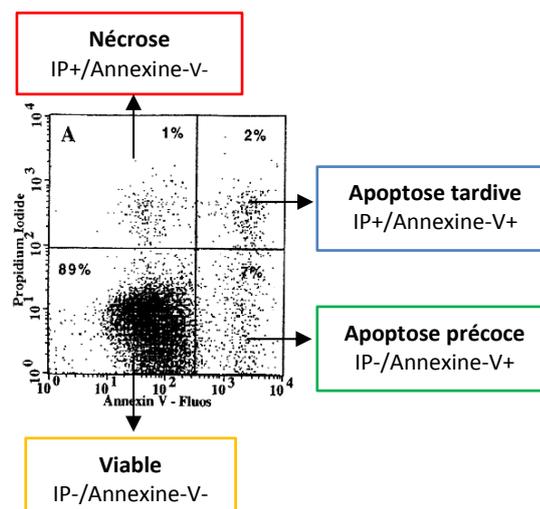


Figure 30 Diagramme de la répartition des JURKAT au CMF après marquage des cellules à l'annexine-V/FITC et à l'IP en fonction de leur état de viabilité (Wolnicka -Glubisz et al. 2002).

En plus de l'analyse du pourcentage de cellules apoptotiques, on calcule le **paramètre Δ apoptose** qui donne la différence entre le nombre de cellules apoptotiques traitées et le nombre de cellules apoptotiques non traitées à un jour donné. Il représente donc la variation du taux d'apoptose par rapport au contrôle journalier pour chaque condition étudiée. Il se calcule selon la formule suivante pour un jour donné (J_x):

$$\Delta \text{ Apoptose }_{J_x} = (\% \text{ cellules traitées marquées Annexine V}^+)_{J_x} - (\% \text{ cellules non traitées marquées Annexine V}^+)_{J_x}$$

3.3.3 Analyse statistique

Une étude statistique a été menée pour chaque essai sur 3 expériences indépendantes dont les échantillons ont été traités en double. Cette analyse statistique a été effectuée sur les jours où les critères de performances sont placés, c'est-à-dire à J+3 pour l'analyse de l'inhibition de la prolifération et à J+1 pour l'analyse de l'apoptose. Pour une interprétation statistique optimale, il est recommandé d'avoir un effectif de 30 (COFRAC, 2012). Cependant, nous avons choisi de limiter le nombre d'expériences à 3 par essais pour qu'ils puissent être faits sur une période de temps réalisable. Un test statistique ANOVA à 1 facteur peut être utilisé sur 3 échantillons indépendants comme dans notre cas, et il a été fait à l'aide du logiciel R.

Lorsque le résultat du test statistique présente une valeur critique p inférieur à 0,05 alors la différence observée est considérée comme significative. Ainsi, la différence est d'autant plus significative que la valeur critique est faible. On utilise les indications suivantes sur les figures :

- ns : non significatif
- * p<0,05
- ** p<0,01
- *** p<0,001

Les résultats obtenus pour les différents essais de l'étude de performances sont présentés dans la partie suivante.

4 RESULTATS

Les performances de la PCE ont été évaluées en étudiant l'influence des deux paramètres suivants, la concentration en 8-MOP et le taux d'hématocrite. Les résultats sont développés dans cette partie.

4.1 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN 8-MOP

Pour étudier les effets biologiques induits par la variation de la concentration en 8-MOP, l'expérience a été réalisée 3 fois pour obtenir $n=3$. Pour cela, 3.10^8 de cellules JURKAT ont été traitées pour chaque condition en présence de 2% d'hématocrite et avec une dose d'irradiation de 2 J/cm^2 . Le contrôle correspond à 1.10^8 JURKAT non traitées en présence de 2% d'hématocrite.

Le seul paramètre qui varie dans ces essais est la concentration en 8-MOP. Deux concentrations sont testées, 200 et 333 ng/ml, correspondant à des volumes respectifs de 3 et 5 ml injectés dans la poche de 300 ml. Une condition sans 8-MOP a été ajoutée pour observer l'effet de l'irradiation UVA seule. Un récapitulatif de l'essai est donné ci-après.

Paramètres	Conditions (n=3)
Quantité de cellules	3.10^8 , (contrôle : 1.10^8)
Taux d'hématocrite	2%
Dose irradiation UVA	2 J/cm^2
Concentration 8-MOP	0, 200, 333 ng/ml

4.1.1 Etude de l'inhibition de la prolifération des JURKAT

Les résultats des taux de prolifération des JURKAT par rapport à la population initiale ainsi que les pourcentages d'inhibition de la prolifération des cellules JURKAT traitées et non traitées (contrôle) sont présentés en Figure 31 A et B.

Les résultats sont donnés à partir de J+3 car c'est à partir de cette durée que le pourcentage de prolifération des cellules indique l'efficacité *in vitro* du traitement par PCE. Les résultats bruts sont donnés en Annexe 5.

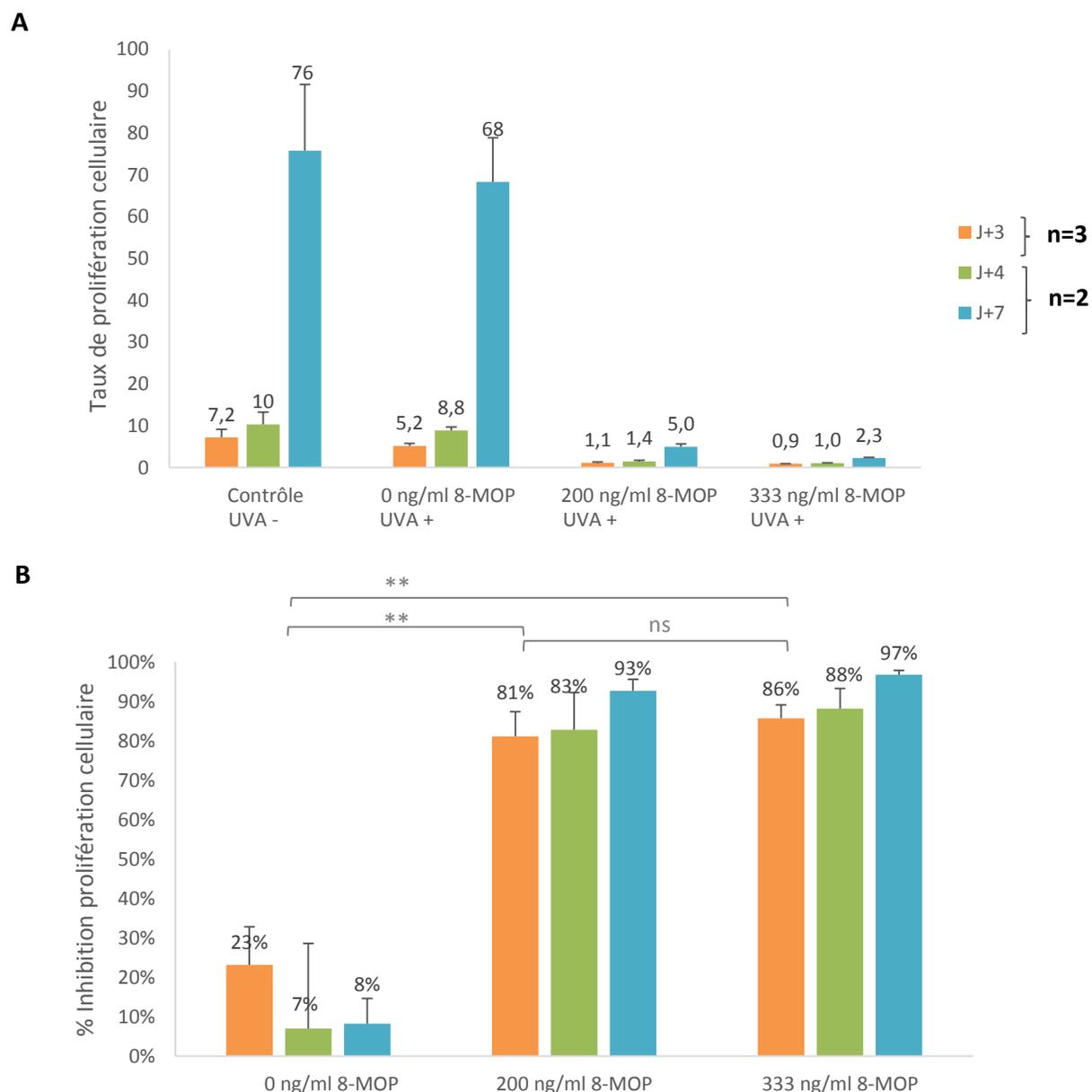


Figure 31 (A) Comparaison du taux de prolifération des JURKAT sans (contrôle) et avec irradiation UVA pour les différentes concentrations de 8-MOP. (B) Comparaison du pourcentage d'inhibition de la prolifération des JURKAT.

D'après la Figure 31.A, au niveau du contrôle, on observe une augmentation progressive du nombre de cellules entre J+3 et J+4 avec une population cellulaire multipliée par 10, suivi d'un pic à J+7 avec une population cellulaire multipliée par 76. En absence de 8-MOP, la cinétique de prolifération des JURKAT est similaire au contrôle avec une population cellulaire multipliée par 68 après 7 jours de culture. Sous l'effet de 200 ng/ml de 8-MOP et de l'irradiation UVA, la population de JURKAT est multipliée par 5 après 7 jours de culture. Tandis qu'à la concentration de 8-MOP la plus élevée de 333 ng/ml, la prolifération cellulaire

reste stable jusqu'à 4 jours de culture, puis une légère augmentation s'observe à J+7 avec une population multipliée par 2.

D'après la Figure 31.B, lorsque les cellules sont uniquement irradiées (concentration de 8-MOP à 0 ng/ml), leur prolifération n'est que légèrement inhibée pour atteindre 8% d'inhibition après 7 jours de culture. En présence de 200 et 333 ng/ml de 8-MOP, le même profil cinétique est observé de J+3 à J+7.

D'après l'analyse statistique (cf. Annexe 9), aucune différence significative ($p > 0,05$) à J+3 n'a été mise en évidence entre les deux concentrations de 8-MOP testées. En revanche, l'inhibition de la prolifération cellulaire est significativement différente entre les échantillons irradiés sans et avec 8-MOP. Cela confirme le rôle déterminant du 8-MOP pour induire l'inhibition de la prolifération cellulaire quelle que soit la concentration de 8-MOP utilisée (200 ou 333 ng/ml).

4.1.2 Etude de l'apoptose des JURKAT

L'étude du pourcentage de cellules apoptotiques a été suivi par CMF jusqu'à 3 jours après le traitement des cellules par PCE.

Un exemple de répartition des JURKAT obtenu à J+1 au CMF est présenté ci-dessous pour les différentes conditions testées (Figure 32). Au cours de ces essais le pourcentage de cellules nécrotiques ne dépasse pas les 1% sauf à J+2 où cela concerne 2% des cellules avec 333 ng/ml de 8-MOP (résultats brut en Annexe 6).

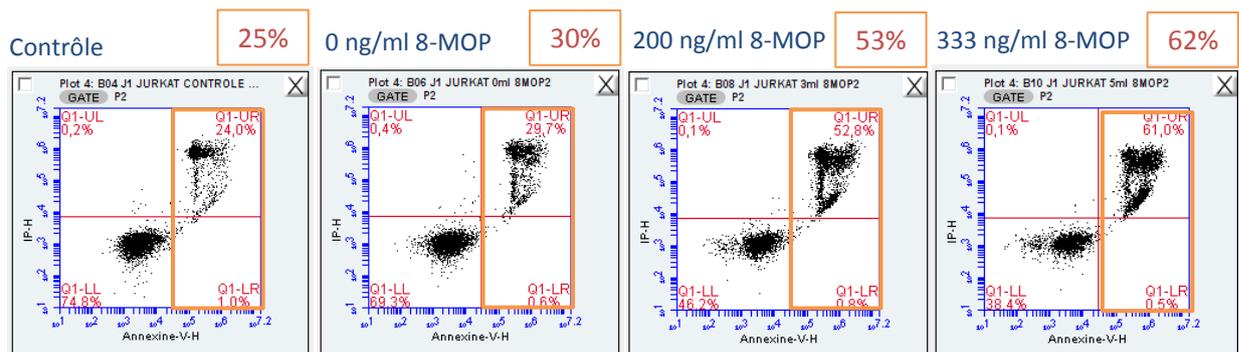


Figure 32 Résultats de la répartition des cellules JURKAT au CMF après marquage Annexine-V/ IP pour un échantillon d'une expérience à J+1 après traitement PCE. Le quadrant droit (orange) représente le pourcentage de cellules apoptotiques dont la valeur est indiquée en rouge. Le quadrant supérieur gauche représente le pourcentage de cellules en nécrose ($\leq 0,4\%$).

A partir des pourcentages de cellules apoptotiques mesurés pour des cellules traitées et non traitées (contrôle), on calcule la proportion de cellules qui entrent en apoptose suite au traitement PCE, le Δ apoptose est alors déterminé.

Les résultats des pourcentages d'apoptose obtenus pour les cellules non traitées (contrôle) et les cellules traitées par irradiations UVA avec les différentes concentrations de 8-MOP est présentée sur la Figure 33.A. La comparaison des pourcentages de Δ apoptose est ensuite donnée dans la Figure 33.B. L'ensemble des résultats bruts relatifs à l'apoptose est donné en Annexe 6.

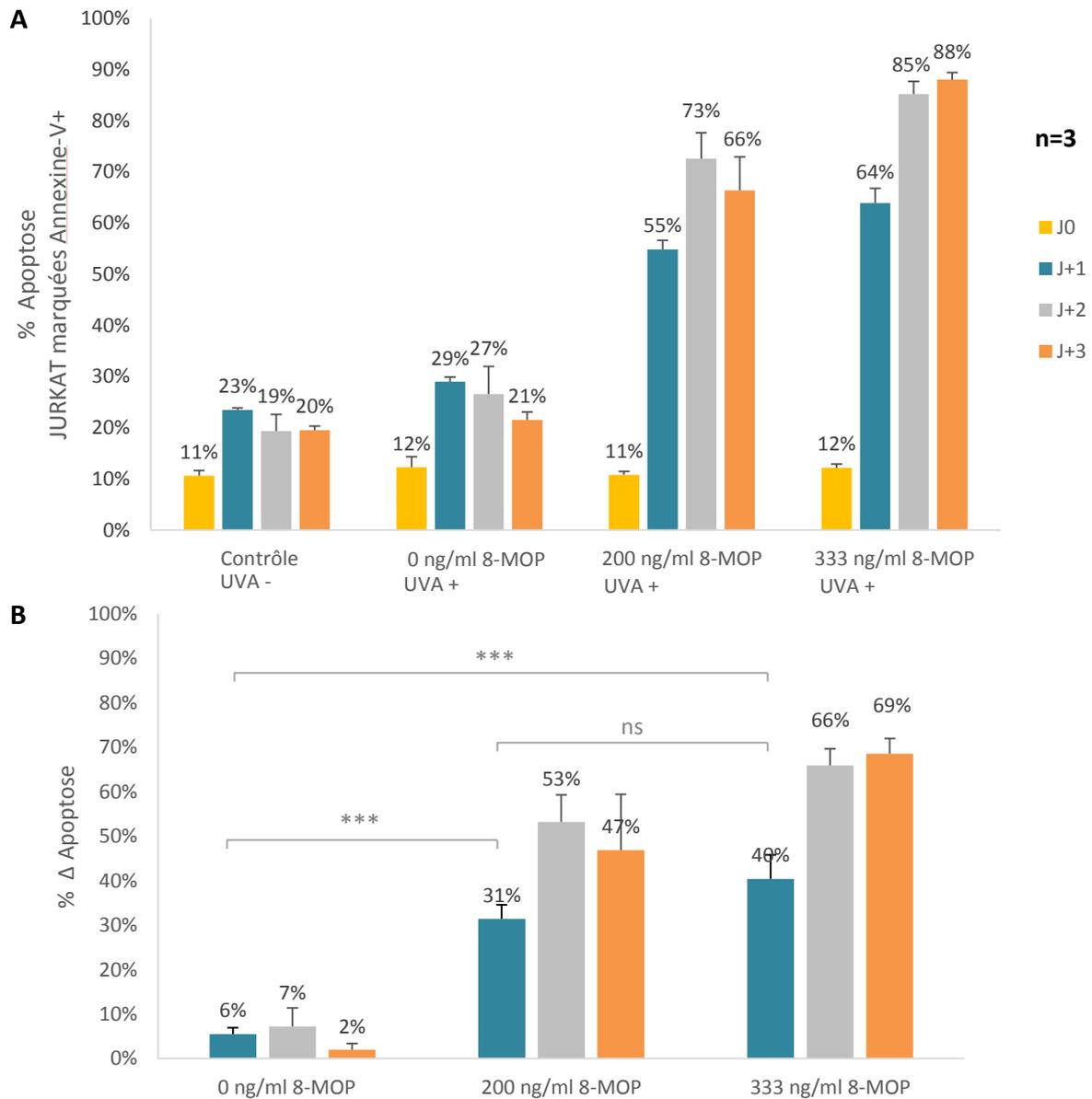


Figure 33 (A) Comparaison du pourcentage d'apoptose moyen des JURKAT marquées Annexine-V+ sans (contrôle) avec irradiation UVA pour les différentes concentrations de 8-MOP. (B) Comparaison du Δ apoptose des JURKAT. Les valeurs significatives sont marquées par un astérisque.

D'après la Figure 33.A, le pourcentage d'apoptose de base est à hauteur de 11%, il est faible. Au niveau du contrôle, on observe une augmentation de la mort cellulaire à J+1, avec un taux d'apoptose qui double pour atteindre 23%. Ce taux plus élevé peut s'expliquer par le

stress causé aux cellules lors de la manipulation le jour précédent. Les taux d'apoptose sont ensuite plus faibles et stables de J+2 à J+3 autour de 20%.

Lorsque les cellules sont uniquement irradiées (concentration de 8-MOP à 0 ng/ml), le profil cinétique d'apoptose des cellules est similaire à celui du contrôle pour tous les jours mesurés avec des taux d'apoptose légèrement supérieurs. Cela indique que l'irradiation UVA à 2 J/cm² seule induit faiblement la mort cellulaire des JURKAT.

En revanche, lorsque les cellules sont irradiées en présence de 200 ou 333 ng/ml de 8-MOP le pourcentage d'apoptose des cellules augmente fortement. On peut observer à partir de J+1 jusque J+3, que les taux d'apoptose obtenus avec 200 ng/ml sont inférieurs à ceux avec 333 ng/ml. En effet, à J+1 avec 200 ng/ml de 8-MOP, le taux d'apoptose atteint 55% tandis qu'avec 333 ng/ml il augmente jusqu'à 64%. A J+2, sous l'effet de 200 ng/ml, le taux d'apoptose augmente avec 73% et diminue à J+3 en passant à 66%. Sous l'effet de 333 ng/ml, le taux d'apoptose augmente progressivement de J+2 à J+3 et atteint en moyenne 88%.

Sur la Figure 33.B, on a comparé les pourcentages de Δ apoptose des cellules. On observe que le Δ apoptose des cellules uniquement irradiés est très faibles de J+1 jusque J+3. Tandis que le Δ apoptose des cellules traitées augmente avec la concentration en 8-MOP dès J+1 après traitement par PCE. L'utilisation de 200 ou 333 ng/ml de 8-MOP est équivalente à J+1 ($p > 0,05$) (cf. Annexe 9, analyse statistique). En revanche, les différences observées entre les cellules irradiées sans ou avec l'une des deux concentrations de 8-MOP sont significatives à J+1 ($p < 0,001$).

Si on compare nos résultats au critère défini par Taverna et al., (2015), qui mentionne qu'un Δ apoptose supérieur à 15% à J+1 indique une efficacité du traitement alors les deux concentrations de 8-MOP testées sont efficaces. En effet, les Δ apoptose à J+1 pour les concentrations de 200 et 333 ng/ml de 8-MOP sont respectivement de 31% et 40%.

De plus, lors de l'évaluation du taux d'apoptose des cellules, il est important de distinguer les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques. En effet, la PCE doit induire l'apoptose pour obtenir les effets escomptés et non la nécrose. Une étude publiée par Radwanski et al., (2015), rapporte un taux de cellules en nécrose inférieur à 1% pour des CMN traitées par PCE avec 200 ng/ml de 8-MOP et 1 J/cm² d'UVA. Suite à la répétition de nos expériences, nous avons observés de faibles pourcentages de cellules en nécroses, inférieurs à 1%, sauf pour une condition avec 2% de nécrose ce qui est négligeable (Annexe 6).

4.2 INFLUENCE DU TAUX D'HEMATOCRITE

Trois expériences ont été répétées pour étudier les performances biologiques de la PCE en faisant varier seulement le taux d'hématocrite. Pour cela, 3.10^8 de cellules JURKAT ont été traitées avec des taux d'hématocrite de 1%, 2%, 4% et >5% en présence de 333 ng/ml de 8-MOP et avec une dose d'irradiation de 2 J/cm².

Le contrôle correspond aux JURKAT non traitées en présence de 4% d'hématocrite et non >5%. En effet, lors de la première expérience, un taux d'hématocrite supérieur à 5% a été atteint alors qu'initialement le taux de 4% était prévu. La suite des expériences a été réalisée en ajoutant une condition avec un taux d'hématocrite >5% pour déterminer à partir de quel taux d'hématocrite les performances du système sont limitées. Un récapitulatif de l'essai est donné ci-après :

Paramètres	Conditions (n=3)
Quantité de cellules	3.10^8 , (contrôle : 1.10^8)
Taux d'hématocrite	1%, 2%, 4%, >5%
Dose irradiation UVA	2 J/cm ²
Concentration 8-MOP	333 ng/ml

4.2.1 Etude de l'inhibition de la prolifération des JURKAT

Les résultats du taux de prolifération des JURKAT par rapport à la population initiale ainsi que les pourcentages d'inhibition de la prolifération des cellules JURKAT traitées et non traitées (contrôle) sont présentés en Figure 34 A et B.

Comme précédemment, les résultats de ces deux paramètres sont donnés à partir de J+3 puisque c'est à partir de cette durée que le pourcentage de prolifération des cellules indique l'efficacité *in vitro* du traitement par PCE. Les résultats bruts associés à cet essai sont présentés en Annexe 7.

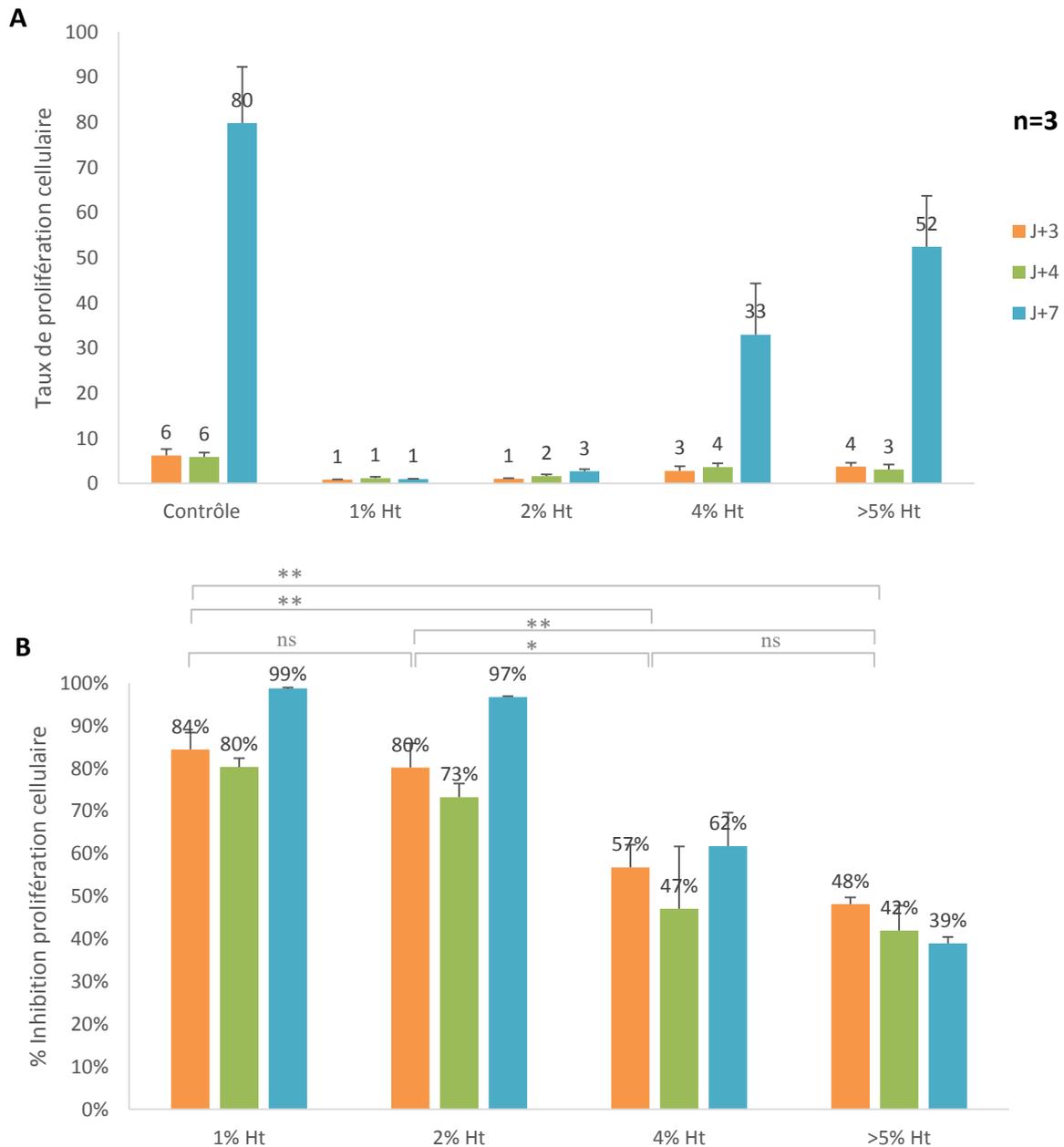


Figure 34 (A) Comparaison du taux de prolifération des JURKAT sans (contrôle) et avec irradiation UVA pour les différents taux d'hématocrite. (B) Comparaison du pourcentage d'inhibition de la prolifération des JURKAT.

D'après la Figure 34.A, on observe que le nombre de cellules non traitées (contrôle) augmente progressivement après traitement jusque J+4 avec une population cellulaire multipliée par 6. Après 7 jours de culture, la population des JURKAT augmente fortement avec un pic de croissance et une population cellulaire multipliée par 80.

Au niveau des conditions où le taux d'hématocrite varie, le taux de prolifération cellulaire est d'autant plus élevé que le taux d'hématocrite est élevé. Ainsi, pour les taux d'hématocrite les

plus faibles (1% et 2%), le nombre de cellules reste stable entre J+3 et J+7, avec une légère augmentation pour 2% d'hématocrite à J+7. En revanche, lorsque les taux d'hématocrite sont élevés (4% et >5%), le nombre de cellules est multiplié par 3 à J+3 et il augmente de façon marquée à J+7 avec des facteurs de multiplication respectifs de 33 et 52.

Concernant le pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire (Figure 34.B), le taux d'hématocrite dans la poche d'irradiation influence directement l'inhibition de la prolifération des JURKAT. Le profil cinétique obtenu en présence des faibles taux d'hématocrite à 1% et 2% est similaire pour l'ensemble des jours mesurés où la population cellulaire est inhibée autour de 80% à J+3. Le pourcentage d'inhibition de la prolifération diminue dès que le taux d'hématocrite augmente à 4%, avec 57 % à J+3 et davantage avec un taux d'hématocrite >5% avec 48%. D'après l'analyse statistique, les pourcentages d'inhibition de la prolifération à J+3, pour 1% et 2% d'hématocrite sont significativement supérieurs à ceux obtenus pour les taux d'hématocrite de 4% et >5% ($p < 0,01$). Cependant, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre 1% et 2% d'hématocrite, de même qu'entre 4% et >5% ($p > 0,05$) (cf. Annexe 9).

4.2.2 Etude de l'apoptose

L'étude du pourcentage de cellules apoptotiques a été suivi par CMF jusqu'à 3 jours après le traitement des cellules par PCE.

Un exemple de la répartition des cellules obtenu à J+1 au CMF est présenté à la Figure 35. Les pourcentages d'apoptose (quadrant droit) sont indiqués pour chaque condition testée à J+3. On peut observer que la présence de cellules en nécrose est faible (quadrant supérieur gauche). Dans les expériences, le taux de cellules nécrotiques ne dépasse pas 1% sauf à J+2 avec 1% d'hématocrite et à J+3 avec 2% d'hématocrite avec des taux respectifs de 2,8 % et 2,0 % (Annexe 8).

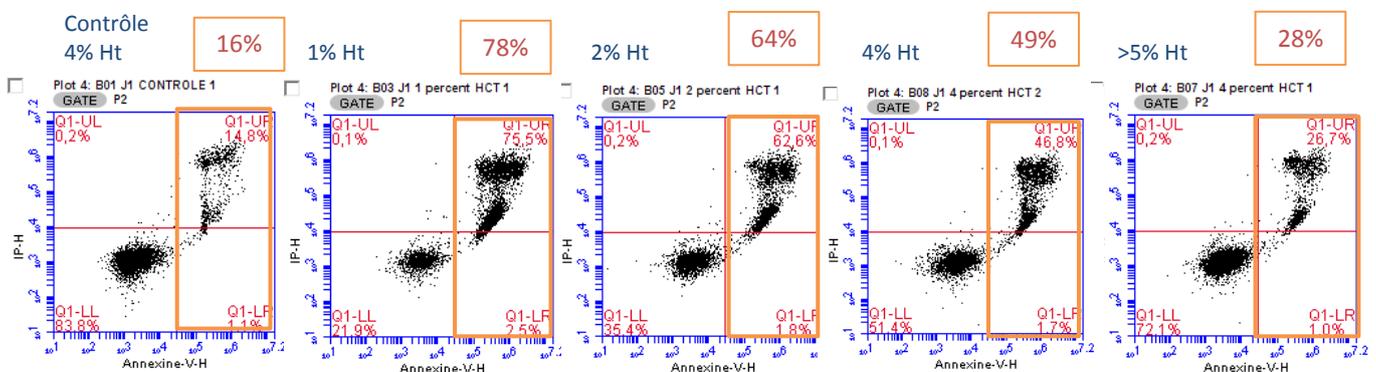


Figure 35 Résultats de la répartition des cellules JURKAT au CMF après marquage Annexine-V/IP pour un échantillon d'une expérience à J+1 après traitement PCE. Le quadrant droit (orange) représente le pourcentage de cellules en apoptose dont la valeur est indiquée en rouge. Le quadrant supérieur gauche donne le pourcentage de cellules en nécrose ($\leq 0,2\%$).

Les résultats des pourcentages d'apoptose obtenus pour les cellules non irradiées (contrôle) et les cellules irradiées aux UVA avec les différents taux d'hématocrite sont présentés sur la Figure 36.A. La comparaison des pourcentages de Δ apoptose est ensuite donnée dans la Figure 36.B. L'ensemble des résultats bruts relatifs à l'apoptose est donné en Annexe 8.

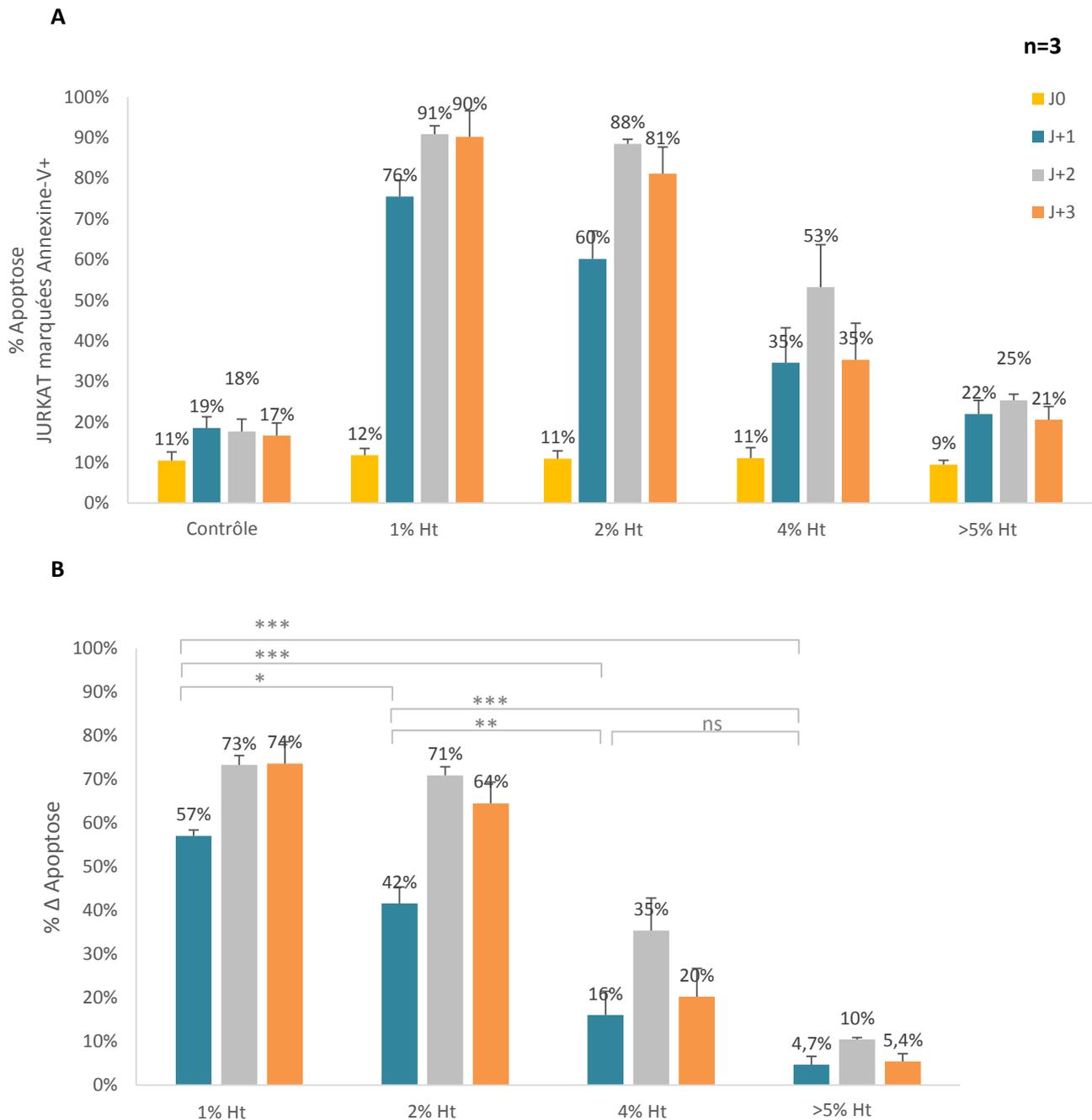


Figure 36 (A) Comparaison du taux d'apoptose moyen des JURKAT marquées Annexine-V+ pour les cellules sans (contrôle) et avec irradiation UVA pour les différents taux d'hématocrite. (B) Comparaison du Δ apoptose des JURKAT.

Le taux d'apoptose de base des JURKAT est faible et à hauteur de 11% (Figure 36.A). Au niveau du contrôle, on observe une augmentation de la mort cellulaire à J+1, avec un taux d'apoptose qui double. Ce taux élevé peut s'expliquer par le stress causé aux cellules lors de la manipulation le jour précédent. Les taux d'apoptose sont faibles et stables de J+2 à J+3 autour de 18%.

Lorsque les cellules sont traitées, on observe que le taux d'apoptose des cellules est d'autant plus élevé que le pourcentage d'hématocrite est faible. Le taux d'apoptose des cellules est inversement proportionnel au taux d'hématocrite.

Dès J+1, on observe une différence très marquée du taux d'apoptose en fonction du taux d'hématocrite. En effet, 1% d'hématocrite correspond au taux d'apoptose le plus élevé avec 76%, puis le taux diminue avec 2% d'hématocrite à 60%, et il diminue jusqu'à 35% avec 4% d'hématocrite. Enfin le taux d'apoptose le plus faible est obtenu en présence de plus de 5% d'hématocrite avec un taux d'apoptose à 22% qui reste stable jusque J+3. Sous l'effet de 1% et 2% d'hématocrite, on observe une augmentation progressive de la mort cellulaire entre J+1 et J+3 pour atteindre des taux d'apoptose respectifs de 91% et 88%. Le taux d'apoptose augmente légèrement avec 4% pour atteindre un taux d'apoptose maximum de 53%.

Concernant les résultats de Δ apoptose (Figure 36.B), si on se réfère au critère de validation, seules les conditions avec 1 et 2% d'hématocrite permettent d'obtenir un Δ d'apoptose supérieur à 15% à J+1 post traitement avec respectivement 57 et 42% (Taverna et al., 2015). Avec 4% d'hématocrite, on obtient un Δ d'apoptose de 16%, soit à la limite du critère de validation. Lorsque le taux d'hématocrite est supérieur à 5%, le Δ apoptose moyen est très faible avec 5%.

Les différences observées à J+1 entre les taux d'hématocrites faibles (1% et 2%) et les taux plus élevés (4% et >5%) sont significatives ($p < 0,001$) (Annexe 9). De même, que le Δ apoptose obtenu avec 1% d'hématocrite est significativement supérieur à celui obtenu avec 2% d'hématocrite ($p < 0,05$). En revanche, au-delà de 4% d'hématocrite, les résultats ne sont plus significativement différents.

Suite à la répétition de nos expériences, nous avons également observés de faibles pourcentages de cellules en nécroses, inférieurs à 1%, excepté dans trois conditions où 1,5% à 2,8% des cellules sont nécrotiques (Annexe 8).

5 DISCUSSION

Les objectifs de ces travaux expérimentaux ont été d'évaluer l'importance relative des paramètres susceptibles d'influencer les performances *in vitro* du système dissocié de la PCE développée par la société Macopharma : la concentration en 8-MOP, le taux d'hématocrite, la dose d'irradiation UVA, le volume de plasma ou encore la quantité de cellules à traiter. Ces travaux se sont limités à l'évaluation d'une part, de la concentration en 8-MOP et, d'autre part, du taux d'hématocrite. La démarche expérimentale a été de faire varier un seul paramètre à la fois en utilisant une lignée cellulaire de lymphocytes T humains, les JURKAT. Nous avons cherché à déterminer si ces paramètres avaient un effet significatif sur la performance de la technologie PCE de Macopharma.

Pour valider nos résultats nous nous sommes basés sur les critères de performance décrits dans la littérature et établis à partir de PBMC issus de patients. Ces critères de performance ou de validation précisent qu'à **J+3 après le traitement PCE, l'inhibition de la prolifération doit être supérieure à 70%** (ANSM, 2011; Jacob et al., 2003) et qu'à **J+1 après le traitement PCE, le Δ apoptose doit être supérieur à 15%** (Taverna et al., 2015).

D'après nos résultats, **le principal paramètre qui influence les performances du système est le taux d'hématocrite**. En effet, l'efficacité du traitement PCE *in vitro* dans nos conditions est directement liée au taux d'hématocrite : plus il est élevé, moins l'effet biologique de la PCE est grand. Une étude publiée par Becherucci et al., en 2016, mets en évidence la corrélation entre l'induction de la mort cellulaire des lymphocytes T après traitement PCE et le taux d'hématocrite du produit de leucaphérèse. Ces travaux sont basés sur des cellules traitées par PCE provenant de patients atteints de GVHD et sur des PBMC de donneurs sains. Le taux d'hématocrite devrait être inférieur à 1% pour assurer l'efficacité du traitement. D'après les recommandations émises par la HAS (2010), le taux d'hématocrite dans la poche d'irradiation ne doit pas dépasser 2%, sinon, le seuil de 70% d'inhibition de la prolifération n'est pas atteint, ce qui invalide la procédure PCE selon le critère recommandé.

Une **perspective très intéressante est la cryo-PCE** développée par Merlin et al., en 2011. **En effet, l'opération de congélation provoque la lyse des globules rouges ce qui réduit considérablement le taux d'hématocrite**. La cryo-PCE permettrait donc d'améliorer davantage les performances de la technologie.

Dans cette procédure, après le prélèvement des leucocytes du patient, le produit de leucaphérèse est divisé en 2 ou 3 fractions égales. L'une des fractions est alors traitée par

PCE et réinjectée au patient, tandis que les fractions restantes sont congelées et conservées à la banque de cellules pour une utilisation ultérieure. La cryo-PCE se base sur le même principe que la congélation des greffons de CSH, méthode où les cellules une fois collectées, sont traitées avec un cryoconservateur, puis congelées et stockées dans une banque de cellules.

Plusieurs avantages sont liés à la cryo-PCE. Tout d'abord, la cryoconservation des CMN avant l'irradiation des cellules n'altère pas les propriétés immunomodulatrices nécessaires à l'efficacité du traitement PCE (Merlin et al., 2011). Sur le plan clinique, cette procédure permet de **réduire le nombre d'opérations d'aphérèse** et donc d'**améliorer la qualité de vie du patient**.

La cryo-PCE a été plus particulièrement développée dans les CHU de Nancy et de Clermont-Ferrand (Pochon et al., 2016). Au CHU de Nancy, entre 2009 et 2015, la cryo-PCE a été testée comme traitement de 2^{ème} à 4^{ème} ligne sur 20 patients atteints de GVHD aiguë et chronique. Ces patients présentaient soit un abord veineux difficile, soit une infection bactérienne, soit un état général altéré, soit une cytopénie, ou encore un éloignement géographique de l'établissement de santé. Les résultats cliniques observés sont similaires à ceux décrits après un traitement PCE classique chez des patients en GVHD. L'intérêt de la cryo-PCE est donc de réussir à maintenir les séances de PCE tout en réduisant le nombre d'aphérèses. Ce qui permet de rendre plus acceptable cette thérapie, notamment en pédiatrie, où les opérations d'aphérèse sont plus difficiles à supporter physiquement et psychologiquement en raison des longues et fréquentes séances de PCE.

La **concentration en 8-MOP** est un paramètre essentiel pour obtenir les effets escomptés de la PCE. L'essai réalisé a eu pour but de comparer les deux concentrations de 8-MOP décrites dans la littérature sur l'efficacité *in vitro* du traitement PCE (HAS, 2010; Annexe 3). **D'après nos résultats, l'utilisation de 200 ou 333 ng/ml de 8-MOP fournit des résultats équivalents sur le plan biologique.** En termes d'inhibition de la prolifération à J+3 et en termes d'apoptose à J+1, ces deux concentrations induisent une réponse biologique conforme aux critères de performances définis précédemment.

Cette étude *in vitro* doit être poursuivie sur les JURKAT par l'évaluation des autres paramètres susceptibles d'influencer les performances de la technologie PCE en système dissocié.

Comme cité précédemment, **l'influence de la dose d'irradiation UVA** doit être étudiée. En effet, nous avons pu observer qu'un taux d'hématocrite élevé réduit les performances de la technologie. Il s'agit de déterminer si l'augmentation de la dose d'irradiation UVA peut compenser cette baisse de performance.

D'après la HAS, si le taux d'hématocrite est supérieur à 2%, la dose d'irradiation UVA doit être augmentée à 2,5 J/cm². Des expériences devront par exemple évaluer l'effet de l'augmentation progressive de la dose d'irradiation à 2,5, 3 et 4 J/cm², avec un taux d'hématocrite élevé, pour évaluer les performances de la PCE.

La **quantité de cellules à traiter** est un paramètre controversé. Actuellement, il n'a pas été établi clairement de relation entre la quantité de cellules à traiter et l'efficacité clinique du traitement. Par conséquent, cela complexifie la mesure *in vitro* de ce paramètre.

Le nombre de cellules collectées dépend de l'appareil d'aphérèse utilisé et du poids du patient. Pour la PCE en système dissocié, une comparaison des appareils d'aphérèse montre que le nombre de leucocytes collectés est compris entre 57.10⁸ et 66.10⁸, alors que dans la PCE en système fermé, il est plus faible, de l'ordre de 14.10⁸ cellules (Brosig et al., 2016). Malgré cette différence, l'efficacité clinique est similaire entre les deux types de procédures PCE (Magro, 2015).

Une étude publiée par Perseghin et al., en 2007, basée sur une analyse rétrospective des résultats cliniques de 25 patients en GVHDc suggère qu'une augmentation de la quantité de leucocyte traitée par kg, diminue le taux d'échec au traitement PCE.

Cependant, plusieurs études publiées montrent que des résultats cliniques satisfaisant peuvent être obtenus en traitant une faible quantité de leucocytes (Hackstein et al., 2009, 2014; Pochon et al., 2016). Pour cela, des patients atteints de GVHD ont reçu des mini traitements PCE où 2,2.10⁶ à 24,56.10⁶ leucocytes sont traités par séance (Hackstein et al., 2014). Ces mini procédures PCE se sont avérées efficaces notamment sur les patients en GVHDa. Cette méthode est moins invasive et permet de lever les contre-indications liées à l'aphérèse.

L'équipe de Brosig et al., propose une étude prospective randomisée pour examiner la corrélation entre la quantité de cellules collectées par leucaphérèse avec les différents appareils et la réponse clinique obtenue.

Le **volume de plasma** est également un paramètre à étudier. En effet, comme les globules rouges, le plasma absorbe les UVA mais dans une proportion plus faible (Lee and Garro, 1989). Or, le produit de leucaphérèse contient toujours une portion de plasma qui se trouve être plus ou moins riche en protéines. Ces protéines plasmatiques peuvent également

interagir avec le 8-MOP. Il convient d'évaluer si les performances de la PCE peuvent diminuer en fonction du volume de plasma du produit de leucaphérèse.

Nos résultats sont cohérents avec les critères de performances décrit dans la littérature ce qui nous permet de dire que les JURKAT représentent un bon modèle cellulaire pour l'étude biologique de la PCE. **Ces différents essais devront être reproduits sur les PBMC de donneurs sains pour représenter la variabilité cellulaire qui caractérise les produits de leucaphérèse.** Cela permettra de valider les performances du système sur un second modèle cellulaire.

Au cours de ces essais, un seul paramètre a varié. Cela nous a permis d'identifier les paramètres avec un effet significatif sur la performance de la PCE. Il est ensuite possible d'envisager de faire varier plusieurs paramètres en même temps pour mesurer la robustesse de la méthode (COFRAC, 2012). Cela correspond à la capacité d'une méthode à supporter sans conséquence de petites variations des paramètres internes à la méthode. Pour faire varier tous les paramètres en même temps, on peut utiliser la méthode par plans d'expériences basée sur la construction de matrices mathématiques. Les plans d'expériences ont l'avantage de réduire le nombre d'essais à réaliser et d'étudier les interactions des paramètres entre eux.

En termes de **contrôle qualité de la procédure PCE**, d'après nos résultats, **l'évaluation du pourcentage de Δ apoptose semble être un critère de performance pertinent.** En effet, ce critère donne la possibilité de déterminer l'efficacité de la méthode 24h après avoir réalisé le traitement. Ce qui est un gain de temps important par rapport aux 3 jours d'attentes nécessaires pour avoir les résultats de l'inhibition de la prolifération. De plus, la mise en place du test du Δ apoptose est moins contraignante par rapport à celle de l'évaluation de la prolifération lymphocytaire. La mesure du Δ apoptose s'affranchit de l'utilisation d'un agent mitogène et de la radioactivité. D'après les recommandations émises par la Société italienne d'hémaphérèse et de manipulation cellulaire (SIdEM) et le Groupe italien pour la transplantation de moelle osseuse (GITMO), la procédure de validation de la PCE devrait inclure le suivi de la mort cellulaire des lymphocytes par CMF jusqu'à 3 à 4 jours après traitement (Pierelli et al., 2013). On peut imaginer que dans la pratique future de la PCE, ce critère soit systématiquement réalisé en complément de l'évaluation du pourcentage d'inhibition de la prolifération.

Un meilleur contrôle qualité des procédures PCE permettrait d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients atteint de GVHD. En effet, **si l'efficacité biologique du traitement PCE est plus précise et confirmée 24h après le traitement** cela permettrait

une **meilleure identification des patients répondeurs au traitement**. Et, d'après des études publiées, la précocité de la mise en place du traitement influence l'efficacité de la PCE, que ce soit pour la GVHDa ou la GVHDc (Das-Gupta et al., 2014; Greinix et al., 2011).

Plusieurs interrogations demeurent sur l'efficacité de la PCE, en prophylaxie, et dans le traitement de première ligne de la GVHD comme le souligne la SFGM-TC (Magro, 2015).

Une étude prospective a été menée sur des patients à la suite d'une allogreffe de CSH pour évaluer l'efficacité de l'association de la PCE à l'étanercept, au tacrolimus et au mycophénolate mofétil en prophylaxie de la GVHD (Kitko et al., 2016). L'incidence de la GVHDc n'a pas été réduite avec cette stratégie. D'autres études prospectives sont nécessaires pour évaluer la PCE en prévention de la GVHD.

Par ailleurs, un protocole d'essai clinique est envisagé par le CHU de Nancy et vise à comparer l'efficacité de la PCE en association avec les corticostéroïdes en traitement de première ligne de la GVHD aiguë, par rapport à la corticothérapie seule.

Finalement, c'est par une meilleure connaissance : du contrôle qualité de la procédure PCE, du mécanisme d'action de la PCE et de la physiopathologie de la GVHD, que la prise en charge des patients par ce traitement de thérapie cellulaire pourra être optimisée afin d'obtenir une réponse clinique satisfaisante.

CONCLUSION GENERALE

L'étude de performances *in vitro* de la PCE en système dissocié sur la lignée cellulaire de JURKAT a donc permis d'initier une étude qui permettra de déterminer l'influence et l'importance respective de chaque paramètre (tels que la concentration en 8-MOP et le taux d'hématocrite de la suspension cellulaire) pouvant intervenir dans l'efficacité *in vitro* du traitement des cellules par la technologie PCE de Macopharma. La poursuite de cette étude permettra d'améliorer davantage la standardisation du fonctionnement biologique de la PCE et devrait ensuite également inclure les essais sur les PBMC de donneurs sains. In fine, ceci devrait permettre d'adapter le traitement PCE en fonction de la composition du produit de leucaphérèse traité.

Sur le plan clinique, la PCE offre une alternative séduisante aux thérapies immunosuppressives pour le traitement de deuxième ligne de la GVHD. Son efficacité et son innocuité par l'absence d'immunosuppression laisse présager une augmentation de son utilisation à l'avenir. La PCE permet de réduire le risque infectieux et donc d'améliorer la qualité de vie des patients. Les résultats des études rétrospectives sont prometteurs, et particulièrement dans la prise en charge de la GVHD cutanée. Aujourd'hui, les lymphomes cutanés à cellules T sont la seule indication pour laquelle la PCE est reconnue par la FDA. On peut penser que les résultats des essais cliniques en cours conduiront vers un élargissement des indications de la PCE.

De plus, dans les centres de santé spécialisés les protocoles liés à l'utilisation de la PCE présentent une certaine dispersion. Les sociétés savantes s'efforcent d'harmoniser les recommandations sur les conditions de mises en œuvre de la PCE, notamment sur le choix des patients éligibles, sur la durée et la fréquence du traitement. Les études prospectives sont encore trop peu nombreuses et difficiles à mettre en place, c'est pourquoi la SFGM-TC propose d'établir un registre des patients traités (Magro, 2015).

Aussi, l'importance de la PCE dans le traitement de la GVHD est une thématique très présente dans la littérature ce qui souligne l'intérêt de cette thérapie pour les chercheurs et les cliniciens. La PCE doit encore faire ses preuves pour être pleinement reconnue dans l'arsenal thérapeutique de la GVHD tant sur la prévention que dans le traitement.

ANNEXES

Annexe 1	Système HLA.....	106
Annexe 2	Tableau d'évaluation du score clinique pour la GVHD chronique d'après le NIH avec fiche évaluation par organe (Jagasia et al., 2015)	108
Annexe 3	Enregistrement du 8-MOP (Macopharma) d'après l'ANSM.....	111
Annexe 4	Agents thérapeutiques utilisés dans le traitement de la GVHD aiguë ou chronique	113
Annexe 5	Résultats liés à l'influence de la concentration en 8-MOP : Nombre de cellules (comptage ViCell), taux de prolifération cellulaire par rapport à la population initiale, pourcentages d'inhibition de la prolifération des JURKAT.	116
Annexe 6	Résultats liés à l'influence de la concentration en 8-MOP : Répartition moyenne des cellules selon leur état de viabilité, obtenus au cytomètre en flux après marquage IP/Annexine-V.....	117
Annexe 7	Résultats liés à l'influence du taux d'hématocrite: Nombre de cellules (comptage ViCell), taux de prolifération cellulaire par rapport à la population initiale, pourcentages d'inhibition de la prolifération des JURKAT	118
Annexe 8	Résultats liés à l'influence du taux d'hématocrite: Répartition moyenne des cellules selon leur état de viabilité, obtenue au cytomètre en flux après marquage IP/Annexine-V.....	119
Annexe 9	Résultats liés à l'influence du taux d'hématocrite: Répartition moyenne des cellules selon leur état de viabilité, obtenue au cytomètre en flux après marquage IP/Annexine-V.....	120

Annexe 1 Système HLA

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), également appelé système *human leucocyte antigen* (HLA) est codé par plus de 200 gènes distribués sur le bras court du chromosome 6 chez l'être humain. Le système HLA a un rôle primordial dans la réponse immunitaire. C'est d'ailleurs le principal déterminant de la tolérance ou du rejet d'une allogreffe de CSH. Les molécules de ce système sont caractérisées par un polymorphisme génétique élevé et se répartissent en deux classes.

Les molécules HLA de **classe I** sont exprimées à la surface de l'ensemble des cellules nucléées et inclut principalement les gènes **HLA-A**, **HLA B** et **HLA C**. Ces molécules sont spécialisées dans la présentation d'antigènes intracellulaire viraux et sont présentées aux **LT CD8+** qui vont ensuite détruire les cellules qui expriment ces antigènes.

Les molécules HLA de **classe II** sont exprimées par les cellules présentatrice d'antigènes (CPA) comprenant les macrophages, les cellules dendritiques et les LB. Les principaux gènes de cette classe sont **HLA-DP**, **HLA-DQ**, **HLA-DR**. Ces molécules sont spécialisées dans la présentation d'antigènes extracellulaires d'origine fongiques ou bactériens et sont présentées aux **LT CD4+** qui vont ensuite activer les lymphocytes B pour produire des anticorps contre l'agent pathogène. La distribution des gènes codant pour le système HLA est schématisée ci-dessous (Figure 37).

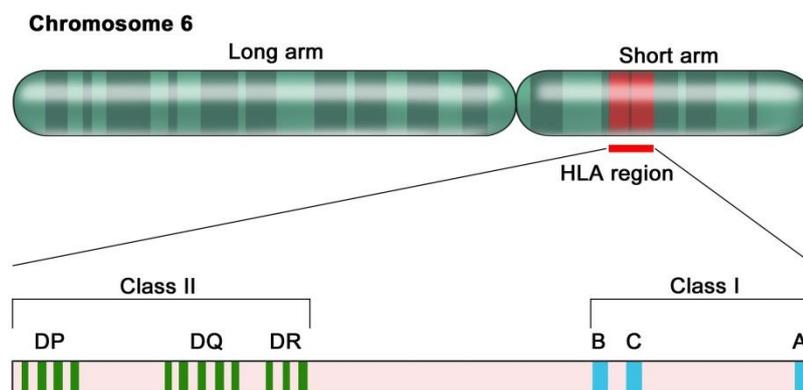


Figure 37 Gènes codant pour le système HLA situé sur le chromosome 6 chez l'être humain.

Le mécanisme de reconnaissance des molécules HLA se fait par le biais du récepteur TCR (*T Cell Receptor*) des lymphocytes T. Le récepteur TCR se lie spécifiquement aux fragments d'antigènes liés à une glycoprotéine membranaire de surface appelée molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou molécule HLA. La spécificité de reconnaissance entre

le TCR des LT CD8+ et des LT CD4+ et les molécules HLA de classe I ou de classe II est représenté ci-après (Figure 38).

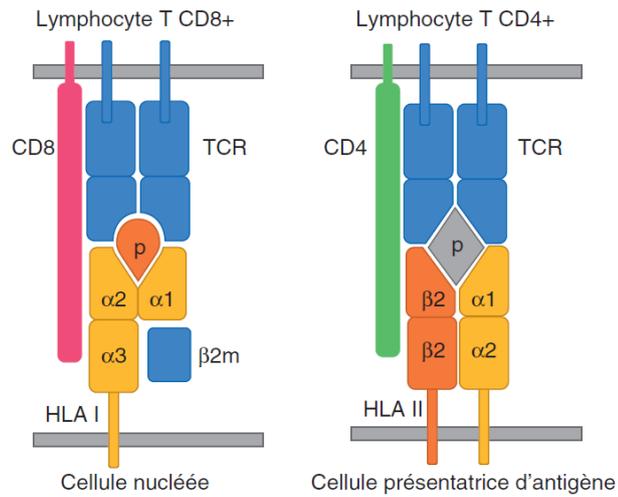


Figure 38 Complexes formés par les TCR des lymphocytes T CD8+ et CD4+ et les molécules HLA de classe I et classe II.

Annexe 2 Tableau d'évaluation du score clinique pour la GVHD chronique d'après le NIH avec fiche évaluation par organe (Jagasia et al., 2015)

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
PERFORMANCE SCORE: <input type="text"/> KPS ECOG LPS	Asymptomatic and fully active (ECOG 0; KPS or LPS 100%)	Symptomatic, fully ambulatory, restricted only in physically strenuous activity (ECOG 1, KPS or LPS 80-90%)	Symptomatic, ambulatory, capable of self-care, >50% of waking hours out of bed (ECOG 2, KPS or LPS 60-70%)	Symptomatic, limited self-care, >50% of waking hours in bed (ECOG 3-4, KPS or LPS <60%)
SKIN† <input type="text"/> SCORE % BSA <i>GVHD features to be scored by BSA:</i> Check all that apply: Maculopapular rash/erythema Lichen planus-like features Sclerotic features Papulosquamous lesions or ichthyosis Keratosis pilaris-like GVHD	No BSA involved	1-18% BSA	19-50% BSA	>50% BSA
SKIN FEATURES SCORE:	No sclerotic features		Superficial sclerotic features "not hidebound" (able to pinch)	Check all that apply: Deep sclerotic features "Hidebound" (unable to pinch) Impaired mobility Ulceration
<i>Other skin GVHD features (NOT scored by BSA)</i>				
Check all that apply: Hyperpigmentation Hypopigmentation Poikiloderma Severe or generalized pruritus Hair involvement Nail involvement <i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i> _____				
MOUTH <i>Lichen planus-like features present:</i> Yes No <i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i> _____	No symptoms	Mild symptoms with disease signs but not limiting oral intake significantly	Moderate symptoms with disease signs with partial limitation of oral intake	Severe symptoms with disease signs on examination with major limitation of oral intake

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
EYES	No symptoms	Mild dry eye symptoms not affecting ADL (requirement of lubricant eye drops ≤ 3 x per day)	Moderate dry eye symptoms partially affecting ADL (requiring lubricant eye drops > 3 x per day or punctal plugs), WITHOUT new vision impairment due to KCS	Severe dry eye symptoms significantly affecting ADL (special eyewear to relieve pain) OR unable to work because of ocular symptoms OR loss of vision due to KCS
<i>Keratoconjunctivitis sicca (KCS) confirmed by ophthalmologist:</i>				
Yes				
No				
Not examined				
<i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>				
GI Tract	No symptoms	Symptoms without significant weight loss* ($< 5\%$)	Symptoms associated with mild to moderate weight loss* (5-15%) OR moderate diarrhea without significant interference with daily living	Symptoms associated with significant weight loss* $> 15\%$, requires nutritional supplement for most calorie needs OR esophageal dilation OR severe diarrhea with significant interference with daily living
Check all that apply:				
Esophageal web/proximal stricture or ring				
Dysphagia				
Anorexia				
Nausea				
Vomiting				
Diarrhea				
Weight loss $\geq 5\%*$				
Failure to thrive				
<i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>				
LIVER	Normal total bilirubin and ALT or AP < 3 x ULN	Normal total bilirubin with ALT ≥ 3 to 5 x ULN or AP ≥ 3 x ULN	Elevated total bilirubin but ≤ 3 mg/dL or ALT > 5 ULN	Elevated total bilirubin > 3 mg/dL
<i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>				
LUNGS**				
Symptom score:	No symptoms	Mild symptoms (shortness of breath after climbing one flight of steps)	Moderate symptoms (shortness of breath after walking on flat ground)	Severe symptoms (shortness of breath at rest; requiring O_2)
Lung score:	FEV1 $\geq 80\%$	FEV1 60-79%	FEV1 40-59%	FEV1 $\leq 39\%$
% FEV1 <input type="text"/>				
<i>Pulmonary function tests</i>				
Not performed				
<i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>				

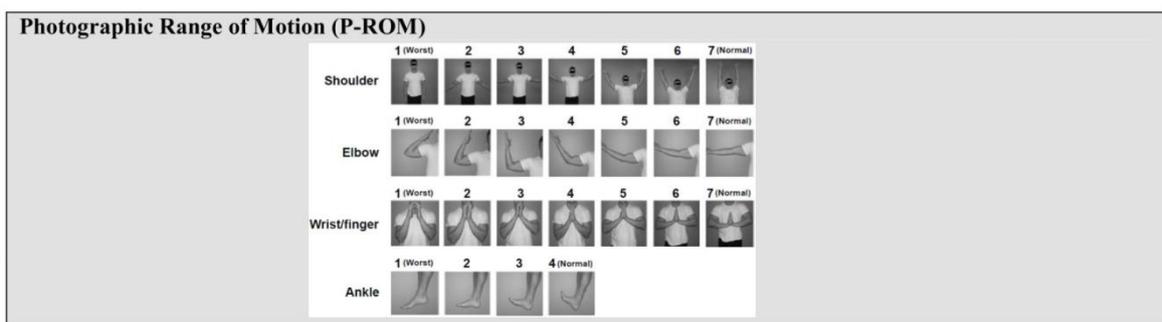
	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
JOINTS AND FASCIA	No symptoms	Mild tightness of arms or legs, normal or mild decreased range of motion (ROM) AND not affecting ADL	Tightness of arms or legs OR joint contractures, erythema thought due to fasciitis, moderate decrease ROM AND mild to moderate limitation of ADL	Contractures WITH significant decrease of ROM AND significant limitation of ADL (unable to tie shoes, button shirts, dress self etc.)
P-ROM score (see below)				
Shoulder (1-7): ___				
Elbow (1-7): ___				
Wrist/finger (1-7): ___				
Ankle (1-4): ___				
<i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>				

GENITAL TRACT (See Supplemental figure [‡])	No signs	Mild signs [†] and females with or without discomfort on exam	Moderate signs [†] and may have symptoms with discomfort on exam	Severe signs [†] with or without symptoms
Not examined				
Currently sexually active				
Yes				
No				
<i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>				

Other indicators, clinical features or complications related to chronic GVHD (check all that apply and assign a score to severity (0-3) based on functional impact where applicable none – 0, mild -1, moderate -2, severe – 3)				
Ascites (serositis) ___	Myasthenia Gravis ___			
Pericardial Effusion ___	Peripheral Neuropathy ___		Eosinophilia > 500/μl ___	
Pleural Effusion(s) ___	Polymyositis ___		Platelets <100,000/μl ___	
Nephrotic syndrome ___	Weight loss >5%* without GI symptoms ___		Others (specify):	

Overall GVHD Severity
(Opinion of the evaluator)

No GVHD
 Mild
 Moderate
 Severe



[†] Skin scoring should use both percentage of BSA involved by disease signs and the cutaneous features scales. When a discrepancy exists between the percentage of total body surface (BSA) score and the skin feature score, OR if superficial sclerotic features are present (Score 2), but there is impaired mobility or ulceration (Score 3), the higher level should be used for the final skin scoring.

* Weight loss within 3 months.

**Lung scoring should be performed using both the symptoms and FEV1 scores whenever possible. FEV1 should be used in the final lung scoring where there is discrepancy between symptoms and FEV1 scores.

Abbreviations: ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group), KPS (Karnofsky Performance Status), LPS (Lansky Performance Status); BSA (body surface area); ADL (activities of daily living); LFTs (liver function tests); AP (alkaline phosphatase); ALT (alanine aminotransferase); ULN (normal upper limit).

[‡] To be completed by specialist or trained medical providers (see Supplemental Figure).

RÉSUMÉ DES CARACTÉRISTIQUES DU PRODUIT THÉRAPEUTIQUE ANNEXE**1 - DÉNOMINATION**

METHOXSALENE (8-MOP) MACOPHARMA 20 microgrammes/ml, solution.

2 - COMPOSITION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE

Pour 100 ml de solution :

Composant	Concentration (mg/100 ml)
Principe actif	
Méthoxsalène	2
Excipients	
Éthanol (96%)	3230
Acide acétique glacial	230
Acétate de sodium trihydraté	860
Chlorure de sodium	400
Eau pour préparations injectables qsp	100 ml

3 - FORME GALÉNIQUE

Solution.

4 - NATURE ET CONTENANCE DU CONDITIONNEMENT

Flacon en verre ambré, rempli à 5 ml.

5 - DONNÉES SUR L'EFFICACITÉ *IN-VITRO* REVENDIQUÉE**5.1 - Effet *in-vitro* revendiqué**

Le méthoxsalène (8-MOP) est indiqué pour la photosensibilisation des cellules nucléées issues d'un prélèvement d'aphérèse, dans le cadre d'une procédure de photochimiothérapie extracorporelle, selon la technique dite « en système dissocié ».

5.2 - Dose et mode d'utilisation

Le protocole thérapeutique comporte les étapes suivantes :

- le prélèvement, à partir du sang du malade, d'un concentré de globules blancs,
- la dilution du concentré de globules blancs par de la solution injectable isotonique de chlorure de sodium (qs 300 ml) ;
- l'addition du contenu d'un flacon de solution de Méthoxsalène MacoPharma 20 microgrammes/ml au concentré de globules blancs ;
- l'illumination du concentré de globules blancs dilué par un rayonnement UVA (320-400nm) ;
- la ré-administration au malade du concentré de globules blancs traité.

Ce protocole devra être adapté le cas échéant à l'indication thérapeutique, mais dans tous les cas validé, conformément à l'autorisation procédé/produit de thérapie cellulaire, telle que prévue à l'article L.1243-5 du code de la santé publique, délivrée par l'ANSM à l'Unité de Thérapie Cellulaire qui met en œuvre ce procédé.

5.3 - Contre-indications à l'utilisation

Le méthoxsalène est un produit photo-sensibilisant.

- Le protocole de photochimiothérapie extracorporelle ne doit pas être initié chez des patients présentant des maladies photosensibles telles que le lupus érythémateux, la porphyrie cutanée tardive, la protoporphyrie érythropoïétique, la porphyrie variégate, le xeroderma pigmentosum, l'albinisme.
- Le protocole doit être discuté chez les patients en cas d'aphalcié, en raison de possibles dommages rétinien chez les patients dépourvus de cristallins.
- Le traitement est contre indiqué chez les patients ayant présenté des allergies aux psoralènes.
- L'association avec des traitements concomitants mettant en jeu des médicaments photo-sensibilisants doit être discutée (voir « interactions potentielles »).
- Utilisation par des hommes sexuellement actifs et par des femmes en âge de procréer à moins de recourir à une contraception appropriée pendant le traitement.
- Grossesse et allaitement

5.4 - Mises en garde, précautions particulières d'emploi

Ce produit est un produit thérapeutique annexe. Ce n'est pas un médicament. Il ne peut en aucun cas être administré à l'homme pour un usage thérapeutique.

Mises en garde :

La solution de Méthoxsalène MacoPharma 20 microgrammes/ml ne doit pas être ingérée ni inhalée.

En cas d'ingestion de la solution, ne pas faire vomir.

La solution de Méthoxsalène MacoPharma 20 microgrammes/ml doit être manipulée avec précautions, pour éviter les risques :

- cutanés : irritant, corrosif, sensibilisant ;
- oculaires : irritant, corrosif ;

L'étendue des dommages tissulaires dépend de la durée du contact.

Les régions en contact avec le produit doivent être rincées à grande eau pendant au moins 15 minutes.

Précautions particulières d'emploi :

L'administration orale de méthoxsalène suivie d'une exposition aux rayons UVA expose à un risque cancérigène pour la peau. Ce risque est dose-dépendant.

Dans le cadre d'un traitement par photochimiothérapie extracorporelle, où les doses reçues par le patient sont infimes, ce risque est moindre.

5.5 - Interactions potentielles

Le méthoxsalène peut potentialiser l'action de médicaments photosensibilisants (en administration systémique ou locale), tels que : anthraline, savons bactériostatiques, goudrons, acide nalidixique, sulfamides, tétracyclines, phénothiazines, normolipémiants... et certains colorants tels que : bleu de méthyène, bleu de toluidine, rose Bengale, méthylorange...

6 - MÉCANISME D'ACTION

Le méthoxsalène, sous l'influence de la photoactivation par des rayons UVA, se conjugue et forme des liaisons covalentes avec l'ADN qui aboutissent aux formations simultanées de dérivés monoconjugués (liaison avec une seule branche de l'ADN) et biconjugués (liaison avec les deux branches de l'ADN). Des réactions avec les protéines sériques ont également été décrites.

L'altération de l'ADN entraîne l'arrêt immédiat de la prolifération et, en quelques heures, l'induction d'un processus apoptotique des cellules. L'excitation photonique du psoralène par les UVA entraîne également des oxydations lipidiques au niveau membranaire ainsi que des modifications des protéines sériques, dont le rôle est encore mal connu.

7 - INCOMPATIBILITÉS MAJEURES PHYSIQUE ET CHIMIQUE

Voir « Interactions potentielles »

8 - CONDITIONS DE CONSERVATION

8.1 - Conditions de conservation avant ouverture du conditionnement

2 ans.

À une température comprise entre 15°C et 30°C.

À l'abri de la lumière.

8.2 - Conditions de conservation après ouverture du conditionnement

La solution de Méthoxsalène MacoPharma 20 microgrammes/ml doit être utilisée immédiatement après ouverture du flacon.

9 - INSTRUCTIONS POUR L'UTILISATION, LA MANIPULATION ET L'ÉLIMINATION

Le protocole thérapeutique comporte principalement les étapes suivantes :

- le prélèvement, à partir du sang du malade, d'un concentré de globules blancs ;
- la dilution du concentré de globules blancs par de la solution injectable isotonique de chlorure de sodium ;
- l'addition du contenu d'un flacon de Méthoxsalène MacoPharma 20 microgrammes/ml au concentré de globules blancs ;
- l'illumination du concentré de globules blancs dilués par un rayonnement UVA (320-400nm) ;
- la réadministration au malade du concentré de globules blancs traité.

Il est rappelé que ce protocole pourra être adapté le cas échéant à l'indication thérapeutique, mais dans tous les cas validé, conformément à l'autorisation procédé/produit de thérapie cellulaire, telle que prévue à l'article L.1243-5 du code de la santé publique, délivrée par l'ANSM à l'Unité de Thérapie Cellulaire qui met en œuvre ce procédé.

La solution de Méthoxsalène MacoPharma 20 microgrammes/ml doit être éliminée selon les procédures prévues pour les déchets hautement toxiques.

10 - BIOVIGILANCE ET TRACABILITÉ

Ce produit entre dans le champ d'application de la biovigilance. Tout incident ou effet indésirable, lié ou susceptible d'être lié à l'utilisation du produit doit être signalé au correspondant local de biovigilance de l'établissement dans lequel est utilisé le produit.

11 - TITULAIRE DE L'AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHÉ

11.1 - Titulaire de l'autorisation de mise sur le marché

MACO PHARMA
rue Lorthiois
F-59420 MOUVAUX
Téléphone : 03.20.11.84.30
Télécopie : 03.20.11.84.86

11.2 - Fabricant sous-traitant

AMATSJ
17 parc des Vautes
F-34983 SAINT GELY DU FESC
Téléphone : 04.99.58.38.60
Télécopie : 04.99.58.38.61

11.3 - Fabricant sous-traitant chargé de la libération

MACO PRODUCTIONS
200 chaussée Fernand Forest
F-59200 TOURCOING
Téléphone : 03.20.11.84.00
Télécopie : 03.20.11.84.03

12 - PRÉSENTATION ET RÉFÉRENCE DU FABRICANT

Solution (5 ml) en flacon de 8 ml en verre ambré, boîte de 10 flacons.

13 - DATE DE PREMIÈRE AUTORISATION

Autorisation TA 07.10.109 délivrée le 19 octobre 2007

14 - DATE DE MISE À JOUR DU TEXTE

05 septembre 2012

Annexe 4 Agents thérapeutiques utilisés dans le traitement de la GVHD aiguë ou chronique

IMMUNOSUPPRESSEURS

Ciclosporine (NEORAL®)

Mécanisme d'action Puissant immunosuppresseur, inhibiteur de la calcineurine. Inhibe les réactions immunitaires liées à la GVHD. Au niveau cellulaire, la ciclosporine inhibe la production et la sécrétion de l'interleukine-2.

Effets secondaires Dose-dépendants et sensibles à une réduction de la dose. Hyperlipidémie, tremblements, céphalées, hypertension artérielle, hirsutisme, dysfonctionnement rénal.

Mode d'administration Voie orale.
Capsules molles.

Thalidomide (CELGENE®)

Mécanisme d'action Inhibition de la production de TNF- α , agit sur les molécules de surfaces responsables de la migration des leucocytes. Propriétés anti-inflammatoires, immunomodulatrices et potentiellement antitumorales.

Effets secondaires Neutropénie, leucopénie, constipation, somnolence, paresthésie, neuropathie périphérique, anémie, lymphopénie, thrombocytopenie, vertiges, tremblements et œdème périphérique.

Mode d'administration Voie orale.
Gélules 50 mg.

Methotrexate (METOJECT®)

Mécanisme d'action Antagoniste de l'acide folique qui inhibe la réduction de l'acide folique et la prolifération des cellules tissulaires, plus particulièrement celles à développement rapide comme les cellules tumorales.

Effets secondaires Thrombopénie, leucopénie, neutropénie, anémie, insuffisance rénale irréversible, nausée, vomissement, douleurs abdominales, anorexie, diarrhée, rash, alopecie.

Mode d'administration Voie sous-cutanée, intra-veineuse, intra-musculaire.

Immunoglobuline anti-thymocyte de lapin (Thymoglobuline®)

Mécanisme d'action Immunoglobuline de lapin anti-thymocytes humains avec effet immunosuppresseur sélectif sur les lymphocytes T. Déplétion lymphocytaire.

Effets secondaires Infections, lymphocytopenie, neutropénie, thrombopénie, dyspnée.

Mode d'administration Voie intra-veineuse.
Poudre pour solution à diluer pour perfusion. Concentration à 5 mg/ml.

Immunoglobuline équine anti-thymocyte (ATGAM®)

Mécanisme d'action Immunoglobuline de cheval anti-thymocytes humains avec effet immunosuppresseur sélectif sur les lymphocytes T. Déplétion lymphocytaire.

Effets secondaires Thrombopénie, leucopénie, rash, fièvre.

Mode d'administration Voie intra-veineuse.
Solution à 50 mg/ml à diluer pour perfusion. Ne pas dépasser la concentration finale de 4 mg/ml. Test cutané à réaliser avant la première perfusion (injection intradermique de 0,1 ml dilué dans une solution de NaCl (1 :1000 v/v) avec injection en parallèle témoin de NaCl. Si réaction locale, réévaluer le rapport bénéfice/risque.

Alemtuzumab (MabCampath®, Campath®)

Mécanisme d'action Anticorps monoclonal IgG1- κ humanisé qui se lie spécifiquement la glycoprotéine CD52 située à la surface des lymphocytes provoquant la lyse des lymphocytes.

Effets secondaires Granulocytopénie, thrombopénie, anémie, infection à CMV/ herpès simplex, hypotension, nausées, vomissements, urticaire, rash, fièvre, frissons.

Mode d'administration Voie intra-veineuse.
Solution (30 mg/ml) à diluer pour perfusion.

INHIBITEUR DE L'INTERLEUKINE

Basiliximab (Simulect®)

Mécanisme d'action Anticorps monoclonal chimérique murin/humain dirigé contre la chaîne α du récepteur de l'interleukine-2 (IL-2) (antigène CD25). Le basiliximab se lie spécifiquement avec une grande affinité à l'antigène CD25 présent à la surface des lymphocytes T activés qui expriment le récepteur de l'IL-2 ce qui empêche la liaison de l'IL-2, signal critique de prolifération des lymphocytes T au cours de la réponse immunitaire impliquée dans le rejet d'allogreffe. N'entraîne pas de myelosuppression.

Effets secondaires Constipation, infection urinaire, douleur, nausées, oedèmes périphériques, hypertension, anémie, céphalées, hyperkaliémie, hypercholestérolémie, complication de lésion post-opératoire, prise de poids, élévation de la créatinine sanguine, hypophosphatémie, diarrhée et infections respiratoires hautes.

Mode d'administration Voie intra-veineuse.
10 ou 20 mg poudre et solvant pour solution injectable ou pour perfusion

INHIBITEURS DU TNF- α

Infliximab (Remicade®)

Mécanisme d'action Anticorps monoclonal chimérique humain/souris qui se lie avec une grande affinité à la fois aux formes solubles et transmembranaires du TNF- α . Formation de complexes stables avec le TNF- α qui équivaut à la perte de bioactivité du TNF- α .

Effets secondaires Infections des voies respiratoires hautes, réactivation virus hépatite B, insuffisance cardiaque congestive, infections graves, réactions graves à la perfusion, réactions d'hypersensibilité, réactions hématologiques.

Mode d'administration Voie intra-veineuse.
Poudre à diluer (100 mg), après reconstitution 10 mg/ml.

Etanercept (Enbrel®)

Mécanisme d'action Protéine dimérique issue de la fusion du récepteur p75 du TNF et du domaine Fc de l'IgG1 humaine. Inhibition compétitive de la liaison du TNF à ses récepteurs de surface bloquant l'activité biologique du TNF (cytokine pro-inflammatoire).

Effets secondaires Réactions au site d'injection, infections, réactions allergiques, développement d'auto-anticorps, démangeaisons et fièvre.

Mode d'administration Voie sous-cutanée.
Poudre et solvant pour solution injectable. Dosages 10, 25, 50 mg.

ANTINEOPLASIQUES

Mycophénolate mofétil (CellCept®)

Mécanisme d'action Puissant inhibiteur sélectif, non compétitif et réversible de l'enzyme inosine monophosphate déshydrogénase. Inhibition de la synthèse de *ново* des nucléotides à base de guanine, essentiel à la prolifération des lymphocytes. Effet cytostatique sur les lymphocytes.

Effets secondaires Septicémie, candidose gastro-intestinale, infection des voies urinaires, herpès, zona, vomissement, douleur abdominale, diarrhée, nausée.

Mode d'administration Voie orale.
Gélules de 250 mg.

Sirolimus (Rapamune®)

Mécanisme d'action Inhibiteur de la cible de la rapamycine indispensable au déroulement du cycle cellulaire, inhibe la protéine mTOR d'où une inhibition de l'activation lymphocytaire.

Effets secondaires Thrombocytopénie, anémie, fièvre, hypertension, hypokaliémie, infection du tracus urinaire, hypercholestérolémie, hyperglycémie, hypertriglycéridémie, douleur abdominale, œdème périphérique, arthralgie, acné, diarrhée, douleur, constipation, nausée, céphalées, élévation de la créatininémie, et élévation de la lactico-déshydrogénase sanguine

Mode d'administration Voie orale.
Comprimés 0,5 ou 1 ou 2 mg.

Imatinib (GLIVEC®)

Mécanisme d'action Inhibiteur de protéine tyrosine kinase. Inhibe les processus cellulaires médiés par l'activation des kinases de ces récepteurs.

Effets secondaires Neutropénie, thrombopénie, anémie, céphalées, Nausées, diarrhée, vomissements, dyspepsie, douleur abdominale, œdème périorbitaire, dermatite, eczéma, rash.

Mode d'administration Voie orale.
Comprimé

Pentostatine (Nipent®)

Mécanisme d'action Inhibiteur de l'enzyme adénosine-désaminase (ADA) dont l'activité est maximale dans les lymphocytes T tumoraux.

Effets secondaires Effet lymphotoxique sur les LT CD4+ avec des taux < 200/μL, infection zostériennes, nausées, vomissement, leucopénie, fièvre, éruption, fatigue.

Mode d'administration Voie intra-veineuse.
Poudre pour solution pour injection, poudre pour solution pour perfusion. 10 mg pentostatine à reconstituer avec 5 ml d'eau pour préparations injectables, solution finale à 2 mg/ml de pentostatine.

Annexe 5 Résultats liés à l'influence de la concentration en 8-MOP : Nombre de cellules (comptage ViCell), taux de prolifération cellulaire par rapport à la population initiale, pourcentages d'inhibition de la prolifération des JURKAT.

Données en fonction du temps pour les cellules non irradiées (contrôle) et les cellules irradiées en présence des différentes concentrations de 8-MOP (0, 200 et 333 ng/ml) , N=3 à J+3 et N+2 à J+4 et J+7, résultats en duplicate sauf à J0.

Nombre de cellules				
Moyennes	J0	J+3	J+4	J+7
Contrôle	5,00	36,05	51,67	378,85
0 ng/ml 8-MOP	5,00	25,82	44,23	341,55
200 ng/ml 8-MOP	5,00	5,61	7,24	25,00
333 ng/ml 8-MOP	5,00	4,51	5,25	11,37
Erreurs standard à la moyenne				
Contrôle		9,78	17,76	97,02
0 ng/ml 8-MOP		3,27	5,35	64,64
200 ng/ml 8-MOP		0,95	1,84	3,81
333 ng/ml 8-MOP		0,14	0,52	0,91
Taux de prolifération cellulaire par rapport à la population initiale				
Moyennes	J0	J+3	J+4	J+7
Contrôle	1,00	7,21	10,33	75,77
0 ng/ml 8-MOP	1,00	5,16	8,85	68,31
200 ng/ml 8-MOP	1,00	1,12	1,45	5,00
333 ng/ml 8-MOP	1,00	0,90	1,05	2,27
Erreurs standard à la moyenne				
Contrôle		1,96	3,55	19,40
0 ng/ml 8-MOP		0,65	1,07	12,93
200 ng/ml 8-MOP		0,19	0,37	0,76
333 ng/ml 8-MOP		0,03	0,10	0,18
Pourcentages d'inhibition de la prolifération cellulaire				
Moyennes		J+3	J+4	J+7
Contrôle		0%	0%	0%
0 ng/ml 8-MOP		23,14%	6,98%	8,19%
200 ng/ml 8-MOP		81,07%	82,73%	92,66%
333 ng/ml 8-MOP		85,63%	88,09%	96,72%
Erreurs standard à la moyenne				
Contrôle				
0 ng/ml 8-MOP		9,66%	21,62%	6,45%
200 ng/ml 8-MOP		6,23%	9,49%	2,89%
333 ng/ml 8-MOP		3,46%	5,10%	1,08%

Annexe 6 Résultats liés à l'influence de la concentration en 8-MOP : Répartition moyenne des cellules selon leur état de viabilité, obtenus au cytomètre en flux après marquage IP/Annexine-V.

Données en fonction du temps pour les cellules non irradiées (contrôle) et les cellules irradiées aux en présence des différentes concentrations de 8-MOP (0, 200 et 333 ng/ml), N=3, résultats issus de duplicate sauf à J0.

Jour après PCE	Conditions	Nécrose	Viable	Apoptose tardive	Apoptose précoce	Apoptose	Δ Apoptose
Moyennes							
J0	Contrôle	0,17%	89,25%	9,52%	1,08%	10,60%	
	0 ng/ml 8-MOP	0,16%	87,59%	10,63%	1,63%	12,26%	
	200 ng/ml 8-MOP	0,33%	88,89%	9,53%	1,25%	10,78%	
	333 ng/ml 8-MOP	0,15%	87,67%	10,71%	1,46%	12,17%	
J+1	Contrôle	0,31%	76,21%	22,87%	0,62%	23,48%	0,00%
	0 ng/ml 8-MOP	0,33%	70,66%	28,53%	0,48%	29,01%	5,53%
	200 ng/ml 8-MOP	0,25%	44,90%	54,26%	0,60%	54,86%	31,38%
	333 ng/ml 8-MOP	0,27%	35,83%	63,56%	0,34%	63,90%	40,42%
J+2	Contrôle	0,28%	80,36%	18,47%	0,89%	19,36%	0,00%
	0 ng/ml 8-MOP	0,35%	73,08%	25,61%	0,97%	26,58%	7,22%
	200 ng/ml 8-MOP	0,36%	27,05%	72,02%	0,57%	72,59%	53,23%
	333 ng/ml 8-MOP	2,33%	12,44%	84,67%	0,57%	85,24%	65,88%
J+3	Contrôle	0,33%	80,15%	17,98%	1,54%	19,52%	0,00%
	0 ng/ml 8-MOP	0,28%	78,23%	20,61%	0,88%	21,49%	1,97%
	200 ng/ml 8-MOP	0,60%	33,01%	65,94%	0,45%	66,39%	46,87%
	333 ng/ml 8-MOP	0,94%	11,02%	87,79%	0,24%	88,03%	68,51%
Erreurs standard à la moyenne							
J0	Contrôle	0,08%	1,04%	0,69%	0,52%	1,02%	
	0 ng/ml 8-MOP	0,07%	2,04%	1,57%	0,52%	2,06%	
	200 ng/ml 8-MOP	0,24%	0,56%	0,53%	0,44%	0,67%	
	333 ng/ml 8-MOP	0,06%	0,67%	0,21%	0,53%	0,73%	
J+1	Contrôle	0,06%	0,46%	0,47%	0,14%	1,38%	0,00%
	0 ng/ml 8-MOP	0,06%	0,93%	0,84%	0,09%	3,95%	1,40%
	200 ng/ml 8-MOP	0,07%	1,73%	1,95%	0,22%	0,82%	3,19%
	333 ng/ml 8-MOP	0,04%	2,93%	3,02%	0,14%	8,04%	5,36%
J+2	Contrôle	0,10%	3,33%	3,25%	0,01%	2,44%	0,00%
	0 ng/ml 8-MOP	0,03%	5,45%	5,41%	0,10%	4,85%	4,13%
	200 ng/ml 8-MOP	0,06%	5,08%	5,15%	0,12%	1,84%	6,04%
	333 ng/ml 8-MOP	2,10%	2,03%	2,46%	0,26%	13,03%	3,78%
J+3	Contrôle	0,09%	0,71%	1,05%	0,50%	0,89%	0,00%
	0 ng/ml 8-MOP	0,05%	1,54%	1,48%	0,14%	6,75%	1,43%
	200 ng/ml 8-MOP	0,28%	6,81%	6,66%	0,11%	4,30%	12,56%
	333 ng/ml 8-MOP	0,32%	1,47%	1,42%	0,06%	1,50%	3,46%

Annexe 7 Résultats liés à l'influence du taux d'hématocrite: Nombre de cellules (comptage ViCell), taux de prolifération cellulaire par rapport à la population initiale, pourcentages d'inhibition de la prolifération des JURKAT

Données en fonction du temps pour les cellules non irradiées (contrôle) et les cellules irradiées en présence des différents taux d'hématocrite (1%, 2%, 4%, >5%), N=3 à J+3 et N+2 à J+4 et J+7, résultats en duplicate sauf à J0.

Nombre de cellules				
Moyennes	J0	J+3	J+4	J+7
Contrôle	5,00	30,78	29,08	398,85
1% Ht	5,00	4,00	5,80	4,69
2% Ht	5,00	5,00	7,94	13,26
4% Ht	5,00	13,68	17,85	164,68
>5% Ht	5,00	18,49	15,44	261,90
Erreurs standard à la moyenne				
Contrôle		7,22	5,09	62,43
1% Ht		0,37	1,41	0,36
2% Ht		0,54	2,04	2,26
4% Ht		5,35	4,27	56,78
>5% Ht		4,42	5,51	56,35
Taux de prolifération cellulaire par rapport à la population initiale				
Moyennes	J0	J+3	J+4	J+7
Contrôle	1,00	6,16	5,82	79,77
1% Ht	1,00	0,80	1,16	0,94
2% Ht	1,00	1,00	1,59	2,65
4% Ht	1,00	2,74	3,57	32,94
>5% Ht	1,00	3,70	3,09	52,38
Erreurs standard à la moyenne				
Contrôle		1,44	1,02	12,49
1% Ht		0,07	0,28	0,07
2% Ht		0,11	0,41	0,45
4% Ht		1,07	0,85	11,36
>5% Ht		0,88	1,10	11,27
Pourcentages d'inhibition de la prolifération cellulaire				
Moyennes	J0	J+3	J+4	J+7
Contrôle		0%	0%	0%
1% Ht		84,40%	80,33%	98,75%
2% Ht		80,16%	73,21%	96,68%
4% Ht		56,74%	47,07%	61,73%
>5% Ht		48,14%	41,90%	38,90%
Erreurs standard à la moyenne				
Contrôle				
1% Ht		0,04	0,02	0,00
2% Ht		0,06	0,03	0,00
4% Ht		0,05	0,15	0,08
>5% Ht		0,02	0,06	0,01

Annexe 8 Résultats liés à l'influence du taux d'hématocrite: Répartition moyenne des cellules selon leur état de viabilité, obtenue au cytomètre en flux après marquage IP/Annexine-V.

Données en fonction du temps pour les cellules non irradiées (contrôle) et les cellules irradiées en présence des différents taux d'hématocrite (1%, 2%, 4%, >5%), N=3, résultats issus de duplicate sauf à J0.

Jour après PCE	Conditions	Nécrose	Viable	Apoptose tardive	Apoptose précoce	Apoptose	Δ Apoptose
Moyennes							
J0	Contrôle	0,07%	8,43%	89,63%	1,89%	10,31%	
	1% Ht	0,05%	8,83%	88,41%	2,72%	11,55%	
	2% Ht	0,07%	8,44%	89,25%	2,26%	10,69%	
	4% Ht	0,08%	8,88%	89,05%	1,99%	10,87%	
	>5% Ht	0,10%	7,43%	90,76%	1,71%	9,14%	
J+1	Contrôle	0,12%	17,34%	81,51%	1,03%	18,37%	0,00%
	1% Ht	0,09%	73,68%	24,48%	1,75%	75,43%	57,07%
	2% Ht	0,18%	58,11%	39,89%	1,83%	59,93%	41,57%
	4% Ht	0,18%	33,31%	65,31%	1,21%	34,52%	16,15%
	>5% Ht	0,24%	20,42%	78,15%	1,20%	21,62%	3,25%
J+2	Contrôle	0,22%	16,05%	82,47%	1,27%	17,31%	0,00%
	1% Ht	2,80%	89,35%	7,14%	0,71%	90,06%	72,74%
	2% Ht	0,21%	87,41%	11,53%	0,85%	88,26%	70,95%
	4% Ht	0,29%	51,86%	46,76%	1,10%	52,96%	35,65%
	>5% Ht	0,55%	23,43%	74,61%	1,42%	24,85%	7,53%
J+3	Contrôle	0,19%	15,26%	83,39%	1,17%	16,43%	0,00%
	1% Ht	1,51%	89,30%	8,60%	0,59%	89,89%	73,46%
	2% Ht	2,01%	79,85%	17,22%	0,92%	80,77%	64,34%
	4% Ht	0,45%	34,00%	64,39%	1,16%	35,16%	18,73%
	>5% Ht	0,69%	19,09%	78,97%	1,25%	20,35%	3,92%
Erreurs standard à la moyenne							
J0	Contrôle	0,03%	1,70%	1,86%	0,18%	1,85%	
	1% Ht	0,02%	1,23%	1,44%	0,45%	1,45%	
	2% Ht	0,02%	1,68%	1,71%	0,38%	1,71%	
	4% Ht	0,02%	2,42%	2,58%	0,18%	2,59%	
	>5% Ht	0,03%	1,26%	1,09%	0,26%	1,12%	
J+1	Contrôle	0,03%	2,34%	2,31%	0,02%	2,33%	0,00%
	1% Ht	0,01%	3,19%	3,41%	0,53%	3,42%	1,37%
	2% Ht	0,05%	6,24%	5,95%	0,40%	5,93%	3,77%
	4% Ht	0,04%	8,41%	8,49%	0,19%	8,53%	5,42%
	>5% Ht	0,03%	3,30%	3,19%	0,09%	3,23%	1,89%
J+2	Contrôle	0,09%	3,05%	3,12%	0,09%	3,13%	0,00%
	1% Ht	1,40%	2,08%	1,44%	0,19%	1,90%	2,21%
	2% Ht	0,14%	1,23%	1,11%	0,13%	1,12%	1,95%
	4% Ht	0,12%	13,25%	12,70%	0,44%	12,81%	7,46%
	>5% Ht	0,27%	2,55%	1,56%	0,72%	1,83%	0,48%
J+3	Contrôle	0,02%	2,57%	2,63%	0,08%	2,63%	0,00%
	1% Ht	0,65%	5,73%	5,33%	0,27%	5,46%	4,98%
	2% Ht	1,75%	5,69%	6,48%	0,20%	5,53%	4,85%
	4% Ht	0,13%	9,26%	8,89%	0,26%	9,00%	6,46%
	>5% Ht	0,23%	3,33%	2,92%	0,21%	3,15%	1,82%

Annexe 9 Résultats liés à l'influence du taux d'hématocrite: Répartition moyenne des cellules selon leur état de viabilité, obtenue au cytomètre en flux après marquage IP/Annexine-V.

Résultats statistiques obtenus avec le test ANOVA à 1 facteur pour comparer les pourcentages d'inhibition de la prolifération à J+3 et les pourcentages de Δ apoptose des JURKAT à J+1. Le test à été réalisé sur les données des expériences (N=3) obtenues lors de l'étude de la variation de la concentration de 8-MOP et de la variation du taux d'hématocrite.

Résultats statistiques		
Variation de la concentration en 8-MOP		
	Inhibition prolifération à J+3	Δ apoptose à J+1
0 vs 200 ng/ml	0,00227 (**)	<0,001 (***)
0 vs 333 ng/ml	0,00180 (**)	<0,001 (***)
200 vs 333 ng/ml	0,88959 (ns)	0,0785 (ns)
Variation du taux d'hématocrite		
	Inhibition prolifération à J+3	Δ apoptose à J+1
1% Ht vs 2% Ht	0,89803 (ns)	0,02522 (*)
1% Ht vs 4% Ht	0,00865 (**)	<0,001 (***)
1% Ht vs >5% Ht	0,00129 (**)	<0,001 (***)
2% Ht vs 4% Ht	0,02365 (*)	0,00163 (**)
2% Ht vs >5% Ht	0,00342 (**)	<0,001 (***)
4% Ht vs >5 Ht	0,63231 (ns)	0,18211 (ns)

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$, ns = non significatif

BIBLIOGRAPHIE

ABM (2015). Activité nationale de greffe de CSH 2015 (Agence de la Biomédecine).

Abraham, R.T., and Weiss, A. (2004). Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 301–308.

Abu-Dalle, I., Reljic, T., Nishihori, T., Antar, A., Bazarbachi, A., Djulbegovic, B., Kumar, A., and Kharfan-Dabaja, M.A. (2014). Extracorporeal Photopheresis in Steroid-Refractory Acute or Chronic Graft-versus-Host Disease: Results of a Systematic Review of Prospective Studies. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *20*, 1677–1686.

Adamski, J., Kinard, T., Ipe, T., and Cooling, L. (2015). Extracorporeal photopheresis for the treatment of autoimmune diseases. *Transfus. Apher. Sci.* *52*, 171–182.

Andreu, G., Leon, A., Heshmati, F., Tod, M., Menkes, C.J., Baudelot, J., and Laroche, L. (1994). Extracorporeal photochemotherapy: evaluation of two techniques and use in connective tissue disorders. *Transfus. Sci.* *15*, 443–454.

ANSES (2015). Guide de validation des méthodes d'analyses (Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail).

ANSM (2011). Compte-rendu de la Commission de Thérapie Génique et Cellulaire (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé).

ANSM (2012). Résumé des caractéristiques du produit thérapeutique annexe - Methoxsalène (8-MOP).

ANSM (2016). Produits thérapeutiques annexes - ANSM: Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.

Arai, S., Arora, M., Wang, T., Spellman, S.R., He, W., Couriel, D.R., Urbano-Ispizua, A., Cutler, C.S., Bacigalupo, A.A., Battiwalla, M., et al. (2015). Increasing Incidence of Chronic Graft-versus-Host Disease in Allogeneic Transplantation: A Report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *21*, 266–274.

Aubin, F., Salard, D., Pouthier, F., Hervé, P., and Humbert, P. (1999). La photochimiothérapie extracorporelle. *Médecine/Sciences* *15*, 983.

Bacigalupo, A., Ballen, K., Rizzo, D., Giralto, S., Lazarus, H., Ho, V., Apperley, J., Slavin, S., Pasquini, M., Sandmaier, B.M., et al. (2009). Defining the Intensity of Conditioning Regimens: Working Definitions. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *15*, 1628–1633.

Becherucci, V., Allegro, E., Brugnolo, F., Piccini, L., Gori, V., Bisin, S., Bindi, B., Ceccantini, R., Pavan, P., Cunial, V., et al. (2016). Extracorporeal photopheresis as an immunomodulatory agent: Haematocrit-dependent effects on natural killer cells: A New Suggested Immunomodulatory Effects of ECP. *J. Clin. Apheresis*.

Berger, M., Albiani, R., Sini, B., and Fagioli, F. (2015). Extracorporeal photopheresis for graft-versus-host disease: the role of patient, transplant, and classification criteria and hematologic values on outcome-results from a large single-center study: Extracorporeal Photopheresis for GVHD. *Transfusion (Paris)* *55*, 736–747.

Biagi, E., Di Biaso, I., Leoni, V., Gaipa, G., Rossi, V., Bugarin, C., Renoldi, G., Parma, M., Balduzzi, A., Perseghin, P., et al. (2007). Extracorporeal Photochemotherapy Is Accompanied by Increasing Levels of Circulating CD4+CD25+GITR+Foxp3+CD62L+ Functional Regulatory T-Cells in Patients With Graft-Versus-Host Disease: *Transplantation* *84*, 31–39.

Billingham, R.E. (1966). The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* *62*, 21–78.

- Braun, M.Y., Lowin, B., French, L., Acha-Orbea, H., and Tschopp, J. (1996). Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* *183*, 657–661.
- Brosig, A., Hähnel, V., Orsó, E., Wolff, D., Holler, E., and Ahrens, N. (2016). Technical comparison of four different extracorporeal photopheresis systems: Comparison of Four ECP Systems. *Transfusion (Paris)*.
- Bruserud, Ø., Tvedt, T.H.A., Paulsen, P.Q., Ahmed, A.B., Gedde-Dahl, T., Tjønnfjord, G.E., Slåstad, H., Heldal, D., and Reikvam, H. (2014). Extracorporeal photopheresis (photochemotherapy) in the treatment of acute and chronic graft versus host disease: immunological mechanisms and the results from clinical studies. *Cancer Immunol. Immunother.* *63*, 757–777.
- Capuano, M., Sommese, L., Pignalosa, O., Parente, D., Fabbricini, R., Nicoletti, G.F., De Pascale, M.R., Schiano, C., and Napoli, C. (2015). Current Clinical Applications of Extracorporeal Photochemotherapy: Extracorporeal Photochemotherapy. *Ther. Apher. Dial.* *19*, 103–110.
- Carlson, M.J., West, M.L., Coghill, J.M., Panoskaltis-Mortari, A., Blazar, B.R., and Serody, J.S. (2009). In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood* *113*, 1365–1374.
- Cervio, M., Scudeller, L., Viarengo, G., Del Fante, C., and Perotti, C. (2015). Quality control on mononuclear cells collected for extracorporeal photochemotherapy: comparison between two UV-A irradiation devices. *Vox Sang.* *109*, 403–405.
- COFRAC (2012). Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/ validation (portée B) des méthodes d'analyse en Biologie Médicale.
- Couriel, D.R., Hosing, C., Saliba, R., Shpall, E.J., Anderlini, P., Rhodes, B., Smith, V., Khouri, I., Giralt, S., de Lima, M., et al. (2006). Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of steroid-resistant chronic GVHD. *Blood* *107*, 3074–3080.
- Čunderlíková, B., Vasovič, V., Randeberg, L.L., Christensen, E., Warloe, T., Nesland, J.M., and Peng, Q. (2014). Modification of extracorporeal photopheresis technology with porphyrin precursors. Comparison between 8-methoxypsoralen and hexaminolevulinate in killing human T-cell lymphoma cell lines in vitro. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1840*, 2702–2708.
- Cutler, C., and Antin, J.H. (2010). Sirolimus immunosuppression for graft-versus-host disease prophylaxis and therapy: an update. *Curr. Opin. Hematol.* *17*, 500–504.
- Das-Gupta, E., Dignan, F., Shaw, B., Raj, K., Malladi, R., Gennery, A., Bonney, D., Taylor, P., and Scarisbrick, J. (2014). Extracorporeal photopheresis for treatment of adults and children with acute GVHD: UK consensus statement and review of published literature. *Bone Marrow Transplant.* *49*, 1251–1258.
- Di Biaso, I., Di Maio, L., Bugarin, C., Gaipa, G., Dander, E., Balduzzi, A., Parma, M., D'Amico, G., Perseghin, P., Biondi, A., et al. (2009). Regulatory T cells and extracorporeal photochemotherapy: correlation with clinical response and decreased frequency of proinflammatory T cells. *Transplantation* *87*, 1422–1425.
- Dignan, F.L., Clark, A., Amrolia, P., Cornish, J., Jackson, G., Mahendra, P., Scarisbrick, J.J., Taylor, P.C., Hadzic, N., Shaw, B.E., et al. (2012a). Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. *Br. J. Haematol.* *158*, 30–45.
- Dignan, F.L., Amrolia, P., Clark, A., Cornish, J., Jackson, G., Mahendra, P., Scarisbrick, J.J., Taylor, P.C., Shaw, B.E., Potter, M.N., et al. (2012b). Diagnosis and management of chronic graft-versus-host disease. *Br. J. Haematol.* *158*, 46–61.
- Dignan, F.L., Scarisbrick, J.J., Cornish, J., Clark, A., Amrolia, P., Jackson, G., Mahendra, P., Taylor, P.C., Shah, P., Lightman, S., et al. (2012c). Organ-specific management and supportive care in chronic graft-versus-host disease. *Br. J. Haematol.* *158*, 62–78.

- Dignan, F.L., Greenblatt, D., Cox, M., Cavenagh, J., Oakervee, H., Apperley, J.F., Fielding, A.K., Pagliuca, A., Mufti, G., Raj, K., et al. (2012d). Efficacy of bimonthly extracorporeal photopheresis in refractory chronic mucocutaneous GVHD. *Bone Marrow Transplant.* *47*, 824–830.
- Dojindo Annexin V, FITC Apoptosis Detection Kit | Dojindo.
- Edelson, R., Berger, C., Gasparro, F., Jegasothy, B., Heald, P., Wintroub, B., Vonderheid, E., Knobler, R., Wolff, K., Plewig, G., et al. (1987). Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma by Extracorporeal Photochemotherapy. *N. Engl. J. Med.* *316*, 297–303.
- EDF (2013). Guideline on Extracorporeal Photopheresis (European Dermatology Forum).
- EMA (2009). Public summary of opinion on orphan designation: Methoxsalen for the treatment of Graft-versus-Host-disease (European medicines agency EMA, Committee for Orphan Medicinal Product COMP).
- Evrard, B., Dosgilbert, A., Jacquemot, N., Demeocq, F., Gilles, T., Chassagne, J., Berger, M., and Tridon, A. (2010). CFSE flow cytometric quantification of lymphocytic proliferation in extracorporeal photopheresis: Use for quality control. *Transfus. Apher. Sci.* *42*, 11–19.
- Fahmy, I.R., and Abu-Shady, H. (1947). Ammi majus Linn.; pharmacognostical study and isolation of a crystalline constituent, ammoidin. *Q. J. Pharm. Pharmacol.* *20*, 281–291; discussion 426.
- Faivre, L., Lecouflet, L., Liu, W.-Q., Khadher, I., Lahaie, C., Vidal, M., Legouvello, S., Beaumont, J.-L., Bierling, P., Rouard, H., et al. (2015). Quality control of extracorporeal photochemotherapy: Proliferation assay using CFSE validated according to ISO 15189:2007 standards: CFSE PROLIFERATION AS A QUALITY CONTROL ASSAY FOR CELLULAR THERAPY PRODUCT. *Cytometry B Clin. Cytom.* *88*, 30–39.
- FDA 8-MOP - FDA prescribing information, side effects and uses.
- Ferrara, J.L., Levine, J.E., Reddy, P., and Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. *The Lancet* *373*, 1550–1561.
- Filipovich, A.H., Weisdorf, D., Pavletic, S., Socie, G., Wingard, J.R., Lee, S.J., Martin, P., Chien, J., Przepiorka, D., Couriel, D., et al. (2005). National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *11*, 945–956.
- Flinn, A.M., and Gennery, A.R. (2016). Extracorporeal photopheresis treatment of acute graft-versus-host disease following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *F1000Research* *5*.
- Flowers, M.E.D., Apperley, J.F., van Besien, K., Elmaagacli, A., Grigg, A., Reddy, V., Bacigalupo, A., Kolb, H.-J., Bouzas, L., Michallet, M., et al. (2008). A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood* *112*, 2667–2674.
- Flowers, M.E.D., Inamoto, Y., Carpenter, P.A., Lee, S.J., Kiem, H.-P., Petersdorf, E.W., Pereira, S.E., Nash, R.A., Mielcarek, M., Fero, M.L., et al. (2011). Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood* *117*, 3214–3219.
- de Fontbrune, F.S., Cavalieri, D., Leclerc, M., Beckerich, F., Maury, S., de Latour, R.P., Stéphanie, N., Bay, J.-O., and others (2016). Immunothérapie et greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques. *Bull. Cancer (Paris)* *103*, S164–S174.
- Forcade, E., Kim, H.T., Cutler, C., Wang, K., Alho, A.C., Nikiforow, S., Ho, V.T., Koreth, J., Armand, P., Alyea, E.P., et al. (2016). Circulating T follicular helper cells with increased function during chronic graft-versus-host disease. *Blood* *127*, 2489–2497.
- Funke, V.A.M., Moreira, M.C.R., and Vigorito, A.C. (2016). Acute and chronic Graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Rev. Assoc. Médica Bras.* *62*, 44–50.

- Gasparro, F.P., Dall'Amico, R., Goldminz, D., Simmons, E., and Weingold, D. (1989). Molecular aspects of extracorporeal photochemotherapy. *Yale J. Biol. Med.* *62*, 579.
- Gerber, A., Bohne, M., Rasch, J., Struy, H., Ansorge, S., and Gollnick, H. (2000). Investigation of annexin V binding to lymphocytes after extracorporeal photoimmunotherapy as an early marker of apoptosis. *Dermatol. Basel Switz.* *201*, 111–117.
- Glucksberg, H., Storb, R., Fefer, A., Buckner, C.D., Neiman, P.E., Clift, R.A., Lerner, K.G., and Thomas, E.D. (1974). Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* *18*, 295–304.
- Gorgun, G. (2002). Immunologic mechanisms of extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease. *Blood* *100*, 941–947.
- Goussetis, E., Varela, I., and Tsirigotis, P. (2012). Update on the mechanism of action and on clinical efficacy of extracorporeal photopheresis in the treatment of acute and chronic graft versus host disease in children. *Transfus. Apher. Sci.* *46*, 203–209.
- Greinix, H.T., van Besien, K., Elmaagacli, A.H., Hillen, U., Grigg, A., Knobler, R., Parenti, D., Reddy, V., Theunissen, K., Michallet, M., et al. (2011). Progressive Improvement in Cutaneous and Extracutaneous Chronic Graft-versus-Host Disease after a 24-Week Course of Extracorporeal Photopheresis—Results of a Crossover Randomized Study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *17*, 1775–1782.
- Greinix, H.T., Worel, N., Just, U., and Knobler, R. (2014). Extracorporeal photopheresis in acute and chronic graft-versus-host disease. *Transfus. Apher. Sci.* *50*, 349–357.
- Guillaume, T., Porcheron, S., Audat, F., Bancillon, N., Berceanu, A., Charbonnier, A., Dulery, R., Edy, N., El Cheikh, J., Hermet, E., et al. (2014). Recommandations de la SFGM-TC concernant l'injection prophylactique, préemptive et curative des lymphocytes du donneur (DLI) après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. *Pathol. Biol.* *62*, 193–196.
- Hackstein, H., Misterek, J., Nockher, A., Reiter, A., Bein, G., and Woessmann, W. (2009). Mini buffy coat photopheresis for children and critically ill patients with extracorporeal photopheresis contraindications. *Transfusion (Paris)* *49*, 2366–2373.
- Hackstein, H., Amoros, J.J.V., Bein, G., and Woessmann, W. (2014). Successful use of miniphotopheresis for the treatment of graft-versus-host disease: Miniphotopheresis for GVHD Treatment. *Transfusion (Paris)* *54*, 2022–2027.
- Hähnel, V., Dormann, F., Nitsopoulos, A., Friedle, A., and Ahrens, N. (2017). A method for the quantification of 8-methoxypsoralen by mass spectrometry for offline extracorporeal photopheresis. *Photochem Photobiol Sci.*
- Hannani, D. (2010). Etude des mécanismes d'action de la PhotoChimiothérapie Extracorporelle chez l'Homme. Université de Grenoble.
- Harris, A.C., Ferrara, J.L.M., and Levine, J.E. (2013). Advances in predicting acute GVHD. *Br. J. Haematol.* *160*, 288–302.
- Hart, J.W., Shiue, L.H., Shpall, E.J., and Alousi, A.M. (2013). Extracorporeal photopheresis in the treatment of graft- versus -host disease: evidence and opinion. *Ther. Adv. Hematol.* *4*, 320–334.
- HAS (2010). Rapport d'évaluation technologique : la Photochimiothérapie Extracorporelle (Haute Autorité de Santé HAS).
- HAS (2016). Commission de la transparence - Avis 29 juin 2016 - Busulfan (Haute Autorité de Santé HAS).
- Henden, A.S., and Hill, G.R. (2015). Cytokines in Graft-versus-Host Disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 4604–4612.
- Heshmati, F. (2003). Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy. *Transfus. Apher. Sci.* *29*, 61–70.

- Heshmati, F. (2008). Extracorporeal photochemotherapy & transfusion medicine (Neuilly-sur-Seine: Help medical).
- Heshmati, F. (2014). Updating ECP action mechanisms. *Transfus. Apher. Sci.* *50*, 330–339.
- Heshmati, F., and Andreu, G. (2003). Extracorporeal photochemotherapy: a historical perspective. *Transfus. Apher. Sci.* *28*, 25–34.
- Jacob, M.-C., Manches, O., Drillat, P., Richard, M.-J., Plumas, J., Chaperot, L., Hegelhofer, H., Garban, F., Gressin, R., Favrot, M., et al. (2003). Quality control for the validation of extracorporeal photopheresis process using the Vilbert-Lourmat UV-A irradiation's system. *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis* *28*, 63–70.
- Jagasia, M.H., Greinix, H.T., Arora, M., Williams, K.M., Wolff, D., Cowen, E.W., Palmer, J., Weisdorf, D., Treister, N.S., Cheng, G.-S., et al. (2015a). National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *21*, 389–401.e1.
- Jagasia, M.H., Greinix, H.T., Arora, M., Williams, K.M., Wolff, D., Cowen, E.W., Palmer, J., Weisdorf, D., Treister, N.S., Cheng, G.-S., et al. (2015b). National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *21*, 389–401.e1.
- Jamil, M.O., and Mineishi, S. (2015). State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment. *Int. J. Hematol.* *101*, 452–466.
- Jeantet (2004). Intoxication et photosensibilisation aux apiacees. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Nantes.
- Kanold, J., Messina, C., Halle, P., Locatelli, F., Lanino, E., Cesaro, S., Deméocq, F., and Paediatric Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) (2005). Update on extracorporeal photochemotherapy for graft-versus-host disease treatment. *Bone Marrow Transplant.* *35 Suppl 1*, S69-71.
- Karolak, L., Tod, M., Leon, A., Heudes, A.M., Petitjean, O., and Laroche, L. (1992). In vitro kinetics of 8-methoxypsoralen penetration into human lymphoid cells. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* *9*, 58–60.
- Keskin, A.U. (2007). Technical report: Effects of PUVA treatment on the optical properties of blood/tissue storage bags during extracorporeal photochemotherapy. *Transfus. Apher. Sci.* *37*, 139–143.
- Kitko, C.L., Levine, J.E., Storer, B.E., Chai, X., Fox, D.A., Braun, T.M., Couriel, D.R., Martin, P.J., Flowers, M.E., Hansen, J.A., et al. (2014). Plasma CXCL9 elevations correlate with chronic GVHD diagnosis. *Blood* *123*, 786–793.
- Kitko, C.L., Braun, T., Couriel, D.R., Choi, S.W., Connelly, J., Hoffmann, S., Goldstein, S., Magenau, J., Pawarode, A., Reddy, P., et al. (2016). Combination Therapy for Graft-versus-Host Disease Prophylaxis with Etanercept and Extracorporeal Photopheresis: Results of a Phase II Clinical Trial. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *22*, 862–868.
- Knobler, R., Barr, M.L., Couriel, D.R., Ferrara, J.L.M., French, L.E., Jaksch, P., Reinisch, W., Rook, A.H., Schwarz, T., and Greinix, H. (2009). Extracorporeal photopheresis: Past, present, and future. *J. Am. Acad. Dermatol.* *61*, 652–665.
- Knobler, R., Berlin, G., Calzavara-Pinton, P., Greinix, H., Jaksch, P., Laroche, L., Ludvigsson, J., Quaglino, P., Reinisch, W., Scarisbrick, J., et al. (2014). Guidelines on the use of extracorporeal photopheresis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* *28*, 1–37.
- Kuby, J., Owen, J.A., Punt, J., Stranford, S.A., Jones, P.P., and Sautès-Fridman, C. (2014). *Immunologie [le cours de Janis Kuby (Paris: Dunod)]*.
- Lamioni, A., Parisi, F., Isacchi, G., Giorda, E., Di Cesare, S., Landolfo, A., Cenci, F., Bottazzo, G.F., and Carsetti, R. (2005). The immunological effects of extracorporeal photopheresis unraveled:

- induction of tolerogenic dendritic cells in vitro and regulatory T cells in vivo. *Transplantation* 79, 846–850.
- Lee, K.H., and Garro, J. (1989). Engineering aspects of extracorporeal photochemotherapy. *Yale J. Biol. Med.* 62, 621–628.
- Lee, S.J., and Flowers, M.E.D. (2008). Recognizing and managing chronic graft-versus-host disease. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 134–141.
- Legitimo, A., Consolini, R., Failli, A., Fabiano, S., Bencivelli, W., Scatena, F., and Mosca, F. (2007). In vitro treatment of monocytes with 8-methoxypsoralen and ultraviolet A light induces dendritic cells with a tolerogenic phenotype: 8-MOP and UVA light on dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 148, 564–572.
- Lerner, A.B., Denton, C.R., and Fitzpatrick, T.B. (1953). Clinical and experimental studies with 8-methoxypsoralen in vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* 20, 299–314.
- Magro, C.L. (2015). Photophérèse extracorporelle. *Hématologie* 21, 4–9.
- Malik, M.I., Litzow, M., Hogan, W., Patnaik, M., Murad, M.H., Prokop, L.J., Winters, J.L., and Hashmi, S. (2014). Extracorporeal photopheresis for chronic graft-versus-host disease: a systematic review and meta-analysis. *Blood Res.* 49, 100.
- Manger, B., Hardy, K.J., Weiss, A., and Stobo, J.D. (1986). Differential effect of cyclosporin A on activation signaling in human T cell lines. *J. Clin. Invest.* 77, 1501–1506.
- Martin, P.J., Inamoto, Y., Carpenter, P.A., Lee, S.J., and Flowers, M.E.D. (2011). Treatment of chronic graft-versus-host disease: Past, present and future. *Korean J. Hematol.* 46, 153.
- Martin, P.J., Rizzo, J.D., Wingard, J.R., Ballen, K., Curtin, P.T., Cutler, C., Litzow, M.R., Nieto, Y., Savani, B.N., Schriber, J.R., et al. (2012). First- and Second-Line Systemic Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: Recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 18, 1150–1163.
- Mays, J., Fassil, H., Edwards, D., Pavletic, S., and Bassim, C. (2013). Oral chronic graft-versus-host disease: current pathogenesis, therapy, and research. *Oral Dis.* 19, 327–346.
- Merlin, E., Jacomet, F., D’Incan, M., Halle, P., Berger, M., Gandemer, V., Pigué, C., Souteyrand, P., Deméocq, F., and Kanold, J. (2011). Use of cryopreserved autologous cells for extracorporeal photochemotherapy: clinical applications: ECP WITH CRYOPRESERVED MNCs. *Transfusion (Paris)* 51, 1296–1299.
- Min, C.-K. (2011). The pathophysiology of chronic graft-versus-host disease: the unveiling of an enigma. *Korean J. Hematol.* 46, 80.
- Miyakira, A. (2012). Types of immune cells present in human PBMC.
- Monem El Mofty, A. (1948). A preliminary clinical report on the treatment of leucoderma with *Ammi majus* Linn. *J. Egypt. Med. Assoc.* 31, 651–665.
- Nakasone, H., Sahaf, B., and Miklos, D.B. (2015). Therapeutic benefits targeting B-cells in chronic graft-versus-host disease. *Int. J. Hematol.* 101, 438–451.
- Nash, R.A., Johnston, L., Parker, P., McCune, J.S., Storer, B., Slattery, J.T., Furlong, T., Anasetti, C., Appelbaum, F.R., Lloid, M.E., et al. (2005). A phase I/II study of mycophenolate mofetil in combination with cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after myeloablative conditioning and allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 11, 495–505.
- Nishimori, H., Maeda, Y., Teshima, T., Sugiyama, H., Kobayashi, K., Yamasuji, Y., Kadohisa, S., Uryu, H., Takeuchi, K., Tanaka, T., et al. (2012). Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17. *Blood* 119, 285–295.
- Paczesny, S., Hakim, F.T., Pidala, J., Cooke, K.R., Lathrop, J., Griffith, L.M., Hansen, J., Jagasia, M., Miklos, D., Pavletic, S., et al. (2015). National Institutes of Health Consensus Development Project on

- Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: III. The 2014 Biomarker Working Group Report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 21, 780–792.
- Parrish, J.A., Fitzpatrick, T.B., Tanenbaum, L., and Pathak, M.A. (1974). Photochemotherapy of Psoriasis with Oral Methoxsalen and Longwave Ultraviolet Light. *N. Engl. J. Med.* 291, 1207–1211.
- Perseghin, P. (2007). Extracorporeal Photochemotherapy as a Challenging Treatment for Cutaneous T-Cell Lymphoma, Acute and Chronic Graft-versus-Host Disease, Organ Rejection and T-Lymphocyte-Mediated Autoimmune Diseases. *Transfus. Med. Hemotherapy* 35, 8–17.
- Perseghin, P., Galimberti, S., Balduzzi, A., Bonanomi, S., Baldini, V., Rovelli, A., Dassi, M., Rambaldi, A., Castagna, L., Corti, P., et al. (2007). Extracorporeal Photochemotherapy for the Treatment of Chronic Graft-Versus-Host Disease: Trend for a Possible Cell Dose-Related Effect? *Ther. Apher. Dial.* 11, 85–93.
- Pierelli, L., Perseghin, P., Marchetti, M., Messina, C., Perotti, C., Mazzoni, A., Bacigalupo, A., Locatelli, F., Carlier, P., Bosi, A., et al. (2013). Extracorporeal photopheresis for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease in adults and children: best practice recommendations from an Italian Society of Hemapheresis and Cell Manipulation (SIdEM) and Italian Group for Bone Marrow Tra: Recommendations for ECP in GVHD. *Transfusion (Paris)* n/a-n/a.
- Pochon, C., Reppel, L., Halle, P., Zang, A., Clément, L., Michel, D., Perrot, A., Roth-Guépin, G., Detrait, M., Kanold, J., et al. (2016). Cryopreservation as a way to maintain extracorporeal photopheresis regimen for GvHD treatment while circumventing patient temporary inability to undergo apheresis. *Bone Marrow Transplant.*
- Presland, R.B. (2016). Biology of chronic graft- vs -host disease: Immune mechanisms and progress in biomarker discovery. *World J. Transplant.* 6, 608.
- Przepiorka, D., Weisdorf, D., Martin, P., Klingemann, H.G., Beatty, P., Hows, J., and Thomas, E.D. (1995). 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* 15, 825–828.
- Qian, L., Wu, Z., and Shen, J. (2013). Advances in the treatment of acute graft-versus-host disease. *J. Cell. Mol. Med.* 17, 966–975.
- Radwanski, K., Heber, C., and Min, K. (2015). Cryopreserved ECP-treated lymphocytes maintain apoptotic response and anti-proliferative effect: Cryopreservation of ECP-Treated MNCs. *J. Clin. Apheresis* 30, 154–161.
- Ram, R., and Storb, R. (2013). Pharmacologic prophylaxis regimens for acute graft-versus-host disease: past, present and future. *Leuk. Lymphoma* 54, 1591–1601.
- Reshef, R., Luger, S.M., Hexner, E.O., Loren, A.W., Frey, N.V., Nasta, S.D., Goldstein, S.C., Stadtmauer, E.A., Smith, J., Bailey, S., et al. (2012). Blockade of Lymphocyte Chemotaxis in Visceral Graft-versus-Host Disease. *N. Engl. J. Med.* 367, 135–145.
- Robin, M., Porcher, R., de Castro, R., Fisher, G., de Latour, R.P., Ribaud, P., Petropoulou, A.D., Rocha, V., Devergie, A., Mary, J.-Y., et al. (2009). Initial Liver Involvement in Acute GVHD is Predictive for Nonrelapse Mortality: *Transplantation* 88, 1131–1136.
- Rowlings, P.A., Przepiorka, D., Klein, J.P., Gale, R.P., Passweg, J.R., Henslee-Downey, P.J., Cahn, J.Y., Calderwood, S., Gratwohl, A., Socié, G., et al. (1997). IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br. J. Haematol.* 97, 855–864.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M., and Venkatachalam, M.A. (1999). Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am. J. Med.* 107, 489–506.
- Sarantopoulos, S., Blazar, B.R., Cutler, C., and Ritz, J. (2015). B Cells in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 21, 16–23.

- Schmid, D., Grabmer, C., Streif, D., Lener, T., Schallmoser, K., and Rohde, E. (2015). T-Cell death, phosphatidylserine exposure and reduced proliferation rate to validate extracorporeal photochemotherapy. *Vox Sang.* *108*, 82–88.
- Schmitt, S., Johnson, T.S., Karakhanova, S., Näher, H., Mahnke, K., and Enk, A.H. (2009). Extracorporeal Photopheresis Augments Function of CD4+CD25+FoxP3+ Regulatory T Cells by Triggering Adenosine Production: *Transplantation* *88*, 411–416.
- Schneider, U., Schwenk, H.-U., and Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* *19*, 621–626.
- Schwartz, K. (2011). Séminaire INSERM. Biothérapie: les thérapies cellulaires et géniques.
- Schwartz, J., Padmanabhan, A., Aqui, N., Balogun, R.A., Connelly-Smith, L., Delaney, M., Dunbar, N.M., Witt, V., Wu, Y., and Shaz, B.H. (2016). Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice-Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Seventh Special Issue: Therapeutic Apheresis-Guidelines 2016. *J. Clin. Apheresis* *31*, 149–338.
- Shephard, S.E., Nestle, F.O., and Panizzon, R. (1999). Pharmacokinetics of 8-methoxypsoralen during extracorporeal photopheresis. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* *15*, 64–74.
- Singh, A.K., and McGuirk, J.P. (2016). Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Historical and Scientific Overview. *Cancer Res.*
- Socié, G., and Ritz, J. (2014). Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood* *124*, 374–384.
- Sung, A.D., and Chao, N.J. (2013). Concise Review: Acute Graft-Versus-Host Disease: Immunobiology, Prevention, and Treatment. *Stem Cells Transl. Med.* *2*, 25–32.
- Taverna, F., Coluccia, P., Arienti, F., Birolini, A., Terranova, L., Mazzocchi, A., Rini, F., Mariani, L., Melani, C., and Ravagnani, F. (2015). Biological quality control for extracorporeal photochemotherapy: Assessing mononuclear cell apoptosis levels in ECP bags of chronic GvHD patients: Flow Cytometry for ECP Quality Control. *J. Clin. Apheresis* *30*, 162–170.
- Van Lint, M.T., Uderzo, C., Locasciulli, A., Majolino, I., Scimé, R., Locatelli, F., Giorgiani, G., Arcese, W., Iori, A.P., Falda, M., et al. (1998). Early treatment of acute graft-versus-host disease with high- or low-dose 6-methylprednisolone: a multicenter randomized trial from the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Blood* *92*, 2288–2293.
- Villarreal, C.D.V., Alanis, J.C.S., Pérez, J.C.J., and Candiani, J.O. (2016). Cutaneous graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplant - a review. *An. Bras. Dermatol.* *91*, 336–343.
- Wolnicka-Głubisz, A., Rijnkels, J.M., Sarna, T., and van Henegouwen, G.M.B. (2002). Apoptosis in leukocytes induced by UVA in the presence of 8-methoxypsoralen, chlorpromazine or 4, 6, 4'-trimethylangelicin. *J. Photochem. Photobiol. B* *68*, 65–72.
- Wolnicka-Głubisz, A., Rajwa, B., Dobrucki, J., Skrzeczyńska-Moncznik, J., van Henegouwen, G.B., and Sarna, T. (2005). Phototoxicity, distribution and kinetics of association of UVA-activated chlorpromazine, 8-methoxypsoralen, and 4,6,4'-trimethylangelicin in Jurkat cells. *J. Photochem. Photobiol. B* *78*, 155–164.
- Wu, X., Hu, X., and Hamblin, M.R. (2016). Ultraviolet blood irradiation: Is it time to remember “the cure that time forgot”? *J. Photochem. Photobiol. B* *157*, 89–96.
- Wysocki, C.A. (2005). Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* *105*, 4191–4199.
- Xia, C.-Q., Campbell, K.A., and Clare-Salzler, M.J. (2009). Extracorporeal photopheresis-induced immune tolerance: a focus on modulation of antigen-presenting cells and induction of regulatory T cells by apoptotic cells: *Curr. Opin. Organ Transplant.* *14*, 338–343.

Zhang, L., Chu, J., Yu, J., and Wei, W. (2016). Cellular and molecular mechanisms in graft-versus-host disease. *J. Leukoc. Biol.* 99, 279–287.

Zhang, Z., Zhang, H., Chen, R., Cheng, J., and Jin, N. (2015). Systematic review and meta-analysis of prospective studies for ECP treatment in patients with steroid-refractory acute GVHD. *Patient Prefer. Adherence* 105.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : LE 2 JUIN 2017

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par : AURELIE FERRY

Sujet : LA PHOTOPHERESE EXTRACORPORELLE (PCE)
COMME TRAITEMENT DE LA MALADIE DU GREFFON
CONTRE L'HOTE (GVHD) AIGUE ET CHRONIQUE :
ETUDE DE PERFORMANCE BIOLOGIQUE ASSOCIEE A
LA PCE EN SYSTEME DISSOCIE

Jury :

Président : Mme Danièle BENSOUSSAN, Professeur
Directeur : Mme Danièle BENSOUSSAN, Professeur
M. Bruno DELORME, Directeur R&D
Macopharma Biothérapies
Juges : Mme Marie-Thérèse RUBIO, Professeur
M. Loïc REPPPEL, Pharmacien

Vu,

Nancy, le 02 Mai 2017

Le Président du Jury

Directeurs de Thèse

Mme Danièle BENSOUSSAN

Mme Danièle BENSOUSSAN
M. Bruno DELORME



Vu et approuvé,

Nancy, le 4.05.2017

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,


Francine PAULUS



Vu,

Nancy, le

16 MAI 2017

Le Président de l'Université de Lorraine,



Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 9838

N° d'identification :

TITRE

**La photophérèse extracorporelle (PCE) comme traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) aiguë et chronique :
Etude de performances biologiques *in vitro* de la PCE en système dissocié.**

Thèse soutenue le 2 juin 2017

Par Aurélie FERRY

RESUME:

La photophérèse ou photochimiothérapie extracorporelle (PCE) est une technique de thérapie cellulaire qui a émergé dans les années 80 à la suite de résultats probants publiés par Edelson dans le traitement du lymphome cutané à cellules T. La PCE se décline en trois grandes étapes. Les leucocytes du patient sont prélevés par aphérèse et sont traités *ex vivo* par irradiation avec un rayonnement ultraviolet A (UVA), en présence d'un agent intercalant photoactivable : le 8-méthoxypsoralène (8-MOP) et, sont enfin retransfusées au patient. Cette thérapie semble être une alternative de choix dans le traitement de deuxième ligne de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD), complication majeure qui peut se développer suite à une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH). En effet, il n'existe pas actuellement de consensus sur le traitement à adopter lorsque la corticothérapie utilisée en première ligne échoue. La PCE a l'avantage de moduler la réponse immunitaire sans induire d'immunosuppression chez le patient. Un état des connaissances sur la prise en charge thérapeutique de la GVHD à la fois aiguë et chronique par la PCE a été réalisé dans la première partie de cette thèse. Dans la seconde partie, est présenté un travail expérimental visant à analyser les performances de la PCE en système dissocié par une étude *in vitro* réalisée sur un modèle cellulaire de lymphocytes T appelé JURKAT. Cette étude s'inscrit dans un projet mené par la société Macopharma Biothérapie qui a développé plusieurs produits de la technologie PCE en système dissocié. L'influence de deux paramètres, la concentration en 8-MOP et le taux d'hématocrite, a été évaluée par la mesure du pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire et du pourcentage de cellules apoptotiques. Les résultats renseignent sur l'efficacité biologique de la PCE et permettront de standardiser la méthode.

MOTS CLES : Photophérèse extracorporelle, PCE, GVHD, thérapie cellulaire, lymphocyte T, JURKAT, prolifération, apoptose, 8-méthoxypsoralène (8-MOP), irradiation UVA.

Directeurs de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
Mme Danièle BENSOUSSAN	Unité de thérapie cellulaire et Banque de Tissus (U.T.C.T), CHU de Nancy	Expérimentale	<input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique	<input type="checkbox"/>
M. Bruno DELORME	Société Macopharma Biothérapie, Mouvaux (59)	Thème	5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle