



**Analyse de la spécificité antigénique des lymphocytes T  
auto-réactifs chez des patients atteints de la maladie de  
Vogt-Koyanagi-Harada**

## **REMERCIEMENTS**

Ces quatre années passées dans le laboratoire du Pr Pierre van der Bruggen ont été une aventure à plus d'un titre. Du projet scientifique élaboré à la suite d'une rencontre improbable au bar d'un grand hôtel parisien jusqu'à sa mise en œuvre à l'occasion de mes allers et retours hebdomadaires Paris-Bruxelles, aucune des conditions requises pour un travail de thèse de sciences ne semblaient réunies.

Grâce à l'intérêt de Pierre van der Bruggen pour cette problématique issue de ma pratique clinique, à son expertise reconnue dans le domaine de la réponse immunitaire aux antigènes de mélanome, et enfin à son aide pour organiser ma venue au sein de son laboratoire, ce travail a pu déboucher sur la mise au point d'une stratégie visant à déterminer la spécificité antigénique des lymphocytes T chez des patients atteints de maladie de Vogt-Koyanagi-Harada. Pour cet accompagnement sans faille durant toutes ces années, je le remercie infiniment.

Une aventure qui m'a permis de rencontrer d'autres personnes de grande qualité. Tout d'abord, le Pr Pierre Coulie qui, par sa disponibilité et sa compétence scientifique, a contribué à trouver des solutions aux problèmes au demeurant insolubles, ce qui lui vaut mon plus profond respect.

Parmi les personnes qui m'ont permis de mener à terme ce travail, je souhaite distinguer et remercier chaleureusement Mme Claude Wildmann. Outre ses compétences techniques, elle a fait preuve de gentillesse, de patience et surtout, d'un soutien indéfectible dans les moments difficiles. Je veux également remercier de manière appuyée le Dr Didier Colau qui est un professionnel non seulement rigoureux et compétent mais également doué d'une grande qualité d'écoute. Mme Nathalie Krack a également contribué au succès de ce travail en me faisant bénéficier de ses précieuses compétences administratives lors de la soumission des manuscrits. Je l'en remercie vivement.

Une aventure qui m'a également permis de découvrir les compétences et qualités humaines de mes collègues doctorants et post-doctorants : Mr Grégoire Wrieers, Mme Nathalie Demotte, M<sup>elle</sup> Violaine François et Mr Pedro Alves. Je les en remercie très amicalement.

Je remercie les patients et mes collègues ophtalmologistes qui m'ont aidé à leur recrutement, en particulier le Pr Antoine Brézin, sans lesquels rien n'aurait été possible.

Je tiens à remercier le Pr Jeffrey Salama pour m'avoir fait bénéficier de ses connaissances encyclopédiques en anatomie du système nerveux central ainsi qu'Angèle Travadel pour la réalisation de schémas d'anatomie de grande qualité.

Je remercie les institutions qui ont rendu possible ce travail de recherche en le soutenant financièrement, l'Institut Servier, 164 avenue Achille Peretti, 92578 Neuilly-sur-Seine Cedex, et la Société Française de Médecine Interne (SNFMI).

J'ai évidemment une pensée pour mon épouse et mes deux filles qui ont vécu au rythme de mes allers et retours durant ces quatre années. Je les remercie de leur patience et de leur confiance qui m'ont aidé à avancer dans les moments de doute.

Enfin, je terminerai ces remerciements en m'adressant à ceux qui m'ont encouragé à développer cette thématique scientifique le Pr Didier Sicard et surtout, le Pr Robin Dhote. Ce dernier, en me déchargeant du travail clinique, m'a permis de me rendre chaque semaine à Bruxelles afin d'y accomplir les travaux de laboratoire qui vont être exposés dans cette thèse.

## **NOMENCLATURE ET ABREVIATIONS**

**TCO:** Tomographie en Cohérence Optique

**COS-7:** Lignée cellulaire établie à partir de fibroblastes rénaux de singe *Cercopithecus aethiops* transformés par le virus simien SV-40

**LG2-EBV:** Lymphocytes B issus du patient LG2 immortalisés par le virus Epstein-Barr

**CMSP:** Cellule Mononuclée du Sang Périphérique

**CD:** Cellule Dendritique

**Th:** Lymphocyte T helper

**CDx:** Cluster de Différentiation lymphocytaire numéro X

**HLA:** Human Leucocyte Antigen

**B7:** Molécule de costimulation lymphocytaire B7

**IL-X:** Interleukine numéro X

**TNF:** Tumor Necrosis Factor

**INF:** Interféron

**GM-CSF:** Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

**PHA:** Phytohémagglutinine

**TRP1 (Tyrp1):** Tyrosinase-related 1 protein

**TRP2 (Tyrp2) :** Tyrosinase-related 2 protein

**GST:** Glutathion-S-Transférase

# TABLE DES MATIERES

## INTRODUCTION

<b>1. Description de la maladie de VKH</b> .....	p7
1.1 Historique.....	p7
1.2 Caractéristiques cliniques au cours de l'évolution .....	p7
1.3 Caractéristiques paracliniques au cours de l'évolution.....	p8
1.4 Critères diagnostiques révisés.....	p9
<b>2. Rapports anatomiques entre les organes cibles</b> .....	p10
<b>3. La maladie de VKH, une pathologie auto-immune</b> .....	p14
3.1 Arguments histopathologiques.....	p14
3.2 Rôle des cellules T CD4.....	p14
3.3 Immunogénétique.....	p16
<b>4. Une auto-immunité dirigée contre les mélanocytes</b> .....	p17
4.1 Le mélanocyte, seule cellule commune aux 4 organes cibles.....	p17
4.2 Le mélanocyte, cible du système immunitaire des patients VKH.....	p20
<b>5. Présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD4</b> .....	p24
5.1 Rôle de la molécule HLA.....	p24
5.2 Caractéristiques des peptides présentés par les molécules HLA classe II.....	p25
5.3 Rôle du lymphocyte T CD4.....	p25
5.4 Les cellules présentatrices d'antigènes.....	p27

## OBJECTIFS DU TRAVAIL

## RESULTATS

<b>1. Tentatives d'isolement de lymphocytes T auto-réactifs</b> .....	p33
1.1 Patiente (n°1) en phase chronique de la maladie de VKH et tri à partir du sang.....	p33
1.2 Patiente (n°2) en phase aigüe et tri à partir du sang.....	p47
1.3 Patiente (n°3) en phase aigüe et tri à partir du liquide cébrospinal.....	p51
<b>2. Analyse de la spécificité antigénique de 107 clones isolés du liquide cébrospinal</b> .....	p60
2.1 Une approche basée sur l'utilisation de protéines produites dans des bactéries recombinantes.....	p60
2.2 Criblage de clones en utilisant le marqueur d'activation CD137.....	p69

2.3 Criblage de clones en utilisant la sécrétion de cytokines comme signe d'activation.. p70

## **DISCUSSION ET CONCLUSIONS**

<b>1. Quels sont les arguments en faveur de l'intervention d'antigènes mélanocytaires durant la phase aiguë de la maladie ?</b> .....	p76
1.1 Arguments histologiques.....	p76
1.2 Arguments immunologiques.....	p77
1.3 Limites des résultats publiés.....	p78
<b>2. Quels sont les arguments en faveur de l'intervention d'antigènes non mélanocytaires à la phase aiguë ?</b> .....	p81
2.1 Arguments cliniques.....	p81
2.2 Arguments histologiques.....	p81
2.3 Arguments immunologiques.....	p82
<b>3. Comment interviendraient les auto-antigènes à la phase aiguë ?</b> .....	p83
<b>4. Quel pourrait être le rôle des lymphocytes Th17 ?</b> .....	p85
<b>5. Que peut-on conclure de notre analyse des cellules du liquide cérebrospinal d'un patient VKH en phase aiguë ?</b> .....	p86
<b>6. Peut-on approfondir notre analyse ?</b> .....	p89
6.1 Amélioration de la qualité du milieu biologique recueilli.....	p89
6.2 Amélioration de la présentation antigénique.....	p89
6.3 Analyse d'un patient porteur de l'allèle de susceptibilité HLA-DRB1*0405.....	p90
<b>7. Notre approche expérimentale pourrait-elle être appliquée à d'autres maladies auto-immunes ?</b> .....	p90
7.1 Quels antigènes candidats utiliser.....	p91
7.2 Clonage des cellules T enrichies en cellules auto-réactives.....	p91
7.3 Exemple d'application au diabète de type 1.....	p92
7.4 Proposition d'une stratégie d'immunosuppression en auto-immunité.....	p93

## **PATIENTS ET METHODES**

<b>1. Patients VKH</b> .....	p95
<b>2. Cellules et milieux de culture</b> .....	p95
2.1 Cellules issues du sang périphérique.....	p95

2.2 Lignées de mélanomes.....	p97
<b>3. Clonage des lymphocytes T.....</b>	<b>p97</b>
3.1 Après tri cellulaire par FACS.....	p97
3.2 Directement par dilution limite d'un liquide biologique.....	p99
<b>4. Stimulation des lymphocytes T CD4.....</b>	<b>p99</b>
4.1 Lysats cellulaires .....	p99
4.2 Bactéries recombinantes exprimant les protéines mélanocytaires d'intérêt.....	p101
<b>5. Mesure de l'activation des clones de lymphocytes T CD4.....</b>	<b>p104</b>
5.1 Mesure de la production d'INF- $\gamma$ .....	p104
5.2 Mesure de l'expression des molécules d'activation CD25, CD137.....	p105
5.3 Mesure simultanée de plusieurs cytokines.....	p105

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### ANNEXES

<b>1. Annexe 1.....</b>	<b>p114</b>
<b>2. Annexe 2.....</b>	<b>p115</b>
<b>3. Annexe 3.....</b>	<b>p116</b>
<b>4. Annexe 4.....</b>	<b>p122</b>

# **INTRODUCTION**

La maladie de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) est une maladie multisystémique qui affecte les structures pigmentées, comme l'œil, l'oreille interne, les méninges et la peau [1]. Il s'agit d'une affection inflammatoire de nature auto-immune au cours de laquelle les mélanocytes seraient la cible des cellules du système immunitaire chez des individus génétiquement prédisposés. La maladie de VKH est l'une des causes les plus fréquentes d'uvéites chez les asiatiques et les amérindiens ou encore chez les populations du pourtour méditerranéen. Les premières descriptions de la maladie semblent remonter à l'antiquité. Il faudra cependant attendre le 20<sup>ème</sup> siècle pour que l'ensemble des lésions dépigmentées survenant au cours du temps soit reconnues comme relevant d'un processus unique et regroupées en une seule et même entité.

## **1. DESCRIPTION DE LA MALADIE DE VKH**

### **1.1 Historique**

Les premières descriptions d'une maladie associant inflammation oculaire et dépigmentation cutanée ont été réalisées par les médecins arabes Ali-Ibn-Isa et Mohammad-al-Ghâfiqi aux X<sup>ème</sup> et XII<sup>ème</sup> siècles [2,3]. La dénomination de la maladie est liée à la description par Alfred Vogt en 1906 d'une poliose (blanchiment localisé des cheveux et cils) associée à une inflammation intra-oculaire, par Einosuke Harada en 1926 de cas d'uvéite postérieure avec décollements de rétine exsudatifs et méningite lymphocytaire, et par Yoshizo Koyanagi en 1929 de patients ayant une dépigmentation de la peau et des phanères, associée à des plaques d'alopécie, une hypoacousie et des acouphènes [4-6]. Ce n'est qu'à partir des années 1930 que l'on parlera d'une seule et même entité regroupant l'ensemble des manifestations dominées par la dépigmentation, le syndrome de Vogt-Koyanagi-Harada [7].

### **1.2 Caractéristiques cliniques au cours de l'évolution**

Les manifestations de la maladie de VKH surviennent selon trois phases [8].

- La phase prodromique précédant de quelques jours l'inflammation oculaire. Elle peut mimer une infection virale en s'accompagnant de manifestations neurologiques (méningisme, hyperesthésie cutanée) et auditives (accouphènes, vertiges).

- La phase aiguë où prédomine une choroïdite caractérisée par des décollements séreux rétiniens et l'œdème papillaire, parfois associée à une méningite lymphocytaire aseptique et à une surdité de perception affectant les fréquences supérieures à 4 kHz. Elle peut durer plusieurs semaines avant d'être suivie par une phase de convalescence.

- C'est lors du passage à la chronicité qu'intervient inconstamment la dépigmentation du fond d'œil (signe du sunset glow fundus ou fond d'œil en « lueur de coucher de soleil ») et du limbe (signe de Sugiura). Lorsque la dépigmentation extra-oculaire survient à ce stade, elle concerne la peau (plaques de vitiligo) et les phanères (poliose). Un parallèle entre la dépigmentation du fond d'œil et le vitiligo est habituellement fait par les auteurs.

Certains patients entrent dans la phase chronique alors que la maladie continue d'évoluer sous la forme d'épisodes itératifs d'uvéite antérieure. Classiquement, il s'agit de poussées inflammatoires d'allure granulomateuse au sein du segment antérieur de l'œil qui évoluent indépendamment des manifestations du segment postérieur.

### **1.3 Caractéristiques paracliniques au cours de l'évolution**

Les examens complémentaires utiles au diagnostic et au suivi de la maladie sont principalement - l'angiographie à la fluorescéine, examen des vaisseaux du fond d'œil qui après injection de fluorescéine permet de mettre en évidence des anomalies spécifiques de perfusion rétinienne et de diffusion de la substance fluorescente - l'échographie oculaire qui peut être utile en cas de fond d'œil inaccessible pour éliminer d'autres pathologies à l'origine de l'épaississement de la choroïde - enfin, la tomographie en cohérence optique (TCO) permettant de quantifier les décollements séreux rétiniens, notamment au cours du suivi de la maladie [7].

A la phase aiguë de la maladie, en cas de doute à l'examen du fond d'œil, l'angiographie à la fluorescéine met typiquement en évidence des zones de retard de perfusion choroïdienne, et/ou de fuite capillaire en « tête d'épingle » de la fluorescéine, voire d'hyperfluorescence en plaques, et/ou une hyperfluorescence de la papille. L'échographie permet de visualiser un épaissement diffus de la choroïde tout en excluant une inflammation de la sclère à la partie postérieure de l'œil. Enfin, la TCO permet de localiser la zone de décollement au pôle postérieur et de quantifier son importance [7].

A la phase chronique, en l'absence de signe clinique de dépigmentation du fond d'œil, l'angiographie permet de visualiser les migrations diffuses de pigment au niveau de l'épithélium pigmentaire. Cela donne un aspect mité, avec de nombreuses zones hyperfluorescentes correspondant à un effet « fenêtre » lié aux pertes de pigmentation de l'épithélium pigmentaire. Enfin, la TCO sert le plus souvent à ce stade à évaluer la ré-application de la rétine sur la choroïde et donc l'efficacité du traitement [7].

#### **1.4 Critères diagnostiques révisés**

Les critères proposés dans le passé ont été progressivement remplacés par le comité de la nomenclature internationale des critères diagnostiques révisés [9] (voir ANNEXE 1). Ces derniers incluent les manifestations oculaires et extra-ophtalmologiques correspondant aux différents stades de la maladie, tout en intégrant des paramètres paracliniques issus des explorations exposées ci-dessus. Contrairement aux critères historiques, ils permettent de distinguer les patients n'ayant eu que des manifestations extra-ophtalmologiques précoces (VKH dit incomplets) de ceux qui au stade chronique de l'uvéïte ont également développé les signes de dépigmentation de la peau et des phanères (VKH dit complets). Enfin, ils distinguent des malades qui en l'absence de manifestations extra-ophtalmologiques auraient une maladie de VKH dite possible. Ces critères révisés appliqués aux cohortes de patients

européens mettent en lumière la faible représentation des formes complètes, probablement du fait de la mise en route précoce du traitement immunosuppresseur qui freine l'évolution de la maladie [10].

## **2. RAPPORTS ANATOMIQUES ENTRE LES ORGANES CIBLES**

Les organes atteints durant la phase aiguë de la maladie de VKH, à savoir l'œil et l'oreille interne, sont étroitement mis en relation par le biais du liquide cébrospinal (LCS) (Fig.1, Fig.2).

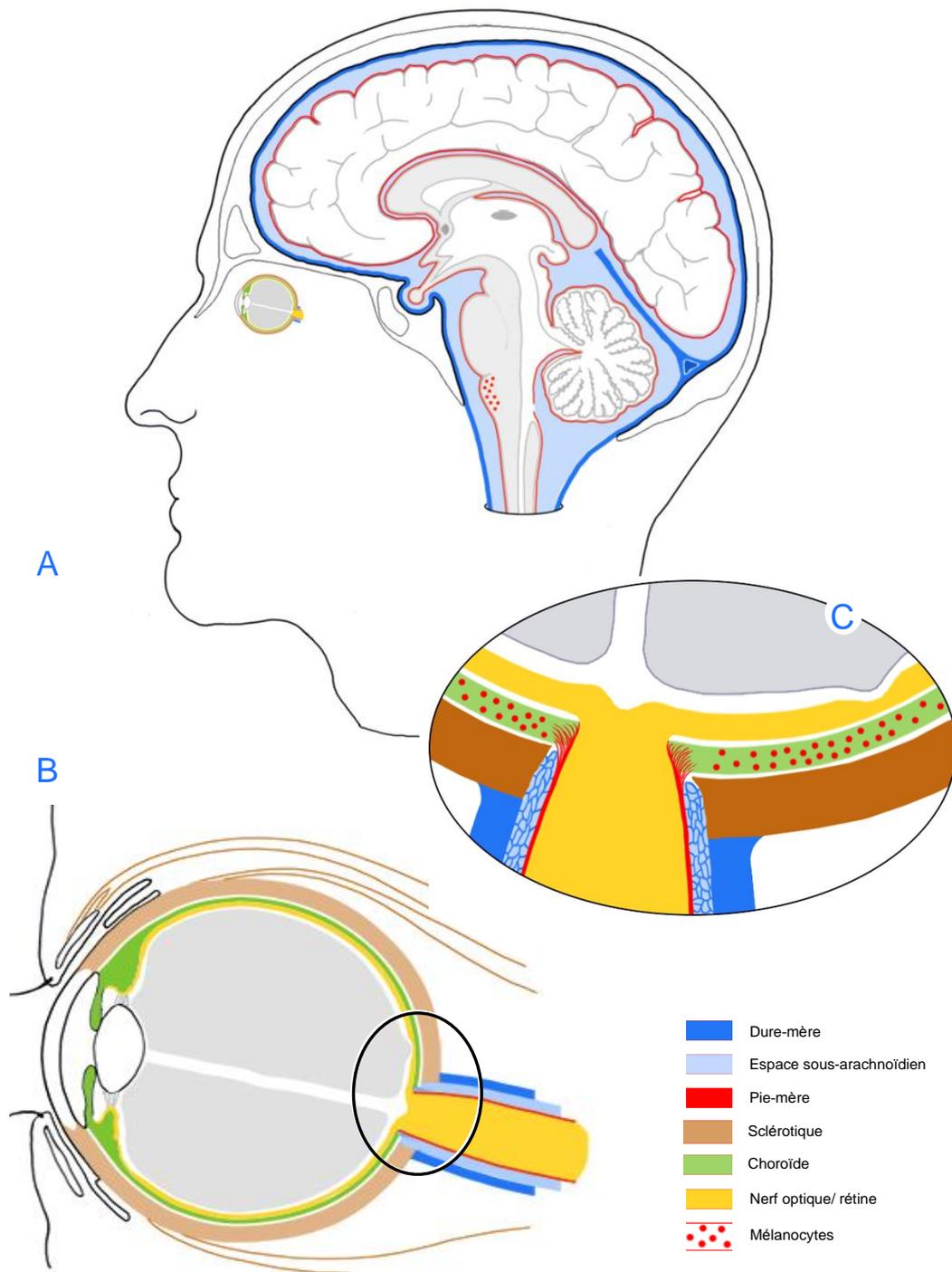
Produit au niveau des plexus choroïdes, le LCS circule à l'intérieur du cerveau grâce au système ventriculaire et à l'extérieur du système nerveux central dans un espace dit « sous-arachnoïdien » (Fig.1A). Ce dernier est un espace compris entre les deux tuniques les plus internes des enveloppes méningées ; d'une part, l'arachnoïde située en dedans de la dure-mère et d'autre part, la pie-mère, fine membrane au contact du système nerveux central. Les méninges protègent le système nerveux central contre les chocs et interviennent dans les échanges entre les vaisseaux et le tissu cérébral.

Au niveau de la terminaison du nerf optique, les tuniques piale et sous-arachnoïdienne vont former un cul de sac limitant l'espace sous-arachnoïdien. Cependant, un certain nombre de fibres de la pie-mère, les plus internes, entrent à ce niveau en contact avec la choroïde de l'œil et donnent une solution de continuité avec l'espace sous-arachnoïdien où circule le LCS (Fig.1B, Fig.1C) [11].

Les rapports entre les méninges et l'oreille interne sont intimes (Fig.2A). Schématiquement, l'oreille interne est constituée du labyrinthe membraneux situé à l'intérieur du labyrinthe osseux creusé dans le massif pétreux. Le labyrinthe membraneux comprend des structures neurosensorielles dédiées à l'équilibre (utricule, saccule, canaux semi circulaires) et à l'audition (cochlée et organe de Corti). Il s'insère en plusieurs endroits sur le labyrinthe

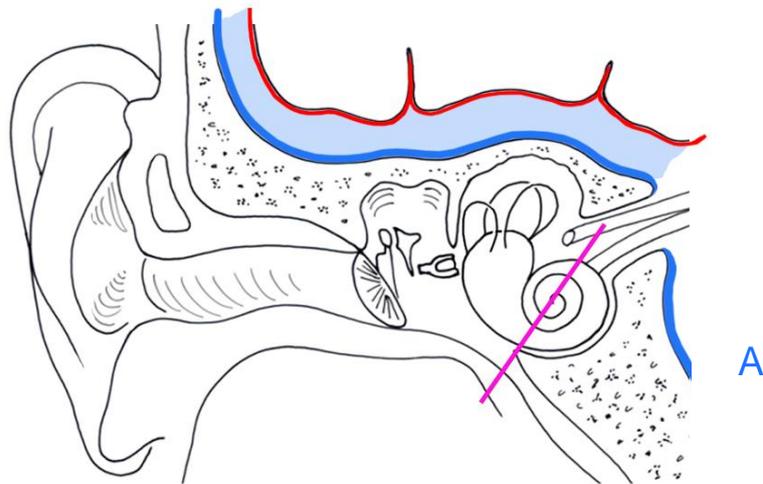
osseux et forme de cette manière une cavité close contenant un liquide appelé endolymphe. Le labyrinthe membraneux reste séparé du labyrinthe osseux dans sa plus grande partie par un espace rempli d'un liquide appelé périlymphe. Alors que cet espace communique directement avec l'espace sous-arachnoïdien via le canal périlymphatique, l'espace clos formé par le labyrinthe membraneux se prolonge par le canal endolymphatique jusque dans la dure-mère où il se termine en cul de sac (Fig.2B) [12]. Ainsi, les voies de circulation de la lymphe au sein de l'oreille interne établissent des solutions de continuité entre oreille interne et méninges [13]. Ces rapports anatomiques entre choroïde et oreille interne via les méninges permettront de mieux de comprendre comment se propage l'inflammation d'un organe cible à l'autre lors de la phase aiguë de la maladie de VKH.

**Figure 1. Rapports anatomiques entre méninges et choroïde**

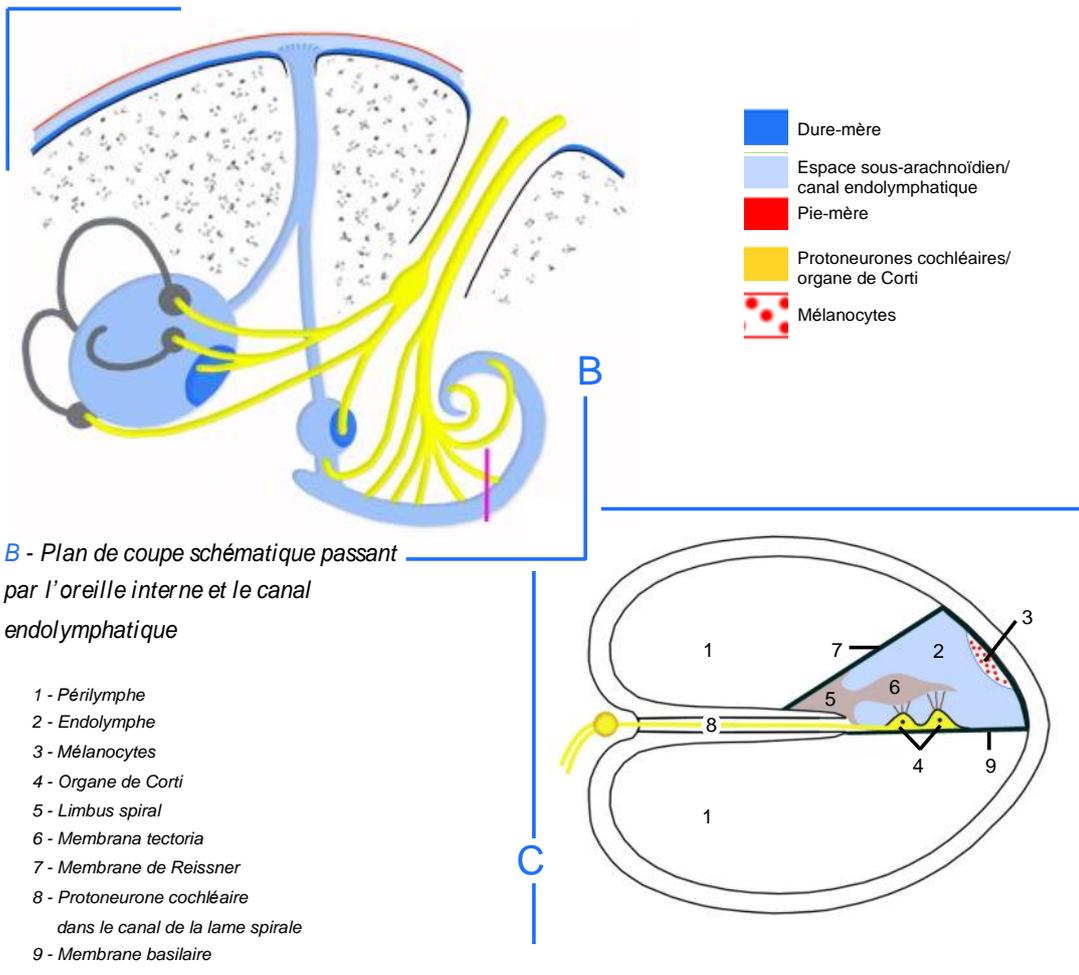


*A - Coupe sagittale du système nerveux passant par l'œil. Mélanocytes au sein des méninges recouvrant les surfaces ventro-latérales de la médulla oblongata. B - Coupe sagittale de l'œil. C - Solution de continuité entre gaines du nerf optique et tuniques de l'œil. Mélanocytes au sein de la choroïde.*

**Figure 2. Rapports anatomiques entre méninges et oreille interne**



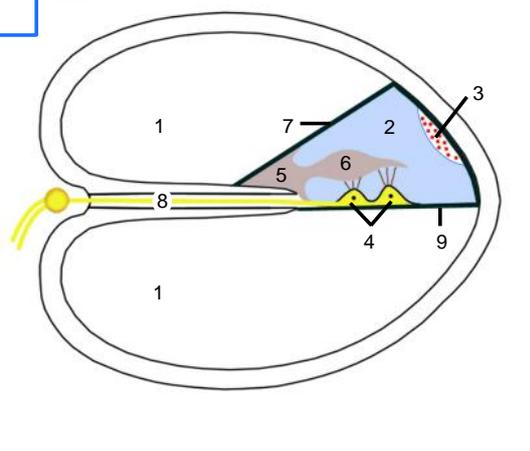
*A - Rapports entre méninges (dure-mère/ espace sous-arachnoïdien/ pie-mère) et oreille interne.*



*B - Plan de coupe schématique passant par l'oreille interne et le canal endolymphatique*

- 1 - Pérylympe
- 2 - Endolymphe
- 3 - Mélanocytes
- 4 - Organe de Corti
- 5 - Limbus spiral
- 6 - Membrana tectoria
- 7 - Membrane de Reissner
- 8 - Protoneurone cochléaire dans le canal de la lame spirale
- 9 - Membrane basilaire

- Dure-mère
- Espace sous-arachnoïdien/ canal endolymphatique
- Pie-mère
- Protoneurones cochléaires/ organe de Corti
- Mélanocytes



*C - Plan de coupe schématique passant par la cochlée et le canal cochléaire. Mélanocytes au sein de la strie vasculaire.*

### **3. LA MALADIE DE VKH, UNE PATHOLOGIE AUTO-IMMUNE**

Plusieurs arguments soutiennent l'hypothèse selon laquelle cette uvéoméningite aseptique relèverait d'un processus auto-immun.

#### **3.1 Arguments histopathologiques**

La maladie de VKH est caractérisée par une infiltration granulomateuse au sein de la choroïde [14]. Les lymphocytes T y prédominent [15,16], accompagnés de cellules épithélioïdes et occasionnellement, de cellules géantes multinuclées. Au sein des zones de vitiligo, il existe une infiltration lymphocytaire de l'épiderme, majoritairement des lymphocytes T CD4, située à proximité de la couche basale où se trouvent les mélanocytes. Cette infiltration lymphocytaire existe également autour des vaisseaux et des follicules pileux [17]. Des études immunohistochimiques de la choroïde réalisées à la phase aiguë de la maladie ont montré la présence de lymphocytes T activés exprimant le récepteur à l'IL-2, avec un ratio CD4/CD8 supérieur à celui du sang périphérique [18,19]. Au stade chronique de la maladie, l'infiltrat choroïdien serait plutôt constitué de lymphocytes T CD8 [20], de lymphocytes B, de cellules plasmocytaires et d'agrégat focal de complément [18,21]. Dans les zones de peau dépigmentée, on observe plutôt une prépondérance de lymphocytes T CD4 exprimant HLA DR [17]. Ainsi, la présence de lymphocytes T CD4 infiltrant chacun des tissus cibles plaide en faveur de leur rôle de cellules effectrices au cours de cette pathologie systémique.

#### **3.2 Rôle des cellules T CD4 effectrices**

Dans les années 1980, il a été mis en évidence dans le sang périphérique de patients VKH la présence de lymphocytes T CD4 potentiellement « capables de lyser des cellules de mélanomes humains ». En effet, le pourcentage de chrome relargué par les cellules cibles en présence de lymphocytes du sang des patients VKH était plus élevé lorsque la cible était une cellule dérivant de la lignée de mélanome humain P-36 qu'en cas de cellules de carcinome

Hela-S3 ou de cellules B-16 de mélanome murin [22]. Au début des années 1990, des études visant à caractériser les populations lymphocytaires du LCS des patients VKH ont mis en évidence des lymphocytes T avec un ratio CD4/CD8 supérieur à celui du sang [23]. Depuis lors, l'implication des cellules effectrices T CD4 a été déterminée à l'aune de leur production de cytokines. Des taux d'INF- $\gamma$  jusqu'à 60 pg/ml ont été mesurés dans l'humeur aqueuse de patients prélevés à la phase aigüe, ce qui est bien supérieur aux taux d'environ 2 pg/ml mesurés chez des patients souffrant de cataracte ( $1,8\pm 4$  pg/ml) [24].

Chez les patients VKH, après une stimulation *ex-vivo* par anticorps anti-CD3, des lymphocytes T CD4 du sang sécrétaient significativement plus d'INF- $\gamma$  et d'IL-2 que les cellules obtenues chez les sujets contrôles alors que la production d'IL-4 était comparable dans les deux groupes [25]. Les lymphocytes T sécréteurs d'INF- $\gamma$  (dits Th1) ont classiquement des fonctions différentes de ceux sécrétant de l'IL-4 (dits Th2) en matière de défense contre les agents infectieux. En effet, les Th1 aident à augmenter la bactéricidie des macrophages ou à stimuler les lymphocytes B impliqués dans la production d'anticorps dirigés contre les bactéries extracellulaires tandis que les Th2 aident à la production d'anticorps dirigés contre les parasites.

Par ailleurs, il a été isolé dans le sang de patients VKH ayant une uvéite active des lymphocytes T CD4 produisant significativement plus d'IL-17 après stimulation par de l'IL-23 que ceux prélevés chez des patients ayant une uvéite quiescente. Ainsi, ces lymphocytes T CD4 producteurs d'IL-17 mais également de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  ou l'IL-6, contribueraient au développement de l'inflammation oculaire chez les patients VKH [26,27]. D'une façon générale, ces lymphocytes dits Th17 interviennent précocement dans la défense contre les infections à germes extracellulaires afin de recruter des polynucléaires neutrophiles sur le site de l'infection et de limiter ainsi sa propagation [28].

Quel que soit le profil de sécrétion cytokinique, Th1 ou Th17, ces données attribuent un rôle prépondérant aux lymphocytes T CD4 dans la pathogénèse de la maladie de VKH.

### **3.3 Immunogénétique**

La maladie de VKH survient sur un fond génétique faisant intervenir les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. La forte association dans la population japonaise de la maladie avec HLA-DR4/DR53 est connue depuis longtemps [29]. Dans les études initiales utilisant des méthodes sérologiques de typage HLA, le risque relatif (RR) de développer la maladie s'élevait jusqu'à 125 ( $p < 10^{-7}$ ) en cas de séropositivité contre HLA-DR4 et à 53 ( $p < 10^{-7}$ ) pour HLA-DR53 [30]. Une association, bien que moins forte, a également été constatée chez les patients chinois, nord-américains, et hispaniques [31]. Parmi les sous-types d'HLA-DR4, actuellement HLA-DRB1\*04, l'analyse génétique a permis de déterminer que l'allèle HLA-DRB\*04:05 est le plus fréquemment retrouvé chez les patients atteints de maladie de VKH. L'HLA-DRB1\*04:05 est l'allèle de susceptibilité prédominant chez les patients brésiliens, une population ethniquement hétérogène (RR à 11,8;  $p: 4.10^{-7}$ ) [32]. Dans cette population, les lymphocytes des patients porteurs de HLA-DRB1\*04:05 reconnaîtraient un plus grand répertoire de peptides dérivés de protéines de différenciation mélanocytaire. En effet, les globules blancs issus du sang périphérique de patients HLA-DRB1\*04:05 seraient capables de proliférer en présence d'un plus grand nombre de peptides issus de ces protéines, à la concentration d'1  $\mu\text{M}$ , comparé aux lymphocytes des sujets contrôles partageant le même HLA de classe II (17/28 vs 8/28 ;  $p: 0,031$ ) et ce, contrairement aux globules blancs provenant du sang de patients HLA-DRB1\*15 (16/28 vs 25/28 ;  $p: 0,014$ ) [33].

Une association secondaire de la maladie de VKH avec HLA-DR1 a également été décrite chez les hispaniques du sud de la Californie (RR: 4,11;  $p: 6.10^{-4}$ ), suggérant que la maladie de VKH et la polyarthrite rhumatoïde survenaient sur un fond génétique commun [34]. Le risque

de développer la maladie chez les indiens Mestizos a été décrit comme 4,6 fois plus grand chez les individus HLA-DRB1\*01:02 ( $p: 0,01$ ) [35]. D'autres allèles HLA-DRB1 semblent être fréquemment rencontrés chez les malades non asiatiques comme HLA-DRB1\*15 chez les patients brésiliens, sans que leur lien avec la maladie ait été mesuré statistiquement [33].

Il semble qu'il y ait également une association entre la maladie de VKH et HLA-DQ. En effet, il a été montré que le risque relatif de développer la maladie était de 11,6 ( $p < 10^{-5}$ ) et de 18,9 ( $p < 10^{-6}$ ) dans les populations japonaise et coréenne en cas de portage d'HLA-DQ4 [36,37]. Cette prédisposition génétique n'a cependant jamais été mise en évidence dans les études menées en dehors des populations asiatiques [32,35]. Quoiqu'il en soit, l'allèle HLA de classe II conférant le risque le plus élevé de développer la maladie de VKH demeure l'HLA-DRB1\*04:05, et ceci reste vrai pour des populations ethniquement différentes.

#### **4. UNE AUTO-IMMUNITE DIRIGEE CONTRE LES MELANOCYTES**

La dépigmentation de la choroïde et de la peau a été la première preuve de l'implication des mélanocytes dans la pathogenèse de la maladie de VKH, ce qui est d'ailleurs soutenu par les résultats des études anatomopathologiques.

##### **4.1 Le mélanocyte, cellule commune aux 4 organes cibles**

Un mélanocyte est une cellule pigmentée dont la fonction est de produire la mélanine. Le système pigmentaire humain se développe durant les 2 premiers mois de l'embryogénèse. Les précurseurs des mélanocytes, les mélanoblastes, migrent des crêtes neurales vers les organes périphériques tels que la peau, l'oreille interne (Fig.2C), l'uvée (Fig.1C) et les méninges (Fig.1A). Dans cette dernière localisation, les mélanocytes ont la même origine embryonnaire que les cellules constituant la pie-mère et l'arachnoïde ; elles dérivent de la portion céphalique

des crêtes neurales contrairement aux mélanocytes de la peau, de l'uvée et de l'oreille interne naissant dans la portion médullaire des crêtes neurales [38].

#### *Mélanocytes et choroïde*

Du fait de leur organisation en dendrites où se trouvent concentrés les granules de mélanine, les mélanocytes présents au sein de la choroïde (Fig.1C) peuvent se présenter en microscopie optique comme un macrophage ayant phagocyté des granules de mélanine. Cependant, ils s'en différencient en prenant spécifiquement le marquage pour la protéine S100. Le nombre de mélanocytes semble constamment diminué au sein du site inflammatoire [1]. Selon les études en microscopie électronique de transmission, les mélanocytes choroïdiens seraient au contact direct des lymphocytes [16]. Les études anatomopathologiques réalisées au stade tardif de la maladie montrent de façon remarquable la disparition des mélanocytes de la choroïde ainsi que des plages d'hypopigmentation alternant avec des plages d'hyperplasie de l'épithélium pigmentaire rétinien [18].

#### *Mélanocytes et méninges*

Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, certains auteurs avaient constaté que des cellules pigmentées se concentraient au sein des méninges recouvrant les surfaces ventro-latérales de la medulla oblongata (Fig.1A). Il faudra attendre l'ère de la microscopie électronique pour que grâce aux propriétés tinctoriales des granules de mélanine, la présence des mélanocytes soit confirmée au sein de cette partie des méninges, et de façon spécifique grâce à l'étude comparée de tissus témoins comme la plèvre et le péritoine [38]. Des observations réalisées récemment chez des malades VKH confortent ces données histologiques. Chez un malade ayant une uvéoméningite, l'imagerie par résonance magnétique a mis en évidence à la partie postérieure de l'œil et au niveau des méninges bulbaires un hypersignal en séquence T2. Ce dernier traduisait l'existence d'un processus inflammatoire au sein de structures où sont localisés les

mélanocytes [39]. La présence de macrophages contenant des pigments de mélanine a été rapportée par plusieurs auteurs au sein du LCS de patients à la phase aiguë de la maladie [40,41].

#### *Mélanocytes et oreille interne*

Les mélanocytes sont situés dans la cochlée au niveau de la strie vasculaire (Fig.2C), structure appartenant au labyrinthe membraneux de l'oreille interne. Les lésions histologiques sont très difficiles à caractériser en pathologie humaine. C'est probablement du fait d'un accès impossible ou alors, au prix de dommages irréversibles. De même, les données histologiques chez l'animal ne sont pas disponibles. Aucun modèle animal de la maladie de VKH, spontanée chez le chien Akita ou induite chez le rat Lewis, ne comporte d'atteinte cochléaire [42].

#### *Mélanocytes et peau*

En peau saine, les mélanocytes sont distribués régulièrement dans l'assise basale de l'épiderme et se localisent au niveau de l'infundibulum ainsi qu'au sommet des papilles dermiques dans les follicules pileux. Le nombre de mélanocytes est au maximum de 2000/mm<sup>3</sup> dans la peau exposée du visage et celle du scrotum ou du prépuce.

Dans les lésions de vitiligo, les mélanocytes contenant les granules de mélanine sont diminués au sein de la couche basale de l'épiderme et remplacés par les cellules de Langerhans habituellement distribuées dans les couches superficielles de l'épiderme. Contrairement à ce qui est constaté au sein de la choroïde, les contacts entre mélanocytes et lymphocytes semblent moins fréquents dans l'épiderme [1,17].

## 4.2 Le mélanocyte : cible du système immunitaire des patients VKH

### *Protéines de différenciation mélanocytaire*

Quatre gènes ont été identifiés après criblage de bibliothèques d'ADNc issus de mélanomes et exprimés dans des cellules HLA-A2, avec des lymphocytes T CD8+ restreints pour cet HLA de classe I provenant de patients atteints de mélanomes [43-49]. Parmi eux, se trouvaient trois gènes codant pour les protéines de différenciation mélanocytaire MART-1<sup>Melan-A</sup>, dénommée ci-après Melan-A [48], pMel-17<sup>gp100</sup> dénommée ci-après gp100 [49], et la tyrosinase [45]. Fait intéressant, il s'agissait de trois protéines exprimées à la fois par les cellules de mélanome, les mélanocytes ou par certaines cellules de la rétine [50]. Ces travaux ont attiré l'attention des immunologistes sur le fait que des protéines exprimées par des tissus non tumoraux étaient reconnues par le système immunitaire de patients atteints de cancers et que de ce fait, elles étaient potentiellement la cible de lymphocytes T auto-réactifs [51]. La maladie de VKH étant une maladie auto-immune affectant les organes contenant des mélanocytes, certains auteurs ont alors recherché chez les patients VKH des effecteurs cellulaires ou humoraux dont la réponse est dirigée contre ces protéines mélanocytaires.

Plus récemment, il a été observé que la vaccination anti-tumorale par les protéines tyrosinase-related 1 (Tyrp1)<sup>TRP1</sup> et tyrosinase-related 2 (Tyrp2)<sup>TRP2</sup>, autres protéines de différenciation de la famille des tyrosinases, induisaient chez la souris non seulement la destruction des cellules de mélanomes mais également celles des mélanocytes. Ces données suggéraient que la vaccination par ces protéines de différenciation mélanocytaire était capable d'induire une auto-immunité [52]. Ces protéines seront respectivement dénommées TRP1 et TRP2 ci-après.

#### ❖ Localisation et fonction des protéines de différenciation mélanocytaire

Ces protéines ont des fonctions dans le mélanocyte dédiées à la synthèse de la mélanine. Dans les cellules pigmentées, l'unité de fabrication de la mélanine est le mélanosome, organite cellulaire apparenté aux lysosomes dont il partage certaines caractéristiques: le mélanosome

possède des protéines lysosomales (protéines de la membrane du lysosome et hydrolases) et surtout, il est accessible à la voie d'endocytose. Cependant, le mélanosome a une fonction distincte de celle des lysosomes. Il serait exclusivement destiné à la synthèse de la mélanine [53].

La mélanogenèse est un processus qui dépend du stade de maturation des mélanosomes [53]. Elle débute par la formation d'organites non pigmentés ou prémélanosomes. Du fait de leurs morphologie, composition et accessibilité à la voie d'endocytose, les stades les plus précoces correspondent à des endosomes communs à la voie d'endocytose et à la biogenèse des mélanosomes [54]. La ségrégation des deux voies a lieu lors de la formation des prémélanosomes qui adoptent une forme ellipsoïdale. Cette particularité morphologique est due à la présence de fibres protéiques de nature amyloïde (en feuillets  $\beta$  plissés) qui servent de support physique à la séquestration de la mélanine [55]. Le constituant principal de ces fibres résulte du clivage de la protéine transmembranaire gp100 dans les endosomes lors du tri [56,57], ainsi que de la séquestration de gp100 au sein des endosomes précoces, précurseurs des prémélanosomes [58,59]. Les enzymes transmembranaires tyrosinase, TRP1, impliquées directement dans la synthèse de la mélanine, sont triées au sein des endosomes grâce à des systèmes de reconnaissance (complexes protéiques AP1, AP3). Elles sont ensuite transportées vers les prémélanosomes par le biais d'un adressage moléculaire, permettant ainsi la progression de ces derniers vers des stades où ils contiennent du pigment mélanique. La tyrosinase est l'enzyme clé de la synthèse de la mélanine. Elle catalyse à elle seule la formation des précurseurs de deux constituants, la phéomélanine (de couleur rouge et jaune) et l'eumélanine (de couleur noire et brune). TRP1 associée à la protéine transmembranaire TRP2, permet uniquement la synthèse de l'eumélanine [60]. Enfin, Melan-A a été identifiée comme une protéine dont des peptides sont reconnus par les lymphocytes T de patients

porteurs de mélanomes, mais sa fonction physiologique au sein des mélanosomes est encore mal comprise [53].

#### ❖ Arguments immunologiques

Les modèles animaux ou les expériences de stimulation des lymphocytes T des malades ont contribué à soutenir l'hypothèse selon laquelle ces protéines mélanocytaires seraient directement impliquées dans la pathogénèse de la maladie de VKH:

Chez le chien Akita, les manifestations survenues trois semaines après l'immunisation par un mélange de peptides dérivés de TRP1 étaient similaires à celles qui se développent spontanément : choroïdite, dépigmentation du fond d'œil, méningite et vitiligo [42]. Chez le rat Lewis, l'immunisation avec des peptides dérivés de TRP1 et TRP2, associés à de la toxine de Bordetella Pertussis, a induit au 12<sup>ème</sup> jour une inflammation prédominant dans la choroïde, caractérisée par des décollements séreux réiniens. S'y associaient dans certains cas, une méningite et une dépigmentation de la peau. Enfin, les lymphocytes sanguins proliféraient en présence des peptides ayant servi à l'immunisation [61].

Chez des patients VKH, il a été montré que des clones de lymphocytes T CD4 issus du sang de patients VKH HLA-DRB1\*04:05 proliféraient en présence de globules blancs autologues chargés avec certains peptides dérivant de TRP1 et de tyrosinase. La production d'IFN- $\gamma$  était alors augmentée au sein des surnageant de co-culture comparativement aux clones contrôles [62]. Dans une étude brésilienne, les globules blancs de patients VKH ne produisaient pas d'IL-4 en présence de peptides dérivant de TRP1, TRP2 et tyrosinase contrairement aux contrôles sains partageant avec les malades au moins un allèle HLA de classe II et ce, quel que soit l'HLA de classe II des patients. Néanmoins, les patients HLA-DRB1\*04:05 tendaient à reconnaître un plus grand répertoire de peptides [33].

Des clones de lymphocytes T CD4 issus de la chambre antérieure de l'œil de patients produisaient de l'IFN- $\gamma$  après avoir été stimulés *in vitro* par des cellules présentatrices

chargées avec un peptide particulier dérivant de gp100 ou de tyrosinase [63]. Enfin, ont également été observées chez les patients VKH des réponses T dirigées contre la protéine Melan-A. Des clones de lymphocytes T CD8 issus du liquide intra-oculaire ont été capables de lyser des cellules T2 HLA-A2 chargées avec des peptides Melan-A chez les patients VKH porteurs du même HLA, et non pas chez ceux ayant une maladie de Behçet ou infectés par HTLV-1 [64]. Plus récemment, a été rapporté le cas d'un patient atteint d'un mélanome métastatique ayant développé des manifestations de la maladie VKH après un transfert de cellules infiltrant le mélanome, préalablement amplifiées *in vitro*. Ces dernières contenaient une forte proportion de lymphocytes T CD8 reconnaissant spécifiquement un peptide dérivé de Melan-A [65].

#### *KU-MEL-1*

Au cours de la maladie de VKH, la réponse immunitaire humorale n'est pas exclusivement dirigée contre des protéines de différenciation mélanocytaire mentionnées ci-dessus. Parmi, les protéines ciblées par les anticorps présents dans le sang des patients, il en est une dont la reconnaissance antigénique semble spécifique de la maladie. Cette protéine a été identifiée après criblage par des anticorps sériques d'une librairie d'ADNc issus d'une lignée de mélanome (SK23-MEL) et de mélanocytes. KU-MEL-1, protéine dont la fonction est inconnue, est fortement exprimée dans la plupart des lignées cellulaires ou échantillons de mélanomes ainsi que dans les mélanocytes en culture, mais faiblement exprimée dans les cellules dérivées d'autres types de tumeurs. Dans une étude récente, les anticorps sériques dirigés contre KU-MEL-1 étaient significativement associés à la maladie de VKH. Ils étaient présents chez 63% des patients et seulement chez 4% des contrôles sains, 24% des patients ayant une maladie de Behçet et 30% des patients sarcoïdiens (30%) ;  $p < 0,01$ . De plus, la

présence des anticorps anti-KU-MEL-1 dans le sang des patients VKH corrélait avec la gravité de la maladie [66].

Bien que ces études aient impliqué les protéines de différenciation mélanocytaire ou KU-MEL-1 dans la pathogenèse de la maladie de VKH, aucune n'a à ce jour montré la capacité de ces protéines à stimuler spécifiquement les lymphocytes T des patients VKH.

## **5. PRESENTATION DE L'ANTIGENE AUX LYMPHOCYTES T CD4**

La présentation d'un antigène aux lymphocytes T CD4 met en jeu le système HLA (ou complexe majeur d'histocompatibilité) dont les loci codent pour des molécules HLA de classe II, glycoprotéines capables de présenter des peptides aux récepteurs des lymphocytes T CD4.

### **5.1 Rôle de la molécule HLA**

Le polymorphisme des gènes HLA a une importance critique pour la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T. Une cellule T reconnaît l'antigène en tant que peptide lié à un variant allélique particulier de la molécule HLA, et ne reconnaît pas ce même peptide quand il est lié à d'autres molécules HLA. Ce phénomène est appelé la restriction du système HLA. La plupart des molécules HLA diffèrent les unes des autres par de multiples substitutions d'acides aminés ; ces différences sont concentrées au niveau des sites de liaison au peptide et des régions adjacentes qui entrent en contact direct avec le récepteur du lymphocyte T. La molécule HLA de classe II est composée de deux glycoprotéines transmembranaires, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  constituées chacune de deux domaines de structure immunoglobulinique. Pour des raisons physicochimiques, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  ont une structure en feuilletts plissés dont l'organisation tridimensionnelle conduit à la formation d'un sillon où vont s'insérer les peptides. Dans une molécule HLA de classe II, le sillon à peptides est formé

par deux domaines appartenant à des chaînes différentes et se trouve ouvert à ses extrémités [67].

## **5.2 Caractéristiques des peptides présentés par les molécules HLA classe II**

Les peptides qui se lient aux molécules HLA de classe II ont souvent une longueur minimale de 13 acides aminés. Les résidus permettant leur ancrage au sein du sillon sont situés à des distances variables des extrémités du peptide. Les chaînes latérales de résidus peptidiques situés à l'extérieur de la zone d'ancrage trouvent leur place aux extrémités ouvertes du sillon peptidique, et de ce fait, le peptide peut se lier à la zone d'ancrage indépendamment de la longueur de ses extrémités [68].

Les peptides liés aux molécules HLA de classe II sont le plus souvent issus de la dégradation en milieu acide de protéines extracellulaires dans les lysosomes et endosomes, Cette étape de transformation de protéines natives, appelée apprêtement de l'antigène, conduit à la formation de longs peptides capables de se lier à la zone d'ancrage de la molécule HLA grâce à des résidus d'acides aminés situés au niveau de deux ou trois positions spécifiques le long de la séquence peptidique. Les peptides se liant à un variant allélique donné d'une molécule HLA de classe II partagent les mêmes résidus ou presque permettant leur ancrage sur la molécule HLA. Autrement dit, pour une protéine native donnée, les peptides reconnus par la molécule HLA vont différer d'un allèle à l'autre, principalement par la nature de leurs résidus d'ancrage [68]. Ces longs peptides ancrés par des résidus loin de leurs extrémités C et N terminales vont laisser déborder leurs extrémités du sillon de la molécule HLA de classe II. Celles-ci seront finalement raccourcies par l'action d'endopeptidases.

## **5.3 Rôle du lymphocyte T CD4**

Les lymphocytes T CD4 ne reconnaissent pas uniquement un peptide mais un peptide lié à une molécule HLA de classe II. Cette reconnaissance peptidique restreinte par les molécules

HLA de classe II se fait grâce à l'action conjointe de la molécule CD4 et du récepteur T, appelé TCR pour T cell Receptors. Le TCR est constitué de deux chaînes polypeptidiques  $\alpha:\beta$  ou  $\gamma:\delta$ , comportant chacune une région constante à son extrémité C terminale et une région variable à son extrémité amino-terminale. Résultant d'un réarrangement aléatoire dans le thymus des segments de gènes codant pour le TCR, la région variable permet la reconnaissance de peptides dérivés de la plupart des protéines de l'environnement. Plus précisément, le site de liaison à l'antigène est formé au sein de la région variable des chaînes  $\alpha:\beta$  par 3 boucles, appelées régions déterminant la complémentarité (CDR). La diversité des récepteurs des lymphocytes T est concentrée dans la boucle CDR3 situé au centre du site de liaison à l'antigène. La diversité du TCR est due à la grande variabilité de CDR3 liée au réarrangement de plusieurs segments de gènes codant le TCR. Les boucles CDR1 et CDR2 situées à la périphérie du centre de liaison montrent une moins grande variabilité et sont plutôt impliquées dans la reconnaissance de la molécule HLA de classe II [67]. En reconnaissant l'antigène, le TCR s'associe à la molécule CD4 à la surface des lymphocytes T. CD4 est une molécule monocaténaire composée de 4 domaines de type immunoglobulinique. Selon des études en cristallographie, le premier domaine du CD4 se lierait par sa face latérale au niveau du domaine  $\beta 2$  de la molécule HLA de classe II, bien éloigné du site par lequel le TCR se lie à sa cible. La présence de la molécule CD4 permettrait de diminuer de 100 fois la dose d'antigènes nécessaire pour l'activation du lymphocyte T. Ainsi, la molécule CD4 permettrait de sensibiliser le lymphocyte T à l'antigène présenté par les molécules HLA de classe II [69]. Par soucis d'exhaustivité, nous rappellerons que la molécule CD4 intervient également dans la sélection positive au sein du thymus. Nous n'irons pas plus loin au risque de dépasser le cadre de l'activation des lymphocytes T en périphérie.

#### 5.4 Les cellules présentatrices d'antigènes

Les peptides sont présentés par les molécules HLA de classe II à la surface de cellules présentatrices d'antigènes, dont la cellule dendritique (CD) est le prototype.

##### *Cellules dendritiques*

Les CD sont issues d'une lignée hématopoïétique distincte des autres catégories de globules blancs. La nature des CD dépend directement de l'influence de cytokines hématopoïétiques ayant contribué à différencier leurs précurseurs hématopoïétiques. Chez l'humain, le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), facteur de croissance hématopoïétique, permet de différencier les précurseurs hématopoïétiques et les monocytes présents dans le sang en CD destinées aux organes non lymphoïdes. Cette voie de différenciation est classiquement utilisée pour obtenir des CD dans le cadre des stratégies vaccinales chez l'homme. Le GM-CSF est souvent utilisé *in vitro* en association avec l'IL-4 afin de limiter la différenciation des monocytes en macrophages [70]. Avant de devenir des cellules professionnelles de la présentation antigénique, les CD sont une population hétérogène de cellules immatures, notamment lorsqu'elles se trouvent au sein des tissus périphériques. Leur fonction y est alors limitée à l'internalisation selon des modalités différentes des antigènes du soi et du non-soi présents dans l'environnement. Les macromolécules sont en général absorbées par endocytose grâce à différents récepteurs situés à la surface des CD, à savoir : récepteurs au fragment FC des immunoglobulines, aux fractions du complément, aux protéines de choc thermique, et récepteurs dits « scavengers » se liant aux lipoprotéines bactériennes. Les antigènes particuliers et solubles sont efficacement internalisés par phagocytose ou macropinocytose sous la forme de grandes vacuoles intracellulaires. La phagocytose est généralement médiée par un récepteur spécifique, alors que la macropinocytose est un type d'endocytose en phase fluide. La dégradation de l'antigène engagé dans la voie d'endocytose et la génération de peptides

antigéniques nécessitent l'intervention de plusieurs protéases dont les cathepsines et les endopeptidases asparaginyliées.

Les CD vont suivre un programme de développement appelé « maturation » dès lors qu'elles répondent à deux types de signaux : la reconnaissance directe des agents pathogènes (par le biais des récepteurs de reconnaissance des formes spécifiques comme les Toll-like récepteurs) et la détection indirecte de l'infection (par le biais de cytokines inflammatoires, de composés cellulaires internes, et des réponses immunitaires spécifiques en cours). En réponse à ces signaux, les CD vont modifier leur activité. D'une part, l'efficacité de l'absorption de l'antigène, de son transport intracellulaire et de sa dégradation seront diminuées.

D'autre part, le chargement des peptides sur les molécules HLA de classe II va augmenter. Peu de temps après leur synthèse dans le réticulum endoplasmique, les molécules HLA de classe II s'associent aux chaînes invariantes Ii. Les complexes HLA classe II/Ii ainsi formés passent à travers l'appareil de Golgi avant d'être transportés par voie d'endocytose sous l'influence d'un signal de transport présent dans la région cytoplasmique de la chaîne Ii. Une fois dans les endo/lysosomes, les complexes se retrouvent dans un milieu riche en protéases acides dans lequel la chaîne Ii est dégradée par plusieurs enzymes protéolytiques de la famille des cathepsines. La molécule HLA de classe II devient alors capable de lier des peptides antigéniques résultant de la dégradation préalable des protéines internalisées. Une fois chargés avec des peptides, les molécules HLA classe II atteignent la membrane cellulaire. Au cours du processus de maturation, la demi-vie du complexe HLA/peptide à la surface des CD va augmenter tout comme l'expression à leur surface de molécules de co-stimulation lymphocytaire telles que B7.1 et B7.2. Ainsi, les cellules dendritiques deviennent des CPA capables d'activer les lymphocytes T naïfs et de déclencher les réponses immunitaires adaptatives.

Par ailleurs, les CD ont également besoin de migrer hors des tissus périphériques pour atteindre les organes lymphoïdes secondaires où se fera la présentation antigénique. En même temps que les modifications de leur capacité de présentation de l'antigène, la maturation induit également l'expression de récepteurs de chimiokines et de molécules d'adhésion permettant la migration des CD, par la lymphe, vers les organes lymphoïdes secondaires [71,72].

### *Lymphocytes B*

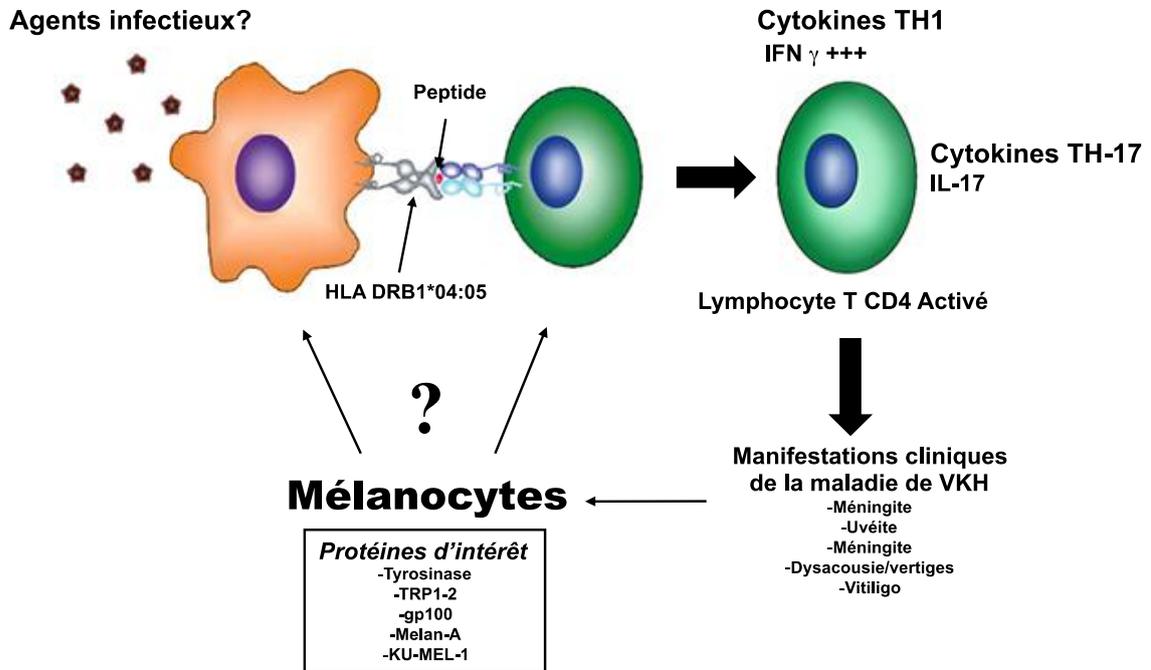
Les lymphocytes B expriment à leur surface des molécules de classe II et ont également la capacité à présenter des antigènes. A la différence de la CD, le lymphocyte B capte difficilement par pinocytose l'antigène dans les liquides extracellulaires. Il procède classiquement par endocytose, notamment en internalisant le récepteur spécifique à l'antigène appelé BCR pour B Cell Receptor. D'autres voies d'internalisation de l'antigène semblent exister au sein du lymphocyte B. En utilisant la fraction complémentaire purifiée C3dg conjuguée à une solution colloïdale d'or, l'analyse en microscopie électronique a montré que le complexe C3dg/or, tel un antigène opsonisé, se liait spécifiquement au récepteur au complément de type 2 (CR2) ou CD21 situé à la surface de cellules B lymphoblastoïdes Raji, avant de cheminer dans les différents compartiments d'endocytose. De plus, l'immunomarquage a montré que ce complexe C3dg/or colocalisait avec les molécules HLA de classe II au sein de ces compartiments [73].

Enfin cette voie d'internalisation, indépendante du BCR, semble permettre aux lymphocytes B de présenter efficacement l'antigène aux lymphocytes T CD4. En effet, plusieurs équipes ont récemment utilisé avec succès des lymphocytes B immortalisés par EBV, chargés avec des antigènes mineurs d'histocompatibilité opsonisés pour détecter des lymphocytes T CD4 spécifiques [74,75].

## **OBJECTIFS DU TRAVAIL**

La maladie de VKH est une maladie auto-immune à l'origine d'une atteinte ciblant des organes ayant en commun une catégorie de cellules, les mélanocytes. Les données publiées à ce jour ont conduit les auteurs à désigner les protéines de différenciation mélanocytaire tyrosinase, TRP1, TRP2, Melan-A, gp100 et la protéine KU-MEL-1 comme les cibles principales de la réponse immunitaire dont les effecteurs sont les lymphocytes T CD4. Ces données sont cependant, essentiellement issues d'études reposant sur la stimulation des lymphocytes T par des peptides d'intérêt. Elles ne permettent donc pas de conclure définitivement que la réponse immunitaire s'exerce contre la protéine entière dont dérivent les peptides ayant servi à stimuler les lymphocytes T. Ainsi, la question de la capacité des protéines tyrosinase, TRP-1, TRP-2, Melan-A, gp100 et de KU-MEL-1 à stimuler les lymphocytes T CD4 des patients VKH reste entière (Fig.3). L'objectif de notre travail était de déterminer la spécificité antigénique d'un grand nombre de clones de lymphocytes T CD4 obtenus à partir de liquides biologiques de patients VKH prélevés à différentes phases de la maladie.

# Spécificité antigénique des lymphocytes T CD4



**Figure 3. Rôle des protéines mélanocytaires tyrosinase, TRP-1, TRP-2, gp100, Melan-A et KU-MEL-1 dans la physiopathologie de la maladie de VKH.** Des peptides issus de chacune des protéines semblent capables de stimuler les lymphocytes T CD4 des patients VKH. Pour autant, la protéine native dont dérive les peptides peut-elle stimuler les lymphocytes des patients? Adapté de Damico FM, Bezerra FT, Silva GC et al. *New insights into Vogt–Koyanagi–Harada disease.* *Arq. Bras. Oftalmol.*, 2009, 72, 413-420.

## **RESULTATS**

L'objectif de ce travail était d'isoler des lymphocytes T CD4 auto-réactifs chez des patients VKH et de définir leur spécificité antigénique. Sur la base des données de la littérature, nous avons supposé que les lymphocytes auto-réactifs étaient spécifiques d'antigènes mélanocytaires [33, 62-64]. Pour notre première tentative, nous avons eu accès au sang d'une patiente en phase chronique de la maladie. Dans l'hypothèse où les lymphocytes auto-réactifs étaient rares dans le sang, nous avons tenté d'obtenir une fraction enrichie en lymphocytes auto-réactifs en stimulant les lymphocytes du sang avec des cellules présentatrices autologues chargées avec un lysat de mélanomes allogéniques et en triant au cytomètre en flux les lymphocytes sécrétant une cytokine. La fraction supposée enrichie sera ensuite clonée en utilisant la méthode des dilutions limites. Cette tentative a été infructueuse en ce sens qu'aucun des clones obtenus ne reconnaissait spécifiquement un antigène mélanocytaire.

Nous avons ensuite exploité un matériel biologique potentiellement plus riche en lymphocytes auto-réactifs, le sang d'une patiente en phase aiguë de la maladie, et avons recommencé cette approche de tri sélectif en modifiant légèrement le protocole de stimulation des lymphocytes avant le tri. Cette deuxième tentative fut également infructueuse. Nous avons ensuite eu accès à un prélèvement de LCS d'un patient en phase aiguë. Ce LCS contenait potentiellement une fraction importante de lymphocytes auto-réactifs et nous avons décidé de cloner directement les lymphocytes T. Les clones obtenus ont été criblés pour leur capacité à reconnaître les différentes lignées de mélanomes. Cette troisième tentative fut elle aussi infructueuse. Ce cheminement méthodologique durant l'étude des trois patients est présenté dans la première partie des résultats, intitulée « tentatives d'isolement de lymphocytes T auto-réactifs ».

Ayant à notre disposition plus de 100 clones T CD4 isolés du liquide céphalorachidien du patient VKH n°3, nous avons décidé de les tester un à un, en les stimulant avec des lymphoblastes B autologues chargés avec des bactéries recombinantes, et en mesurant la

production de cytokines de chacun des clones. Ces bactéries codaient 6 protéines mélanocytaires différentes. Dans la deuxième partie des résultats, nous décrivons la mise au point de cette approche et sa validation avec un lymphocyte T de spécificité connue et les résultats obtenus en appliquant cette approche à l'ensemble de la centaine de clones de lymphocytes T.

## **1. TENTATIVES D'ISOLEMENT DE LYMPHOCYTES T AUTO-REACTIFS**

### **1.1 Patiente (n°1) en phase chronique de la maladie et tri à partir du sang**

#### *Patiente n°1*

Il s'agissait d'une patiente âgée de 31 ans, d'origine maghrébine, HLA DRB1\*04:05, - ; DQB1\*03:02, - ; DPB1\*04:01, - dont les manifestations ophtalmologiques avaient commencé 9 ans auparavant. Elle rapportait à l'époque une baisse d'acuité auditive et visuelle, et des maux de tête qui avaient débuté 2 semaines plus tôt. La meilleure acuité visuelle corrigée correspondait à VBLM dans les deux yeux. L'examen ophtalmologique initial révélait une poussée inflammatoire dans les deux yeux avec une réaction cellulaire en chambre antérieure quantifiée à 2+ à droite et à 1+ à gauche, une inflammation du vitré à 2+ à droite et à 3+ à gauche, ainsi qu'un décollement séreux rétinien central, bilatéral. L'échographie oculaire retrouvait un épaissement pariétal choroïdien bilatéral prédominant dans le cadran supéro-temporal. A la phase initiale de la maladie de VKH, l'audiogramme documentait une surdité de perception bilatérale et la ponction lombaire, une méningite à liquide clair. Le LCR contenait 760 leucocytes/mm<sup>3</sup> (90% de lymphocytes) et 13 hématies/mm<sup>3</sup>. L'évolution sous corticostéroïdes a été caractérisée par la récurrence des oedèmes séreux rétiens pour un seuil de prednisone à plus de 25 mg/j et ce, malgré l'adjonction d'azathioprine à 2 mg/kg/j et de 6 bolus de cyclophosphamide (1 gr). Finalement sous ciclosporine à raison de 350 mg/j pendant 4 ans, les décollements rétiens vont progressivement régresser mais des de plis rétiens se formeront lors de la re application de la rétine contre la choroïde. A terme, une fibrose sous

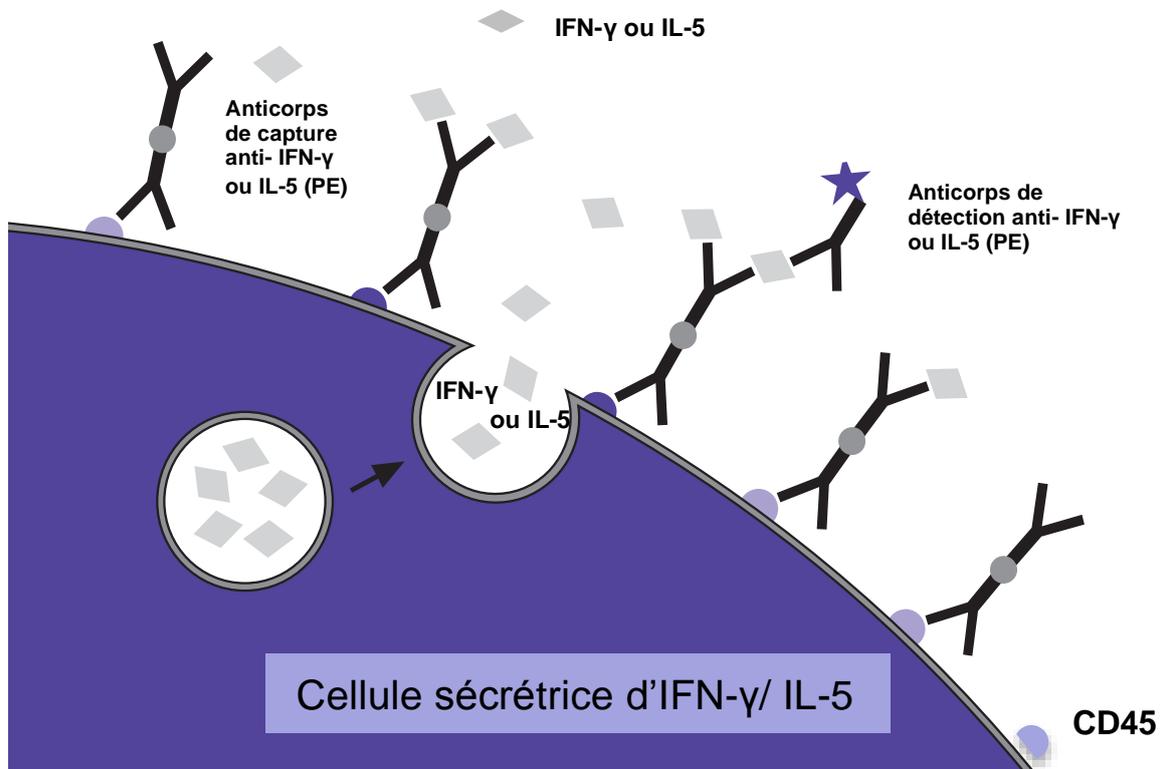
rétinienne bilatérale s'installera. Au moment du prélèvement sanguin, la patiente voyait bouger la main avec les deux yeux alors qu'elle ne recevait plus qu'une corticothérapie minimale de 5 mg/j.

*Procédure de tri basée sur l'utilisation de cellules dendritiques présentatrices d'antigènes*

Afin de sélectionner des lymphocytes T spécifiques d'antigènes à partir des cellules mononuclées du sang périphérique (CMSP) de cette patiente, nous avons opté pour une procédure de tri précédemment utilisée pour le monitoring de la réponse T CD4 à la vaccination avec la protéine MAGEA3, une protéine présente dans de nombreuses tumeurs [76].

Les CMSP ont été séparées en deux catégories cellulaires en fonction de leur capacité d'adhérence. Les cellules adhérentes ont été différenciées en CD et utilisées en tant que cellules présentatrices d'antigènes. Pour ce faire, elles ont été incubées à 37°C en présence d'IL-4 et de GM-CSF. Au 5<sup>ème</sup> jour, les CD ont été récoltées et chargées avec un antigène d'intérêt. Après 20 heures d'incubation, ont été rajoutées les cellules non adhérentes, contenant les lymphocytes T à stimuler avec l'antigène d'intérêt. Après 24 heures de co-culture, les cellules ont été incubées avec des anticorps bispécifiques, capables d'une part de se fixer à la surface de tous les leucocytes et d'autre part, de capturer spécifiquement l'IFN- $\gamma$  ou l'IL-5 sécrétés (Fig.4). Enfin, ces cellules ont été marquées avec un second anticorps spécifique soit de l'IFN- $\gamma$ , soit de l'IL-5, anticorps de détection conjugué à la R-phycoérythrine (PE) permettant la détection de ces cellules par cytométrie de flux (Fig.4).

Ainsi, les cellules T CD4 de nos patients sécrétant de l'IFN- $\gamma$  et/ou de l'IL-5 à la suite de la stimulation avec un antigène d'intérêt ont pu être détectées puis sélectionnées en vue d'un clonage.



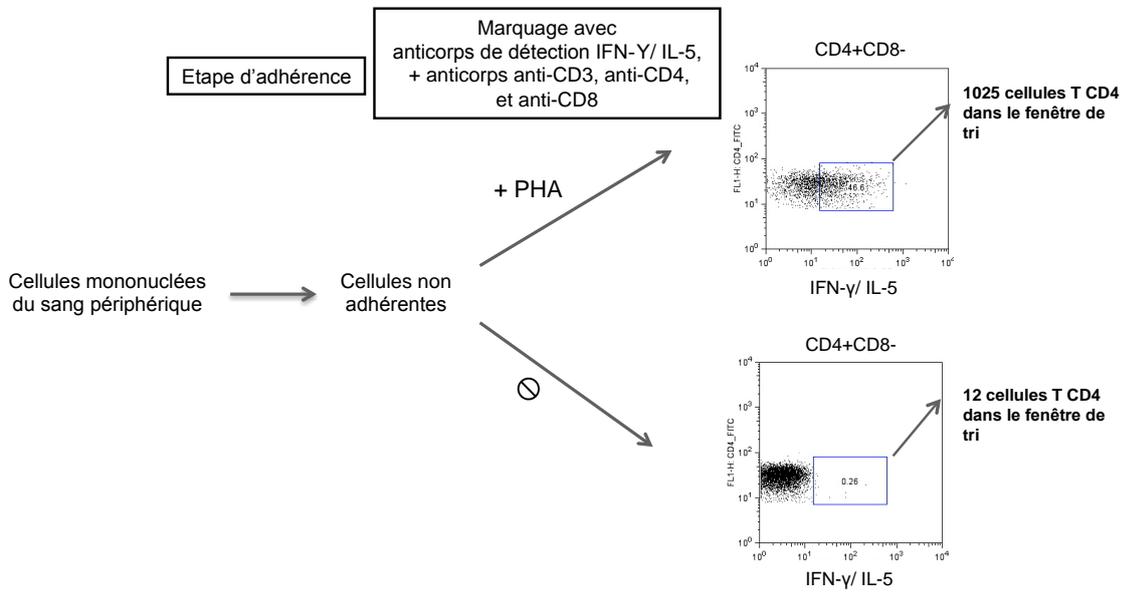
**Figure 4. Principe du test de détection des cytokines secrétées par des cellules activées.** Ce test est fondé sur l'utilisation d'anticorps bispécifiques fixés à la surface des leucocytes sur les molécules CD45 et reconnaissant spécifiquement l'IFN- $\gamma$  et l'IL-5. Seules les cellules sécrétant de l'IFN- $\gamma$  et/ou de l'IL-5 vont être marquées par l'anticorps de détection spécifique anti-IFN- $\gamma$  ou anti-IL-5 couplé à la phycoerythrine (PE). D'après le fabricant Miltenyi Biotec.

### *Tri sélectif des lymphocytes T CD4 et clonage*

Des CD et des lymphocytes T ont été isolés à partir des cellules mononuclées du sang de cette patiente selon la procédure exposée ci-dessus. Les CD utilisées comme cellules présentatrices d'antigènes ont été mises en présence d'un lysat de lignées de mélanomes (LB33-MEL.B, SK23-MEL, EB81-MEL.B, et Na17-MEL) dans le but de présenter des antigènes mélanocytaires aux lymphocytes T CD4 de la patiente. Parmi les protéines exprimées par les 4 lignées de mélanomes, se trouvaient tyrosinase, Melan-A, gp100 ainsi que la protéine MAGEA3 exprimée par les tumeurs. Certains fragments de ces protéines mélanocytaires semblaient activer les lymphocytes T CD4 des patients VKH dans les travaux publiés [33, 62-64]. Après une mise au point des critères de sélection lors du tri (Fig.5A), 130 lymphocytes T CD4 ont été ainsi sélectionnés en vue d'un clonage chez cette patiente en phase chronique de la maladie (Fig.5B).

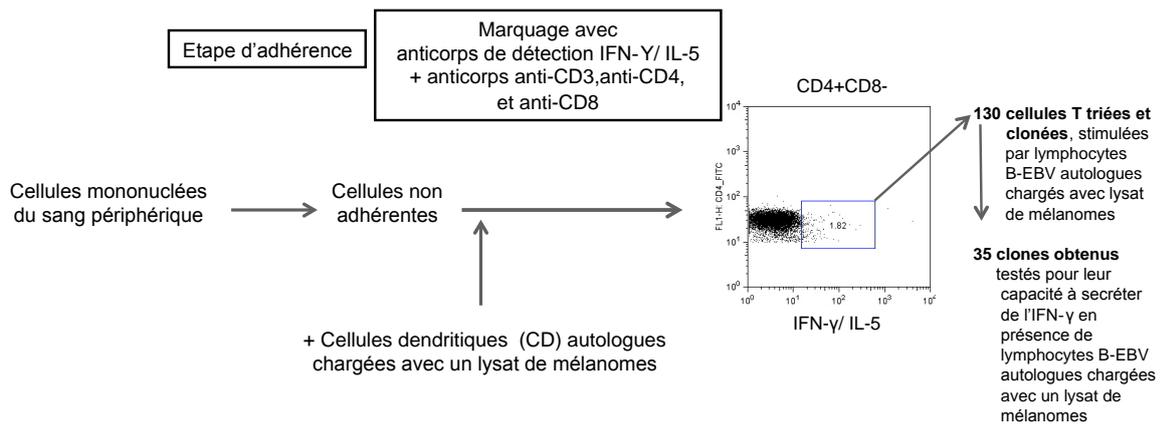
A

Définition d'une fenêtre de tri avec le sang d'un donneur



B

Tri des lymphocytes IFN-γ<sup>+</sup> ou IL-5<sup>+</sup> dans le sang d'une patiente VKH



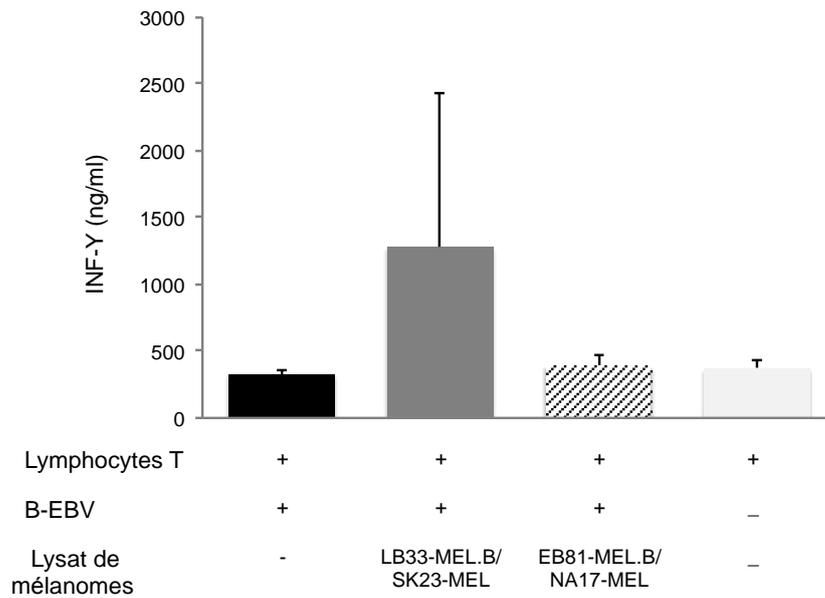
**Figure 5. Procédure de tri sélectif des lymphocytes TCD4 auto-réactifs issus du sang périphérique d'une patiente en phase chronique de la maladie de VKH.** (A) Définition de la fenêtre de tri (cadre des figures FACS) : afin de sélectionner les cellules à cloner parmi les lymphocytes T CD4 IFN- $\gamma$ +IL-5+ de la patiente VKH n°1, nous avons défini au préalable la fenêtre de sélection en utilisant des cellules non adhérentes ( $2 \times 10^6$ /puits) issues du sang d'un patient atteint d'une hémochromatose, incubées (témoin positif) ou non (témoin négatif) avec de la PHA pendant 20 heures. Les cellules ont ensuite été marquées avec les anticorps de capture anti-IFN- $\gamma$  et IL-5 et incubées pendant 45 minutes à 37°C afin de permettre la sécrétion des cytokines. Les cellules ont ensuite été marquées avec les anticorps de détection anti-IFN- $\gamma$  et anti-IL-5 conjugués tous deux à la PE, ainsi qu'avec des anticorps anti-CD4-FITC et anti-CD8-PERCP Cy5. Les cellules montrées sont les cellules CD4+CD8-.

(B) Réalisation du tri sélectif des lymphocytes T CD4 IFN- $\gamma$ +IL-5+ chez la patiente VKH n°1: des cellules non adhérentes ( $2 \times 10^6$ /puits) ont été stimulées avec des cellules dendritiques (CD) autologues ( $2 \times 10^5$ /puits) chargées avec un lysat de mélanomes (lignées EB81-MEL.B, NAI7-MEL, LB33-MEL.B et SK23-MEL) à raison d'une CD pour 20 cellules tumorales. Après une nuit de co-culture, le marquage des cellules sécrétant de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-5 a été réalisé selon le protocole utilisé en (A). Les cellules T CD4 IFN- $\gamma$ +IL-5+ à l'intérieur de la fenêtre de tri définie en (A) sont les cellules sélectionnées pour être clonées. Chez notre patiente, 130 cellules ont été ainsi sélectionnées puis stimulées en conditions clonales avec des lymphocytes B-EBV autologues chargés avec un lysat de mélanomes réalisé avec les lignées mentionnées ci-dessus. Au final, 35 clones T CD4 ont proliféré.

### *Réactivité des clones de lymphocytes T stimulés avec un lysat de mélanomes*

Les 130 lymphocytes T CD4 sélectionnés ont été amplifiés en conditions clonales (1 cellule/puits). Ils ont été stimulés avec des cellules présentatrices d'antigènes préalablement incubés avec le lysat de mélanomes contenant les lignées LB33-MEL.B, SK23-MEL, EB81-MEL.B, et Na17-MEL. L'amplification itérative des cellules T nécessitant un grand nombre de cellules présentatrices, nous avons utilisé des lymphocytes B immortalisés en les infectant avec le virus Epstein-Barr (EBV).

Cette amplification des cellules T CD4 a permis d'obtenir 35 clones qui ont été criblés pour leur capacité à reconnaître spécifiquement un antigène mélanocytaire. Dans le cadre d'un test à grande échelle, nous avons à nouveau utilisé les lymphocytes B-EBV autologues en tant que cellules présentatrices d'antigènes. Nous avons testé en triplicats la capacité des 35 clones à produire de l'IFN- $\gamma$  après stimulation par des lymphocytes B-EBV autologues préalablement incubées pendant 20 heures en présence de 2 lysats de mélanomes exprimant les antigènes d'intérêt tyrosinase, Melan-A, gp100 ainsi que la protéine MAGEA3. Le premier lysat contenait les lignées LB33-MEL.B et SK23-MEL, le second les lignées NA17-MEL et EB81-MEL.B. La présence d'IFN- $\gamma$  a été évaluée par ELISA. Seul le clone A12 tendait à sécréter plus d'IFN- $\gamma$  en présence du lysat contenant les lignées LB33-MEL.B et SK23-MEL (Fig.6).

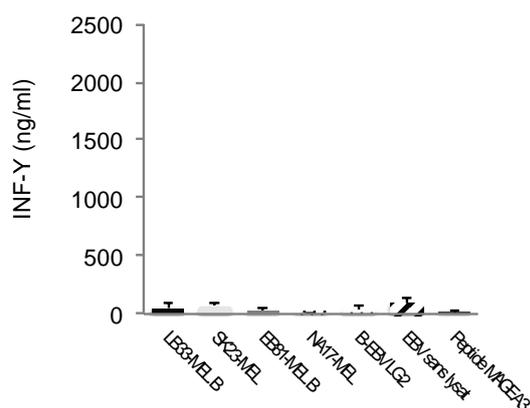


Stimulation du clone A12 avec lysats de mélanomes

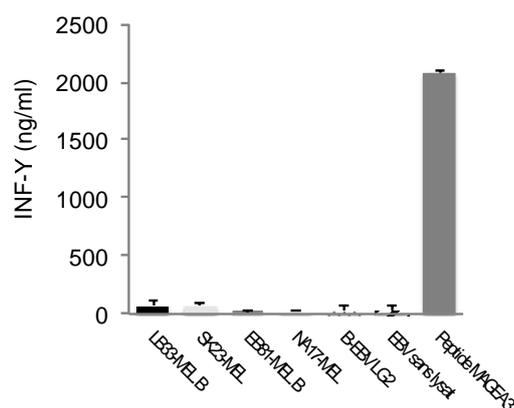
**Figure 6. Sécrétion d'IFN- $\gamma$  du clone A12 après stimulation par des lymphocytes B-EBV chargés avec des lysats de mélanomes.** Les cellules présentatrices d'antigènes ( $2 \times 10^5$ /puits) sont des lymphocytes B-EBV autologues chargés avec deux sortes de lysat de mélanomes exprimant les protéines mélanocytaires d'intérêt; l'un contenant les lignées LB33-MEL.B et SK23-MEL et l'autre contenant les lignées EB81-MEL.B et NA17-MEL. Comme témoin négatif, ont été utilisés des lymphocytes B-EBV autologues non chargés. Au total, 5.000 cellules de chaque clone T CD4 ont été ajoutées à chaque puits. Comme autre témoin négatif, nous avons utilisé les cellules de chaque clone T non stimulées par les cellules présentatrices d'antigènes. La quantité d'IFN- $\gamma$  sécrété dans le surnageant de la co-culture a été mesurée par ELISA. Les résultats présentés correspondent à une moyenne des co-cultures réalisées en triplicats.

Le clone A12 a été amplifié dans les conditions décrites ci-dessus et retesté en triplicats avec des lymphocytes B-EBV autologues chargés cette fois séparément avec des lysats de chacune des 4 lignées de mélanomes exprimant les antigènes mélanocytaires d'intérêt mais également, la protéine témoin MAGEA3. Comme premier témoin positif, des lymphocytes B-EBV.DP4 chargés avec les mêmes lysats ont été testés pour leur reconnaissance par des cellules d'un clone T anti-MAGEA3.DP4. Comme second témoin positif, nous avons utilisé des lymphocytes B-EBV chargés avec le peptide MAGEA3.DP4 ACYEFLWGPRALEVTS.

Le clone A12 ne reconnaissait aucun des antigènes des mélanomes présentés par les lymphocytes B-EBV, tout comme le clone T anti-MAGEA3.DP4. Cependant, ce dernier reconnaissant le peptide MAGEA3.DP4 présenté par les mêmes cellules présentatrices, on pouvait suspecter un faible niveau de stimulation antigénique de la part des lysats de mélanomes (Fig.7). Il fallait donc chercher à augmenter le niveau d'expression des antigènes mélanocytaires pour stimuler nos clones de lymphocytes T.



Stimulation du clone A12 avec différents lysats de mélanomes



Stimulation du clone T anti-MAGEA3.DP4 avec différents lysats de mélanomes

**Figure 7. Sécrétion d'IFN- $\gamma$  du clone A12 stimulé par des lymphocytes B-EBV chargés avec un lysat d'une seule lignée de mélanome.** Les cellules présentatrices d'antigènes (20.000/puits) sont des lymphocytes B-EBV autologues chargés séparément avec un lysat de chaque lignée de mélanome LB33-MEL.B, SK23-MEL, EB81-MEL.B et NA17-MEL. Comme témoins négatifs, nous avons utilisé des lymphocytes B-EBV non chargés, autologues ou issus du patient LG2 non VKH. Au total, 20.000 cellules du clone T CD4 A12 ont été ajoutées à chaque puits. Comme premier témoin positif, des lymphocytes B-EBV HLA DP4 chargés avec les mêmes lysats ont été testés pour leur reconnaissance par des cellules d'un clone T anti-MAGEA3.DP4. Comme second témoin positif, nous avons utilisé des lymphocytes B-EBV chargés avec le peptide MAGEA3.DP4 ACYEFLLWGPRALEVTS. La quantité d'IFN- $\gamma$  sécrété dans le surnageant de la co-culture a été mesurée par ELISA. Les résultats présentés correspondent à une moyenne des co-cultures réalisées en triplicats.

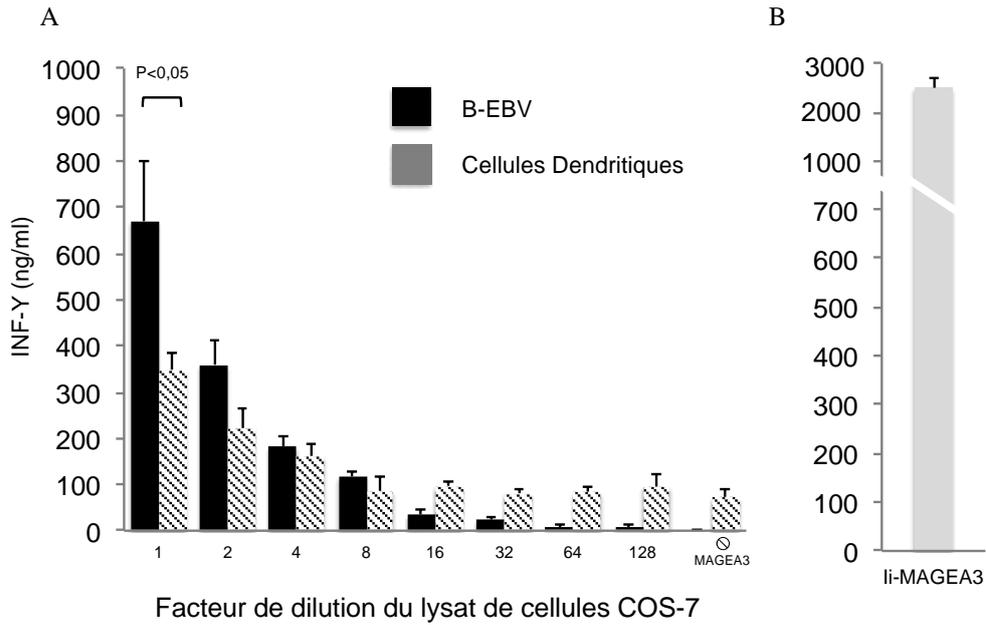
### *Procédure de tri modifiée avec des lymphocytes B pour présenter les antigènes*

Afin d'améliorer la stimulation antigénique des lymphocytes T et ce dès l'étape du tri sélectif, nous avons opté pour une approche reposant sur l'utilisation de cellules présentatrices d'antigènes exprimant fortement les protéines d'intérêt. Dans cette optique, des cellules COS-7 ont été transfectées avec les gènes codant des protéines mélanocytaires d'intérêt, puis lysées dans le but d'être incubées en présence des cellules présentatrices d'antigènes. Les modifications de la procédure de tri sélectif comportaient également le remplacement des CD par les lymphocytes B ayant l'avantage d'être facilement disponibles et en grand nombre. Afin de valider l'utilisation des lymphocytes B-EBV en tant que cellules présentatrices dans le cadre du tri sélectif, nous avons au préalable comparé la capacité des lymphocytes B-EBV à celle des CD pour présenter les lysats de cellules COS-7 transfectées aux lymphocytes T.

#### ❖ Etude comparative de la capacité à présenter des lymphocytes B-EBV

Des cellules issues de la lignée COS-7 ont été transfectées avec le gène codant pour la protéine MAGEA3 puis lysées. Différentes dilutions du lysat ont été incubées pendant 20 heures avec des cellules présentatrices: CD ou lymphocytes B-EBV. Ces deux types de cellules ont ensuite été mises en présence d'un clone T CD4 reconnaissant spécifiquement un peptide de MAGEA3, afin de mesurer sa capacité à sécréter de l'INF- $\gamma$ .

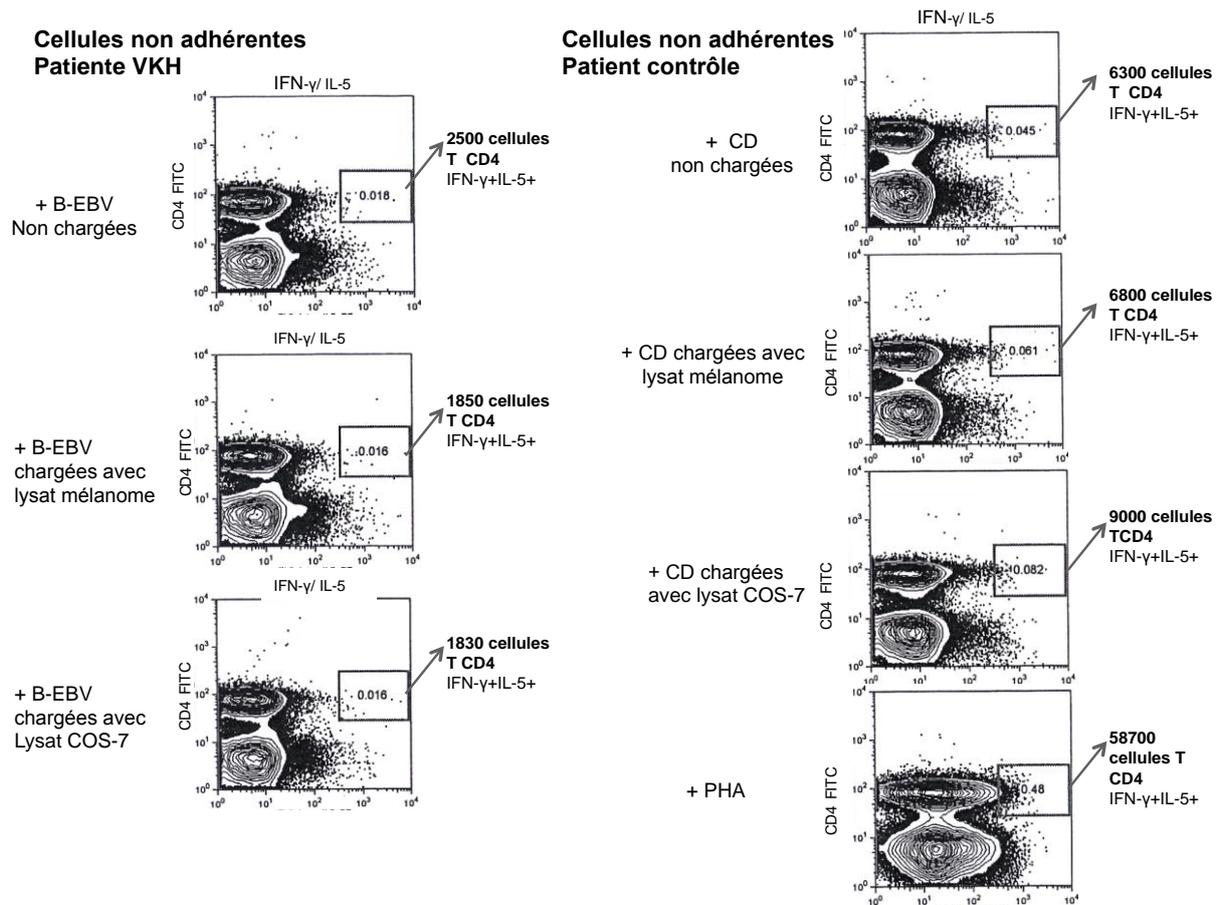
La production d'INF- $\gamma$  par le clone T anti-MAGEA3 était facilement détectable après stimulation, même après avoir dilué d'un facteur 4 le lysat de cellules COS-7 transfectées avec MAGEA3 dans un lysat témoin de cellules COS-7. Les capacités de présentation et de stimulation des lymphocytes B étaient égales ou supérieures aux capacités des CD. Par ailleurs, la sécrétion d'INF- $\gamma$  non liée au stimulus d'intérêt était plus élevée en cas de présentation antigénique par les CD (Fig.8).



**Figure 8. Dilution d'un lysat de cellules COS-7 transfectées avec le gène codant pour MAGEA3.** (A) Un lysat de cellules COS-7 transfectées avec le cDNA codant pour MAGEA3 a été dilué avec un lysat de cellules COS-7 transfectées avec le gène codant pour gp100. Les lysats de cellules COS-7 ainsi dilués ont été incubés pendant une nuit avec des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) HLA DP4 (1 CPA pour 20 cellules COS-7), soit des lymphocytes B-EBV, soit avec des cellules dendritiques. Les cellules présentatrices chargées avec un lysat de cellules COS-7 transfectées avec le gène codant pour gp100 ont été utilisées comme témoin négatif. Les lymphocytes T CD4 anti-MAGEA3.DP4 (10.000/puits) ont été ajoutés aux CPA (10.000/puits). (B) Les lymphocytes B-EBV.rétro-Ii.MAGEA3 ont été utilisés comme témoin positif. La quantité d'IFN- $\gamma$  sécrété dans le surnageant après une nuit de co-culture a été mesurée par ELISA. Les résultats présentés correspondent à une moyenne des co-cultures réalisées en triplicats.

- ❖ Evaluation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et/ ou d'IL-5 non liée au stimulus d'intérêt en cas de présentation par les lymphocytes B

Si les lymphocytes B-EBV semblaient être des cellules présentatrices aussi efficaces que les CD, il fallait également évaluer leur capacité à stimuler non spécifiquement les lymphocytes T CD4 des patients VKH dans le cadre du tri sélectif ; concrètement, leur capacité à stimuler des lymphocytes T en cas de présentation d'antigènes d'un lysat de cellules COS-7 non transfectées. En pratique, nous avons déterminé par cytométrie en flux le niveau de stimulation non spécifique des lymphocytes T CD4 chez la patiente en phase chronique de la maladie, mis en contact avec des lymphocytes B-EBV autologues. Les lymphocytes T CD4 producteurs d'IFN- $\gamma$  et d'IL-5 ont été marqués avec des anticorps capables de capturer spécifiquement l'IFN- $\gamma$  ou l'IL-5 sécrétés selon la procédure exposée précédemment (Cf. section 1.1). Ils ont ensuite été comptabilisés par cytométrie en flux après stimulation par des lymphocytes B-EBV préalablement chargés soit par un lysat de cellules COS-7 non transfectées, soit par un lysat de mélanomes. Enfin, à titre de comparaison, nous avons évalué de la même manière la stimulation non spécifique de lymphocytes T CD4 par des CD chargées dans les mêmes conditions chez un patient atteint d'hémochromatose (Fig.9). Le nombre de lymphocytes T CD4 stimulés par les B-EBV chargés avec le lysat de cellules COS-7 était de 1830 lymphocytes T CD4 pour 114 000 analysés, inférieur à celui résultant de la stimulation dans les mêmes conditions des CD du patient ayant une hémochromatose. La part revenant à la stimulation non spécifique des lymphocytes B-EBV (< 2%) paraissait donc acceptable (Fig.9).



**Figure 9. Sécrétion non spécifique de cytokines par des lymphocytes T CD4.** Les cellules non adhérentes issues du sang périphérique de la patiente n°1 ( $2 \times 10^6$ /puits) ont été stimulées avec des lymphocytes B-EBV autologues ( $2 \times 10^5$ /puits) chargées avec un lysat de cellules d'intérêt (20 cellules pour 1 lymphocyte B-EBV), soit des cellules COS-7 non transfectées, soit des cellules de mélanome. A titre de comparaison, des cellules non adhérentes issues d'un patient ayant une hémochromatose ont été stimulées avec des cellules dendritiques autologues ( $4 \times 10^5$ /puits) chargées dans les mêmes conditions. Comme témoin positif, les cellules non adhérentes ont été incubées en présence de PHA. Après une nuit de coculture, les cellules ont été marquées avec les anticorps de capture anti-IFN- $\gamma$  et IL-5, et incubées pendant 45 minutes à 37°C afin de permettre la sécrétion des cytokines. Les cellules ont ensuite été marquées avec les anticorps de détection anti-IFN- $\gamma$  et anti-IL-5 conjugués tous deux à PE, des anticorps anti-CD4-FITC, anti-CD3-APC et anti-CD8-PERCP Cy5. Le cadre de chaque figure FACS correspond à la fenêtre de tri cellulaire utilisée pour sélectionner les cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> selon leur capacité à sécréter de l'IFN- $\gamma$  et/ou de l'IL-5.

## **1.2 Patiente (n°2) en phase aiguë de la maladie et tri à partir du sang**

Si nous disposions à présent d'une approche permettant l'expression à fort niveau de protéines mélanocytaires dans le but d'améliorer la stimulation antigénique des lymphocytes T, il nous fallait également travailler à partir d'un milieu potentiellement enrichi en lymphocytes T auto-réactifs comme le sang d'un patiente en phase aiguë de la maladie.

### *Patiente n°2*

Une patiente âgée de 27 ans, d'origine maghrébine, HLA DRB1\*01:02, 01:07; DQB1\*02:02, 05:01; DPB1\*02:01, 04:01 a été recrutée dès l'apparition des premières manifestations de la maladie en vue de prélever du sang à la phase aiguë de la maladie. Cette patiente rapportait une baisse d'acuité visuelle qui avait débuté 2 semaines plus tôt. Son seul antécédent était une polyarthrite rhumatoïde chez sa mère. La meilleure acuité visuelle corrigée était de 8/10 OD et 10/10 OG. Il existait une poussée inflammatoire dans les deux yeux avec une réaction cellulaire en chambre antérieure quantifiée 1+, intensité du flare à 16 OD et 49 OG, ainsi qu'un décollement séreux rétinien non central et bilatéral. La première phase de l'angiographie à la fluorescéine montrait de multiples têtes d'épingle hyperfluorescentes aux deux yeux. A la phase tardive, l'angiographie montrait une hypopigmentation située aux endroits des détachements rétiniens séreux. L'évolution sera favorable après la mise en route d'une corticothérapie débutée par bolus. Un après, la patiente aura recouvré 10/10 dans chaque œil et les décollements séreux auront disparu. Cependant, on pourra observer à l'examen du fond d'œil une dépigmentation péripapillaire dans les deux yeux, évocatrice de maladie de VKH. La patiente ne développera jamais de manifestations extra-ophtalmologiques.

### *Tri sélectif des lymphocytes TCD4 et clonage*

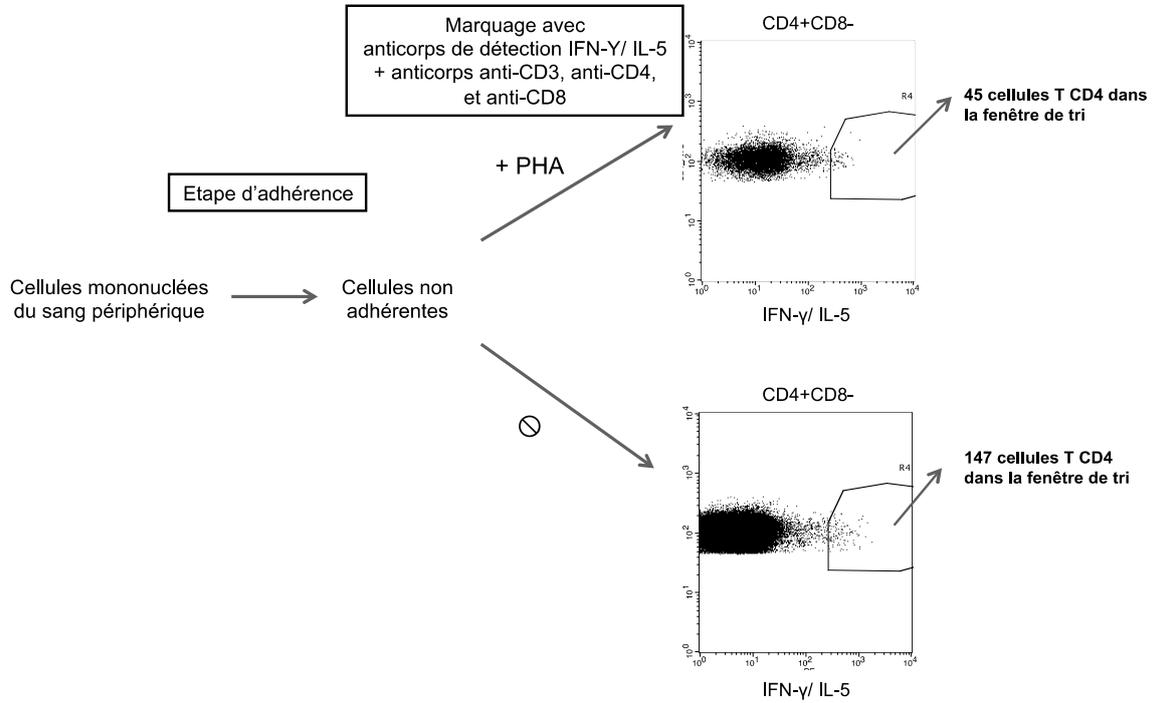
Les lymphocytes B-EBV s'avérant d'aussi bons «candidats» pour la présentation des protéines d'intérêt que les CD, ils ont été utilisés pour sélectionner les lymphocytes T potentiellement auto-réactifs.

Les lymphocytes B-EBV de cette patiente ont été incubés durant une nuit avec un lysat de cellules COS-7 transfectées avec chacun des gènes d'intérêt KU-MEL-1, gp100, Melan-A, TRP1, TRP2, et tyrosinase puis co-cultivés avec les lymphocytes du sang de la patiente. Les lymphocytes T CD4 produisant de l'IFN- $\gamma$  et/ou de l'IL-5, potentiellement auto-réactifs, ont été sélectionnés par cytométrie en flux en vue d'un clonage. Parmi les lymphocytes T CD4 sécrétant de l'INF- $\gamma$  et/ou de l'IL-5, nous avons sélectionné les cellules T CD4 en cherchant à minimiser le nombre de lymphocytes T stimulés indépendamment des protéines mélanocytaires. Cependant en l'absence de stimulation efficace par la PHA (témoin positif) des lymphocytes T d'un patient témoin, nous avons été contraints d'utiliser une fenêtre de tri sélectionnant d'avantage de cellules T sécrétant de l'INF- $\gamma$  et/ou de l'IL-5 en réponse à la stimulation par un lysat de cellules COS-7 non transfectées (témoin négatif) (Fig.10A).

Chez cette patiente en phase aiguë, 445 lymphocytes T CD4 ont ainsi été sélectionnés après stimulation par le lysat de cellules COS-7 transfectées avec le gène codant chaque protéine d'intérêt (Fig.10B).

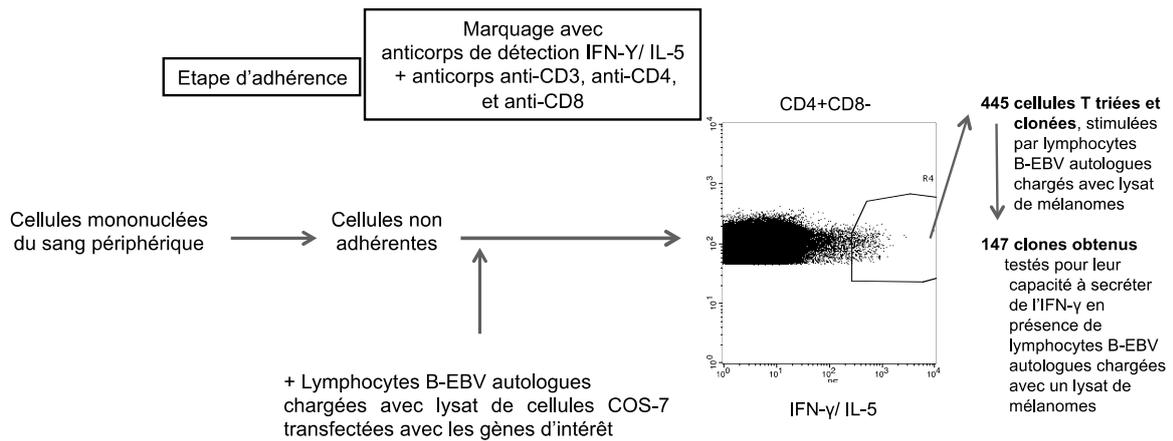
A

Définition d'une fenêtre de tri avec le sang d'un donneur



B

Tri des lymphocytes IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ou IL-5<sup>+</sup> dans le sang d'une patiente VKH



**Figure 10. Procédure de tri sélectif des lymphocytes TCD4 auto-réactifs issus du sang d'une patiente en phase aiguë de la maladie de VKH.** (A) Définition de la fenêtre de tri (cadre des figures FACS): afin de sélectionner les cellules à cloner parmi les lymphocytes T CD4 IFN- $\gamma$ +IL-5+ de la patiente VKH n°2, nous avons défini au préalable la fenêtre de sélection en utilisant des cellules non adhérentes ( $2 \times 10^6$ /puits) issues du sang d'un patient atteint d'une hémochromatose, incubées (témoin positif) ou non (témoin négatif) avec de la PHA pendant 20 heures. Les cellules ont ensuite été marquées avec les anticorps de capture anti-IFN- $\gamma$  et IL-5 et incubées pendant 45 minutes à 37°C afin de permettre la sécrétion des cytokines. Les cellules ont ensuite été marquées avec les anticorps de détection anti-IFN- $\gamma$  et anti-IL-5 conjugués tous deux à la PE, ainsi qu'avec des anticorps anti-CD4-FITC et anti-CD8-PERCP Cy5. Les cellules montrées sont les lymphocytes CD4+CD8-.

(B) Réalisation du tri sélectif des lymphocytes T CD4 IFN- $\gamma$ +IL-5+ chez la patiente VKH n°2: des cellules non adhérentes ( $2 \times 10^6$ /puits) ont été stimulées avec des lymphocytes B-EBV autologues ( $2 \times 10^5$ /puits) chargées avec un lysat de cellules COS-7 transfectées avec chacun des gènes d'intérêt KU-MEL-1, gp100, Melan-A, TRP1, TRP2, et tyrosinase, à raison d'un lymphocyte B-EBV pour 20 cellules COS-7. Après une nuit de coculture, le marquage des cellules sécrétant de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-5 a été réalisé selon le protocole utilisé ci-dessus (A). Les cellules T CD4 IFN- $\gamma$ +IL-5+ à l'intérieur de la fenêtre de tri définie en (A) sont les cellules sélectionnées pour être clonées.

Chez notre patiente, 445 cellules ont été ainsi sélectionnées puis stimulées en condition clonale avec des lymphocytes B-EBV autologues chargés avec un lysat de cellules COS-7 transfectées avec les gènes codant chacune des protéines d'intérêt. Au final, 147 clones T CD4 ont proliféré.

### *Réactivité des clones de lymphocytes T stimulés avec 6 protéines mélanocytaires*

Après amplification en conditions clonales des 445 lymphocytes T CD4 sélectionnés, 147 clones ont été obtenus puis criblés pour leur spécificité (Fig.10B). Pour les besoins d'un test à grande échelle, les lysats de cellules COS-7 transfectées avec chacun des gènes d'intérêt KU-MEL-1, gp100, Melan-A, TRP1, TRP2, et tyrosinase ont été regroupés par quatre au maximum, en considérant qu'un lysat de cellules COS-7 transfectées avec le gène MAGEA3 pouvait être reconnu par un clone anti-MAGEA3 même s'il avait été dilué d'un facteur 4 (Fig. 8).

Les 147 clones T CD4 ont été testés en duplicats pour leur capacité à produire de l'IFN- $\gamma$  après stimulation par des lymphocytes B-EBV autologues chargés de deux mélanges de lysats de cellules COS-7 transfectées avec les gènes d'intérêt et le gène témoin MAGEA3. L'un contenant les gènes codant TRP1, TRP2 et tyrosinase, l'autre ceux codant KU-MEL-1, gp100, Melan-A et MAGEA3. La présence d'IFN- $\gamma$  dans le surnageant de culture a été évaluée par ELISA.

Aucun des 147 clones ne sécrétait d'IFN- $\gamma$  en présence des mélanges de lysats de cellules COS-7 transfectées, y compris le clone reconnaissant spécifiquement MAGEA3. Ce dernier produisant de l'IFN- $\gamma$  au contact de lymphocytes B-EBV rétro-transcrits pour MAGEA3, on pouvait en déduire que les lysats de cellules COS-7 transfectées avec les gènes d'intérêt ne permettaient pas de stimuler les clones T. Il fallait donc envisager une autre source d'antigènes d'intérêt capable d'exprimer ces antigènes à fort niveau et de façon reproductible afin de pouvoir tester à grande échelle les clones T des patients VKH.

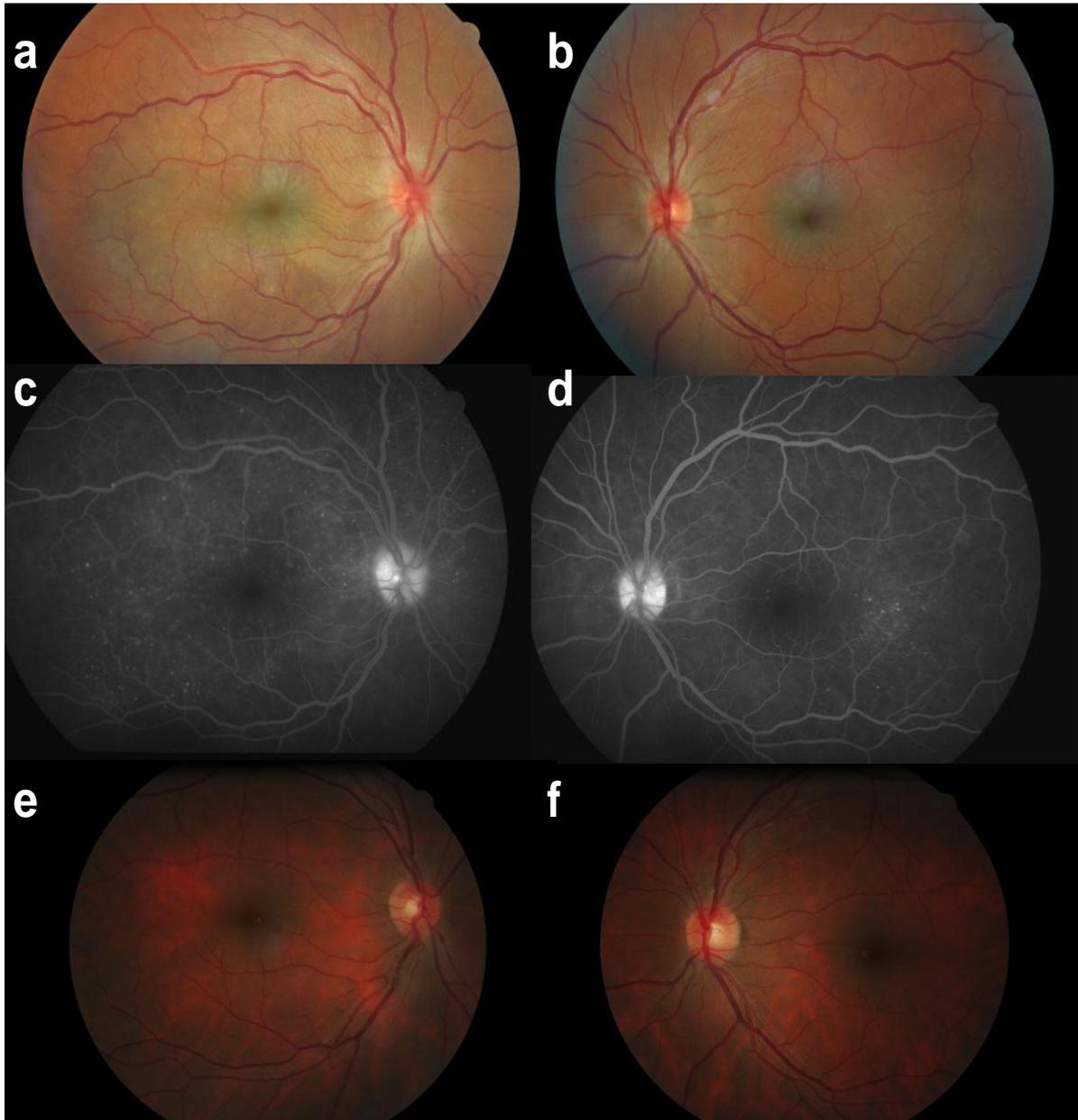
### **1.3 Patient (n°3) en phase aiguë de la maladie et tri à partir du liquide cébrospinal**

Plusieurs raisons nous ont conduit à utiliser les lymphocytes du LCS d'un patient ayant une uvéoméningite à la phase aiguë de la maladie. Faciles à obtenir par ponction lombaire, geste

effectué en routine, les lymphocytes du LCS sont supposés être enrichis en lymphocytes auto-réactifs à la suite d'une stimulation par des antigènes de mélanocytes, cellules communes aux tissus méningés et à l'uvée postérieure [1,23,38-41].

### *Patient n°3*

Il s'agissait d'un homme de 37 ans d'origine africaine, sans antécédent médical, HLA DRB1\*14:01, 15:03; DQB1\*05:03, 06:03; DPB1\*01:01, 04:02 qui était hospitalisé en raison de la perte de vision et de maux de tête ayant débuté 3 semaines plus tôt. La meilleure acuité visuelle corrigée était de 3/10 dans les deux yeux. L'examen ophtalmologique initial révélait une poussée inflammatoire dans les deux yeux avec une réaction cellulaire quantifiée à 2+ en chambre antérieure, ainsi qu'un décollement séreux rétinien bilatéral. Du fait de la présence de liquide sous-rétinien, l'épaisseur centrale de la rétine mesurée en TCO s'élevait à 409  $\mu\text{m}$  à l'œil droit et à 243  $\mu\text{m}$  à l'œil gauche ( $N \leq 250 \mu\text{m}$ ). La première phase de l'angiographie à la fluorescéine montrait de multiples têtes d'épingle hyperfluorescentes aux deux yeux et à la phase tardive, elle montrait une hypopigmentation située aux endroits des détachements rétiniens séreux. Un an après le début d'une corticothérapie débutée par bolus, on pouvait observer des modifications du fond d'œil liées à l'hypopigmentation diffuse avec un aspect dit « en coucher de soleil » dans les deux yeux (Fig.11). Il n'y avait pas de manifestations extra-ophtalmologiques à la phase initiale de la maladie à l'exception d'une méningite à liquide clair. Le LCS contenait 561 éléments/ $\text{mm}^3$  dont 95% de lymphocytes et moins de 1 globules rouges par  $\text{mm}^3$ , ce qui reflétait l'absence de rupture de la barrière hémato-encéphalique. Nous n'avons pas détecté de virus du groupe Herpes par PCR dans le LCS et la concentration d'IFN- $\alpha$  était normale.



**Figure 11. Caractéristiques ophtalmologiques du patient VKH en phase aiguë.** (a, b) *Le fond d'œil montre des décollements exsudatifs bilatéraux de la rétine.* (c, d) *L'angiographie à la fluorescéine révèle des zones bilatérales, multifocales de fuites ponctiformes au niveau de l'épithélium pigmentaire de la rétine et du nerf optique.* (e, f) *La photographie du fond d'œil obtenue une année plus tard montre un aspect dit « en coucher de soleil », caractérisé par une dépigmentation diffuse de l'épithélium pigmentaire de la rétine affectant les deux yeux.*

### *Clonage direct des lymphocytes T par la méthode des dilutions limites*

Les cellules du LCS ont été distribuées à raison d'une cellule par puits dans cinq microplaques de 96 puits, et stimulées toutes les deux semaines avec anticorps anti-CD3 et anti-CD28, en présence d'IL-2, d'IL-7 et de cellules allogéniques irradiées. Un total de 145 clones ont été obtenus. Quatre vingt dix pourcent d'entre eux étaient CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>.

### *Réactivité des clones de lymphocytes T stimulés avec des lignées de mélanomes*

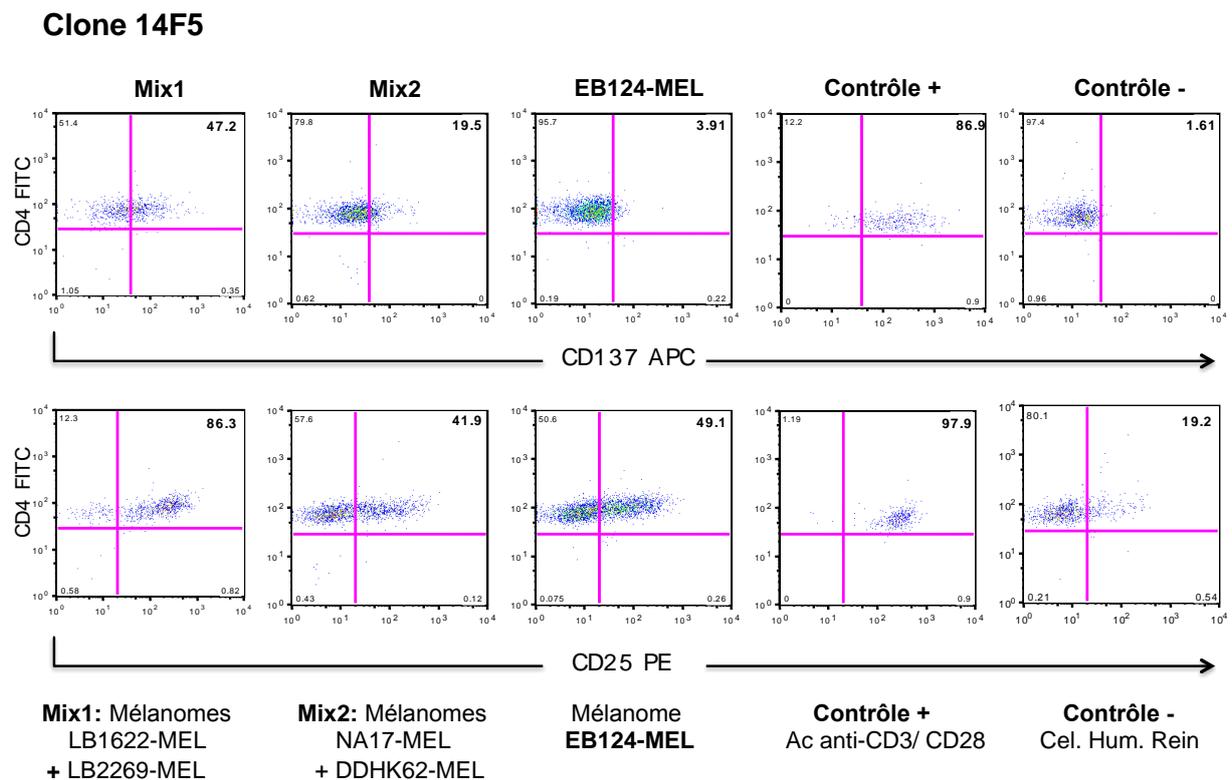
Afin d'améliorer la stimulation des cellules T, nous avons utilisé des lignées de mélanomes ayant une ou plusieurs molécules HLA-classe II identiques à celles du patient.

#### ❖ Analyse de la spécificité d'un échantillon de clones T CD4

Afin de ne pas se limiter à un profil de sécrétion cytokinique pour la détection des clones de lymphocytes T activés, nous avons opté pour l'utilisation de marqueurs d'activation lymphocytaire et en particulier, du marqueur CD137 dont on a montré l'expression à la surface des lymphocytes T activés [77]. Cependant, nous avons constaté que certains clones anti-tumoraux du laboratoire n'exprimaient pas ou très peu le marqueur CD137 à leur surface contrairement au récepteur à l'IL-2 (CD25), après activation par un peptide dérivant d'un antigène tumoral ou par un anticorps anti-CD3 (données non montrées). Dans l'hypothèse où CD137 était un marqueur d'activation peu sensible, nous avons finalement opté pour l'utilisation du CD137 couplé au CD25 dans la détection des lymphocytes T activés après stimulation.

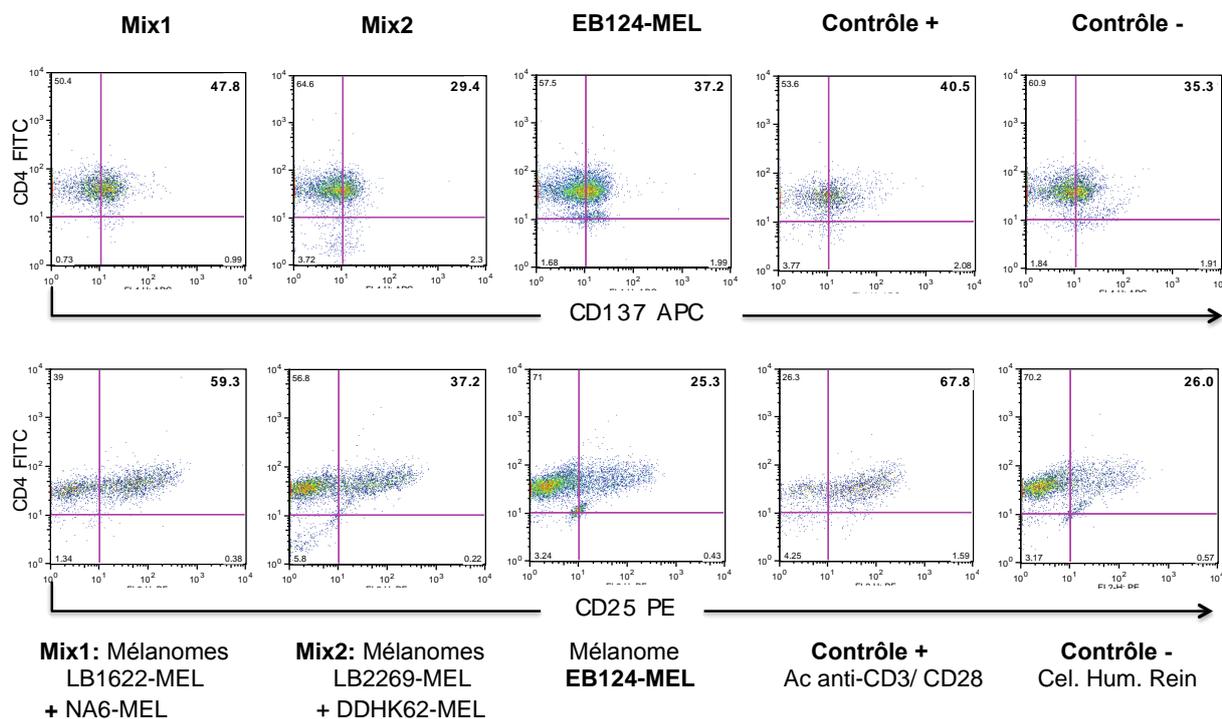
Les lignées de mélanomes restreintes pour l'HLA de classe II (LB1622-MEL, NA6-MEL, LB2269-MEL, DDHK62-MEL et EB124-MEL) et exprimant chacune tyrosinase, Melan-A et gp100, ont été utilisées en tant que cellules stimulantes. Quarante clones T ont été co-cultivés en monoplicats avec soit une seule lignée, soit un mélange de deux lignées de mélanomes. Après 20 heures de co-culture, le surnageant a été congelé et les cellules marquées avec des anticorps détectant CD25 et CD137.

Le clone 14F5 exprimait fortement les marqueurs CD25 et CD137 en présence d'un mélange contenant les lignées LB1622-MEL et LB2269-MEL ainsi qu'en présence de billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Fig.12). Le clone 14G10 exprimait fortement CD25 en présence du mélange des lignées LB1622-MEL et NA6-MEL comme en cas de stimulation par les billes recouvertes d'anticorps (Fig.13). Ainsi, deux clones T sur les 40 testés semblaient reconnaître des lignées de mélanomes.



**Figure 12. Expression des marqueurs d'activation lymphocytaire du clone 14F5 après stimulation avec des lignées de mélanomes.** Les lymphocytes de chaque clone T (20.000/puits) ont été cultivés en monocultures pendant une nuit avec des lignées de mélanomes (40.000/puits). Comme témoins, chaque clone de lymphocytes T a été stimulé avec des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (témoin positif) ou mis en présence de cellules non pertinentes (cellules humaines de rein) à titre de témoin négatif. Les marqueurs d'activation lymphocytaire CD25 et CD137 ont été mesurés en cytométrie de flux à la surface des clones T CD4. La lignée EB124-MEL a été utilisée seule. Mix1: mélange des lignées de mélanomes LB1622-MEL et LB2269-MEL. Mix2: mélange des lignées NA6-MEL et DDHK62-MEL.

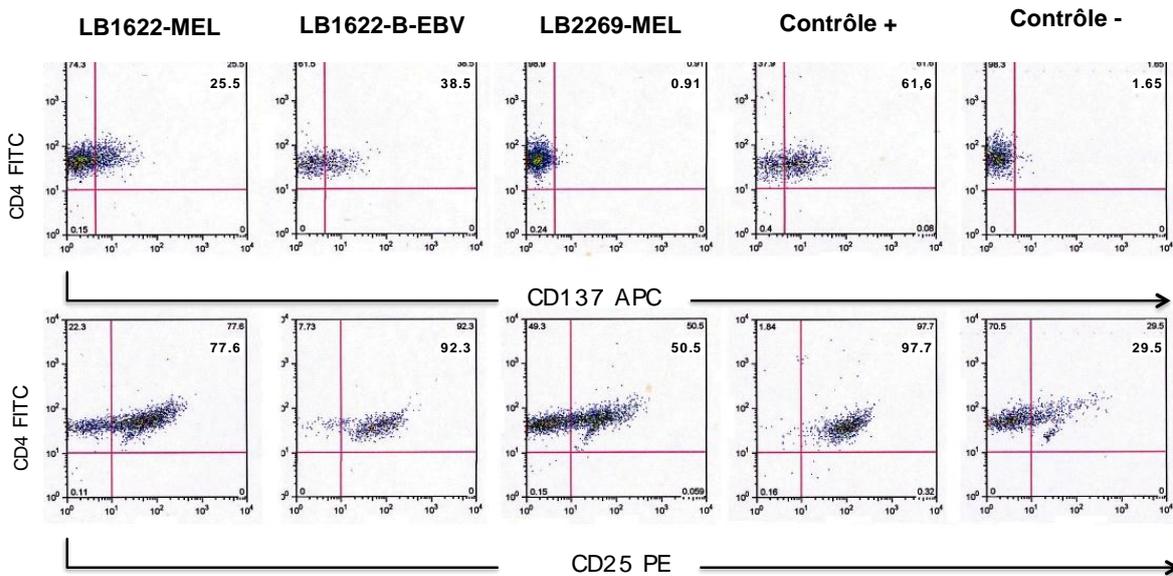
## Clone 14G10



**Figure 13.** Expression des marqueurs d'activation lymphocytaire du clone 14G10 après stimulation avec des lignées de mélanomes. Les lymphocytes de chaque clone T (20.000/puits) ont été cultivés en monocultures pendant une nuit avec des lignées de mélanomes (40.000/puits). Comme témoins, chaque clone de lymphocytes T a été stimulé avec des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (témoin positif) ou mis en présence de cellules non pertinentes (cellules humaines de rein) à titre de témoin négatif. Les marqueurs d'activation lymphocytaire CD25 et CD137 ont été mesurés en cytométrie de flux à la surface des clones T CD4. La lignée EB124-MEL a été utilisée seule. Mix1: mélange des lignées de mélanomes LB1622-MEL et NA6-MEL, Mix2: mélange des lignées LB2269-MEL et DDHK62-MEL.

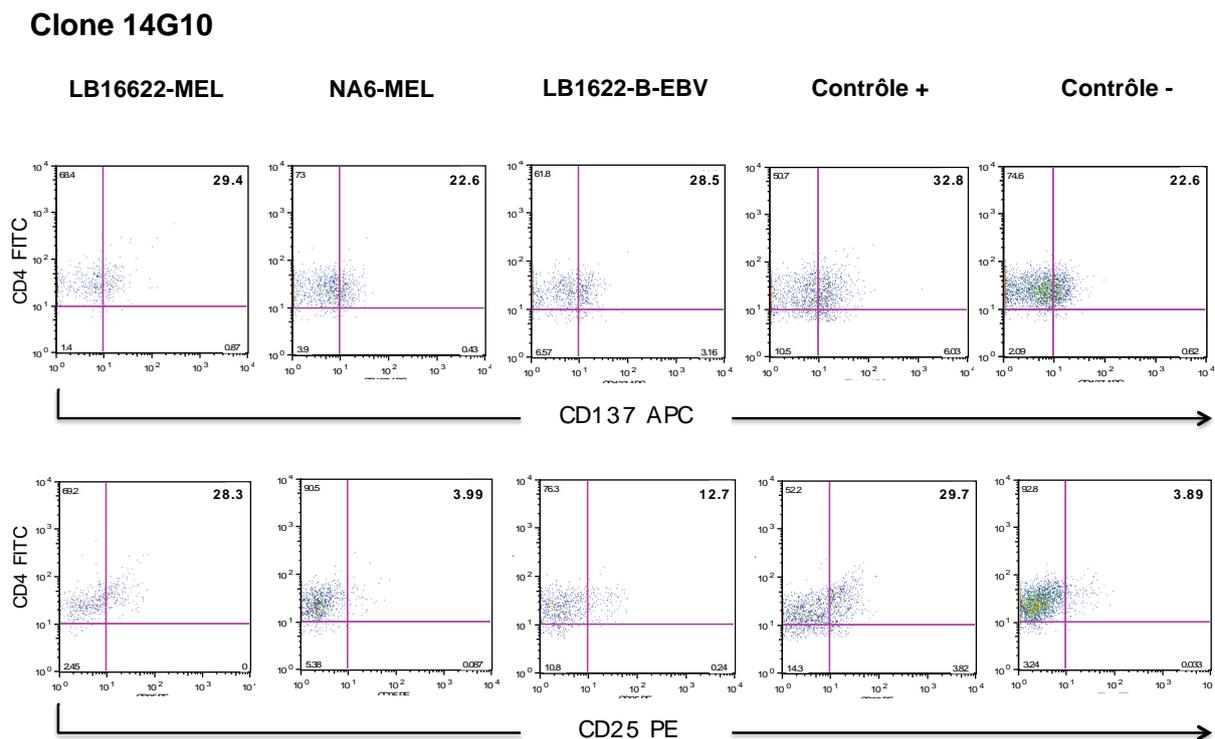
Cependant, le clone 14 F5 exprimait de façon remarquable CD25 et CD137 aussi bien en présence de la lignée de mélanome LB1622-MEL que des lymphocytes B LB1622-MEL, faisant alors évoquer une reconnaissance allogénique des cellules LB1622-MEL par ce clone (Fig.14).

### Clone 14F5



**Figure 14.** Expression des marqueurs d'activation lymphocytaire du clone 14F5 stimulé par des lignées de mélanomes individualisées. Les lymphocytes du clone T (20.000/puits) ont été cultivés en monoplicats avec les lignées de mélanomes LB1622-MEL et LB2269-MEL (40.000/puits) pendant une nuit. Comme témoins, le clone 14G10 a été stimulé avec des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (témoin positif) et mis en présence de cellules non pertinentes (lymphocytes B-EBV LB1622, cellules humaines de rein) à titre de témoin négatif. Les marqueurs d'activation lymphocytaire CD25 et CD137 ont été mesurés en cytométrie de flux à la surface du clone T CD4.

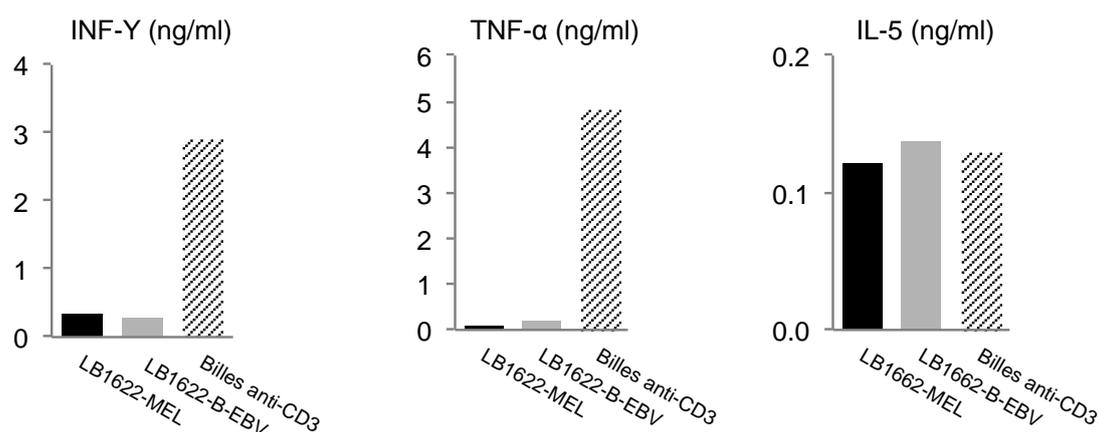
Le clone 14G10 exprimait CD25 en présence de la lignée LB1622-MEL aussi fortement que le contrôle positif, et non pas en présence des lymphocytes B autologues. Cela suggérait cette fois une reconnaissance spécifique des protéines mélanocytaires exprimées par la lignée LB1622-MEL (Fig.15). Afin de confirmer ce résultat, il nous fallait encore analyser les cytokines produites dans le surnageant de co-cultures.



**Figure 15. Expression des marqueurs d'activation lymphocytaire du clone 14G10 stimulé par des lignées de mélanomes individualisées.** Les lymphocytes du clone T (20.000/puits) ont été cultivés en monoplicats avec les lignées LB1622-MEL et NA6-MEL (40.000/puits) pendant une nuit. Comme témoins, le clone 14G10 a été stimulé avec des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (témoin positif) ou mis en présence de cellules non pertinentes (lymphocytes B-EBV LB1622, cellules humaines de rein) à titre de témoins négatifs. Les marqueurs d'activation lymphocytaire CD25 et CD137 ont été mesurés en cytométrie de flux à la surface du clone T CD4.

#### ❖ Contrôle de la spécificité du clone 14 G10

Les surnageants de co-cultures ont été décongelés afin d'y mesurer les concentrations de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL-5 produites par le clone 14G10 en présence de la lignée tumorale LB1622-MEL ou de lymphocytes B LB1622. Le niveau de production de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  était bas dans les deux cas. Cependant, les concentrations de ces cytokines étaient augmentées dans le surnageant après stimulation du clone 14G10 avec des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Fig.16). Enfin, le niveau de production d'IL-5 était le même quel que soit le mode de stimulation. Le clone 14G10 ne reconnaissait donc pas spécifiquement la lignée de mélanome LB1622-MEL.



**Figure 16. Evaluation de la sécrétion de cytokines par le clone 14G10 stimulé par la lignée AUMA.** Les lymphocytes du clone T (20.000/puits) ont été cultivés en monocultures avec les cellules du mélanome LB1622-MEL (40.000/puits) pendant une nuit. A titre de témoins, le clone 14G10 a été stimulé avec des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (témoin positif) ou avec les lymphocytes B du patient LB1622 (40.000/puits) à titre de témoin négatif. La quantité de TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\gamma$ , et d'IL-5 dans le surnageant de co-cultures a été estimée par un dosage groupé des cytokines (test multiplex).

## **2. ANALYSE DE LA SPECIFICITE ANTIGENIQUE DE 107 CLONES ISOLES DU LIQUIDE CEREBROSPINAL**

Les différentes techniques de stimulation antigénique n'ayant pas permis jusqu'alors d'identifier un clone T auto-réactif, nous devons envisager une approche d'avantage sensible et tout en étant reproductible pour envisager tester la spécificité antigénique d'un grand nombre de clones.

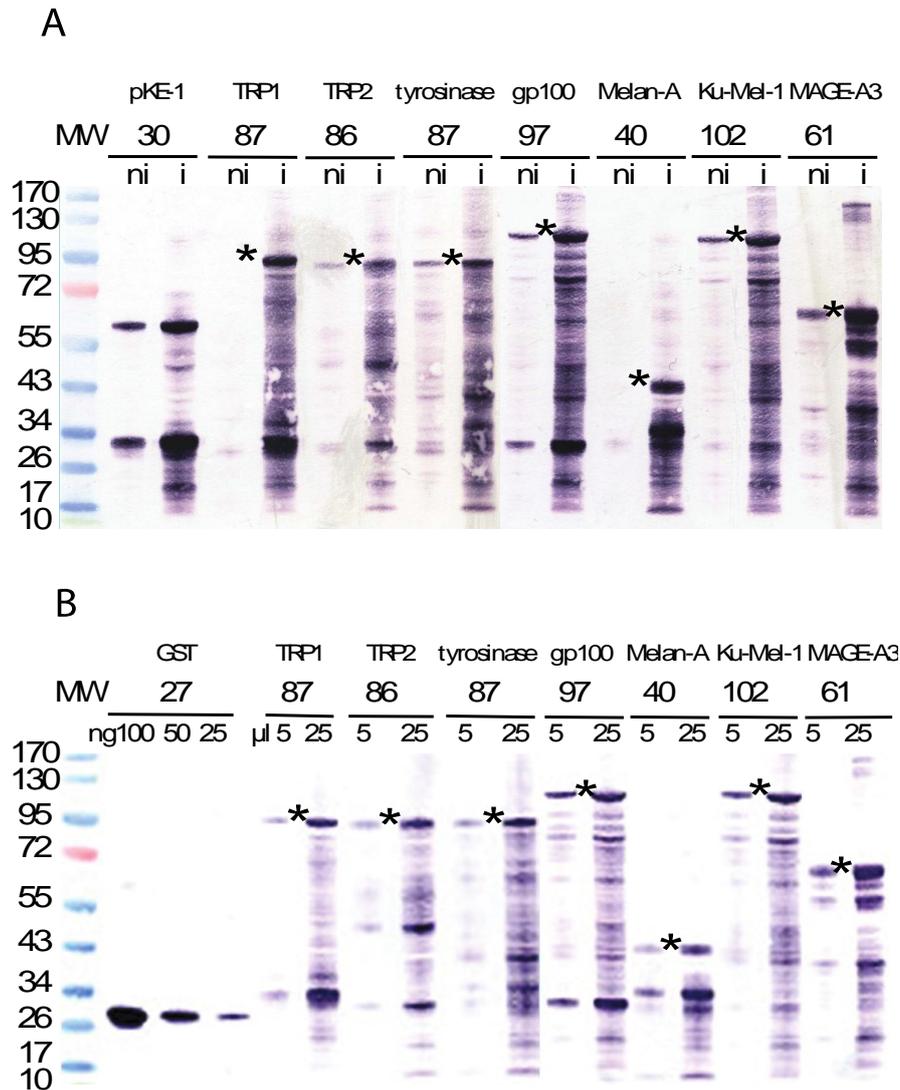
### **2.1 Une approche basée sur l'utilisation de protéines produites dans des bactéries recombinantes**

Nous avons décidé d'utiliser une approche très sensible développée précédemment dans notre laboratoire [74]. Après une étape de construction, des bactéries recombinantes produisant chacune des protéines d'intérêt (TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A et KU-MEL-1) ont été incubées avec du complément permettant d'augmenter l'absorption des protéines par les cellules présentatrices d'antigènes, à savoir des lymphocytes B-EBV autologues. Ces lymphocytes B-EBV chargés de bactéries ont été ensuite utilisés comme cellules stimulantes pour chacun des clones de lymphocyte T.

#### *Construction de bactéries productrices de protéines mélanocytaires*

Des séquences d'ADN codant pour chacune des protéines mélanocytaires TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A et KU-MEL-1, ont été introduites dans le vecteur PKE-1, permettant la production de protéines recombinantes fusionnées à l'extrémité C-terminale de la glutathion-S-transférase (GST) [78]. L'expression du gène recombinant est contrôlée par le répresseur lacI, et peut être induite par l'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Les bactéries transformées avec les différents plasmides ont été sélectionnées, l'IPTG a été ajouté aux cultures, et la production des protéines recombinantes a été contrôlée dans des extraits bactériens par Western Blot avec un anticorps anti-GST.

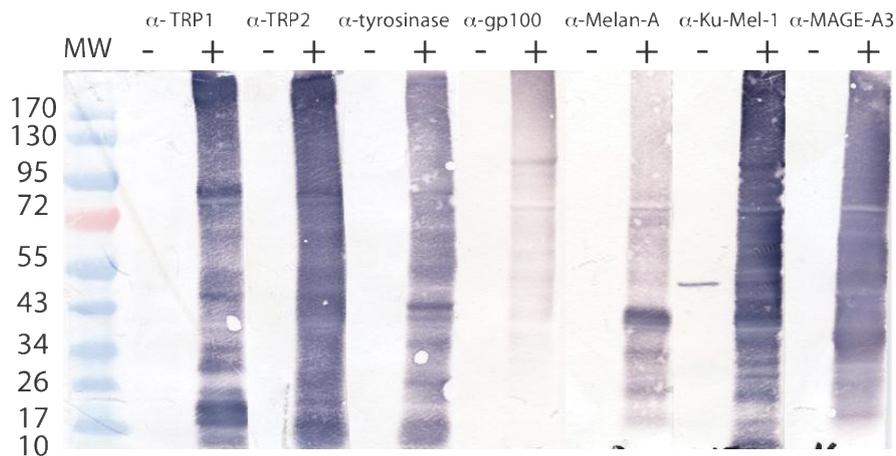
Des protéines de fusion entières ont été détectées pour chaque clone bactérien, avec un grand nombre de produits plus petits qui peuvent représenter des produits de traduction avortée ou des produits de dégradation (Fig.17A). L'identité de la protéine de fusion mélanocytaire a été confirmée en utilisant des anticorps spécifiques de chacune des protéines mélanocytaires d'intérêt (Fig.18). La quantité de chaque protéine de fusion entière a été estimée avec une protéine GST recombinante purifiée comme référence (Fig.17B, tableau 1). Cette quantité variait de 75 à 300 picomoles de protéine par ml de culture.



**Figure 17. Analyse par Western Blot des protéines recombinantes fusionnées à la GST produites dans des bactéries.** La protéine GST et la protéine recombinante fusionnée à la GST ont été détectées avec un anticorps monoclonal anti-GST. MW: l'échelle de poids moléculaire est exprimée en Kd. (A) Des quantités similaires de protéines extraites à partir des cultures bactériennes avant (NI) et après (I) induction par l'IPTG, ont été chargées. La masse moléculaire attendue de la protéine de fusion de longueur maximale est indiquée par \*. Une protéine d'un poids de 29,9 Kd est attendue en cas de vecteur PKE-1 vide. Elle contient la séquence de la GST d'un poids de 26,5 Kd avec des acides aminés supplémentaires à l'extrémité C-terminale. Des dimères de la protéine GST (~60 Kd) ont également été observés. (B) La quantité des protéines entières, fusionnées à la GST (\*), produites dans les bactéries a été estimée à l'aide de la protéine recombinante GST purifiée comme référence. Des extraits de 5 et 25 μl de cultures de bactéries induites et des quantités connues d'une protéine recombinante GST (26,5 Kd) ont été chargées. La quantité (ng) de protéine GST au sein de la protéine de fusion entière a été évaluée visuellement par comparaison avec la protéine GST purifiée et convertie en nombre de moles de GST puis en nombre de moles de protéine fusionnée à la GST.

Protéine de fusion	µg de GST au sein de la protéine fusionnée avec GST	pmoles de protéine fusionnée avec GST
TRP1	4	150
TRP2	2	75
gp100	8	300
KU-MEL-1	8	300
Melan-A	2	75
Tyrosinase	2	75
MAGEA3	15	570

Tableau 1 : Les quantités sont exprimées par millilitre de culture induite. pmoles : picomoles



**Figure 18. Identité des protéines recombinantes fusionnées à la GST produites dans des bactéries.** Chaque protéine d'intérêt produite en fusion avec la GST a été détectée avec un anticorps spécifique correspondant. Les profils de Western Blot montrent une variété de fragments de protéines recombinantes comme précédemment détectées par l'anticorps monoclonal anti-GST (Fig.17). (-): Extraits de cultures de bactéries induites contenant le vecteur vide *PKE-1*. (+): Extraits de cultures de bactéries recombinantes induites contenant la séquence codant pour les protéines fusionnées à la GST.

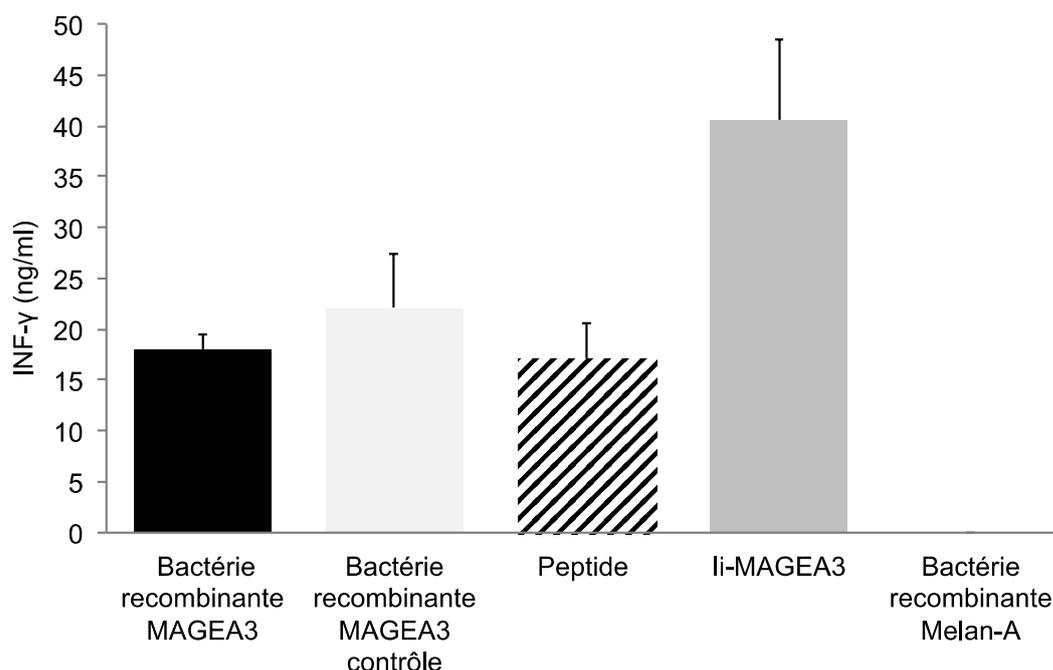
### *Validation de l'approche avec un clone de lymphocyte T CD4 anti-MAGEA3*

Pour évaluer la sensibilité de notre approche reposant sur la présentation d'antigènes produits par des bactéries recombinantes, nous ne disposions pas de clones de lymphocytes T CD4 reconnaissant spécifiquement un peptide dérivant de l'une des six protéines mélanocytaires. De plus, aucun clone fonctionnel n'était disponible dans d'autres laboratoires. Nous avons alors utilisé un clone de lymphocytes T CD4 dirigé contre un peptide de MAGEA3 présenté par HLA-DP4. Nous avons construit un vecteur PKE-1 contenant une séquence codante pour MAGEA3. L'expression de la protéine de fusion a été confirmée par Western Blot comme décrit ci-dessus (Fig.17A et Fig.18). La quantité de la protéine totale recombinante GST-protéine MAGEA3 a été estimée à environ 570 picomoles par ml de culture (Fig.17B, tableau 1). Les bactéries productrices de MAGEA3 ont été collectées, lavées, opsonisées avec le complément humain, et incubées pendant une nuit avec des lymphocytes B-EBV HLA-DP4 afin de générer des cellules présentatrices d'antigènes portant à leur surface des molécules HLA-DP4 présentant des peptides dérivés de la protéine MAGEA3.

Une lignée de lymphocytes B-EBV HLA-DP4 a été générée à partir de cellules du sang périphérique du patient VKH. Comme premier témoin positif, nous avons chargé les cellules B-EBV avec une bactérie recombinante exprimant MAGEA3 qui a été obtenue précédemment dans notre laboratoire selon les modalités de construction exposées ci-dessus [74]. Comme deuxième témoin positif, nous avons utilisé des lymphocytes B-EBV HLA-DP4 transduits avec un rétrovirus codant pour une chaîne invariante humaine tronquée (Ii) fusionnée à la protéine MAGEA3 (réto-Ii.MAGEA3) [79]. Dans cette protéine chimérique, des signaux présents au sein de la chaîne invariable dirigent la protéine MAGEA3 vers les compartiments intracellulaires où se fait le traitement des antigènes de classe II [79]. En tant que troisième témoin positif, des cellules présentatrices ont été chargées avec le peptide MAGEA3 reconnu par le clone de lymphocytes T CD4 anti-MAGEA3.DP4 [80]. La

reconnaissance des antigènes dérivant de la protéine MAGEA3 par les lymphocytes T a été évaluée en mesurant les quantités d'IFN- $\gamma$  libérées dans le surnageant des co-cultures de 20 heures.

Les lymphocytes T anti-MAGEA3.DP4 ont sécrété des quantités similaires d'IFN- $\gamma$  lors d'un contact avec des cellules présentatrices chargées soit avec nos bactéries recombinantes productrices de MAGEA3, soit avec les bactéries contrôle MAGEA3 précédemment construites dans notre laboratoire, ou avec le peptide MAGEA3.DP4. Ils ont sécrété plus d'IFN- $\gamma$  après stimulation par des lymphocytes transduits avec li-MAGEA3 (Fig.19). Nos constructions bactériennes exprimant MAGEA3 étaient donc capables de stimuler le clone anti-MAGEA3.DP4.



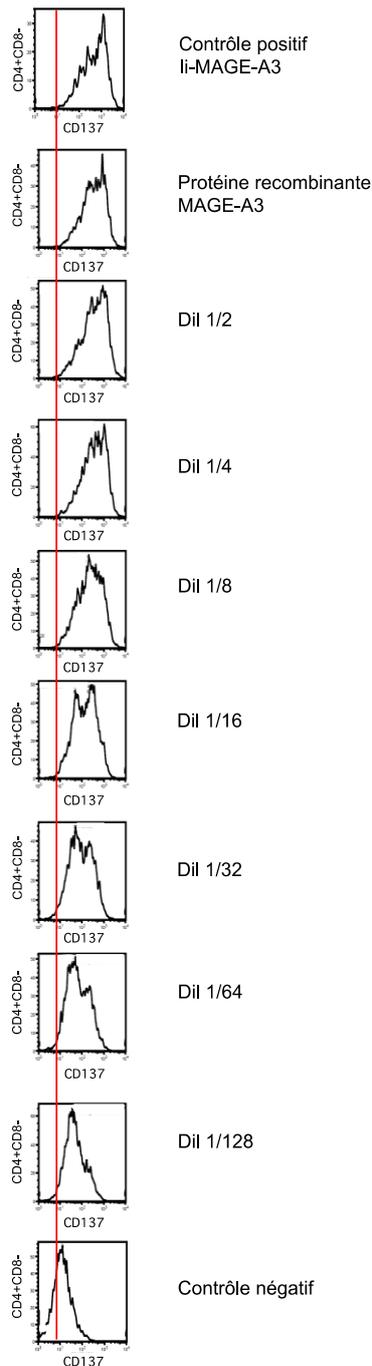
**Figure 19. Reconnaissance des lymphocytes B-EBV chargés avec des bactéries exprimant MAGEA3.** Les cellules présentatrices d'antigènes (30.000/puits) sont des lymphocytes B-EBV HLA-DP4 chargés avec des bactéries opsonisées avec du complément, qui expriment soit MAGEA3, soit Melan-A en tant que témoin négatif. Cette lignée cellulaire B-EBV a été obtenue à partir du patient VKH n°3. Comme témoins positifs, nous avons utilisé des lymphocytes B-EBV chargés avec une bactérie recombinante produisant MAGEA3 déjà construite dans notre laboratoire, mais également des lymphocytes B transduits avec un rétrovirus codant pour une chaîne invariante humaine tronquée (Ii) fusionnée à la protéine MAGEA3 (rétro-Ii.MAGEA3), ou encore des lymphocytes B-EBV chargés avec le peptide MAGEA3.DP4 ACYEFLWGPRALEVTS [24]. Au total, 5.000 cellules du clone T anti-MAGEA3.DP4 ont été ajoutées à chaque puits. La quantité d'INF- $\gamma$  sécrétée dans le surnageant de la co-culture a été mesurée par ELISA. Les résultats présentés correspondent à une moyenne des co-cultures réalisées en triplicats.

### *L'expression de CD137 comme marqueur d'activation d'un lymphocyte T*

Afin de ne pas se limiter à un profil de sécrétion cytokinique pour la détection des lymphocytes T activés, nous avons à nouveau utilisé le marqueur CD137 présent à la surface des lymphocytes T activés [77]. Nous avons détecté par cytométrie en flux le marqueur CD137 après stimulation du clone T CD4 anti-MAGEA3.DP4 avec des lymphocytes B-EBV.DP4 du patient, préalablement incubés avec des clones bactériens exprimant MAGEA3 dilués dans des bactéries non pertinentes. Comme témoin positif, le clone anti-MAGEA3.DP4 a été stimulé par des lymphocytes transduits avec Ii-MAGEA3 [79]. Comme témoin négatif, le clone T CD4 anti-MAGEA3 a été co-cultivé avec des lymphocytes B-EBV.DP4 du patient, chargés uniquement avec des bactéries non pertinentes. Le marqueur d'activation lymphocytaire CD137 était facilement détectable lorsque les bactéries exprimant MAGEA3 avaient été diluées 128 fois dans des bactéries non pertinentes (Fig.20).

Un millilitre de bactéries exprimant MAGEA3 opsonisé avec du complément contenait environ 570 picomoles de protéine MAGEA3 (tableau 1). En considérant que notre approche permettait de détecter MAGEA3 diluée au moins 128 fois, une suspension bactérienne contenant environ 4,45 picomoles de protéines MAGEA3 (570 divisé par 128) devait être reconnue par les lymphocytes T CD4 anti-MAGEA3.DP4. Certaines des bactéries recombinantes produisant environ la quantité minimale de 75 picomoles de protéines mélanocytaires (tableau 1), il était donc possible de les diluer encore 16 fois (75 divisé par 4,45). Sachant que nous avons regroupé les bactéries recombinantes par trois et quatre bactéries différentes lors des tests de spécificité antigénique des lymphocytes T, la quantité des protéines mélanocytaires produites par les bactéries ainsi regroupées ne devait donc pas être un facteur limitant.

**Expression  
CD137**



**Figure 20. Détection du marqueur d'activation CD137 après stimulation du clone T CD4 anti-MAGEA3 avec des bactéries productrices de MAGEA3 diluées avec des bactéries non pertinentes.** Après induction de l'expression des protéines par l'IPTG, les bactéries productrices de MAGEA3 ont été mélangées avec des bactéries productrices de Melan-A, opsonisées avec du complément et incubées pendant une nuit avec des lymphocytes B-EBV.DP4, qui ont été générés à partir de cellules sanguines du patient VKH n°3. Les lymphocytes T CD4 anti-MAGEA3.DP4 (5.000/puits) ont été ajoutés aux cellules présentatrices d'antigènes (30.000/puits). Des lymphocytes B-EBV.retro-Ii.MAGEA3 et des lymphocytes B-EBV.DP4 chargés avec des bactéries exprimant Melan-A ont été utilisés comme témoins positif et négatif, respectivement. Le marqueur d'activation lymphocytaire CD137 a été mesuré en cytométrie de flux à la surface des clones T CD4 cultivés en monocults.

## **2.2 Criblage de clones en utilisant le marqueur d'activation CD137**

Connaissant la limite de détection du marqueur d'activation lymphocytaire CD137 en cas de dilution des bactéries recombinantes, nous pouvions dès lors utiliser ce marqueur afin de tester sur un échantillon de 40 clones T la reconnaissance des protéines d'intérêt produites par nos constructions bactériennes.

Les bactéries recombinantes exprimant les protéines d'intérêt KU-MEL-1, gp100, Melan-A, TRP1, TRP2, tyrosinase et MAGEA3 ont été mises en culture en présence d'IPTG, puis opsonisées avec du complément humain. Des lymphocytes B-EBV.DP4 autologues ont été incubés durant 20 heures en présence de deux mélanges de bactéries recombinantes opsonisées, l'un contenant les bactéries exprimant TRP2, TRP2 et gp 100 et l'autre celles exprimant tyrosinase, KU-MEL-1, Melan-A, et MAGEA3. Les clones lymphocytaires à tester ont été co-cultivés avec les lymphocytes B-EBV.DP4 autologues préalablement incubés avec les mélanges bactériens. Comme témoin positif d'activation, les clones lymphocytaires ont été mis en présence de billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Comme autre témoin positif, le clone de lymphocyte T anti-MAGEA3 a été stimulé par des lymphocytes B-EBV.DP4 préalablement incubés avec le mélange bactérien contenant MAGEA3.

Sur les 40 clones lymphocytaires testés, aucun n'a exprimé le marqueur d'activation CD137 en présence des protéines recombinantes d'intérêt aussi fortement qu'en cas de stimulation par des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (données non présentées). Cependant, les cellules du clone T CD4 anti-MAGEA3.DP4 exprimaient CD137 avec la même intensité, qu'elles soient co-cultivées avec des lymphocytes B-EBV chargés avec le mélange bactérien exprimant MAGEA3 ou stimulées par des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 (données non présentées). Nous pouvons donc en déduire qu'aucun des 40 premiers clones analysés ne reconnaissait les protéines mélanocytaires synthétisées par les bactéries recombinantes.

### **2.3 Criblage de l'ensemble des clones en utilisant la sécrétion de cytokines comme signe d'activation**

Nous avons ensuite opté pour des dosages groupés de cytokines potentiellement produites par l'activation lymphocytaire car contrairement à la détection du marqueur d'activation CD137 en cytométrie de flux, cela rendait possible l'évaluation à grande échelle de l'ensemble des clones obtenus. En plus de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$ , et de l'IL-5, nous avons dosé l'IL-17 car, selon des données récentes, les lymphocytes T CD4 sécrétant de l'IL-17 seraient impliqués dans la physiopathogénie des maladies auto-immunes du système nerveux central comme la maladie de VKH [26].

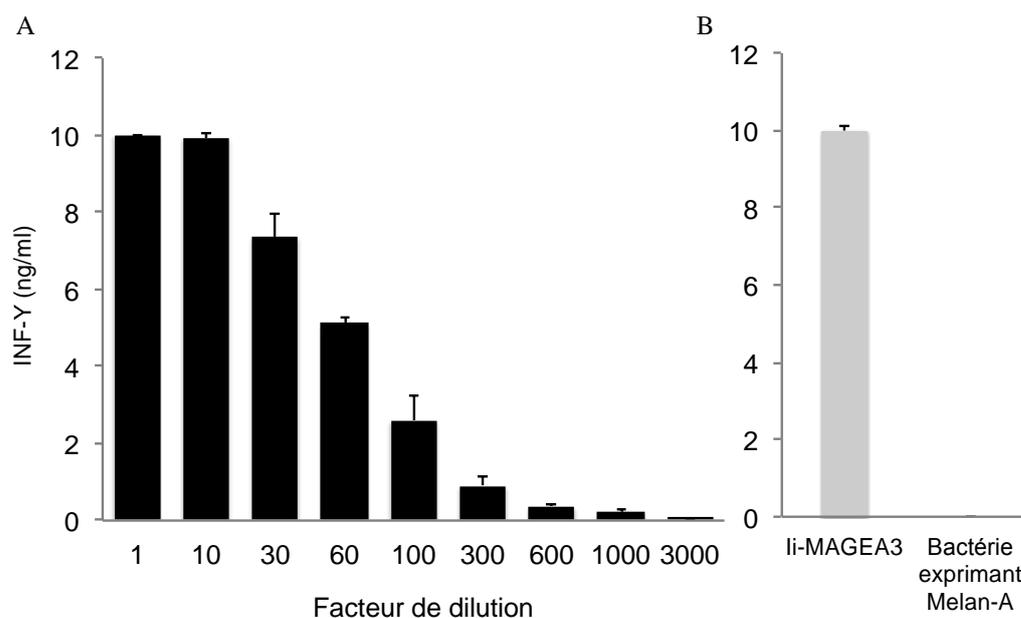
Quoi qu'il en soit, il nous fallait au préalable vérifier la sensibilité d'une détection des clones auto-réactifs reposant sur une mesure des cytokines.

#### *Sensibilité de détection de l'activation lymphocytaire T par la mesure des cytokines*

Les bactéries productrices de protéines MAGEA3 ont été diluées dans des bactéries non pertinentes, opsonisées avec du complément humain, et incubées durant une nuit avec des lymphocytes B-EBV.DP4 du patient. La reconnaissance par les lymphocytes T CD4, évaluée par la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , était facilement détectable lorsque les bactéries productrices de protéine MAGEA3 avaient été diluées 300 fois dans les bactéries non pertinentes, et encore détectable lorsque le facteur de dilution était de 1.000 (Fig.21).

Pour mémoire, 1 ml de bactéries opsonisées exprimant MAGEA3 contenait environ 570 picomoles de protéine MAGEA3 (tableau 1). En considérant que notre approche de détection avec MAGEA3 permettait un facteur de dilution d'au moins 300, une suspension bactérienne contenant environ 1,9 picomoles de protéines MAGEA3 (570 divisé par 300) devait être reconnue par les lymphocytes T CD4 anti-MAGEA3.DP4. Certaines des bactéries recombinantes produisant la quantité minimale de 75 picomoles de protéines mélanocytaires (tableau 1), il était donc permis de les diluer encore 39 fois (75 divisé par 1,9). Sachant que

nous avons regroupé au maximum par 4 les bactéries recombinantes (voir ci-dessous), la quantité des protéines mélanocytaires produites par les bactéries ne devait donc pas être là encore un facteur limitant.



**Figure 21. Sensibilité de détection de la production d'IFN- $\gamma$  après stimulation par les bactéries MAGEA3 diluées avec des bactéries non pertinentes.** (A) Après induction de l'expression des protéines par l'IPTG, les bactéries productrices de MAGEA3 ont été mélangées avec des bactéries productrices de Melan-A, opsonisées avec du complément et incubées pendant une nuit avec des lymphocytes B-EBV.DP4, qui ont été générés à partir de cellules sanguines du patient VKH n°3. Les lymphocytes T CD4 anti-MAGEA3.DP4 (5.000/puits) ont été ajoutés aux cellules présentatrices d'antigènes (30.000/puits). (B) Les lymphocytes B-EBV.retro-Ii.MAGEA3 et les lymphocytes B-EBV.DP4 chargés avec des bactéries exprimant Melan-A ont été utilisés comme témoins positif et négatif, respectivement. La quantité d'IFN- $\gamma$  sécrétée dans le surnageant après une nuit de co-culture a été mesurée par ELISA. Les résultats présentés correspondent à une moyenne de co-cultures réalisées en triplicats.

### *Criblage de l'ensemble des clones T*

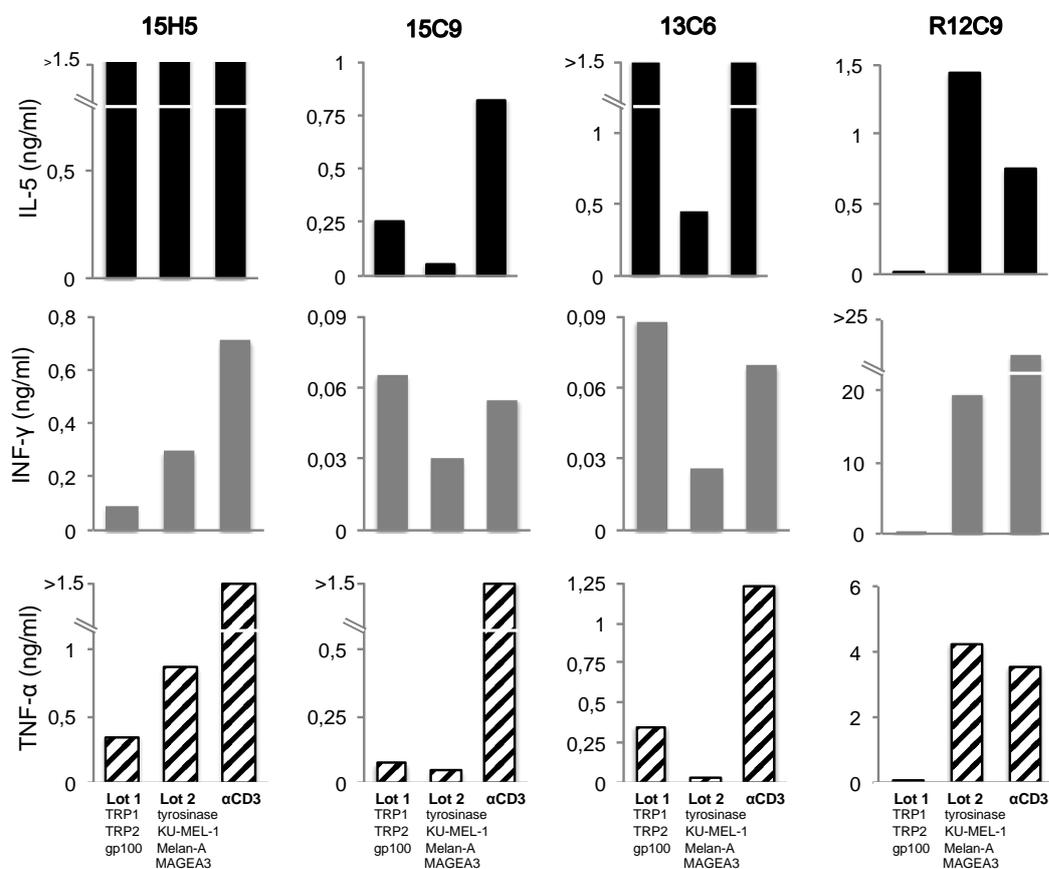
Les cellules de chacun des clones de lymphocytes T isolés à partir du LCS du patient ont été cultivées en présence de cellules présentatrices d'antigènes, à savoir des lymphocytes B-EBV.DP4 autologues qui ont été préalablement incubés pendant 20 heures avec l'un des deux groupes de bactéries opsonisées. Le premier groupe contenait trois bactéries différentes, produisant TRP1, TRP2 ou gp100. Le second groupe contenait quatre bactéries différentes, produisant tyrosinase, Melan-A, KU-MEL-1 et MAGEA3. Comme témoin positif, chaque clone de lymphocytes T a été stimulé avec des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Comme autre témoin positif, des lymphocytes B-EBV.DP4 autologues chargés avec des bactéries exprimant MAGEA3, ont été testés pour leur reconnaissance par les lymphocytes T anti-MAGEA3. Les quantités de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5 et IL-17 libérés dans le surnageant de co-cultures durant la nuit ont été estimées par un test « multiplex ». Ce dernier permet de doser dans un même puits de culture plusieurs cytokines grâce à des billes magnétiques recouvertes d'anticorps capturant spécifiquement chacune des cytokines.

Un total de 145 clones de lymphocytes T ont été testés en monoplicats. Les 38 clones ayant sécrété moins de 100 pg/ml pour chacune des 4 cytokines en cas de stimulation par les billes, n'ont pas été pris en considération.

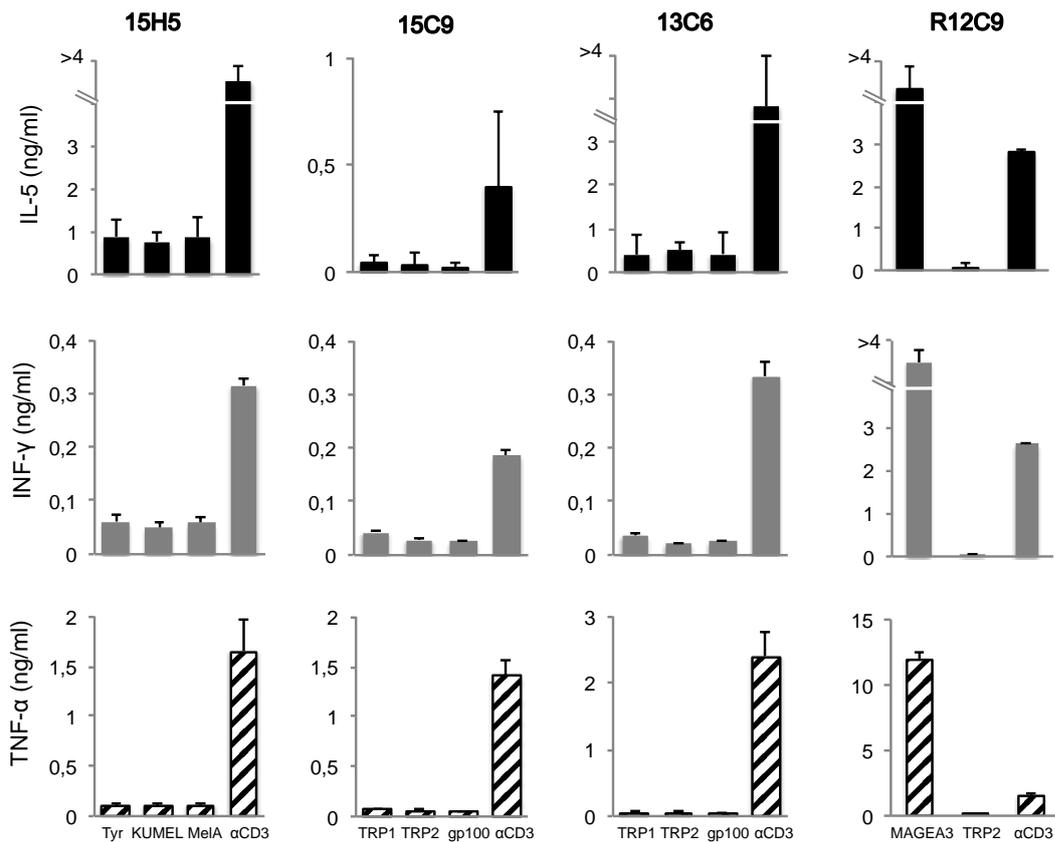
Les 107 autres clones ont été testés en monoplicats pour leur capacité à sécréter des cytokines lors de la stimulation par des lymphocytes B-EBV chargés avec chacun des deux groupes de bactéries. Un clone était considéré positif s'il sécrétait au moins deux fois plus d'une cytokine donnée lors de la stimulation avec un groupe de bactéries comparé à l'autre groupe. Trois clones étaient positifs pour deux cytokines (Fig.22) et huit clones positifs pour une cytokine (données non présentées). Ces 11 clones ont été amplifiés et retestés en triplicats avec des lymphocytes B-EBV.DP4 autologues chargés cette fois séparément avec chacune des bactéries recombinantes. Aucun d'entre eux ne s'est avéré positif dans ce second test (la figure

23 montre les données pour les trois clones montrés dans la figure 22). Nous avons conclu que la positivité initiale résultait probablement d'erreurs techniques ou de l'analyse en monoplicats.

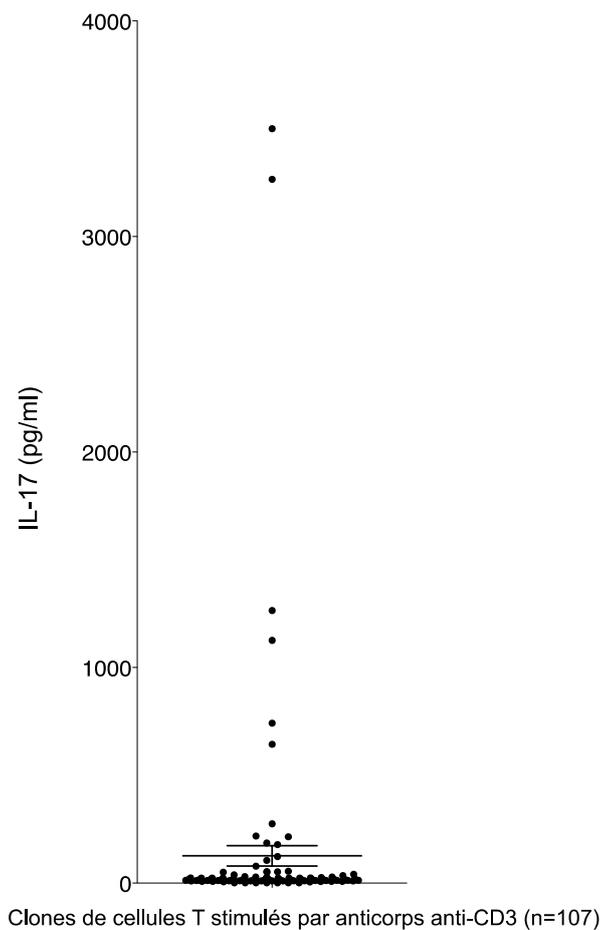
La sécrétion d'IL-17 a également été évaluée par le test multiplex, et de façon notable, neuf des 107 clones ont produit des quantités importantes d'IL-17 en réponse à la stimulation avec des billes revêtues d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Fig.24).



**Figure 22. Première analyse de la sécrétion de cytokines des clones T CD4 après stimulation avec des protéines mélanocytaires.** Les bactéries recouvertes de complément ont été regroupées en deux lots, puis ajoutées aux lymphocytes B-EBV.DP4 autologues et incubées pendant une nuit. Les lymphocytes T CD4 (5.000/puits) ont été cultivés en monoplicats avec des lymphocytes B-EBV.DP4 autologues (30.000/puits). Le clone T CD4 anti-MAGEA3.DP4 a été utilisé comme témoin positif. La quantité de cytokines dans le surnageant de co-cultures a été estimée par un test multiplex permettant le dosage groupé des cytokines.



**Figure 23. Test de sécrétion des cytokines avec des clones sélectionnés et stimulés par les protéines mélanocytaires individualisées.** Après l'induction de l'expression des protéines par l'IPTG et opsonisation avec du complément, les bactéries ont été ajoutées à des lymphocytes B-EBV.DP4 autologues et incubées pendant une nuit. Des cellules de chaque clone T CD4 (5.000/puits) ont été ajoutées aux lymphocytes B-EBV.DP4 autologues (30.000/puits). Comme témoin positif, le clone de cellules T CD4 anti-MAGEA3.DP4 a été utilisé. La quantité de cytokines dans le surnageant de co-cultures a été estimée avec un kit multiplex de détection multicytokine. Les résultats présentés correspondent à une moyenne de co-cultures réalisées en triplicats.



**Figure 24. Certains clones de cellules T obtenues à partir du liquide cébrospinal d'un patient à la phase aiguë de la maladie de VKH sécrètent de l'IL-17. Des clones de cellules T (n=107) ont été stimulés avec des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28. La quantité d'IL-17 dans le surnageant de co-cultures pendant une nuit a été mesurée dans le cadre du dosage groupé des cytokines (test multiplex). Aucun des clones présentés dans les figures 22 et 23 n'a sécrété de quantités importantes d'IL-17.**

## **DISCUSSION ET CONCLUSIONS**

L'objectif de ce travail était de déterminer la spécificité antigénique de lymphocytes T CD4 potentiellement auto-réactifs obtenus chez des patients VKH prélevés à différentes phases évolutives de la maladie. Lors d'expériences préliminaires reposant sur des approches manquant de sensibilité, nous n'avons pas isolé de lymphocytes auto-réactifs dans le sang de 2 patients. Dans le cas d'un troisième patient en phase aiguë, nous avons utilisé une autre méthodologie et surtout, isolé les lymphocytes du LCS. Nous avons obtenu plus de 100 clones de lymphocytes T, dont 90% étaient CD4<sup>+</sup>. Chacun d'eux a été testé pour sa capacité à sécréter des cytokines après stimulation avec des cellules présentatrices d'antigènes autologues chargées avec l'une des protéines recombinantes mélanocytaires TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A ou KU-MEL-1. Aucun des clones de lymphocytes T n'a été capable de sécréter du TNF- $\alpha$ , de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-5, ou de l'IL-17 au contact de cellules B autologues chargées avec chacune des six protéines mélanocytaires. Ainsi, les clones de lymphocytes T CD4 isolés du LCS de ce patient VKH à la phase aiguë ne reconnaissaient aucune des six protéines mélanocytaires produites par les bactéries recombinantes.

## **1. QUELS SONT LES ARGUMENTS EN FAVEUR DE L'INTERVENTION D'ANTIGENES MELANOCYTAIRES DURANT LA PHASE AIGUE DE LA MALADIE ?**

A ce jour, aucun auto-antigène n'a été aussi fortement impliqué dans la physiopathologie de la maladie de VKH que ceux dérivant de mélanocytes ou de mélanomes :

### **1.1 Arguments histologiques**

Outre le fait que les mélanocytes sont les seules cellules communes aux quatre tissus cibles, à savoir choroïde, méninge, oreille interne et peau, les études histologiques décrivaient à l'origine le mélanocyte comme la cible cellulaire privilégiée du système immunitaire. Sugiura rapportait dès les années 1970 la présence fréquente de cellules épithélioïdes au sein de la

choroïde que l'on sait être le point de départ de l'inflammation oculaire. Ces cellules épithélioïdes y étaient décrites en amas, parfois confluentes en cellules géantes, dont les lysosomes contiennent des granules de mélanine. Ikui conclut à la suite de plusieurs travaux que ces cellules épithélioïdes n'étaient que des mélanocytes engagés dans la réaction inflammatoire [1].

Dans les années 1990, des études en immunohistochimie ont montré que les mélanocytes présents au sein du foyer inflammatoire choroïdien des patients VKH exprimaient à leur surface des molécules HLA de classe II [19,20], suggérant alors que les mélanocytes choroïdiens étaient capables de présenter des antigènes aux lymphocytes T CD4.

## **1.2 Arguments immunologiques**

Depuis les années 1990, plusieurs travaux ont soutenu l'idée selon laquelle les mélanocytes étaient la source d'auto-antigènes. En effet, l'injection de protéines de différenciation mélanocytaire TRP1 et TRP2 chez les rats Lewis est capable d'induire une inflammation oculaire et extra-oculaire, semblable à la maladie humaine [61]. Des anticorps dirigés contre les protéines mélanocytaires, KU-MEL-1 et PAX-3 ont été détectés dans le sang périphérique de patients VKH [66, 81]. Une équipe japonaise aurait réussi à stimuler des lymphocytes issus du sang de patients VKH avec une protéine soluble de 75 kd isolée à partir d'une culture de la lignée de mélanome G-361 [82]. Un patient présentant un mélanome métastatique a développé les manifestations de la maladie de VKH après un transfert adoptif de lymphocytes infiltrant les tumeurs. Ces derniers contenaient des pourcentages élevés de lymphocytes T CD8 spécifiques d'antigènes peptidiques dérivés de la protéine mélanocytaire Melan-A [65]. Des lymphocytes T CD4 isolés à partir du sang ou de l'humeur aqueuse prélevés à la phase aiguë de la maladie de VKH, ont été stimulés *in vitro* avec des peptides dérivés de protéines

mélanocytaires TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100 et Melan-A. Les lymphocytes T produisaient de l'IFN- $\gamma$  après stimulations itératives avec les mêmes peptides [33,62,63,83].

### **1.3 Limites des résultats publiés**

Bien que ces travaux mettent en évidence la capacité des protéines mélanocytaires à entretenir une réponse immunitaire B ou T chez les patients VKH, un certain nombre de points décrits ci-après limitent la portée de leurs résultats [33,62,63,83].

#### *Manque de spécificité des anticorps isolés*

En 2005, Matsuzaki et al. ont isolé dans le sang de patients VKH et non chez des volontaires sains, des anticorps dirigés contre la protéine PAX3. Après avoir comparé des bibliothèques de cDNA exprimés dans des cellules humaines provenant de tissus différents, ils ont établi que le cDNA de cette protéine s'exprimait préférentiellement dans les mélanocytes ou la lignée de mélanome SK23-MEL [81]. Cependant, ces auteurs n'ont pas évalué la spécificité des anticorps anti-PAX3 pour la maladie de VKH en utilisant un groupe comparateur de malades atteints d'uvéoméningites de nature différente, comme en cas de maladie de Behçet ou de sarcoïdose. De plus, dans un travail ultérieur visant à déterminer les cibles antigéniques reconnues par les anticorps sériques des patients VKH, ces mêmes auteurs ne retrouveront pas les anticorps anti-PAX3 dans le sang de patients VKH en utilisant une approche différente, appelée SEREX. Celle-ci consiste à évaluer la reconnaissance par les anticorps sériques des patients, d'une bibliothèque de cDNA incorporés à un phage, exprimés dans des cellules bactériennes. Dans ce travail, il s'agissait d'une bibliothèque de cDNA préparée à partir de mélanocytes ou d'une lignée de mélanome SK23-MEL [66].

### *Manque de contrôle de spécificité antigénique des lymphocytes T*

En 2000, Yamaki et al. ont réalisé pendant trois jours des cultures en monoplicats de 200.000 cellules mononucléées du sang périphérique en présence de 30  $\mu$ M de peptides longs de  $\pm$  30 acides aminés, correspondant à des séquences de TRP1, TRP2 et tyrosinase [62]. La prolifération a été mesurée au 3<sup>ème</sup> jour par incorporation de thymidine tritiée. La positivité des micropuits a été observée uniquement avec les cellules sanguines des dix patients VKH HLA-DRB1\*04:05, mais pas avec les cellules sanguines des trois témoins sains appariés pour ce HLA [62]. Cela suggère, mais ne prouve pas, que ces patients VKH avaient dans leur sang des lymphocytes T spécifiques des mélanocytes. En effet, les peptides synthétiques sont connus pour être contaminés par des impuretés, à savoir des groupements chimiques protecteurs, qui peuvent stimuler les lymphocytes T. Ainsi, tester la spécificité des lymphocytes T ayant proliféré en présence d'un peptide synthétique en les stimulant à nouveau avec le même peptide peut donner des faux positifs. Il aurait été plus convaincant de montrer que les clones de cellules T étaient capables de reconnaître spécifiquement des cellules autologues exprimant (ou chargées) avec les protéines d'intérêt. Un an plus tard, le même groupe a publié des données similaires, mais dans cette nouvelle série d'expériences, les lymphocytes T qui ont répondu à la stimulation ont été clonés et testés dans un essai de prolifération après stimulation peptidique [83]. Encore une fois, un important contrôle n'a pas été effectué: les cellules T n'ont pas été testées pour leur capacité à reconnaître des cellules autologues chargées avec la protéine entière pertinente. En 2005, un autre groupe de recherche a communiqué des données obtenues auprès de 34 patients VKH portant l'allèle HLA-DRB1\*04:05 et/ou DRB\*15 [33]. La réactivité de certaines microcultures à la stimulation peptidique n'a pas été confirmée en utilisant les cellules présentatrices autologues chargées de la protéine entière pertinente [33]. Des clones de lymphocytes T ont également été établis à partir des cellules infiltrant l'humeur aqueuse de patients VKH DRB1\*04:05.

Leur capacité à sécréter RANTES et de l'IFN- $\gamma$  a été mise en évidence lorsque les peptides dérivant de tyrosinase ou gp100 ont été ajoutés à des concentrations supérieures à 100  $\mu$ M [63]. Des concentrations inférieures à 1  $\mu$ M sont plus que suffisantes pour induire l'activation des lymphocytes T spécifiques [Pierre van der Bruggen, communication personnelle]. Dans cet article, les contrôles avec les protéines entières tyrosinase ou gp100, chargées sur des cellules autologues n'ont pas été effectués. Par ailleurs, les auteurs ont montré que l'un des clones spécifiques du peptide était capable de sécréter des cytokines lors d'un contact avec des cellules de mélanome allogénique. De façon étonnante, la sécrétion de cytokines était sept fois plus élevée avec les cellules de mélanome qu'avec des cellules présentatrices autologues chargées avec 200  $\mu$ M de peptides. Dans l'expérience de mon laboratoire d'accueil, la stimulation avec les cellules présentatrices chargées de peptides est plus forte que la stimulation avec des cellules tumorales exprimant la protéine correspondante [Pierre van der Bruggen, communication personnelle].

#### *Absence d'évaluation de la fréquence des lymphocytes auto-réactifs*

Chez tout donneur de sang, on peut s'attendre à une fréquence de lymphocytes T CD4 capables de reconnaître une combinaison HLA-peptide donnée, à environ  $3 \times 10^{-7}$  dans le sang périphérique (données issues de nos propres observations non publiées avec des cellules T CD8 et des travaux de P. Chaux et al. [84]). Cela suggère qu'il existe potentiellement dans le sang d'un sujet sain des lymphocytes T auto-réactifs dont la fréquence est basse.

Dans les études décrites ci-dessus, les fréquences des cellules T auto-réactives isolées dans le sang ou l'humeur aqueuse des patients VKH n'étaient pas indiquées [63,83]. Étaient-elles plus élevées ou identiques à celles retrouvées chez les donneurs de sang ? En l'absence de fréquence des cellules T auto-réactives, il est impossible de donner une signification à leur présence chez les patients VKH. Pour cette raison, on estime que la fréquence des

lymphocytes T auto-réactifs doit être déterminée dans toute étude visant à déterminer la pathogénicité des lymphocytes T isolés.

## **2. QUELS SONT LES ARGUMENTS EN FAVEUR DE L'INTERVENTION D'ANTIGENES NON MELANOCYTAIRES A LA PHASE AIGUE**

### **2.1 Arguments cliniques**

Les antigènes reconnus par les lymphocytes T auto-réactifs durant la phase aiguë de la maladie de VKH pourraient ne pas être exprimés par les mélanocytes. La dépigmentation de la peau et des phanères n'intervient en effet qu'à la phase à la phase chronique de la maladie et s'avère inconstante. Elle concernerait seulement un tiers des malades et ce, quelle que soit leur origine ethnique [10,85]. Dans ces conditions, la reconnaissance du mélanocyte par le système immunitaire des patients VKH serait aléatoire à la phase chronique et de ce fait, le mélanocyte devrait être envisagé plutôt comme une cible secondaire intervenant après les cibles mises en jeu à la phase aiguë. L'atteinte du mélanocyte n'aurait alors que peu de conséquences délétères puisqu'elle ne serait pas à l'origine de l'inflammation choroïdienne que l'on sait conditionner le pronostic de la maladie.

### **2.2 Arguments histologiques**

Si le mélanocyte n'est qu'une cible antigénique secondaire, la choroïde doit être considérée comme la source principale d'antigènes à l'origine du processus auto-immun. En effet, les décollements choroïdiens sont des manifestations inaugurales de la maladie et il a été clairement montré que l'infiltrat lymphocytaire T prédominait dans la choroïde [20]. De nombreuses catégories de cellules sont présentes au sein du stroma choroïdien et pourraient ainsi constituer ces cibles antigéniques initiales; fibroblastes à l'origine de fibres de collagène et élastiques, cellules musculaires lisses et cellules du système nerveux autonome [86].

### **2.3 Arguments immunologiques**

#### *Auto-antigènes non mélanocytaires*

En utilisant la technique SEREX, des auteurs ont cherché à mettre en évidence des anticorps sériques reconnaissant une librairie de cDNA préparée à partir d'un tissu uvéal. Ils ont ainsi montré la présence dans le sérum des patients VKH et, non chez les volontaires sains, la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes non mélanocytaires : l'uveal auto-antigène (UACA) et du lens epithelium derived growth factor (LEDGF), exprimés dans la choroïde mais aussi dans d'autres tissus comme le muscle squelettique, le foie et les poumons [87,88]. Contrairement aux anticorps dirigés contre l'antigène UACA, ceux dirigés contre LEDGF étaient significativement plus fréquents dans le sang des patients VKH que dans le sang de patients atteints d'uvéoméningite de Behçet ou de sarcoïdose (66,7% versus 21,6%,  $p < 0,001$ ), suggérant que LEDGF était une cible antigénique spécifique de la maladie de VKH. Toutefois, il faut souligner que ce travail évaluait la spécificité des anticorps anti-LEDGF pour une maladie humaine à partir d'une librairie de cDNA issus d'un tissu uvéal d'origine animale [87]. D'ailleurs, la spécificité de ces anticorps ne sera pas confirmée dans un travail ultérieur recourant à une librairie de cDNA établie à partir d'une lignée de mélanome ou de mélanocytes humains [66].

#### *Antigènes d'origine virale*

Compte tenu de symptômes pseudo grippaux précédant l'inflammation oculaire aiguë, il a été supposé que certains agents viraux comme les virus du groupe herpès pourraient déclencher la maladie de VKH. Le virus EBV serait possiblement un facteur déclenchant dans la mesure où son ADN a été retrouvé dans le corps vitré des patients VKH [89]. Sugita et al. ont étudié la réactivité croisée entre des peptides dérivés de la tyrosinase et certains antigènes du cytomégalovirus (CMV) présentés aux lymphocytes T CD4 issus du liquide intra-oculaire de patients VKH en phase aiguë. Ils ont montré pour 6 clones T que deux peptides ayant une

homologie de séquence, le peptide issu de la glycoprotéine d'enveloppe H (CMV-egH 290-302) et le peptide tyrosinase 450-462, étaient à l'origine d'une augmentation significative de la production de RANTES dans les surnageants de cultures comparativement aux peptides contrôles [63]. Bien que le lien entre infections virales et maladies systémiques soit connu et que des symptômes viraux précèdent les signes inflammatoires au sein des organes cibles, il n'y a ce jour aucune association claire entre la maladie de VKH et un agent viral particulier.

### **3. COMMENT INTERVIENDRAIENT LES AUTO-ANTIGENES A LA PHASE AIGUE ?**

Par analogie avec d'autres maladies auto-immunes affectant le système nerveux central, on pourrait supposer que les auto-antigènes initiant la réaction inflammatoire au sein de l'organe cible permettent le recrutement d'autres antigènes par le phénomène de dérive antigénique ou « epitope spreading » au cours de la maladie de VKH. En effet, dans un modèle murin de sclérose en plaques, l'Encéphalomyélite Allergique Expérimentale (EAE), la réponse immunitaire dirigée contre les déterminants des gaines de myéline évolue dans le temps. Après avoir immunisé des souris (SJLxB10.PL)F1 avec de la protéine basique de myéline (MBP), on assiste à une évolution de la réponse lymphocytaire T CD4. Initialement dirigée contre un peptide immunodominant, elle s'exerce progressivement contre certains déterminants cryptiques de la MBP [90]. Le phénomène de spreading intermoléculaire a également été décrit. Perry et al. ont mis en évidence la prolifération de cellules T en présence de myéline protéolipidique (PLP) au cours de l'EAE chez la souris (SJLxPL)E, initialement immunisée avec la MBP [91]. La pathogénicité du « spreading » intermoléculaire a été établie en transférant passivement l'EAE avec des splénocytes stimulés par PLP 139-151, issus de souris SJL/J qui avaient précédemment développé la maladie après immunisation avec des déterminants immuno-dominants 87-99 de la MBP [92].

La mesure de la prolifération des splénocytes après stimulation par une série de

peptides dérivés de la MBP comprenant le peptide encéphalitogène p87-99, a permis de montrer que de nouveaux déterminants antigéniques apparaissent tels une cascade séquentielle au cours de la progression de l'EAE chez des souris SWXJ immunisées avec le peptide PLP immunodominant 139-151 [93]. Ce phénomène d'épitope spreading serait amorcé avec les nouveaux auto-antigènes issus de la destruction des tissus, présentés aux cellules T infiltrant les cibles tissulaires [94,95]. Les auteurs ont montré que la dérive antigénique intervenait également dans le cadre de l'équivalent humain de l'EAE, la sclérose en plaques (SEP). Durant le développement précoce et la progression de la SEP, l'épitope spreading survient à l'intérieur de régions auto-antigéniques de la protéine PLP. Dans certains cas, la reconnaissance des auto-antigènes générés par la dérive antigénique serait restreinte par HLA-DP. La progression de l'EAE et de la SEP serait liée au déplacement des auto-antigènes ayant déclenché l'inflammation vers des déterminants antigéniques secondaires qui entretiennent le processus d'auto-reconnaissance au fur et à mesure que la maladie progresse [93].

Ainsi, dans le cas de la maladie de VKH, un agent de nature inconnue initierait la réaction inflammatoire au sein de la choroïde. Les lésions tissulaires alors créées contribueraient à exposer des protéines du soi au système immunitaire. Ces dernières pourraient être présentées aux lymphocytes T auto-réactifs par des cellules compétentes présentes au sein du site inflammatoire comme les mélanocytes que l'on sait capables d'exprimer les molécules de classe II en contexte inflammatoire [19].

On peut alors supposer que la présentation des antigènes choroïdiens aux lymphocytes T puissent se dérouler de deux façons à la phase aiguë de la maladie de VKH. Soit, les protéines mélanocytaires TRP1, TRP2, tyrosinase, Melan-A, gp100 ou KU-MEL-1 initieraient la cascade séquentielle du « spreading antigénique » au sein du tissu choroïdien.

Soit, un auto-antigène d'origine inconnue interviendrait initialement avant d'être remplacé dans le cadre de la dérive antigénique par les protéines mélanocytaires sus-citées.

#### **4. QUEL POURRAIT ÊTRE LE RÔLE DES LYMPHOCYTES Th17 ?**

Les lymphocytes T CD4 producteurs d'IL-17 ont initialement été isolés au sein du système nerveux central de souris SJL ayant développé une EAE après immunisation par des peptides MOG [96]. Il a été clairement montré chez ces mêmes souris mais invalidées pour le gène codant l'IL-23 que la différenciation des lymphocytes T CD4 en lymphocytes produisant de l'IL-17 dépendait d'IL-23. Des transferts de lymphocytes Th17 issus de souris SJL préalablement immunisées par des peptides MOG ont été capables d'induire une EAE chez des souris naïves [96]. Ces données ont permis d'individualiser le phénotype Th17 comme une quatrième voie de différenciation des lymphocytes T helpers, en plus de celles des lymphocytes T régulateurs (T<sub>regs</sub>), Th1 et Th2. Les lymphocytes Th17 ont été impliqués dans la physiopathogénie de pathologies auto-immunes chez l'homme. Notamment, des taux élevés d'IL-17 ont été mesurés dans le sérum de patients lupiques ou atteints de maladie de Crohn, dans la peau de patients ayant un psoriasis, dans le liquide synovial de patients en poussée de polyarthrite rhumatoïde, et dans le LCS de patients atteints de sclérose en plaques [97].

Les lymphocytes Th17 interviendraient également dans l'immunité dirigée contre des agents fongiques et des bactéries extracellulaires, principalement celles qui colonisent les surfaces d'échanges comme la peau, les surfaces respiratoires et digestives [28]. En cas de franchissement des agents infectieux, les lymphocytes Th17 seraient à l'origine de l'afflux massif et rapide de polynucléaires neutrophiles permettant de circonscrire le foyer infectieux [28].

Dans le cadre de la maladie de VKH, il a également été montré que les lymphocytes T CD4 issus du sang de patients ayant une uvéite active produisent significativement plus d'IL-17 après stimulation par IL-23 que ceux prélevés chez des patients ayant une uvéite

quiescente ( $p < 0,001$ ), ce qui suggère que les lymphocytes Th17 interviendraient à la phase aiguë de la maladie de VKH [26]. Dans l'hypothèse d'une réaction inflammatoire initiée au sein de la choroïde par un agent infectieux, des lymphocytes Th17 pourraient intervenir à la phase aiguë de la maladie de VKH selon deux modalités. Dans le premier cas de figure, les lymphocytes Th17 reconnaîtraient de façon croisée les antigènes bactériens et du soi par mimétisme moléculaire. Ils seraient directement stimulés par un antigène bactérien avant de reconnaître un antigène du soi présent au sein de la choroïde. Dans le second cas, l'antigène infectieux déclencherait une inflammation à l'origine de la différenciation en Th17 des lymphocytes T auto-réactifs présents au sein du site inflammatoire. Les agents bactériens en interagissant avec les Toll Like Récepteurs présents à la surface des CD, induiraient chez ces dernières la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23 [98]. Celles-ci contribueraient alors à induire la différenciation en Th17 des lymphocytes T auto-réactifs présents dans le voisinage des CD [97,98]. Ces derniers seraient à l'origine du recrutement au sein de l'organe cible de cellules mononuclées sécrétrices de cytokines pro-inflammatoires, capables d'entretenir le processus auto-immun [28].

Il resterait cependant à déterminer où se déroule l'activation initiale des lymphocytes Th17. En périphérie ou directement au sein de la cible ? A ce jour, aucun élément clinique ou bactériologique n'a permis de mettre en évidence chez les patients VKH un agent infectieux ayant un tropisme particulier.

## **5. QUE PEUT-ON CONCLURE DE NOTRE ANALYSE DES CELLULES DU LIQUIDE CEREBROSPINAL D'UN PATIENT VKH EN PHASE AIGUE ?**

L'absence de détection du CMV ou d'autres virus du groupe Herpes par PCR dans le LCS de notre patient n'est pas en faveur de l'hypothèse d'un déclenchement viral de la maladie, contrairement à ce qui est proposé dans la littérature [99]. La présence parmi les 107 clones T isolés de 9 clones sécréteurs d'IL-17 à des taux significatifs serait plutôt en faveur de la

participation d'un agent bactérien à la phase aiguë de la maladie [28]. Nos résultats confortent les données récemment publiées selon lesquelles il existerait une augmentation significative des lymphocytes Th17 dans le sang des patients VKH en phase aiguë de la maladie [26]. Il faut cependant rappeler que les neuf clones sécrétaient de l'IL-17 certes à un taux significatif, mais après stimulation par des billes anti-CD3. Cela ne préjuge évidemment pas de leur capacité à reconnaître spécifiquement un antigène bactérien. Des lymphocytes T reconnaissant une cible différente des antigènes bactériens pourraient avoir été différenciés dans la voie Th17 sous l'influence de cytokines, comme IL-23, sécrétées dans leur voisinage par des CD ayant détecté un agent infectieux grâce à leurs récepteurs de surface (Cf. section 4).

Les lymphocytes T CD4 isolées dans le LCS de notre patient prélevé à la phase aiguë de la maladie de VKH ne semblent pas reconnaître des peptides provenant des protéines mélanocytaires TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A ou KU-MEL-1, ce qui est en contradiction apparente avec les études précédemment exposées concernant l'auto-réactivité des cellules T ou B isolées chez les patients VKH [33,62,63,66,83].

Il n'est pas impossible qu'une très faible proportion de clones (moins d'un pourcent) soit spécifique d'une de ces 6 protéines mentionnées ci-dessus. Une fréquence élevée de cellules auto-immunes est cependant attendue dans le cas d'une maladie auto-immune. Chez un patient atteint d'un mélanome métastatique ayant développé des manifestations de la maladie de VKH après un transfert adoptif de lymphocytes infiltrant les tumeurs, 4% des cellules T CD8 détectées dans l'humeur aqueuse et 2 % de celles détectées dans le sang avaient une réponse dirigée contre un peptide Melan-A présenté par HLA-A2 [65]. Chez notre patiente VKH, en dépit de la présentation aux lymphocytes T de six protéines mélanocytaires entières dont les peptides pouvaient se combiner aux 6 molécules HLA autologues du patient, aucun des 107 clones testés s'est avéré positif. Cela semble difficile de penser que TRP1,

TRP2, la tyrosinase, Melan-A, gp100 ou KU-MEL-1 soient la source des auto-antigènes reconnus par les lymphocytes T CD4 auto-réactifs du patient VKH numéro 3.

Certes, le patient VKH analysé dans cette étude était porteur de l'HLA-DRB1\*14:01, 15:03, un haplotype qui diffère de l'allèle HLA-DRB1\*04:05 classiquement associé à la maladie VKH. De ce fait, nous ne nous attendions pas à ce que l'ensemble des peptides présentés pour être reconnus par les lymphocytes T auto-immuns isolés chez les patients VKH DRB1\*04:05 soient les mêmes peptides que ceux reconnus par les clones de lymphocytes T de notre patient non DRB1\*04:05. Selon les nombreux travaux réalisés dans le domaine de l'immunologie tumorale, il est fréquent d'isoler des cellules T anti-tumorales reconnaissant ces protéines mélanocytaires chez les patients atteints de mélanome [43-49]. Chez les patients HLA-DR4, un ensemble de peptides dérivant des protéines TRP-1, tyrosinase, gp100 ou Melan-A, restreints pour HLA-DR4 ont été identifiés pour leur capacité à stimuler des cellules T CD4 anti-mélanome; chez les patients HLA-DR15, il a été montré que les lymphocytes T CD4 anti-mélanome reconnaissaient une autre série de peptides dérivant des 4 protéines mentionnées ci-dessus, restreints par HLA-DR15. (voir <http://cancerimmunity.org/peptide/differentiation>) [100]. Ainsi, il était raisonnable de supposer que chez notre patient VKH, les protéines mélanocytaires seraient également la source de peptides antigéniques reconnus par les cellules T prétendument auto-immunes. Par conséquent, il a été surprenant de constater qu'aucun des 107 clones de lymphocytes n'ait reconnu un peptide dérivant de l'une des six protéines mélanocytaires.

Nous formulons l'hypothèse selon laquelle les lymphocytes T CD4 pourraient être stimulés, au cours de la phase aiguë de la maladie de VKH, par des peptides dérivés de protéines mélanocytaires autres que celles précédemment proposées dans la littérature.

## **6. PEUT-ON APPROFONDIR NOTRE ANALYSE ?**

### **6.1 Amélioration de la qualité du milieu biologique recueilli**

Est-il possible d'utiliser un milieu biologique techniquement simple à prélever et dont l'enrichissement en cellules auto-réactives est supérieur à celui du LCS?

Chez les patients VKH, ces conditions sont en théorie réunies en cas de prélèvement de l'humeur aqueuse de la chambre antérieure de l'oeil. En effet, ce type de prélèvement est réalisé en routine; les petits volumes (de l'ordre du microlitre) prélevés à l'occasion d'une ponction de chambre antérieure permettraient d'obtenir des clones de lymphocytes T à partir de la totalité des cellules recueillies ; enfin et surtout, l'humeur aqueuse est le liquide biologique le plus proche du site inflammatoire où débute la maladie de VKH.

Il ne faut cependant pas méconnaître la présence de mélanocytes au sein des structures de l'uvée antérieure comme l'iris et les processus ciliaires [101]. Ces structures peuvent constituer une source d'antigènes mélanocytaires mis en jeu secondairement en cas d'extension de l'inflammation choroïdienne vers la chambre antérieure de l'oeil. Enfin, la principale limite à la ponction de chambre antérieure demeure à ce jour l'absence d'indication dans le cadre de la prise en charge diagnostique de la maladie de VKH du fait d'un rapport bénéfice/risque défavorable. La ponction de chambre antérieure se justifie alors en cas de doute diagnostique avec une uvéite d'origine infectieuse ou avec un lymphome intra-oculaire.

### **6.2 Amélioration de la présentation antigénique**

En théorie, la cellule présentatrice idéale permettant de tester la réactivité d'un lymphocyte T auto-réactif est celle qui assure elle même la présentation de l'auto-antigène en contexte autologue. Chez le patient VKH, il s'agit de ses propres mélanocytes dont on sait qu'ils expriment les HLA classe II en contexte inflammatoire. Dans la pratique, il n'est pas possible d'étudier la reconnaissance des mélanocytes autologues par les clones de cellules T. En effet, si l'on considère qu'une biopsie de peau de 8 mm de diamètre contient tout au plus 30.000

mélanocytes, nous serions en mesure de tester seulement trois clones en monoclicats dans le cadre de notre approche expérimentale.

### **6.3 Analyse d'un patient porteur de l'allèle de susceptibilité HLA-DRB1\*0405**

Notre hypothèse de travail est fondée sur le fait que la reconnaissance des protéines mélanocytaires par les lymphocytes T est indépendante de l'haplotype HLA des patients. Cependant, il conviendrait en toute rigueur d'utiliser notre stratégie afin de tester la spécificité antigénique des clones de lymphocytes T isolés du LCS de patients VKH HLA DRB1\*04:05 chez lesquels ont été décrits des lymphocytes T possiblement auto-réactifs.

Ces patients sont malheureusement rares en Europe. Dans une étude rétrospective, seuls 11 patients ont été recrutés dans notre centre universitaire entre 1996 et 2005, suggérant une fréquence de 1 à 2 nouveaux patients par an. Seulement six d'entre eux (55%) avaient une méningite lymphocytaire [10]. En sachant que la fréquence de l'allèle HLA-DRB1\*04:05 n'est que de 25% de notre population de patients VKH, il faudrait donc au moins un à deux ans pour recruter un nouveau patient VKH souffrant de méningite et porteur de l'HLA DRB1\*04:05. Nous pensons néanmoins qu'une telle étude serait nécessaire pour confirmer nos résultats.

## **7. NOTRE APPROCHE EXPERIMENTALE POURRAIT-ELLE ÊTRE APPLIQUEE A D'AUTRES MALADIES AUTO-IMMUNES ?**

Bien que ces travaux n'aient pas débouché sur l'isolement de cellules T CD4 spécifiques d'un auto-antigène mélanocytaire chez nos patients VKH, ils ont permis de proposer une approche originale en auto-immunité à savoir, la détection d'un clone T spécifique d'une protéine donnée grâce à l'utilisation de bactéries recombinantes capables de produire à fort niveau la protéine en entier. Nous avons montré que le clone T CD4 spécifique de la protéine MAGEA3 était capable de reconnaître MAGEA3 exprimée par des bactéries recombinantes

diluées plus de 1000 fois. Ces résultats mettent en lumière les potentialités de cette approche dans la détection de clones T CD4 auto-réactifs appliquée à d'autres maladies auto-immunes.

### **7.1 Quels antigènes candidats utiliser ?**

Comme dans le cas de la maladie de VKH, il faut avoir identifié des protéines candidates au test de reconnaissance par les lymphocytes T CD4. En l'absence de données concernant la nature de ces antigènes, on pourrait tester la réactivité des lymphocytes T CD4 contre des protéines reconnues par des immunoglobulines d'isotype G (IgG) présentes dans le sérum des patients. En considérant que cet isotype résulte d'une commutation de classes d'immunoglobulines dans le cadre de la coopération entre lymphocytes B et T CD4, on peut supposer que l'antigène reconnu par l'IgG est alors capable de stimuler les lymphocytes T CD4 du patient [102].

### **7.2 Clonage des cellules T enrichies en cellules auto-réactives**

Afin d'améliorer la sensibilité de détection des clones auto-réactifs, nous proposons deux stratégies de clonage selon le niveau d'enrichissement potentiel en cellules auto-réactives des liquides prélevés.

En cas de prélèvement d'un liquide biologique drainant le site où l'inflammation a débuté, l'enrichissement en cellules auto-réactives contenues dans ce liquide est en théorie maximal, ce qui permet d'envisager le clonage direct des lymphocytes par la méthode des dilutions limites. Cela devrait concerner uniquement les pathologies auto-immunes s'accompagnant de réactions méningées, d'épanchements articulaires ou de séreuses (plèvres, péritoine voire péricarde) dont les prélèvements peuvent être justifiés dans la pratique médicale.

En cas d'étude de maladies auto-immunes où l'atteinte des organes cibles ne s'accompagne pas de réactions inflammatoires au sein de liquides biologiques, seul le sang

périphérique des patients est alors exploitable pour le recueil des cellules auto-réactives. Cependant, dans la mesure où ces dernières sont distribuées dans de grands volumes, une étape de tri sélectif des cellules T CD4 avant clonage nous semble adapté à la mise en évidence de clones auto-réactifs à basse fréquence. Selon Zhang et al., cette approche utilisée dans le cadre du monitoring de la réponse aux antigènes tumoraux permettrait de détecter des lymphocytes T CD4 dont la fréquence minimale varie entre  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$  [76].

### **7.3 Exemple d'application au diabète de type 1**

En utilisant nos bactéries recombinantes, nous pourrions tester la réactivité des lymphocytes T CD4 circulants contre la Glutamic Acid Décarboxylase (GAD) chez les diabétiques de type 1 sans tenir compte de la restriction HLA. Si la GAD est reconnue par des anticorps sériques utilisés au titre de marqueurs diagnostiques, elle est également à l'origine d'une réponse lymphocytaire T CD4. Chez la souris diabétique non-obèse (NOD), le transfert adoptif de cellules T reconnaissant un nombre limité d'épitopes de la GAD suffit à induire le diabète [103]. Cependant, le monitoring de la réponse immunitaire T anti-GAD chez les patients nécessite l'identification du répertoire peptidique et donc de procéder à l'haplotypage HLA classe II de chacun des patients diabétiques [104]. L'utilisation de la protéine totale permettrait non seulement de s'affranchir de cette contrainte mais surtout, de s'assurer que les lymphocytes clonés à partir du sang des patients sont capables de reconnaître spécifiquement une protéine présente au sein de l'organe cible.

Chez la souris NOD, il a été montré que l'on pouvait faire proliférer *in vitro* les lymphocytes  $T_{\text{regs}}$  CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3 en les stimulant en présence d'IL-2 avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Les lymphocytes  $T_{\text{regs}}$  ainsi amplifiés supprimaient la réponse des cellules T auto-réactives. Fait remarquable, il a été montré que certains lymphocytes  $T_{\text{regs}}$  spécifiques de peptides auto-antigéniques avaient la capacité de freiner la progression du

diabète murin, laissant entrevoir des perspectives thérapeutiques dans la prise en charge du diabète chez l'homme [105,106]. De ce fait, il pourrait être intéressant chez les patients diabétiques de faire proliférer puis de réinjecter des lymphocytes  $T_{\text{regs}}$  reconnaissant spécifiquement la GAD et que l'on saurait capables de supprimer la réponse des cellules T auto-réactives au sein même du pancréas.

#### **7.4 Proposition d'une stratégie d'immunosuppression appliquée en auto-immunité**

La stratégie suivante pourrait être proposée en auto-immunité dans le but d'obtenir des lymphocytes  $T_{\text{regs}}$  capables de reconnaître un auto-antigène au sein de la cible et de pouvoir les réinjecter aux patients. Il s'agirait dans un premier temps, d'isoler au sein d'un liquide biologique potentiellement enrichi en cellules T auto-réactives des lymphocytes T CD4 et d'évaluer leur capacité à reconnaître spécifiquement des cellules présentatrices autologues chargées avec des bactéries recombinantes exprimant des protéines cibles potentielles de l'auto-immunité. Dans un second temps, après identification des protéines cibles, il s'agirait d'identifier les peptides reconnus par chacun des clones T auto-réactifs. Dans un troisième temps, nous pourrions sélectionner au sein d'un liquide biologique potentiellement enrichi en cellules T auto-réactives, tous les lymphocytes capables de se lier à un tétramère constitué d'un peptide « auto-réactif » et de la molécule HLA correspondante. Une fois ces lymphocytes amplifiés en conditions clonales, nous pourrions cribler une fraction de chacun des clones afin d'identifier ceux ayant un phénotype de lymphocyte  $T_{\text{regs}}$ , c'est à dire de lymphocytes T CD4+, CD25+ au repos et ne produisant aucune cytokine après activation. Il faudrait ensuite vérifier l'expression constitutive de Foxp3 ainsi que la déméthylation de l'intron 1 de Foxp3, seul marqueur spécifique à l'heure actuelle des  $T_{\text{regs}}$  naturels [107]. Ces lymphocytes  $T_{\text{regs}}$  seraient alors amplifiés en vue d'être réinjectés au patient. Lorsque plusieurs peptides auto-réactifs ainsi que les molécules HLA présentatrices auront été

identifiés, en particulier des molécules HLA exprimées fréquemment telles que HLA-DP4 (75 % de la population caucasienne), l'utilisation de tétramères HLA/peptide devrait permettre d'isoler des lymphocytes T<sub>regs</sub> chez plusieurs patients ayant une maladie auto-immune déclarée.

## **PATIENTS ET METHODES**

## **1. PATIENTS VKH**

Selon les critères diagnostiques révisés par un groupe d'experts internationaux [1], nos patients avaient une maladie de VKH, dans le premier cas en phase chronique et dans les deux autres, en phase aiguë. Le protocole de recherche a été approuvé par le comité d'éthique "Comité de Protection des Personnes CPP Ile de France III" (Cf. ANNEXE 2). Un consentement éclairé écrit a été obtenu de chaque patient avant sa participation à l'étude. Les recherches ont été réalisées conformément aux principes de la déclaration d'Helsinki. La quantification de l'œdème maculaire a été réalisée avec un appareil OCT3 Stratus (Humphrey Instruments, Carl Zeiss division, San Leandro, CA, USA).

## **2. CELLULES ET MILIEUX DE CULTURE**

### **2.1 Cellules issues du sang périphérique**

Pour chaque patient, des CMSP ont été obtenues après avoir appliqué une technique de séparation en couches des éléments figurés du sang. Plus précisément, 15 ml de sang total ont été délicatement ajoutés à la surface d'un volume identique de Lymphoprep (Stemcell™ Technologies, Vancouver, BC, Canada), contenu dans un tube Leucosep™ (BioClot GmbH, Aidenbach, Germany) et préalablement centrifugé. Après une centrifugation, à 2200 rpm, ont été recueillis par pipetage le surnageant contenant le plasma et l'anneau blanchâtre où se trouvent les CMSP. Les cellules ainsi recueillies ont ensuite été lavées 4 fois dans du PBS-EDTA puis centrifugées. En vue d'une étape d'adhérence, les CMSP ont été resuspendues à la concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/2 ml/puits (plaques de 24 puits) dans du milieu RPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplémenté avec 0,24 mM de L-asparagine, 0,55 mM de L-arginine, 1,5 mM de L-glutamine (AAG), et avec du plasma autologue à 1% et de la DNase à 5 UI/ml. Après une incubation d'une heure, les cellules non adhérentes (c'est à dire les lymphocytes B et T) ont été récoltées.

Une lignée de lymphocytes B immortalisés par Epstein-Barr virus (B-EBV) a été obtenue à partir des cellules non adhérentes pour chacun des trois patients VKH. Pour cela, des fibroblastes de souris exprimant fortement CD40L (3T6.CD40L) ont été irradiés, puis cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Life Technologies) contenant du sérum de veau fœtal à 10% (SVF) (Thermo Scientific, Cramington, Royaume-Uni), du Caryoser à 1% (Life Technologies) et de la Cyclosporine A à 1 µg/ml. Après une étape d'adhérence, les cellules 3T6.CD40L décollées à l'aide de trypsine ont été resuspendues à  $10^5$  cellules/ml dans du milieu RPMI 1640 (Life Technologies) supplémenté en AAG, et contenant 10 % de SVF (Thermo Scientific), puis incubées dans ce même milieu en présence des cellules non adhérentes ( $5 \times 10^6$  cellules/ml) de chaque patient et de surnageant de virus B95-8. Au bout de 8 jours, les cellules formant des agrégats ont été recueillies puis cultivées en lignée dans du milieu Dulbecco modifié par Iscove (IMDM) (Life Technologies), supplémenté avec AAG, 100 µg/ml de streptomycine, 100 U/ml de pénicilline et 30 µg/ml de gentamycine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) et 10% de SVF (Thermo Scientific).

Les CD des patientes n°1 et n°2 ont été obtenues à partir des CMSP ayant adhéré après une heure d'incubation dans du milieu RPMI 1640 (Life Technologies) supplémenté en AAG et avec du plasma autologue à 1%. Les cellules adhérentes ont été cultivées en présence de rIL-4 recombinante humaine produite dans le laboratoire (200 UI/ml) et de GM-CSF (70 ng/ml) dans du milieu RPMI 1640 (Life Technologies) supplémenté en AAG et avec du plasma autologue à 1%. Tous les deux jours, un quart du milieu a été remplacé par du milieu frais, tout comme les cytokines. Au cinquième jour, les cellules non adhérentes ont été utilisées comme une source de cellules enrichies en CD, tel que cela a été décrit précédemment [108].

## 2.2 Lignées de mélanomes

Plusieurs lignées de mélanomes dont certaines ont été générées dans notre laboratoire ont été utilisées pour leur capacité à exprimer les protéines mélanocytaires tyrosinase, Melan-A, gp100 ainsi que la protéine MAGEA3. Il s'agissait des lignées LB1622-MEL, DDHK62-MEL, EB81-MEL.B, LB33-MEL.B, LB2269-MEL, NA6-MEL, NA17-MEL, EB124-MEL, SK23-MEL.

Les lignées LB1622-MEL (DRB1\*15:02; DQB1\*06:01,06:04; DPB1\*04:01), DDHK62-MEL (DRB1\*14; DQB1\*05), NA6-MEL (DRB1\*15:01; DQB1\*06:02; DPB1\*04:01), LB2269-MEL (DQB1\*05:03; DPB1\*04:01) et EB124-MEL (DPB1\*04:01) avaient en commun avec le patient VKH n°3 au moins **un allèle HLA de classe II**.

Chacune des lignées de mélanomes a été maintenue en culture dans du milieu IMDM (Life Technologies), contenant 10% de SVF (Thermo Scientific) et 30  $\mu$ g/ml de gentamycine (Sigma-Aldrich).

## 3 CLONAGE DES LYMPHOCYTES T

### 3.1 Après tri cellulaire par FACS

#### *Etape préalable du tri cellulaire*

Les CD autologues, obtenues à la suite d'une étape d'adhérence des CMSP, ont été chargées avec un lysat de cellules exprimant des antigènes d'intérêt (rapport CD/cellules d'intérêt: 1/20) en présence de rIL-4 (200 UI/ml) et de GM-CSF (70 ng/ml) et incubées pendant 24 heures dans du milieu RPMI 1640 (Life Technologies) supplémenté en AAG et avec du plasma autologue à 1%.

Les CMSP n'ayant pas adhéré (contenant les lymphocytes T) ont été soustraites, lavées et resuspendues à la concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/ml dans du milieu IMDM (Life Technologies), supplémenté avec AAG, 30  $\mu$ g/ml de gentamycine (Sigma-Aldrich) et du plasma autologue à 1%. Ces cellules ont étéensemencées en plaques de 24 puits (1 ml/puits).

Les CD préalablement incubées avec les lysats de cellules d'intérêt ont alors été ajoutées ( $2 \times 10^5$  cellules/ml). Les cellules non adhérentes issues du sang ont également été stimulées par la phytohaemagglutinine (PHA) à  $0,5 \mu\text{g/ml}$  (PHA HA16; Murex Biotech;  $125 \text{ ng/ml}$ ). Seize heures plus tard, les cellules ont été collectées, lavées, resuspendues et marquées avec des anticorps de capture anti-IFN- $\gamma$  et anti-IL-5 dilués au  $1/10^{\text{ème}}$  (IFN- $\gamma$  et IL-5 Secretion Assay-Detection kits PE; Miltenyi Biotec), et incubées pendant 45 minutes à  $37^\circ\text{C}$  avec une agitation douce. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 15 minutes à  $4^\circ\text{C}$  avec un anticorps de détection anti-IFN- $\gamma$  conjuguée à la phycoérythrine (PE), dilué au  $1/20^{\text{ème}}$ , avec un anti-CD3-PerCP ( $1/40$ ; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), anti-CD8-APC ( $1/40$ ; BD Biosciences) et l'anti-CD4-FITC ( $1/40$ ; BD Biosciences). Les cellules ont alors été lavées et les cellules  $\text{CD4}^+\text{CD8}^-\text{IFN-}\gamma^+\text{IL-5}^+$  ont été sélectionnées par cytométrie de flux en utilisant un FACSvantage (BD Biosciences).

#### *Etape du clonage selon la méthode des dilutions limites*

Les cellules ainsi sélectionnées ont été distribuées à raison d'une cellule par puits en plaques de 96 puits dans du milieu, puis stimulées chaque semaine avec des lymphocytes B-EBV autologues préalablement incubés avec un lysat de cellules exprimant les antigènes d'intérêt (1 B-EBV pour 20 cellules). Des lymphocytes LG2-EBV irradiés ont été ajoutés en tant que cellules nourricières ( $10^4$  cellules/puits). Les clones de lymphocytes T ont été cultivés dans du milieu IMDM (Life Technologies), supplémenté avec AAG,  $100 \text{ pg/ml}$  streptomycine,  $100 \text{ U/ml}$  de pénicilline et  $30 \text{ }\mu\text{g/ml}$  de gentamycine (Sigma-Aldrich), et avec 10% de sérum humain (SH).

### **3.2 Directement par dilution limite d'un liquide biologique**

Des clones de lymphocytes T ont été obtenus par dilution limite à partir des cellules mononucléées du LCS du patient VKH n°3, distribuées directement après leur recueil à raison d'une cellule par puits. Ils ont été stimulés avec des CMSP allogéniques et irradiées dans des microplaques ( $10^4$  cellules/puits à fond rond). Des lymphocytes LG2-EBV irradiés ont été ajoutés en tant que cellules nourricières ( $10^4$  cellules/puits). Les clones de lymphocytes T ont été cultivés dans du milieu IMDM (Life Technologies), supplémenté avec AAG, 100 pg/ml streptomycine, 100 U/ml de pénicilline et 30 µg/ml de gentamycine (Sigma-Aldrich), et avec 10% de SH. Ce milieu de culture a été complété par de l'IL-2 (Proleukin Chiron, Amsterdam, Pays-Bas, 50 UI/ml), de la rIL-4 produite dans le laboratoire (5 UI/ml), IL-7 (R & D Abington, Oxford, Royaume-Uni; 10 ng/ml), des anticorps anti-CD3 (Janssen-Cilag, Berchem, Belgique; 1 ng/ml) et de la gentamycine (15 pg/ml) (Sigma-Aldrich). Après plusieurs stimulations, les clones de lymphocytes T ont été congelés. Un aliquot de chaque clone a été marqué par l'anti-CD3-PerCP (1/30; BD Biosciences), anti-CD8-APC (1/40; BD Biosciences) et l'anti-CD4-FITC (1/30; BD Biosciences), puis analysé par cytométrie en flux avec un appareil FACSCalibur (BD Biosciences). Les cellules du clone T CD4 spécifique de la protéine MAGEA3 et restreint pour HLA-DPB1\* 0401, ont été stimulées ( $5 \times 10^5$  cellules/puits) toutes les deux semaines avec les cellules B-EBV-DP4 li.MAGEA3 ( $2 \times 10^5$  cellules/puits) dans des plaques de 24 puits. Les lymphocytes B-EBV LG2 irradiés ont été ajoutés comme cellules nourricières ( $1.5 \times 10^6$  cellules/puits).

## **4 STIMULATION DES LYMPHOCYTES T CD4**

### **4.1 Lysats cellulaires**

#### *Lignées de mélanomes*

Les lysats de mélanomes ont été réalisés en utilisant les lignées NA17-MEL, EB81-MEL.B, SK23-MEL et LB33-MEL.B. Les cellules tumorales de chaque lignée ont été re suspendues

dans du milieu RPMI 1640 (Life Technologies) à  $40 \times 10^6$  cellules/ml. Trois cycles de congélation/décongélation ont été réalisés, suivis d'une centrifugation à 1300 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Les surnageants ont été recueillis et incubés avec les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) selon le ratio de 20 cellules tumorales pour une CPA.

#### *Cellules COS-7 transfectées avec des gènes de protéines mélanocytaires*

Nous avons décongelé et mis en culture dans du milieu LB contenant 10 g de Bacto Tryptone (BD, 38800 Le Pont de Claix, France), 5 g d'extrait de levures (BD) et 10 g de NaCl pour 1 litre d'eau, avec de l'ampicilline (35 mg/ml), des bactéries E. Coli dont les plasmides contiennent de l'ADNc codant les protéines TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A, et MAGEA3, et disponibles dans notre laboratoire. Le vecteur d'expression codant pour KUMEL-1 nous a été gracieusement fourni par le Dr Kawakami (Division of Cellular Signaling, Institute for Advanced Medical Research Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjyukuku, Tokyo, 160-8582, Japan). Après une étape de purification sur colonne (Kit PC 2000, Nucleobond, Biomed Diagnostics, Glendale, CA, USA), les vecteurs d'expression contenant les séquences d'intérêt ont été resuspendus dans de l'eau stérile.

Ces plasmides ont été transfectés dans une lignée de cellules COS-7 maintenues en culture dans un milieu DMEM (Life Technologies, Paisley PA4 9RF, UK) contenant 10% de SVF. Il a été prélevé pour chaque plasmide 200 µg d'ADN pour réaliser la transfection de  $30 \times 10^6$  cellules COS-7 en milieu DMEM contenant 10% de Nu-serum (BD, 95131 San Jose CA, USA), chloroquine-diphosphate salt à 10mM (Sigma-Aldrich) et DEAE dextran (10mg/ml) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Après une incubation de 4 heures à 37°C, le milieu a été remplacé par du PBS-DMSO à 10%. Après une incubation de 2 min à température ambiante, la solution de PBS-DMSO a été remplacée par du milieu DMEM contenant 10% de SVF. Les

cellules COS-7 ont été ainsi incubées pendant 48 heures avant d'être décollées, lavées au PBS puis congelées sous forme de culots cellulaires.

Pour les besoins d'un test, les culots de cellules tumorales ont été décongelés et resuspendus à  $160 \times 10^6$  cellules/ml dans du milieu IMDM (Life Technologies), supplémenté avec AAG, et du SH à 10%. Les cellules tumorales ont ensuite été lysées selon la procédure utilisée pour réaliser les lysats de mélanomes, puis incubées en présence de lymphocytes B-EBV autologues (20 cellules COS-7 pour 1 B-EBV).

## **4.2 Bactéries recombinantes exprimant les protéines mélanocytaires d'intérêt**

### *Construction des bactéries recombinantes*

Nous avons utilisé les vecteurs d'expression contenant les séquences d'ADNc codant TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A, KU-MEL-1, et MAGEA3, obtenus pour transférer les cellules COS-7. Les ADNc ont été amplifiés par PCR en utilisant des amorces spécifiques contenant un site de restriction EagI et un site de restriction AseI:

- Melan-A, sens 5'-CCCTACAAGCGGCCGAATGCCAAGAGAAG-3' et

inverse 5'CGCTGGCTCTTAGGCGCGCCAGGTGAATAAGG-3'

- gp 100, sens 5'-GAAGAACACACCGGCCGAAATGGATCTGGTGC-3' et

inverse 5'TGAGAGTACTCAGGCGCGCCGACCTGCTG-3'

- tyrosinase, sens 5'-AGAGGAAGACCGGCCGAATGCTCCTGGCTGTT-3' et inverse

5'TGCCTAAGCCTTTTAGGCGCGCCTAAATGGCTCTG-3'

- TRP1, sens 5'-TCAAGCAGACCGGCCGAATGAGTGCTCCTAAA-3' et

inverse 5'GGGCATTTGTTAGGCGCGCCGACCACAGACTG-3'

- TRP2, sens 5'-TATAAAGCCCGGCCGAATGAGCCCCCTTGG-3' et

inverse 5'ATGAGCACCTAGGCGCGCCGGCTTCTTCTGT-3'

- KU-MEL-1, sens 5'-ACAGTTCAATCGGCCGAATGGGGGACATTC-3' et

inverse 5'AGCCCTGACTTAGGCGCGCCCACTGGGTA-3'

- MAGE-A3, sens 5'-ACCAGAGTCATCGGCCGCATGCCTCTTG-3' et

inverse 5'CTCAGACTCAGGCGCGCCCTCTTCCCC-3'

Les sites EagI à l'extrémité 5' et Ascl à l'extrémité 3' des ADNc amplifiés ont permis un clonage directionnel. Après amplification, les ADNc ont été purifiés sur colonnes de chromatographie (High Pure PCR product Purification Kit ref 1732676; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne), puis visualisés sur un gel d'agarose coloré par le bromure d'éthidium. Par la suite, les ADNc des protéines d'intérêt ont été digérés avec EagI (Biolabs, Ipswich, MA, USA; R0505-S) et Ascl (Biolabs; R0558-S), purifiés et ligaturés directionnellement dans le vecteur PKE-1 préalablement digéré par EagI et Ascl. Le PKE-1 vecteur nous a été donné par le Dr Davis (Département de génétique moléculaire du développement, Université Ben Gourion du Néguev, Beer Sheva, Israël) [78]. Ce vecteur PKE-1 contient un promoteur tac inductible par IPTG et, en plus d'un gène de résistance à l'ampicilline, un gène de résistance à la kanamycine. L'ADNc inséré correctement dans le cadre de lecture confère à l'hôte bactérien une résistance à la kanamycine, contrairement aux cas où le vecteur reste vide et où les inserts d'ADNc aboutissent à des codons stop dans le cadre de lecture. Les produits de ligation ont ensuite été introduits par électroporation dans des bactéries E. coli XL1-blue. Ces bactéries E. coli recombinantes ont alors été étalées sur des boîtes de gélose contenant de l'ampicilline (50 g/ml) et de la kanamycine (7,5 g/ml). Après une nuit de culture à 37°C, les bactéries ont été prélevées, déposées dans du milieu LB puis congelées à 80°C dans un milieu LB/ 20% glycérol. Pour analyser les inserts d'ADNc des colonies bactériennes, l'ADN a été séquençé en utilisant le kit de séquençage ABI PRISM Big Terminators Dye™ v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et les amorces suivantes: 5'-sens CTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3' et 5'-inverse AGACGTTTCCCGTTGAATATGG-3', correspondant aux séquences du vecteur PKE-1 [78].

Les séquences d'ADN ont été analysées avec le séquenceur ABI PRISM 310 Genetic (Applied Biosystems) et évaluées à l'aide du logiciel d'analyse Sequencher Software™ v3.7 (Applied Biosystems).

#### *Analyse en Western Blot des produits de synthèse bactérienne*

Les bactéries contenues dans un millilitre de culture, induites ou non induites par IPTG, ont été recueillies après sédimentation puis lysées dans un tampon de Laemmli (Sigma-Aldrich). Les protéines ont été séparées par SDS/PAGE sur un gel de polyacrylamide 4-12%. Les protéines de fusion ont été analysées par Western Blot en utilisant un anticorps de souris monoclonal anti-GST (TPS [1E5], Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) et un anticorps anti-IgG de souris conjugué à la phosphatase alcaline. Du substrat chromogène BM Purple (Roche, Mannheim, Allemagne) a été utilisé pour la détection. La protéine recombinante GST (TPS [1-218], Santa Cruz Biotechnology) a servi de référence pour la quantification des protéines de fusion. L'identité des protéines fusionnées à la GST a été analysée en Western Blot avec des anticorps dirigés contre TRP1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA; ref. 69542 NBP1), TRP2 (Novus Biologicals; ref. 86893 NBP1), la tyrosinase (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA; ref. MS800P1), gp100 (Thermo Scientific; ref. MA5-13232), Melan-A (Thermo Scientific; ref. MA1-26245), KU-MEL-1 (Biorbyt, Cambridge, UK; ref. Orb 31521) et MAGEA3 (Novus Biologicals; ref. 56404 NBP1).

#### *Opsonisation des bactéries par le complément*

La procédure a été décrite précédemment [20]. Après décongélation, les bactéries recombinantes ont été amplifiées dans du milieu LB contenant de l'ampicilline (50 µg/ml) et de la kanamycine (7,5 µg/ml), à 37°C sous agitation jusqu'à ce qu'une  $DO_{600}$  de 0,5 ait été atteinte. De l'isopropyl  $\beta$ -D-galactoside (IPTG; 1 mM) a été ajouté pour induire l'expression des protéines et au bout de 4 h à 37°C, les bactéries contenue dans 1 ml de culture ont été

opsonisées pendant 1 h sous agitation à 37 °C en ajoutant 150 µl de HS contenant 17% (v/v) de complément (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Les bactéries opsonisées ont été regroupées en transférant 345 µl de chaque bactérie en deux groupes différents, et ont été centrifugées à 2500 rpm pendant 15 min. Le surnageant a été jeté et les bactéries ont été remises en suspension dans 1350 µl (groupe 1: TRP1, TRP2 et gp100) ou 1800 µl (groupe 2: la tyrosinase, Melan-A, KU-MEL-1 et MAGEA3) de milieu IMDM contenant du SVF 10% et de la gentamicine (30 mg/ml). Par la suite, 1 ml de bactéries opsonisées avec du complément provenant de chaque groupe bactérien a été ajouté aux lymphocytes B-EBV du patient VKH et distribuées dans trois plaques de 24 puits ( $1 \times 10^6$  cellules/puits) contenant chacun 2 ml de milieu IMDM avec 10% de SVF et de la gentamicine (30 mg/ml). Après une nuit d'incubation pour permettre l'endocytose des protéines et l'apprêtement des antigènes, les lymphocytes B-EBV ont été utilisés comme cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T CD4.

## **5 MESURE DE L'ACTIVITE DES CLONES DE LYMPHOCYTES T CD4**

### **5.1 Mesure de la production d'INF- $\gamma$**

Après avoir été sélectionnées puis amplifiées en conditions clonales, les cellules T CD4 issues du sang des patients VKH n°1 et n°2 ont été cultivées ( $5 \times 10^3$ /puits) en présence de lymphocytes B-EBV autologues ( $20 \times 10^3$ /puits). Ces derniers ont été préalablement chargés avec un lysat de cellules (lignées de mélanomes ou cellules COS-7) exprimant des antigènes d'intérêt (Cf. 4.1), en microplaques de 96 puits à fond rond avec du milieu IMDM (Life Technologies) contenant 10% d'HS, de l'IL-2 à 100 UI/ml et de la gentamicine à 30 mg/ml (Sigma-Aldrich). Après une nuit de co-culture à 37°C, les surnageants ont été récoltés et la quantité d'INF- $\gamma$  a été mesurée par ELISA (Life Technologies).

## **5.2 Mesure de l'expression des molécules d'activation CD25 et CD137**

Les différents clones de lymphocytes T issus du LCS du patient VKH n°3 ont été décongelés puis cultivés pendant une nuit en plaques de 96 puits à fond rond dans du milieu IMDM (Life Technologies) contenant de l'HS à 10% et de l'IL-2 (25 UI/ml). Des cellules de mélanomes ( $40 \times 10^3$ /puits) des lignées AUMA, KEHA, NAmel6, CJA, RIVO ou des lymphocytes EBV-B autologues ( $30 \times 10^3$ /puits) préalablement chargés avec les groupes de bactéries opsonisées ont été placés en plaques de 96 puits (60  $\mu$ l et 100  $\mu$ l/puits, respectivement). Les lymphocytes T CD4 ( $5 \times 10^3$  cellules/puits) ont été ajoutés aux lymphocytes B-EBV dans un volume de 100  $\mu$ l de milieu IMDM (Life Technologies) contenant 10% d'HS, d'IL-2 (100 UI/ml) et de gentamicine (30 mg/ml) (Sigma-Aldrich). Comme contrôle positif, les clones de lymphocytes T ont été stimulés par des microbilles recouvertes d'anticorps anti-CD3/CD28 (1 bille/3 cellules T) (Invitrogen, Oslo, Norvège; Ref 111.31D). Après une nuit de co-culture à 37°C, les cellules ont été récoltées, lavées puis incubées pendant 15 minutes à 4°C avec les anticorps anti-CD137-APC (1/20, BD Biosciences, 95131 San Jose CA, USA), anti-CD25-PE (1/20, BD Biosciences), anti-CD3-PerCP (1/40; BD Biosciences), et l'anti-CD4-FITC (1/40; BD Biosciences). Les cellules ainsi marquées ont été analysées par cytométrie en flux avec un appareil FACSCalibur (BD Biosciences).

## **5.3 Mesure simultanée de plusieurs cytokines**

Les surnageants de co-cultures cellules T/ cellules présentatrices d'antigènes ont été récoltés afin d'y mesurer la quantité d'IL-5, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , et d'IL-17 à l'aide d'un kit Bioplex (Biorad, Hercules, CA, USA; Ref 171304000 - TNF- $\alpha$ ; ref 171 B5026M - IL-5; ref 171 B5005M - IFN- $\gamma$ ; ref 171 B5019M - IL-17; ref 171 B5014M) selon la procédure du fabricant.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] SUGIURA S. Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 1978, 22, 9-35
- [2] PATINSON EM. Uveo-meningoencephalitic syndrome (Vogt-Koyanagi-Harada). *Arch. Neurol.*, 1965, 12, 197-205
- [3] HERBORT CP, MOCHIZUKI M. Vogt-koyanagi-Harada disease : inquiri into genesis of a disease name in the historical context of Switzerland and Japan. *Int. Ophthalmol.*, 2007, 27, 67-69
- [4] VOGT A. Friihzeitiges Ergrauen der Zilien und Bemerkungen über den sogenannten platlzichen Eintrill dieser Verfinderung. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, 1906, 4, 228-242
- [5] KOYANAGI Y. Dysakusis, Alopecia und Poliosis bei schwerer Uveifis nicht traumatischen Ursprungs. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, 1929, 82, 194-211
- [6] HARADA E. Clinical study of non suppurative choroiditis: a report of acute diffuse choroiditis. *Acta. Soc. Ophththalmol. Jpn.*, 1926, 30, 356-378
- [7] BREZIN AP. Maladie de Vogt-Koyanagi-Harada. In: les uvéites/ ed. par Antoine P. BREZIN Paris: Elsevier Massson, 2010-p.395-403
- [8] MOORTHY RS, INOMATA H, RAO NA. Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Surv. Ophthalmol.*, 1995, 39, 265-292
- [9] READ RW, HOLLAND GN, RAO NA, et al. Revised diagnostic criteria for Vogt-Koyanagi-Harada disease: report of an international committee on nomenclature. *Am. J. Ophthalmol.*, 2001,131, 647-652
- [10] ABAD S, MONNET D, CAILLAT-ZUCMAN S, et al. Characteristics of Vogt-Koyanagi-Harada disease in a French cohort: Ethnicity, systemic manifestations and HLA genotype data. *Ocul. Inflamm. Immunol.*, 2008, 16, 3-8
- [11] TESTUD L. Nerf optique. In: traité d'anatomie- 8ème édition- tome troisième méninge, système nerveux périphérique/ eds Gaston Douin 1930-p. 61-67
- [12] COULOIGNER V, TEIXEIRA M, STERKERS O, et al. Le sac endolymphatique : ses fonctions au sein de l'oreille interne. *Med. Sci. (Paris)*, 2004, 20, 304-310
- [13] B YOUNG. Les organes des sens. In: weather's fonctionnal histology. A text and colour Atlas/ 4ème ed. par B YOUNG and JW HEATH Churchill Livingston: Harcourt Publisher Limited 2000-p.380-401
- [14] LUBIN JR, NI C, ALBERT DM: Clinicopathological study of the Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Int. Ophthalmol. Clin.*, 1982, 22, 141-156
- [15] SAKAMOTO T, MURATA T, INOMATA H. Class II major histocompatibility complex on melanocytes of Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Arch. Ophthalmol.*, 1991, 109, 1270-1274

- [16] BOYD SR, YOUNG S, LIGHTMAN S. Immunopathology of the noninfectious posterior and intermediate uveitides. *Surv. Ophthalmol.*, 2001, 46, 209-233
- [17] OKADA T, SAKAMOTO T, ISHIBASHI T, et al. Vitiligo in Vogt-Koyanagi-Harada disease : immunohistological analysis of inflammatory site. *Graefe's. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 1996, 234, 359-363
- [18] KHAN M, PEPOSE JS, GREEN WR, et al. Immunologic findings in a case of a Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Ophthalmology*, 1993, 100, 1191-1198
- [19] SAKAMOTO T, MURATA T, INOMATA H. Class II major histocompatibility complex on melanocytes of Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Arch. Ophthalmol.*, 1991, 109, 1270-1274
- [20] INOMATA H, SAKAMOTO T. Immunohistochemical studies of Vogt-Koyanagi-Harada disease with sunset sky fundus. *Curr. Eye. Res.*, 1990, 9(suppl), 35-40
- [21] CHAN CC, PALESTINE AG, KUWABARA T, et al. Immunopathologic study of Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Am. J. Ophthalmol.*, 1988, 105, 607-611
- [22] MAEZAWA N, YANO A, TANIUCHI M, et al. The role of cytotoxic T lymphocytes in the pathogenesis of Vogt-Koyangi-Harada disease. *Ophthalmologica*, 1982, 185, 179-186
- [23] NOROSE K, YANO A, AOSAI F, et al. Immunologic analysis of cerebrospinal fluid lymphocytes in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1990, 31, 1210-1216
- [24] TAKASE H, FUTAGAMI Y, YOSHIDA T, et al. Cytokine profile in aqueous humor and sera of patients with infectious or noninfectious uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006, 47, 1557-1561
- [25] IMAI Y, SUGITA M, NAKAMURA S, et al. Cytokine production and helper T cell subsets in Vogt-Koyanagi-Harada's disease. *Curr. Eye. Res.*, 2001, 22, 312-318
- [26] CHI W, YANG P, LI B, et al. IL-23 promotes CD4+ T cells to produce IL-17 in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, 119, 1218-1224
- [27] LI F, YANG P, LIU X, et al. Upregulation of interleukin 21 and promotion of interleukin 17 production in chronic or recurrent Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Arch. Ophthalmol.*, 2010, 128, 1449-1454
- [28] PECK A, MELLINS ED. Precarious balance : Th17 cells in host defense. *Infect. Immun.*, 2010, 78, 32-38
- [29] TAGAWA Y, SUGIURA S, YAKURA H, et al. Letter: HLA and Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 1976, 295, 173

- [30] SHINDOY, OHNO S, YAMAMOTO T, et al. Complete association of HLA-DRB1\*04 and DQB1\*04 alleles with Vogt-Koyanagi-Harada's disease. *Hum. Immunol.*, 1994, 39, 169-176
- [31] DAVIS JL, MITTAL KK, FREIDLIN V, et al. HLA associations and ancestry in Vogt-Koyanagi-Harada disease and sympathetic ophthalmia. *Ophthalmology*, 1990, 97, 1137-1142
- [32] GOLDBERG AC, YAMAMOTO JH, CHIARELLA J, et al. HLA-DRB1\*0405 is the predominant allele in Brazilian patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Hum. Immunol.*, 1998, 59, 183-188
- [33] DAMICO FM, CUNHAunha-NETO E, GOLDBERG AC, et al. T cell recognition and cytokine profile induced by melanocyte epitopes in patients with HLA-DRB1\*0405-positive and negative Vogt-Koyanagi-Harada uveitis. *Invest. Ophthalmol.Vis. Sci.*, 2005, 46, 2465-2471
- [34] WEISZ JM, HOLLAND GN, ROER LN, et al. Association between Vogt-Koyanagi-Harada syndrome and HLA-DR1 and HLA-DR4 in hispanic patients living in southern California. *Ophthalmology*, 1995, 102, 1012-1015
- [35] LEVINSON RD, SEE RF, RAJALINGAM R, et al. HLA-DRB1 and DQB1 alleles in Mestizo patients with Vogt-Koyanagi-Harada's disease in Southern California. *Hum. Immunol.*, 2004, 65, 1477-1482
- [36] SHINDO Y, INOKO H, YAMAMOTO T, Ohno S. HLA-DRB1 typing of Vogt-Koyanagi-Harada's disease by PCR-RFLP and the strong association with DRB1\*0405 and DRB1\*0410. *Br. J. Ophthalmol.*, 1994, 78, 223-226
- [37] KIM MH, SEONG MC, KWAK NH, et al. Association of HLA with Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome in Koreans. *Am. J. Ophthalmol.*, 2000, 129, 173-177
- [38] GOLDGEIER MH, KLEIN LE, KLEINEin-ANGERER S, et al. The distribution of melanocytes in the leptomeninges of the human brain. *J. Invest. Dermatol.*, 1984, 82, 235-238
- [39] LOHMAN BD, GUSTAFSON CA, Mc KINNEY AM, et al. MR imaging of Vogt-Koyanagi-Harada syndrome with leptomeningeal enhancement. *Am. J. Neuroradiology*, 2011, 32, 169-171
- [40] NAKAMURA S, NAKAZAWA M, YOSHIOKA M, et al. Melanin-laden macrophages in cerebrospinal fluid in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Arch. Ophthalmol.*, 1996, 114, 1184-1188
- [41] KIM LA, KHUARANA RN, PARIKH JG, et al. Melanin-laden macrophages in the CSF to diagnose Vogt-Koyanagi-Harada simulating ocular syphilis. *Ocul. Immunol. Inflamm.*, 2008, 16, 59-61
- [42] YAMAKI K, OHNO S. Animal models of Vogt-koyanagi-Harada disease (sympathetic ophthalmia). *Ophthalmic. Res.*, 2008, 40, 129-135

- [43] VAN DER BRUGGEN P, TRAVERSARI C, CHOMEZ P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 1991, 254, 1643-1647
- [44] GAUGLER B, VAN DEN EYDE B, VAN DER BRUGGEN P, et al. 1994. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on melanoma cell by autologous cytolytic lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1994, 179, 921-930
- [45] BRICHARD V, VAN PEL A, WOLFEL T, et al. The tyrosinase gene coded for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.*, 1993, 178, 489-495
- [46] WOLFEL T, VAN PEL A, BRICHARD V, et al. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 759-764
- [47] COULIE PG, BRICHARD V, VAN PEL A, et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.*, 1994, 180, 35-42
- [48] KAWAKAMI Y, ELIYAHU S, SAKAGUCHI K, et al. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1994, 180, 347-352
- [49] BAKKER AB, SCHREURS MW, DE BOER AJ, et al. Melanocyte lineage-specific antigens gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1994, 179, 1005-1009
- [50] KAWAKAMI Y, ELIYAHU S, DELGADO CH, et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 3515-3519
- [51] HOUGHTON AN. Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *J. Exp. Med.*, 1994, 180, 1-4
- [52] OVERWIJK WW, LEE DS, SURMAN DR, et al. Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a self antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: recruitment for CD4 T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 2982-2987
- [53] DELEVOYE C, GIORDANO F, VAN NIEL G, et al. La biogenèse des mélanosomes: L'échiquier de la pigmentation. *Med. Sci. (Paris)*, 2011, 27, 153-162
- [54] RAPOSO G, TENZA D, MURPHY DM, et al. Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J. Cell. Biol.*, 2001, 152, 809-824
- [55] FOWLER DM, KOULOV AV, ALORY-JOST C, et al. Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS. Biol.*, 2006, 4, e6

- [56] BERSON JF, HARPER DC, TENZA D, et al. Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell.*, 2001, 12, 3451-3464
- [57] WATT B, VAN NIEL G, FOWLER DM, et al. N-terminal domains elicit formation of functional Pmel17 amyloid fibrils. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, 35543-35555
- [58] HURBAIN I, GEERTS WJ, BOUDIER T, et al. Electron tomography of early melanosomes: implications for melanogenesis and the generation of fibrillar amyloid sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105, 19726-19731
- [59] THEOS AC, TRUSCHEL ST, TENZA D, et al. A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis. *Dev. Cell.*, 2006, 10, 343-354
- [60] EBANKS JP, WICKETT RR, BOISSY RE. Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. *Int. J. Mol. Sci.*, 2009, 10, 4066-4087
- [61] YAMAKI K, KONDO I, NAKAMURA M, et al. Ocular and extra-ocular inflammation induced by immunisation of tyrosinase related protein 1 et 2 in Lewis rats. *Exp. Eye. Res.*, 2000, 71, 361-369
- [62] YAMAKI K, GOCHO K, HAYAKAWA K, et al. Tyrosinase family proteins are antigens specific to Vogt-Koyanagi-Harada disease. *J. Immunol.*, 2000, 165, 7323-7329
- [63] SUGITA S, TAKASE H, TAGUCHI C, et al. Ocular infiltrating CD4+ T cells from patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease recognize human melanocyte antigens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006, 47, 2547-2554
- [64] SUGITA S, SAGAWA K, MOCHIZUK M, et al. Melanocyte lysis by cytotoxic T lymphocytes recognizing the MART-1 melanoma antigen in HLA-A2 patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Int. Immunol.*, 1996, 8, 799-803
- [65] YEH S, KAME NK, KERKAR SP, et al. Ocular and systemic autoimmunity after successful tumor-infiltrating lymphocyte immunotherapy for recurrent, metastatic melanoma. *Ophthalmology*, 2009, 116, 981-989
- [66] OTANI S, SAKURAI T, YAMAMOTO K, et al. Frequent immune response to a melanocyte specific protein KU-MEL-1 in patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Br. J. Ophthalmol.*, 2006, 90, 773-777
- [67] BROWN JH, JARDETZKY TS, GORGA JC, et al. The three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*, 1993, 364, 33-39
- [68] FALK K, ROTZSCHKE O, STEVANOVIC S, et al. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing and general rules. *Immunogenetics*, 1994, 39, 230-242
- [69] JANEWAY CA Jr. The T cell receptor as a multicomponent signaling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T-cell activation. *Annu. Rev. Immunol.*, 1992, 10, 645-674

- [70] MERAD M, SATHE P, HELFT J, et al. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, 31, 563-604
- [71] GUERMONPREZ O, VALLADEAU J, ZITVOGEL L, et al. Antigen-presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002, 20, 621-667
- [72] RANDOLPH GJ, OCHANDO J, PARTIDA-SANCHEZ S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu. Rev. Immunol.*, 2008, 26, 293-316
- [73] HESS MW, SCHWENDINGER MG, ESKELINEN EL, et al. Tracing uptake of C3dg-conjugated antigen into B cells via complement receptor type 2 (CR2, CD21). *Blood*, 2000, 95, 2617-2623
- [74] VAN DE CORPUT L, CHAUX P, VAN DER MEIJDEN ED, et al. A novel approach to identify antigens recognized by CD4 T cells using complement-opsonized bacteria expressing a cDNA library. *Leukemia*, 2005, 19, 279-285
- [75] GRIFFIOEN M, VAN DER MEIJDEN ED, SLAGGER EH, et al. Identification of phosphatidylinositol 4-kinase type II beta as HLA class II-restricted target in graft versus leukemia reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105, 3837-3842
- [76] ZHANG Y, SUN Z, NICOLAY H, et al. Monitoring of anti-vaccine CD4 T cell frequencies in melanoma patients vaccinated with a MAGE-3 protein. *J. Immunol.*, 2005, 174, 2404-2411
- [77] WOLFL M, KUBALL J, EVRICH M, et al. Use of CD137 to study the full repertoire of CD8+ T cells without the need to know epitope specificities. *Cytometry A*, 2008, 73, 1043-1049
- [78] DAVIS CA, BENZER S. Generation of cDNA expression libraries enriched for in-frame sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 2128-2132
- [79] SANDERSON S, FRAUWIRTH K, SHASTRI N. Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 7217-7221
- [80] CHAU P, VANTOMME V, STROOBANT V, et al. Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4+ T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1999, 189, 767-778
- [81] MATSUZAKI Y, HASHIMOTO S, FUJITA T, et al. Systematic identification of human melanoma antigens using serial analysis of gene expression. *J. Immunother.*, 2005, 28, 10-19
- [82] KONDO I, YAMAGATA K, YAMAKI K, et al. Analysis of the candidate antigen for Harada's disease. *J. Jpn. Ophthalmol. Soc.*, 1994, 98, 96-603
- [83] GOCHO K, KONDO I, YAMAKI K. Identification of autoreactive T cells in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001, 42, 2004-2009

- [84] CHAUX P, VANTOMME V, COULIE P, et al. Estimation of the frequencies of anti-MAGE-3 cytolytic T lymphocyte precursors in blood from individuals without cancer. *Int. J. Cancer*, 1998, 77, 538-542
- [85] YANG P, REN Y, LI B, et al. Clinical characteristics of Vogt-Koyanagi-Harada syndrome in Chinese patients. *Ophthalmology*, 2007, 114, 606-614
- [86] AL KIERSZENBAUM. Organes sensoriels. L'uvée. In: *histologie et biologie cellulaire. Introduction à l'anatomopathologie/ ed. par AL KIERSZENBAUM: Elsevier Science Limited, 2002-p.232*
- [87] YAMADA K, SENJU S, SHINOHARA T, et al. Humoral Immune response directed against LEDGF in patients with VKH. *Immunol. Lett.*, 2001, 78, 161-168
- [88] YAMADA K, SENJU S, NAKATSURA T, et al. Identification of a novel autoantigen UACA in patients with panuveitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 280, 1169-176
- [89] BASSALI SS, PEYMAN GA, GEBHARDT BM, et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in the vitreous from a patient with Vogt-Koyanagi syndrome. *Retina*, 1996, 16, 60-61
- [90] LEHMANN PV, FORSTHUBER T, MILLER A, et al. Spreading of T cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature*, 1992, 358, 155-157
- [91] PERRY LL, BARZAGA-GILBERT E, TROTTER JL. T cell sensitization to proteolipid protein in myelin basic protein-induced relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, 1991, 33, 7-15
- [92] CROSS AH, TUOHY VK, RAINE CS. Development of reactivity to new myelin antigens during chronic relapsing autoimmune demyelination. *Cell. Immunol.*, 1993, 146, 261-269
- [93] TUOHY VK, MIN Y, YIN L, et al. The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol. Rev.*, 1998, 164, 93-100
- [94] TUOHY VK, FRITZ RB, BEN-NUN A. Self-determinants in autoimmune demyelinating disease : changes in T cell response specificity. *Curr. Opin. Immunol.*, 1994, 6, 887-891
- [95] VANDERLUGT CJ, MILLER SD. Epitope spreading. *Curr. Opin. Immunol.*, 1996, 8, 831-836
- [96] LANGRISH CJ, CHEN Y, BLUMENSCHNEIN WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.*, 2005, 201, 233-240
- [97] VOLIN MV, SHAHRARA S. Role of TH-17 cells in rheumatic and other autoimmune diseases. *Rheumatology (Sunnyvale)*, 2011, 1, pii: 2169

- [98] EVANS HG, SUDDASON T, JACKSON I, et al. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104, 17034-17039
- [99] GRECCO A, FUSCONI M, GALLO A, et al. Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Autoimmun. Rev.*, 2013, 12, 1033-1038
- [100] VAN DER BRUGGEN P, STROOBANT V, VIGNERON N, et al. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. *Cancer Immun.*, 2013, URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide>
- [101] MOURIAUX F, SAUBE S, DESJARDINS L, et al. Les mélanocytes choroïdiens normaux et malins : de la cellule à la clinique. *J. F. Ophthalmol.*, 2005, 28, 781-793
- [102] SAHIN U, TURECI O, SCHMITT H, et al. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 11810-11813
- [103] LEVISETTI MG, LEWIS DM, SURI A, et al. Weak proinsulin peptide-major histocompatibility complexes are targeted in autoimmune diabetes in mice. *Diabetes*, 2008, 57, 1852-1860
- [104] YANG J, JAMES EA, SANDA S, et al. CD4+ T cells recognize diverse epitopes within GAD65: implications for repertoire development and diabetes monitoring. *Immunology*, 2013, 138, 269-279
- [105] TARBELL KV, YAMAZAKI S, OLSON K, et al. CD25+CD4+T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.*, 2004, 11, 1467-1477
- [106] TANG Q, HENRIKSEN KJ, BI M, et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.*, 2004, 199, 1455-1465
- [107] FRANCOIS V, OTTAVIANI S, RENKVIST N, et al. The CD4+ T cell response of melanoma patients to a MAGE-A3 peptide vaccine involves potential regulatory T cells. *Cancer Res.*, 2009, 69, 4335-4345
- [108] SCHULTZ ES, CHAPIRO C, LURQUIN S, et al. The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *J. Exp. Med.*, 2002, 195, 391-399

## **ANNEXES**

**ANNEXE 1: Critères diagnostiques révisés de la maladie de Maladie de Vogt-Koyanagi-Harada.** Version française tirée de « Les uvéites »/ed. par Antoine P. BREZIN Paris: Elsevier Massson, 2010.

<p><b>1. Absence d'antécédent de traumatisme oculaire pénétrant ou de chirurgie oculaire ayant précédé le début de l'uvéite.</b></p>
<p><b>2. Absence d'élément clinique ou d'examen complémentaire évoquant une autre maladie oculaire</b></p>
<p><b>3. Atteinte oculaire bilatérale, pour laquelle les critères a ou b doivent être remplis, selon le stade de la maladie lorsque le patient est examiné</b></p> <p><i>a. Manifestations précoces de la maladie</i></p> <p>(1) Éléments en faveur d'une choroïdite diffuse (sans ou avec une uvéite antérieure, une hyalite ou une papillite), pouvant se manifester selon l'une des manières suivantes :</p> <p>(a) Zones localisées de liquide sous-rétinien</p> <p>(b) Décollements séreux rétiniens bulbeux</p> <p>(2) Dans les cas douteux à l'examen du fond d'œil, les deux éléments suivants doivent être également présents</p> <p>(a) Zones focales de retard de perfusion choroïdienne, zones multifocales de fuite en tête d'épingle, grandes zones d'hyperfluorescence en plaque, mélange avec le liquide sous-rétinien et hyperfluorescence de la papille (liste par ordre d'apparition au cours la séquence) en angiographie à la fluorescéine.</p> <p>(b) Épaississement choroïdien diffus, sans signe de sclérite postérieure en échographie</p> <p><i>b. Manifestations tardives de la maladie</i></p> <p>(1) Histoire de la maladie suggérant un antécédent de manifestations selon 3a, ainsi que soit (2) et (3) selon ci-dessous, ou signes multiples selon (3)</p> <p>(2) Dépigmentation oculaire (n'importe laquelle des manifestations ci-dessous est suffisante)</p> <p>(a) Fond d'œil en lumière de coucher de soleil« sunset glow fundus »</p> <p>(b) Signe de Sugiura</p> <p>(3) Autres signes oculaires (n'importe laquelle des manifestations ci-dessous est suffisante)</p> <p>(a) Cicatrices choroïdiennes dépigmentées nummulaires</p> <p>(b) Accumulation et/ou migrations de l'épithélium pigmentaire rétinien</p> <p>(c) Uvéite antérieure récidivante ou chronique</p>
<p><b>4. Manifestations neurologiques ou auditives</b> (pouvant avoir été résolutive au moment de l'examen) (n'importe laquelle des manifestations ci-dessous est suffisante)</p> <p>(a) Signes méningés (maaise, fièvre, céphalées, nausées, douleurs abdominales, raideur de la nuque et du dos ou combinaison de ces manifestations. Cependant, des céphalées à elles seules ne peuvent suffire pour définir des signes méningés).</p> <p>(b) Acouphènes</p> <p>(c) Pléiocytose à l'examen du liquide céphalo-rachidien</p>
<p><b>5. Manifestations tégumentaires</b> (qui ne peuvent pas avoir précédé le début de l'atteinte oculaire ou du système nerveux central) (n'importe laquelle des manifestations ci-dessous est suffisante)</p> <p>(a) Alopecie</p> <p>(b) Poliose</p> <p>(c) Vitiligo</p>

**Forme complète** – Les critères 1 à 5 doivent être présents

**Forme incomplète** – Les critères 1 à 3 doivent être présents et 4 ou 5

**Maladie possible**– Forme oculaire isolée - Les critères 1 à 3 doivent être présents

## ANNEXE 2

### COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES CPP ILE DE FRANCE III

Hôpital Tarnier-Cochin, 89 rue d'Assas 75006 Paris-Tél. : 01.46.33.68.67-Fax. : 01.46.33.70.46-  
E-mail : [cpp.iledefrance3@orange.fr](mailto:cpp.iledefrance3@orange.fr)

**Composition du Bureau** : Président : Pr. Boyan CHRISTOFOROV, Vice président : Françoise KLELTZ-DRAPEAU, Trésorier : Catherine HOLZMANN, Secrétaire : Chantal ZARADE, Trésorier Adjoint : Marie-Lucie BRUNET, Secrétaire Adjoint : Denis BERNARD.

A Paris, le 15 mai 2007

BC/LG/CC 2007-200

**REF : A rappeler dans toute correspondance :**  
N°EUDRACT : 2007-A00306-47  
Réf CPP Dossier N° : 2429

Le Comité a été saisi le 29/03/2007  
par le promoteur : **Association E.S.P.O.I.R.S.**

d'une demande d'avis pour le projet de recherche :  
**N°:« Détermination de peptides autoréactifs à partir d'antigènes mélaniques humains au cours de la maladie de Vogt-Koyanagi-Harada ».**

*dont l'investigateur coordonnateur est le Dr. Sébastien ABAD*

Le Comité a examiné le protocole (version du 21/03/2007), la note d'information-consentement du patient – (version du 21/03/2007).

Lors de sa séance du **24 AVRIL 2007**

Conformément aux dispositions de l'article R 1123-11 du Code de la Santé Publique, ont participé à la délibération :

Collège n°1 : *Personnes qualifiées en matière de recherche biomédicale* :

Dr. Bernard ASSELAIN titulaire (compétent en matière biostatistiques) - Pr. Michel DETILLEUX suppléant

Dr. Baris TURAK titulaire - Dr. Denis BERNARD suppléant

Pr. Boyan CHRISTOFOROV titulaire

*Pharmacien hospitalier* : Dr. Laurence ESCALUP titulaire (compétent en matière biostatistiques), Dr. Marie-Lucie BRUNET suppléant

*Infirmier* : Bernadette SMUTEK titulaire,

Collège n°2 : *Personnes qualifiées sur les questions éthiques* : Françoise KLELTZ-DRAPEAU titulaire, Corinne GUERIN suppléant

*Psychologue* : Nadine LABBE suppléant

*Représentant des travailleurs sociaux* : Marie Claude FONTAN suppléant

*Personnes compétentes en matière juridique* : Me Chantal ZARADE titulaire

*Représentant des associations agréées de maladies et d'usagers du système de santé* :

- Paulette MORIN suppléant

Le Comité rend un **AVIS FAVORABLE** à la mise en œuvre de la recherche biomédicale aux motifs suivants : conditions satisfaisantes de validité / pertinence scientifique / intérêt de la recherche / conclusions de l'évaluation de la balance risque/bénéfice / intelligibilité de la note d'information et la conformité des modalités de recueil du consentement.

Commentaire : la réponse à la demande du comité datée du 02/05/2007, incluant la note d'information-consentement modifiée - version du 02/05/2007-, a été prise en compte pour l'avis favorable.

Signé : Le Président

Pr. Boyan CHRISTOFOROV.



ORIGINAL REPORT

# Characteristics of Vogt-Koyanagi-Harada Disease in a French Cohort: Ethnicity, Systemic Manifestations, and HLA Genotype Data

**S. Abad**

Service de Médecine Interne, Laboratoire de recherche clinique et thérapeutique UPRES EA3409, Université Paris XIII, Faculté Léonard de Vinci, Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

**D. Monnet**

Service d'Ophtalmologie, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Cochin, Paris, France

**S. Caillat-Zucman**

Laboratoire d'Immunologie, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Necker, Paris, France

**S. Mrejen**

Service d'Ophtalmologie, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Cochin, Paris, France

**P. Blanche**

Service de Médecine Interne, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Cochin, Paris, France

**M. Chalumeau**

Service de Pédiatrie, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital St-Vincent de Paul, Paris, France

**L. Mouthon**

Service de Médecine Interne, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Cochin, Paris, France

**R. Dhote**

Service de Médecine Interne, Laboratoire de recherche clinique et thérapeutique UPRES EA3409, Université Paris XIII, Faculté Léonard de Vinci, Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

**A. P. Brézin**

Service d'Ophtalmologie, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Cochin, Paris, France

Received 16 May, 2007;  
accepted January 15, 2008.

This study was financially supported by the Institut Servier, 164 avenue Achille Peretti, 92578 Neuilly sur Seine, Cedex, France.

Correspondence and reprint requests to: Dr.

Sébastien Abad, Service de Médecine Interne, Hôpital Avicenne, 125 route de Stalingrad, 93009 Bobigny Cedex, France. E-mail: sebastien.abad@avc.ap-hop-paris.fr

**ABSTRACT** *Purpose:* To assess in patients followed in a French referral center the clinical spectrum of Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) disease and the HLA-DRB1\*04 genotype. *Methods:* Patients previously diagnosed as having VKH disease were re-evaluated in a cross-sectional study using the VKH Committee's revised criteria. High-resolution HLA-DRB1 genotyping was performed. *Results:* Eleven white patients satisfied ophthalmologic diagnostic criteria. All originated from Mediterranean countries. Nine and 3 patients had neurologic and/or cutaneous abnormalities, respectively. Among DRB1\*04-positive patients, the HLA-DRB1\*0405 subtype was 71%. *Conclusion:* These VKH patients predominantly had an incomplete form. The HLA-DRB1\*0405 subtype allele was enriched in a group of Mediterranean stock.

**KEYWORDS** Ethnicity; HLA-DRB1\*0405; uveomeningoencephalitides; vitiligo; Vogt-Koyanagi-Harada disease

Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) disease is an inflammatory disorder affecting the eyes, the auditory system, the meninges, and the skin. Although its etiology remains unknown, immunologic studies suggest that VKH disease involves a T-lymphocyte-mediated autoimmune process directed against an antigen associated with melanocytes.<sup>1–3</sup>

VKH disease appears to primarily affect individuals whose ancestry is traceable to peoples from Asia, who migrated across the Bering strait to North America and further down to Central and South America.<sup>4</sup> This propensity, along with evidence of an increased frequency among individuals with particular HLA-DRB1 genotypes, points to a genetically determined pathophysiologic susceptibility to VKH disease.<sup>5–7</sup>

Because VKH disease is distinctly uncommon in Europeans, its clinical and demographic features and the presence of particular HLA-DRB1 genotypes have not been well characterized. In a retrospective study, we previously reported a series of patients diagnosed as having VKH disease, who were white Caucasians

or Africans, two unusual ethnic groups for VKH disease. As opposed to Japanese population, the cutaneous manifestations seemed to be significantly rarer.<sup>8</sup>

In a cross-sectional study, we assessed the clinical presentation and the HLA-DRB1\*04 genotype in our patients diagnosed with VKH disease according to the VKH Committee's revised criteria.<sup>9</sup>

## PATIENTS AND METHODS

The patients were recruited in a French academic referral center, where they were treated for uveitis. Consecutive patients previously diagnosed as having VKH disease between September 1996 and September 2005 were reevaluated for a routine cross-sectional standardized evaluation by two internists (AS, DR) and two ophthalmologists (MD, BAP). The study was approved by an academic medical research ethics committee and followed the tenets of the declaration of Helsinki.

All patients underwent a comprehensive examination. Gender, race, and age were recorded at the time of the study. Digital color fundus photography was systematically performed with a 60° Canon fundus camera. Based of the recent classification,<sup>9</sup> patients were cross-sectionally evaluated for early and late signs of VKH disease, corresponding with early ophthalmologic signs (section 3a), neurologic/auditory manifestations (section 4), and late ophthalmologic signs (section 3b), and intertegumentary findings (section 5). For the purpose of this cross-sectional study, we considered patients as being at the acute or /chronic stage of VKH disease according to the time of onset of the ocular disease, that is, less or more than 3 months.<sup>10</sup>

To complete these data, a history of initial trauma or surgery (section 1) and clinical or laboratory evidence suggestive of other ocular disease (section 2) were retrospectively sought. Patients with ophthalmic features compatible with sarcoidosis were excluded if they had noncaseating granulomas on bronchial or salivary gland biopsy, or relevant morphologic findings. All patients underwent initially a standard screening protocol including a medical history and laboratory tests for syphilis, *Borrelia burgdorferi* and HTLV-1 serology in patients with risk factors for the latter infection. Mean age at onset of VKH disease was recorded.

Prior early manifestations, which might have resolved by the time of examination, were reevaluated, including analysis of fluorescein angiography and/or ultrasonography (section 3a). Regarding more recent pa-

tients, optical coherence tomography (Zeiss Humphrey OCT-3, San Leandro, California, USA) was used to confirm presence of subretinal fluid or bullous serous retinal detachment. Presence of cerebrospinal fluid pleiocytosis was recorded when cerebro-spinal fluid (CSF) analysis was performed (section 4). Hearing loss was assessed by audiogram examination. According to the revised diagnostic criteria for VKH disease, patients could finally be classified as having a complete or an incomplete VKH disease or an isolated ocular disease.<sup>9</sup>

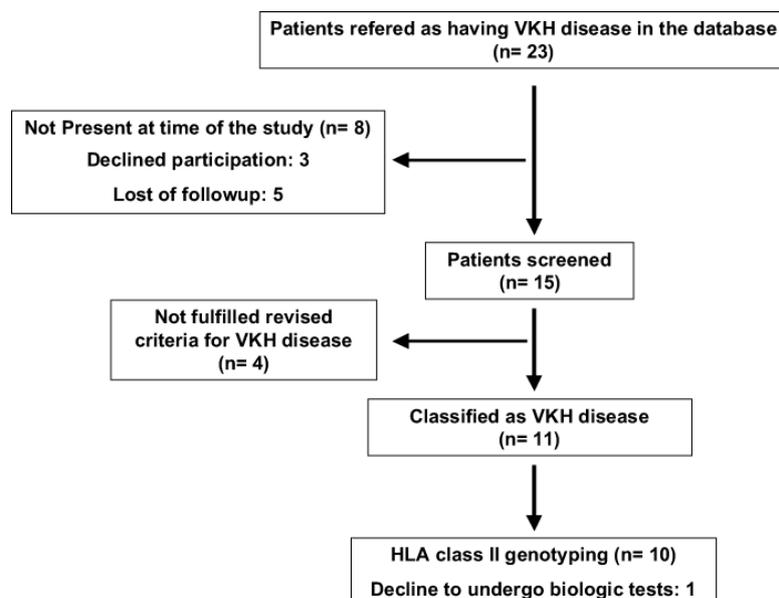
DNA was extracted from the peripheral blood using a classic salting-out procedure. HLA class II DNA typing was performed by means of hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes following amplification of the second exon of the DRB1 gene by the polymerase chain reaction (PCR), using the InnoLipa HLA typing kit (Abbott, France), which provides a low-resolution genotyping for the major HLA-DRB1 alleles. In HLA-DRB1\*04-positive samples, high-resolution DRB1\*04 subtyping was performed using sequence-specific primer amplification (Dynal, France).

Patients who did not fulfill the diagnostic revised criteria for VKH disease were excluded from the analysis. All quantitative data were expressed as means  $\pm$  SD. HLA-DRB1 allele frequencies were determined by counting in the different groups.

## RESULTS

Twenty-three patients were contacted. All were living in a large Paris suburban geographic area. Five patients defaulted and 3 others refused to participate. Finally, 15 patients were evaluated for the revised diagnostic criteria for VKH disease (Figure 1). All 3 patients seen at the acute stage fulfilled diagnostic criteria, while among patients seen at the chronic stage, 4 patients were excluded on the basis of section 3 of the VKH Committee's criteria. Reasons for exclusions included absence of relevant retrospective data at the acute phase in 1 patient and no evidence of ocular depigmentation or chronic uveitis in 3 patients considered as being at the chronic phase.

The characteristics of the 11 patients classified as having VKH disease are listed in Table 1, according to the VKH disease diagnostic category (complete, incomplete, or probable). All 11 VKH patients originated from Mediterranean regions, predominantly North Africa (8/11). These latter were therefore white as well as 3 European Hispanic patients. Among the 4 patients who did not fulfill the VKH Committee's criteria, only



**FIGURE 1** Flow diagram of the study cohort

1 originated from North Africa. Six of the 11 VKH patients were males. Mean age (years  $\pm$  SD) at current evaluation was  $41.7 \pm 15.4$  years while age at the onset of VKH disease was  $33.5 \pm 14.2$  years.

## Ophthalmologic Features

Among the late manifestations of VKH disease (section 3b), pigmented scars and chronic anterior uveitis, were predominantly present by the time of the study in the 8 patients seen at the chronic stage. Retrospectively, all 11 patients had evidence of early ophthalmic manifestations of VKH disease (section 3a). Nine of them underwent a fluorescein angiography (7/11) or an ultrasonography (2/11), showing in all patients typical choroidal changes or evidence of a choroidal thickening, respectively. OCT disclosed bullous serous retinal detachment in the other 2 cases.

## General Features

At the time of study, 3 of the 8 VKH disease patients seen at the chronic phase had some intertegumentary findings, including alopecia (1/8), poliosis (1/8), and vitiligo (2/8), which exclusively affected the eyelids or the sacral area in 2 patients. Retrospectively, presence of meningismus, tinnitus, or hearing loss were recorded in 8, 2, and 3 patients, respectively. In case of hearing loss, the audiogram found bilateral cochlear deafness. CSF

analysis was carried out in 8 of the 11 VKH patients, Three patients were excluded from statistical analysis because of concomitant corticosteroid treatment (1/11) or unavailable data (2/11). Six of these 8 patients had pleocytosis in CSF ranging from 20 to 500 cells/mm<sup>3</sup> with increased numbers of lymphocytes (>80%), and protein levels ranging from 0.4 to 1.5 g (normal value < 0.4 g) per liter (data not shown in Table 2). Overall, 8 of the 11 VKH patients were considered to have some type of neurologic/auditory abnormality. According to these findings, 1 patient was diagnosed as suffering from a complete form of VKH disease, and 9 patients as having an incomplete VKH disease, while 1 patient had a probable disease, that is, isolated ocular involvement.

## HLA Class II Distribution

HLA class II genotyping was performed in 10 out of the 11 VKH patients. The distribution of HLA-DRB1 allele frequencies and HLA-DRB1\*04 subtype frequency in the VKH different patients subgroups is shown in Table 2. As compared with all the HLA DRB1 alleles, the HLA-DRB1\*04 allele frequency was highest in VKH patients (35%). Six patients with complete or incomplete VKH disease carried the DRB1\*04 allele, while the only 1 with isolated ocular disease did not. Moreover, the HLA-DRB1\*0405 subtype was mostly present in DRB1\*04-positive patients (71%). Of the 6

**TABLE 1 Screening of patients for signs of VKH disease**

	VKH disease			Total patients n = 11
	Complete n = 1	Incomplete n = 9	Probable <sup>§</sup> n = 1	
<b>Epidemiologic characteristics</b>				
Age at the time of the study (years ± SD)	59	42.3 ± 13.4	15	41.7 ± 15.4
Age at the onset (years ± SD)	52	32.7 ± 12	15	33.5 ± 14.2
Male – n°/n	1	5/9	0	6/11
<b>Origin – n°/n</b>				
North African	1/1	6/9	1/1	8/11
European Hispanic	0/1	3/9	0/1	3/11
<b>Ocular characteristics</b>				
Early manifestations – n°/n	1/1	9/9	1/1	11/11
Choroiditis (SRF/BSRD) – n°/n	1/1	9/9	1/1	11/11
Angiography (FA/MA/LPA/ONS) – n°/n	ND	6/6	1/1	7/7*
Choroidal thickening – n°/n	1/1	1/1	ND	2/2**
Late manifestations – n°/n	1/1	7/7	—	8/8 <sup>§</sup>
Ocular depigmentation (SGF/SS) – n°/n	1/1	3/7	—	4/8 <sup>§</sup>
Other signs (NCDS/RPEC/CAV) – n°/n	1/1	6/7	—	7/8 <sup>§</sup>
<b>Extraocular characteristics</b>				
Early manifestations – n°/n	1/1	7/9	0/1	8/11
Cerebrospinal fluid pleocytosis > 5 cell/mm <sup>3</sup> – n°/n	1/1	5/7 <sup>§</sup>	§	6/8 <sup>§</sup>
Cerebrospinal fluid lymphocytosis > 80% – n°/n	1/1	5/7 <sup>§</sup>	§	6/8 <sup>§</sup>
Hearing loss – n°/n	0/1	3/9	0/1	3/11
Tinnitus – n°/n	1/1	1/9	0/1	2/11
Meningismus – n°/n	1/1	7/9	0/1	8/11
Late manifestations – n°/n	1/1	2/7	—	3/8 <sup>§</sup>
Alopecia – n°/n	0/1	1/7	—	1/8 <sup>§</sup>
Poliosis – n°/n	0/1	1/7	—	1/8 <sup>§</sup>
Vitiligo – n°/n	1/1	1/7	—	2/8 <sup>§</sup>

Note. \*Angiography and \*\*echography provided evidence of VKH disease in all patients who underwent such explorations.

<sup>§</sup>Patients receiving systemic corticosteroids, and <sup>§</sup>those for whom result of lumbar puncture was not available were excluded from statistical analysis.

<sup>\*</sup>Patients seen at the chronic phase. SRF, serous retinal fluid; BSRD, bullous serous retinal detachments; FA, focal areas of delay in choroidal perfusion; MA, multifocal areas of pinpoint leakage; LPA, large place areas of hyperfluorescence; ONS, optic nerve staining; SGF, sunset glow fundus; SS, sugiura sign; NCDS, nummular chorioretinal depigmented scars; RPEC, retinal pigment epithelium clumping; CAV, chronic anterior uveitis; ND, not done.

HLA-DRB1\*04-positive patients, 4 expressed the HLA-DRB1\*0405 subtype and 1 of them was homozygous for this allele.

## DISCUSSION

Vogt-Koyanagi-Harada disease is frequently found among Japanese, Spanish-Americans, American-Indians, or Brazilians, primarily in their third to fifth decades, with a feminine predominance.<sup>11–15</sup> Our study originally described 11 white VKH patients, predominantly of North African origin (8/11) or European Hispanics (3/11), who are known to share a common ancestry. Indeed, during the first millennium, Arab invasions via the Gibraltar strait led to a mix-up with the populations from South Europa. VKH disease has been recently reported among the most common

causes of uveitis in a referral center in Tunisia, a North African country.<sup>16</sup> In our patients, mean age at onset (33 years) was comparable to that reported in the largest series of VKH patients but the majority of our patients were males.

Systemic manifestations are diverse and race dependent. Previous studies found that, when compared with Japanese patients, Hispanics from California tended to have a lower incidence of hearing impairment (11 vs. 80%), vitiligo (8 vs. 25%), alopecia (17 vs. 60%), and poliosis (6 vs. 60%) despite the fact that they had typical ocular and neurologic manifestations.<sup>12,17</sup>

Until recently the diagnostic criteria for VKH disease took into account the cutaneous involvement as the major criterion, and this led to underdiagnosing VKH disease in patients at the early phase.<sup>18</sup> Actually, cutaneous findings are not typically present at the initial

**TABLE 2** HLA DRB1 allele frequency and HLA DRB1\*04 subtype frequency of vogt-koyanagi-harada disease

HLA-DRB1 alleles	VKH disease			Total VKH patients n = 20
	Complete n = 2	Incomplete n = 16	Probable n = 2	
	DRB1- n <sup>o</sup> ./n (%) <sup>*</sup>			
01	0	0	0	0 (0%)
03	0	2	0	2 (10%)
04	1	6	0	7 (35%)
0401	0	1	0	1 (14%)
0402	0	0	0	0 (0%)
0403	0	0	0	0 (0%)
0404	0	1	0	1 (13%)
0405	1	4	0	5 (71%)
0406	0	0	0	0 (0%)
0407	0	0	0	0 (0%)
0408	0	0	0	0 (0%)
07	0	2	0	2 (10%)
08	0	0	0	0 (0%)
09	0	0	0	0 (0%)
10	0	1	0	1 (5%)
11	1	1	1	3 (15%)
12	0	0	0	0 (0%)
13	0	2	1	3 (15%)
14	0	2	0	2 (10%)
15	0	0	0	0 (0%)
16	0	0	0	0 (0%)

Note. HLA-DRB1 allele genotyping and HLA-DRB1\*04 allele subtyping were performed in 10 and 6 patients, respectively.

phase of the disease. The revised criteria rightly take into account different periods in the progression of the disease. With the new criteria, VKH disease can be sorted into three distinct forms: complete, incomplete, or probable.

This diagnostic system is a more reliable way to classify VKH patients. Kitamura et al. have recently confirmed that these revised criteria were highly specific (100%) of VKH disease.<sup>19</sup> From this standpoint, our study appears to be based on homogenous groups of patients. Based on ophthalmologic criteria, we excluded one-third of patients previously diagnosed as having VKH disease on the grounds of incomplete data or wrong criteria.

In agreement with the Japanese study cited above, a similar proportion of our patients could be identified as having a complete, incomplete, or probable VKH disease (1/11, 9/11, 1/11, respectively). However, in a recent series of Chinese patients, a large proportion of patients (67%) were diagnosed as having a complete VKH.<sup>20</sup> In agreement with the Kitamura et al. findings,

a number of them (8/11) had neurologic/auditory disorders and to a lesser extent some type of intergumentary lesions (3/8). Interestingly, in this cross-sectional study conducted 8 years after disease onset, systematic examination disclosed vitiligo in 2 of the 8 VKH patients seen at the chronic phase and poliosis or alopecia in another patient. This indicates that cutaneous lesions are not as rare as previously reported in our VKH patients with lower levels of skin pigmentation when sought.<sup>8</sup> Of note, in our patients, vitiligo had a particular topography with a symmetric distribution on the eyelids or the trunk, especially the sacrum. However, the majority of our patients originating from Mediterranean regions did not have the complete form of the VKH disease as recently observed in Tunisian patients.<sup>21</sup>

Our study showed a high percentage of HLA-DRB1\*04-positive patients fulfilling the new revised criteria of VKH disease. An increased frequency of DRB1\*04 has previously been observed in Hispanic,<sup>6</sup> Japanese,<sup>7</sup> Chinese,<sup>22</sup> Korean,<sup>23</sup> Brazilian,<sup>24</sup> and Italian patients.<sup>25</sup>

Among HLA-DRB1\*04 subtypes, a high frequency of the HLA-DRB1\*0405 allele was observed, suggesting a significant association with VKH disease as described in Asian or Brazilian populations.<sup>23,24,26</sup> Two-thirds of our HLA-DRB1\*04-positive, not selected, patients carried the HLA-DRB1\*0405 allele. To the best of our knowledge, it is the first time that this has been observed in patients originating from Mediterranean countries. As opposed to the Brazilian patients, none of our patients was of Japanese or Asian descent. Studies using controls matched for their ethnic group are required to confirm whether the HLA-DRB1\*0405 allele is strongly associated with the VKH disease in these patients.

According to a recent study,<sup>27</sup> VKH patients carrying the HLA-DRB1\*0405 allele recognize a more diverse array of peptides derived from melanocyte differentiation proteins TYR, TRP1, TRP2, and Pmel17, which supports a major role of HLA-DRB1\*0405 in the presentation of melanocyte epitopes. Along with previous reports in different populations of various ethnic and geographic origins, our results reinforce the notion that VKH disease may occur worldwide in HLA-DRB1\*0405 positive patients, and strengthen the hypothesis that the pathogenesis of VKH disease might be related to an abnormal immune response against melanocyte-derived peptides in HLA susceptible individuals.

In summary, our VKH patients originating from Mediterranean regions appeared to have a presentation similar to that of Japanese or Tunisian patients according to the new revised criteria for VKH disease.

## REFERENCES

- [1] Kondo I, Yamagata K, Yamaki K, et al. Analysis of the candidate antigen for Harada's disease. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi—Acta Societatis Ophthalmologicae Japonicae*. 1994;98:596–603.
- [2] Sugita S, Sagawa K, Mochizuki M, et al. Melanocyte lysis by cytotoxic T lymphocytes recognizing the MART-1 melanoma antigen in HLA-A2 patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Int Immunol*. 1996;8:799–803.
- [3] Norose K, Yano A. Melanoma specific Th1 cytotoxic T lymphocyte lines in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Br J Ophthalmol*. 1996;80:1002–1008.
- [4] Moorthy RS, Inomata H, Rao NA. Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome. *Surv Ophthalmol*. 1995;39:265–292.
- [5] Numaga J, Matsuki K, Tokunaga K, et al. Analysis of human leukocyte antigen HLA-DR beta amino acid sequence in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32:1958–1961.
- [6] Weisz JM, Holland GN, Roer LN, et al. Association between Vogt-Koyanagi-Harada syndrome and HLA-DR1 and HLA-DR4 in hispanic patients living in southern California. *Ophthalmology*. 1995;102:1012–1015.
- [7] Shindo Y, Ohno S, Yamamoto T, et al. Complete association of HLA-DRB1\*04 and DQB1\*04 alleles with Vogt-Koyanagi-Harada's disease. *Human Immunol*. 1994;39:169–176.
- [8] Guenoun JM, Parc C, Dhote R, et al. Vogt-Koyanagi-Harada Disease: clinical features, therapy and long-term visual outcome in a Caucasian and African population. *J Fr Ophthalmol*. 2004;27:1013–1016.
- [9] Read RW, Holland GN, Rao NA, et al. Revised diagnostic criteria for Vogt-Koyanagi-Harada disease: report of an international committee on nomenclature. *Am J Ophthalmol*. 2001;131:647–652.
- [10] Jabs DA, Nussenblatt RB, Rosebaum JT. Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data: results of the First International Workshop. *Am J Ophthalmol*. 2005;140:509–516.
- [11] Ohno S, Char DH, Kimura SJ, et al. Vogt-Koyanagi-Harada's syndrome. *Am J Ophthalmol*. 1977;83:735–740.
- [12] Beniz J, Forster DJ, Lean JS, et al. Variations in clinical features of the Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome. *Retina*. 1991;11:275–280.
- [13] Nussenblatt RB. Clinical studies of Vogt-koyanagi-Harada's disease at the National Eye Institute, NIH, USA. *Jpn J Ophthalmol*. 1988;32:330–333.
- [14] Belfort Junior R, Nishi M, Hayashi S, et al. Vogt-Koyanagi-Harada's disease in Brazil. *Jpn J Ophthalmol*. 1988;32:344–347.
- [15] Sheu SJ. Update on uveomeningoencephalitis. *Curr Opin Neurol*. 2005;18:323–329.
- [16] Khairallah M, Yahia SB, Ladjimi A, et al. Pattern of uveitis in a referral centre in Tunisia, North Africa. *Eye*. 2007;21:33–39.
- [17] Sugiura S. Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Jpn. J Ophthalmol*. 1978;22:9–35.
- [18] Read RW, Rao NA. Utility of existing Vogt-Koyanagi-Harada syndrome criteria at initial evaluation of individual patient: a retrospective analysis. *Ocular Immunol Inflamm*. 2000;8:227–234.
- [19] Kitamura M, Takami K, Kitachi N, et al. Comparative study of two sets of criteria for the diagnosis of Vogt-Koyanagi-Harada's disease. *Am J Ophthalmol*. 2005;139:1080–1085.
- [20] Yang P, Ren Y, Li B, et al. Clinical characteristics of Vogt-Koyanagi-Harada syndrome in Chinese patients. *Ophthalmology*. 2007;114:606–614.
- [21] Khairallah M, Zaouali S, Messaoud R, et al. The spectrum of Vogt-Koyanagi-Harada disease in Tunisia, North Africa. *Int Ophthalmol*. 2007;27:125–130.
- [22] Zhao M, Jiang Y, Abrahams IW. The association of HLA antigens with VKH syndrome in a Han Chinese population. *Arch Ophthalmol*. 1991;109:368–370.
- [23] Kim MH, Seong MC, Kwak NH, et al. Association of HLA with Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome in Koreans. *Am J Ophthalmol*. 2000;129:173–177.
- [24] Goldberg AC, Yamamoto JH, Chiarella JM, et al. HLA-DRB1\*0405 is the predominant allele in Brazilian patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Hum Immunol*. 1998;59:183–188.
- [25] Pivetti-Pezzi P, Accorinti M, Colabelli-Gisoldi RA, et al. Vogt-koyanagi-Harada disease and HLA type in Italian patients. *Am J Ophthalmol*. 1996;122:889–891.
- [26] Shindo Y, Inoko H, Yamamoto T, et al. HLA-DRB1 typing of Vogt-Koyanagi-Harada's disease by PCR-RFLP and the strong association with DRB1\*0405 and DRB1\*0410. *Br J Ophthalmol*. 1994;78:223–226.
- [27] Damico FM, Cunha-Neto E, Goldberg AC, et al. T-Cell recognition and cytokine profile induced by melanocyte epitopes in patients with HLA-DRB1\*0405-positive and negative Vogt-Koyanagi-Harada Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:2465–2471.

**ANNEXE 4: Article accepté pour publication dans *Molecular Vision***

**Absence of recognition of common melanocytic antigens by T cells isolated from the cerebrospinal fluid of a Vogt-Koyanagi-Harada patient**

*Sébastien Abad<sup>a\*</sup>, Grégoire Wieërs<sup>b1</sup>, Didier Colau<sup>b</sup>, Claude Wildmann<sup>b</sup>, Emmanuelle Delair<sup>c</sup>, Robin Dhoté<sup>a</sup>, Antoine P. Brézin<sup>c</sup>, Yukata Kawakami<sup>d</sup>, Pierre G. Coulié<sup>e</sup>, Pierre van der Bruggen<sup>b</sup>*

<sup>a</sup> Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire de recherche clinique et thérapeutique, UPRES EA3509, F-93009, Bobigny, France; Service de Médecine Interne, Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), F-93009, Bobigny, France.

<sup>b</sup> Ludwig Institute for Cancer Research and de Duve Institute, Université catholique de Louvain, 74 av. Hippocrate, P.O. Box B1-7403, B-1200 Brussels, Belgium.

<sup>c</sup> Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, AP-HP, Groupe Hospitalier Cochin-Hôtel-Dieu, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, F-75014 Paris, France.

<sup>d</sup> Division of Cellular Signaling, Institute for Advanced Medical Research, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan.

<sup>e</sup> de Duve Institute, Université catholique de Louvain, 74 av. Hippocrate, P.O. Box B1-7404, B-1200 Brussels, Belgium.

\* Corresponding author: Sébastien Abad, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire de recherche clinique et thérapeutique, UPRES EA3509, F-93009, Bobigny, France; Email: [sebastien.abad@avc.aphp.fr](mailto:sebastien.abad@avc.aphp.fr), tel. +(33)148955352, fax +(33)148955854.

---

<sup>1</sup> Present address: Department of Internal Medicine, Cliniques universitaires Saint-Luc, Université catholique de Louvain, 10 av. Hippocrate, B-1200 Brussels, Belgium.

## **ABSTRACT**

Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) disease is an autoimmune uveomeningitis, strongly associated with expression of HLA-DRB1\*04:05. Melanocytes are considered as the source of self-antigens and melanocytic proteins TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100 have been proposed as the proteins targeted by autoreactive T cells from DRB1\*04:05 VKH patients. Here, a large number of potentially autoreactive CD4 T lymphocyte clones were obtained from the cerebrospinal fluid of a DRB1\*04:05-negative VKH patient. To determine the antigen specificity of these clones, they were stimulated with autologous antigen-presenting cells loaded with either of the whole melanocytic proteins TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A and KU-MEL-1. None of the 107 clones was able to secrete specifically TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5, or IL-1 upon stimulation. Nine clones secreted high level IL-17 upon non-specific stimulation with anti-CD3 antibodies. We tentatively conclude that the self-antigens having triggered the VKH disease in this DRB1\*04:05-negative patient probably derive from melanocytic proteins other than these 6 melanocytic proteins.

## **KEYWORDS**

Vogt-Koyanagi-Harada, IL-17, melanocyte, T lymphocyte

## 1. Introduction

Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) disease is characterized by an inaugural uveomeningitis and hearing loss, followed at a later stage by a depigmentation of eyes and skin [1]. An association between VKH disease and HLA-DR4 was described for Asian, Hispanic, or Native American patients [2-4], and in particular the HLA-DRB1\*04:05 subtype was associated with VKH in Asian and Brazilian patients [5-8]. The DRB1 molecules associated with VKH disease share the motif LLEQRRRA<sub>67-73</sub> located in the peptide-binding cleft [9-11]. The HLA molecules sharing this motif may thus present to T cells a common set of peptides and, by this, contribute to the recognition of the ocular self-peptides [9].

VKH pathogenesis remains incompletely understood, but autoimmune T cells have nonetheless been implicated. Activated CD4 T lymphocytes are present in the cerebrospinal fluid (CSF) of VKH patients [12], usually in higher numbers than their CD8 counterparts. IFN- $\gamma$  was found elevated in the aqueous humor of VKH patients with uveitis [13]. A few differences between blood T cells from VKH patients and control donors have been reported: a decreased expression of CD18 and AKNA transcription factors in VKH patients [14], a higher expression of transcription factor T-bet [15], less apoptosis of T cells from VKH patients after *in vitro* stimulation with phytohemagglutinin [16]. Upon *ex vivo* non-specific stimulation, blood CD4 T lymphocytes of VKH patients secreted slightly more IFN- $\gamma$  and IL-2 than did cells obtained from control individuals, whereas IL-4 secretion was similar in both groups [17]. IL-17 production by CD4 T cells was stimulated by IL-23, which was suggested to be responsible for the development of uveitis seen in patients with VKH disease, and IL-17-producing CD4 T cells of VKH patients were shown to produce proinflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  [18, 19].

Melanocytes can be found in the four affected tissues: choroid, inner ear, leptomeninges and skin [20-22], and accordingly the melanocytes were proposed as the source of self-antigens. Noteworthy, skin melanocytes are destroyed (vitiligo) by some cancer patients recovering from their melanoma [23]. A patient with a metastatic melanoma developed late manifestations of VKH disease after adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes containing a high proportion of CD8 T cells specific for a peptide from melanocytic protein Melan-A [24]. In rats, injection of melanocytic proteins TRP1 and TRP2 induced ocular and extra-ocular inflammation, similar to a human VKH disease [25].

T lymphocytes are predominant among the leucocytes present in the CSF of VKH

patients, but monocytes are also present. Some of them contain melanin granules [26, 27], presumably following phagocytosis of damaged melanocytes from the meninges, suggesting that melanocyte-derived antigens can activate the CSF T lymphocytes. Viruses have been proposed to be responsible for the destruction of melanocytes, thus initiating VKH disease [28]. CD4 T lymphocytes isolated from the blood or the aqueous humor of DRB1\*04:05 VKH patients could be stimulated *in vitro* with peptides derived from melanocytic proteins TRP1, TRP2, tyrosinase, and gp100. The expanded T lymphocytes produced IFN- $\gamma$  upon further stimulation with the same peptides [29-32]. Antibodies against the melanocytic protein KU-MEL-1 were detected in the blood of DRB1\*04:05 VKH patients [33].

We isolated a large number of CD4 T lymphocyte clones from the CSF of a naive VKH patient in the acute phase of the disease. This patient expressed DRB1\*14:01,\*15:03 and not DRB1\*04:05, the HLA allele classically associated with VKH disease. We decided to determine the antigen specificity of these clones and stimulated each of them with autologous cells having processed either of 6 proteins that are potential target for autoreactive T cells in DRB1\*04:05 VKH patients, namely TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A and KU-MEL-1.

## 2. Material and methods

### 2.1. Patient

Based on the VKH Committee's revised diagnostic criteria [1], a diagnostic of early phase VKH disease was made. The research protocol was approved by the ethics committee "Comité de protection des personnes CPP Ile de France III". Written informed consent was obtained from the patient before enrolment. All research adhered to the tenets of the declaration of Helsinki. Ophthalmic examination was performed with Stratus OCT3 (Humphrey Instruments, Carl Zeiss Division, San Leandro, CA, USA).

### 2.2. T cell clones and Epstein-Barr virus-transformed B cells (EBV-B)

T cell clones were derived by limiting dilution from CSF mononuclear cells of this VKH patient. They were stimulated with irradiated allogenic peripheral blood mononuclear cells in 96-well U-bottom plates ( $10^4$  cells/well). Irradiated LG2-EBV cells were added as feeder cells ( $10^4$  cells/well). T cell clones were cultured in Iscove's modified Dulbecco medium (IMDM) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 0.24 mM L-asparagine, 0.55 mM L-arginine, 1.5 mM L-glutamine (AAG), 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin and 30 µg/ml gentamycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (culture medium), and with 10% human serum (HS). This culture medium was supplemented with human rIL-2 (Proleukin Chiron, Amsterdam, Netherlands; 50 UI/ml), human rIL-4 produced in our laboratory (5 UI/ml), IL-7 (R&D Abington, Oxford, UK; 10 ng/ml), anti-CD3 antibodies (Janssen-Cilag, Berchem, Belgium; 1 ng/ml), and gentamycin (15 µg/ml). After several stimulations, T cell clones were frozen. An aliquot of each clone was labeled with anti-CD3-PerCP (1/30; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), anti-CD8-APC (1/40; BD Biosciences) and anti-CD4-FITC (1/30; BD Biosciences), and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). Cells of the MAGE-A3-specific HLA-DPB1\*0401-restricted CD4 T cell clone, R12C9, hereafter named as anti-MAGE-A3 T cell clone, were stimulated ( $5 \times 10^5$  cells/well) every two weeks with HLA-DP4 EBV li.MAGE-A3 cells ( $2 \times 10^5$  cells/well) in 24-well plates. Irradiated LG2-EBV cells were added as feeder cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/well). An EBV-B cell line derived from the VKH patient, which also expresses DP4 molecules, and the HLA-DP4 EBV li.MAGE-A3 cells were maintained in IMDM containing 10% FCS (Thermo Scientific, Cramington, UK).

### 2.3. Construction of recombinant protein-producing bacteria

The template expression vectors containing the cDNA sequences encoding TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A, KU-MEL-1 and MAGE-A3 were available in our laboratories. The cDNAs were amplified by PCR using specific primers containing an EagI restriction site and an AscI restriction site:

- Melan-A, forward 5'CCCTACAAGCGGCCGAATGCCAAGAGAAG-3' and reverse 5'CGCTGGCTCTTAGGCGCGCCAGGTGAATAAGG-3'
- gp 100, forward 5'-GAAGAACACACGGCCGAAATGGATCTGGTGC-3' and reverse 5'TGAGAGTACTCAGGCGCGCCGACCTGCTG-3'
- tyrosinase, forward 5'-AGAGGAAGACGGCCGAATGCTCCTGGCTGTT-3' and reverse 5'TGCCTAAGCCTTTTAGGCGCGCCTAAATGGCTCTG-3'
- TRP1, forward 5'-TCAAGCAGACGGCCGAATGAGTGCTCCTAAA-3' and reverse 5'GGGCATTTGTTAGGCGCGCCGACCACAGACTG-3'
- TRP2, forward 5'-TATAAAGCCC GGCCGAATGAGCCCCCTTTGG-3' and reverse 5'ATGAGCACCTTAGGCGCGCCGGCTTCTTCTGT-3'
- KU-MEL-1, forward 5'-ACAGTTCAATCGGCCGAATGGGGGACATTC-3' and reverse 5'AGCCCTGACTTAGGCGCGCCCACTGGGTA-3'
- MAGE-A3, forward 5'-ACCAGAGTCATCGGCCGCATGCCTCTTG-3' and reverse 5'CTCAGACTCAGGCGCGCCCTCTTCCCCC-3'.

The amplification resulted in cDNAs with an EagI site at the 5' end and an AscI site at the 3' end, thus permitting directional cloning. After amplification, cDNAs were purified by column chromatography (High Pure PCR product Purification Kit ref. 1732676; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and then visualized on an ethidium bromide stained agarose MP gel. Subsequently, protein cDNAs were digested with EagI (Biolabs, Ipswich, MA, USA; R0505-S) and AscI (Biolabs; R0558-S), purified and directionally ligated into pKE-1 vector digested with EagI and AscI. The pKE-1 vector was kindly provided by Dr Davis (Department of Developmental Molecular Genetics, Ben Gourion University of the Negev, Beer Sheva, Israel) [34]. This pKE-1 vector contains an inducible *tac* promoter and, in addition to an ampicillin resistance gene, a kanamycin resistance gene. cDNAs inserted in the correct reading frame confer kanamycin resistance to the host, whereas the vector alone or cDNA inserts containing stop codons in the frame translated by the bacteria should not. The ligation products were electroporated into *E. coli* XL1-blue bacteria. The recombinant *E. coli*

bacteria were plated out on large agar plates containing ampicillin (50 g/ml) and kanamycin (7.5 g/ml) and, after overnight culture at 37°C, the bacteria were scraped in LB medium and frozen in LB/20% glycerol at 80°C. To analyze the cDNA inserts of the bacterial colonies, DNA sequencing was performed using the ABI PRISM Big Dye™ Terminators v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the following primers: forward 5'-CTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3' and reverse 5'-AGACGTTTCCCGTTGAATATGG-3', corresponding to sequences of pKE-1 vector [34]. Sequences were determined with an ABI PRISM 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems) and evaluated using the Sequencher Analysis Software™ v3.7 (Applied Biosystems). We also used another bacteria producing MAGE-A3 that was previously constructed in our laboratory (Fig.4) [35].

#### 2.4. *Western Blot analysis*

One milliliter of bacterial cultures, induced or non induced, were pelleted and lyzed in Laemmli buffer. Proteins were separated by SDS/PAGE on a 4-12% polyacrylamide gel. The fusion proteins were analyzed by Western Blot using an anti-GST mouse monoclonal antibody (GST [1E5]; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG antibody. Chromogenic substrate BM Purple (ROCHE, Mannheim, Germany) was used for detection. Recombinant GST protein (GST [1-218]; Santa Cruz Biotechnology) was used as reference for quantifying the fusion proteins. The identity of the GST-fusion proteins was analysed in Western Blot with antibodies directed against TRP1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA; ref. NBP1 69542), TRP2 (Novus Biologicals; ref. NBP1 86893), tyrosinase (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA; ref. MS800P1), gp100 (Thermo Scientific; ref. MA5-13232), Melan-A (Thermo Scientific; ref. MA1-26245), KU-MEL-1 (Biorbyt, Cambridge, UK; ref. Orb 31521) and MAGE-A3 (Novus Biologicals; ref. NBP1 56404).

#### 2.5. *The complement-opsonized bacteria assay*

Procedure was described previously [35]. After thawing, the recombinant bacteria were amplified in LB medium containing ampicillin (50 µg/ml) and kanamycin (7.5 µg/ml), at 37°C under agitation until an OD<sub>600</sub> of 0.5 was reached. Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG; 1 mM) was added to induce protein expression and after 4 h at 37°C under agitation, bacteria

from 1 ml of culture were opsonized by adding 150  $\mu$ l of HS containing 17% (v/v) of complement (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) during 1 h under agitation at 37°C. The opsonized bacteria were pooled by transferring 345  $\mu$ l of each bacteria in two different pools, and centrifuged at 2,500 rpm for 15 min. The supernatant was discarded and bacteria were resuspended in 1,350  $\mu$ l (pool 1: TRP1, TRP2 and gp100) or 1,800  $\mu$ l (pool 2: tyrosinase, Melan-A, KU-MEL-1 and MAGE-A3) of IMDM/10% FCS with gentamycin (30  $\mu$ g/ml). Subsequently, 1 ml of complement-opsonized bacteria from each bacterial pool was added into the EBV-B cells of the VKH patient and plated out in three 24-well plates ( $1 \times 10^6$  cells/well) in 2 ml/well IMDM/10% FCS with gentamycin (30  $\mu$ g/ml). After overnight incubation to allow uptake and processing of the bacteria-encoded proteins, EBV-B cells were used as antigen-presenting cells for the CD4 T cells.

## 2.6. *Screening of the T cell clone specificity*

The different T cell clones were usually thawed the day before and cultured overnight in 96-well U-bottom plates with IMDM/10% HS with IL-2 (25 UI/ml). Autologous EBV-B cells previously loaded with pools of opsonized bacteria were added to the microwells (60  $\mu$ l/well). CD4 T cells ( $5 \times 10^3$  cells/well) were added in 100  $\mu$ l IMDM/10% HS with IL-2 (100 UI/ml) and gentamycin (30  $\mu$ g/ml) to the EBV-B cells. T cell clones were also stimulated by microbeads coated with anti-CD3/CD28 antibodies (1 bead/3 T cells) (Invitrogen, Oslo, Norway; ref. 111.31D). After overnight co-culture at 37°C, supernatants were harvested, and the amount of IL-5, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 was measured using Bioplex kit (Biorad, Hercules, CA, USA, ref. 171304000; TNF- $\alpha$ , ref. 171 B5026M; IL-5, ref. 171 B5005M; IFN- $\gamma$ , ref. 171 B5019M; IL-17, ref. 171 B5014M) according to manufacturer's procedure. Alternatively, the amount of IFN- $\gamma$  was measured by ELISA using reagents from Life Technologies (Camarillo, CA, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Patient

A 37-year-old black man was referred to our center because of vision loss and headaches that had started 3 weeks earlier. He had no medical history. The best decimal corrected visual acuity was 0.3 in both eyes. Ophthalmic examination revealed 2+ chamber cells and flare in both eyes, and bilateral serous retinal detachments. Due to the presence of sub-retinal fluid, the central retinal thickness was increased to 409  $\mu\text{m}$  in the right eye and 243  $\mu\text{m}$  in the left eye. The early phase of the fluorescein angiogram showed bilateral multiple hyperfluorescent pinpoints and the late phase showed staining in the areas of the serous retinal detachments. One year later, diffuse hypopigmentary fundus changes with a moderate sunset-glow appearance were observed in both eyes on dilated fundoscopic examination (Fig.1). There was no extra-ophthalmologic manifestation at the initial phase of the disease except for the CSF. The CSF contained 561 white blood cells/ $\text{mm}^3$  with 95% lymphocytes and less than 1 red blood cell per  $\text{mm}^3$ , reflecting the lack of blood-brain barrier disruption. We did not detect Herpesviridae in the CSF by PCR and the concentration of IFN- $\alpha$  was normal.

#### 3.2. Isolation of T cell clones from the CSF

Because in VKH disease the CSF is supposed to contain an enriched population of potentially autoreactive T cells [12, 20-22, 26, 27], CSF cells were distributed at one cell per well in five 96-well microplates, stimulated every two weeks with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, in the presence of IL-2, IL-7 and irradiated allogeneic cells. A total of 145 clones were obtained. A third of them were phenotyped for CD3, CD4 and CD8 and, as expected [12], 90% of them were CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>.

#### 3.3. Construction of the tools to screen for antigen specificity of the T cell clones

The HLA class II type of the patient was DRB1\*14:01,\*15:03; DQB1\*05:03,\*06:02; DPB1\*01:01,\*04:02. Because the HLA haplotype of this patient, as well as that of many Caucasian VKH patients, differed from the classical HLA-DRB1\*04:05 VKH patients, we decided to test the specificity of the CD4 T cell clones using a very sensitive approach previously developed in our laboratory [35]. Briefly, recombinant bacteria producing each of

the proteins of interest were constructed. Bacteria were incubated with complement to increase their uptake by antigen-presenting cells, namely autologous EBV-B cells. Bacteria-loaded EBV-B cells were subsequently used as stimulating cells for each of the T cell clones. On the basis of published reports, our working hypothesis was that some of these CD4 T cell clones recognized antigens derived from melanocytic proteins and we decided to test TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A and KU-MEL-1.

### 3.3.1. Construction of bacteria producing recombinant melanocytic proteins

DNA sequences encoding either of the melanocytic proteins TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A and KU-MEL-1, were introduced into vector pKE-1, which allows the production of recombinant proteins fused at the C-terminus of Glutathione-S-Transferase (GST) [34]. Expression of the recombinant gene is controlled by the lacI repressor, and can be induced by isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Bacteria transformed with the different plasmids were selected, IPTG was added to the cultures, and the production of the recombinant proteins was analyzed in bacterial extracts by Western Blot with an anti-GST antibody.

Full-length fusion proteins were detected for each bacterial clone, together with a large number of smaller fusion products that can represent abortive translation or degradation products (Fig.2A). The identity of the melanocytic fusion protein was confirmed using antibodies specific to each of the melanocytic protein (Fig.3). The amount of each full-length fusion protein was estimated with a purified recombinant GST protein as a reference (Fig.2B, Table 1). It ranged from 75 to 300 picomoles of protein per ml of culture.

### 3.3.2. Bacteria expressing recombinant protein MAGE-A3 as source of antigen for anti-MAGE-A3 CD4 T cells

To assess the sensitivity of our recombinant bacteria-based approach of antigen presentation, we had no CD4 T cell clone that was specific for an antigenic peptide derived from one of the six melanocytic proteins. We were unable to receive a functional clone from other laboratories. We had however a CD4 T cell clone directed against a MAGE-A3 peptide presented by HLA-DP4 molecules. We constructed a pKE-1 vector containing a MAGE-A3 coding sequence. Expression of the fusion protein was confirmed by Western blot as described above (Fig.2A and Fig.3). The amount of the recombinant full-length GST-MAGE-A3 protein was estimated to be about 570 picomoles per ml of culture (Fig.2B, Table 1).

MAGE-A3-producing bacteria were collected, washed, opsonized with human

complement, and incubated overnight with HLA-DP4 EBV-B cells to generate antigen-presenting cells harboring on their surface HLA-DP4 molecules presenting MAGE-A3 peptides. The EBV-B cell line was generated from blood cells of the patient. As a first positive control, we loaded EBV-B cells with other complement-opsonized recombinant bacteria that produced MAGE-A3 [35]. As a second positive control, we used HLA-DP4 EBV-B cells transduced with a retroviral construct encoding a truncated human invariant chain (Ii) fused with the MAGE-3 protein (retro-Ii.MAGE-3) [36]. In this chimeric protein, signals within the Ii should target the MAGE-3 protein to the class II antigen-processing compartments [36]. As a third positive control, we loaded the presenting cells with the MAGE-A3 peptide that is recognized by the anti-MAGE-3 T cell clone [37].

The recognition of the MAGE-A3-derived antigen by T cells was assessed by measuring the amounts of IFN- $\gamma$  released in the supernatant of overnight co-cultures. The anti-MAGE-A3 T cell clone secreted similar amounts of IFN- $\gamma$  upon contact with presenting cells loaded with either our recombinant bacteria producing MAGE-A3, or the MAGE-A3 control bacteria, or the peptide. They secreted more IFN- $\gamma$  upon stimulation with cells transduced with Ii-MAGE-A3 (Fig.4). To estimate the sensitivity of this approach, our MAGE-3-producing bacteria were diluted in irrelevant bacteria, opsonized with human complement, and incubated overnight with HLA-DP4 presenting cells. Recognition by the CD4 T cells, as assessed by IFN- $\gamma$  secretion, was easily detectable when MAGE-A3-producing bacteria were diluted 300 times into irrelevant bacteria, and still detectable with a dilution factor of 1,000 (Fig.5).

When 1 ml of MAGE-A3-producing bacteria was opsonized with complement before loading on antigen-presenting cells, this bacterial suspension contained about 570 picomoles of MAGE-A3 (Table 1). Considering that our detection approach with MAGE-A3 allows for a dilution factor of at least 300, a bacterial suspension containing about 1.9 picomoles (570 divided by 300) should result in recognition by the anti-MAGE-A3 clone. Some of the recombinant bacteria produced about 75 picomoles of melanocytic protein (Table 1). This should allow for a dilution factor of 39 (75 divided by 1.9). Considering that we decided to screen the recombinant bacteria by pools of three and four different bacteria (see below), the amount of melanocytic protein produced by the bacteria should not be a limiting factor.

#### *3.4. Analysis of the antigen specificity of the T cell clones isolated from the CSF*

Cells of each of the T cell clones isolated from the CSF of the patient were cultured with

antigen-presenting cells, namely autologous EBV-B cells that were previously incubated for 20 h with either of two pools of opsonized bacteria. The first pool contained three different bacteria, producing TRP1, TRP2 or gp100. The second pool contained four different bacteria, producing tyrosinase, Melan-A, KU-MEL-1 or MAGE-A3. As positive control, each T cell clone was stimulated with beads coated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. As another positive control, EBV-B cells loaded with MAGE-A3 bacteria were tested for recognition by anti-MAGE-A3 T cells. The amounts of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5 released in the supernatant of overnight co-cultures were estimated by multiplex bead-based assays.

A total of 145 T cell clones were tested in monoplicates and 38 secreted upon non-specific stimulation less than 100 pg/ml of the four cytokines, and were not taken into consideration .

The remaining 107 clones were tested in monoplicate for their ability to specifically release cytokines upon stimulation with cells loaded with each of the two bacteria pools. The criterion of positivity was to release at least twice as much of any cytokine upon stimulation with one bacteria pool versus the other. Three clones scored positive for two cytokines (Fig.6) and eight clones scored positive for one cytokine (data not shown). These 11 clones were expanded and re-tested in triplicates with autologous EBV-B cells loaded separately with each recombinant bacteria. None of them scored positive in this second test (Figure 7 shows the data for the three clones shown in Figure 6). We tentatively concluded that the initial positivity resulted from technical errors or monoplicate analysis.

IL-17 secretion was also estimated by multiplex bead-based assays and, noteworthy, nine of the 107 clones produced significant amounts of IL-17 in response to the stimulation with beads coated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Fig.8). This is the first report of IL-17-producing CD4 T cells in the CSF of a VKH patient at the early phase of the disease.

#### 4. Discussion

How to explain that the CD4 T cells isolated from the CSF of our patient during the acute phase of his VKH disease do not appear to recognize the melanocytic proteins TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A or KU-MEL-1?

It could be explained if the CD4 T cells recognized some viral agents like CMV, which have been presumed as a trigger mechanism for the VKH disease [32]. Indeed, prodromal symptoms such as cold usually precede the acute ocular inflammation. However, the failure to detect CMV or other Herpesviridae by PCR in the CSF of our patient does not support the hypothesis of such a viral infection.

It could also be explained if the frequency of the CSF-infiltrating CD4 T cells that recognize antigens derived from the six melanocytic proteins was lower than one percent. However, a higher frequency of autoimmune cells is expected in the case of an autoimmune disease. Indeed, in a metastatic melanoma patient who developed uveitis and vitiligo – manifestations seen at the late stage of VKH – after an adoptive transfer of *in vitro*-expanded tumor-infiltrating lymphocytes, 4% of the CD4 T cells detected in the aqueous humor and 2% of those detected in the blood were directed against a Melan-A peptide presented by HLA-A2 [24]. If TRP1, TRP2, tyrosinase, Melan-A, gp100 or KU-MEL-1 were to be the source of self-antigens recognized by the autoimmune CD4 T cells of our patient, we would expect that a few would recognize an antigenic peptide derived from at least one of the six different whole melanocytic proteins complexed with at least one of the six HLA class II molecules expressed by the autologous B cells.

As we failed to find T cells that recognize melanocytic antigens, we cannot exclude that we had false negative results. We have nevertheless controlled different steps of our experimental approach. The bacteria were shown to be able to produce enough of the melanocytic protein, and the patient antigen-presenting cells to be able to present a control protein, MAGEA3, to anti-MAGEA3 CD4 T cells. We have shown that each T cell clone from the VKH patient was able to secrete cytokines after non-specific stimulation. We were unfortunately unable to find a T cell clone, in particular one from an HLA-DRB1\*04:05 VKH patient, specific for an antigen derived from one of the six melanocytic proteins, in order to be able to further control our experimental procedure. However, we never experienced false negative results with a specific CD4 T cell stimulated with protein-loaded antigen-presenting B cells. We were unable to control the recognition of autologous melanocytes by the T cell clones. Indeed, considering that a skin punch biopsy of 8 mm of diameter provides less than

30,000 melanocytes and that a recognition assay with one T cell clone in triplicate necessitates 30,000 melanocytes, this important control is very difficult to perform.

The VKH patient analyzed in this study was typed HLA-DRB1\*14:01,\*15:03, an HLA haplotype that differs from the HLA-DRB1\*04:05 haplotype classically associated with VKH disease. Considering that the different HLA isoforms are highly variable close to the peptide-binding cleft, the set of peptides that binds to DRB1\*04:05 molecules is different from the set of peptides able to bind to DRB1\*14:01 or DRB1\*15:03 molecules. If we had tested in the current study recognition of peptides with the T cell clones, the lack of antigen recognition by the T cells could have been related to the genotype of the patient. But we have used six whole melanocytic proteins which have been processed by autologous B cells. In analogy with the tumor immunology field, we surmised that the proteins would generate peptides able to bind to some of the molecules of our VKH patient. Indeed, a set of peptides derived from either TRP1, tyrosinase, gp100 or Melan-A have been found to stimulate anti-melanoma CD4 T cells isolated from DR4 patients. When the antigen specificity of anti-melanoma CD4 T cells was analyzed in DR15 melanoma patients, another set of peptides was identified as the target antigens, the peptides being derived from the same four above-mentioned proteins [38]. Hence, our surprise that none of the 107 T cell clones recognized even one peptide derived from one of the six melanocytic proteins.

Our negative results are in agreement with preliminary results obtained many years ago by one of the co-authors. T cells were cultured from the CSF of several VKH patients, including DRB1\*04:05 individuals. The T cells were tested for their reactivity and failed to recognize antigens derived from tyrosinase, gp100, Melan-A, despite the fact that some T cells responded to presenting cells loaded with allogeneic melanocyte lysates (Kawakami, unpublished data).

Our results seem in apparent contradiction with studies of T cells isolated from other VKH patients. In 2000, Yamaki *et al.* cultured for three days in monoplicates 200,000 blood mononuclear cells in the presence of  $\pm 30$   $\mu$ M of 30 amino-acid-long peptides corresponding to parts of the sequences of TRP1, TRP2 and tyrosinase [31]. Proliferation was measured on day 3 by tritiated thymidine incorporation. Positive microwells were observed only with blood cells of the ten HLA-DRB1\*04:05 VKH patients, but not with blood cells of the three HLA-matched healthy controls [31]. One year later, the same group published similar data but in this new set of experiments, responding T cells were cloned and tested in a proliferation assay after peptide stimulation [30]. These results suggested but did not prove that these VKH patients had melanocyte-specific T cells in their blood. Indeed, synthetic peptides are known

to be contaminated with impurities, *i.e.* bulky chemical protecting groups that can stimulate T cells. Thus testing the specificity of T cells expanded with a synthetic peptide by stimulating them again with the same peptide can yield false positives. It would have been more convincing to show that T cell clones were able to specifically recognize autologous cells expressing or loaded with the relevant proteins.

In 2005, another research group reported data obtained with 34 VKH patients carrying HLA DRB1\*04:05 and/or DRB1\*15 alleles [29]. In this paper also, the reactivity of some microcultures to peptide stimulation was not confirmed by testing autologous presenting cells loaded with the whole relevant protein [29]. T cell clones were also established from cells infiltrating the aqueous humor of DRB1\*04:05 VKH patients and found to secrete RANTES and IFN- $\gamma$  when tyrosinase or gp100-derived peptides were added at concentrations higher than 100  $\mu$ M [32]. Noteworthy, concentrations lower than 1  $\mu$ M are in our experience more than sufficient to induce activation of specific T cells. Controls with whole tyrosinase or gp100 proteins loaded on autologous cells were not performed. In this paper, the authors have shown that one of the peptide-specific T cell clone was able to secrete cytokines upon contact with allogeneic melanoma cells. Surprisingly, the cytokine secretion was seven times higher with melanoma cells than with cells loaded with 200  $\mu$ M of peptides. In our experience, stimulation with peptide-loaded cells is stronger than stimulation with tumor cells expressing the corresponding protein. In the studies described above, the frequencies of autoreactive T cells found in the peripheral blood or aqueous humor of VKH patients were not indicated [30, 32]. This is an important information because in any blood donor, one can expect a frequency of CD4 T cells against most HLA-peptide combination at about  $3 \times 10^{-7}$  of the blood CD4 T cells (based on our own unpublished observations with CD8 T cells and Chaux *et al.* [39]).

Thus, in apparent contradiction with data obtained with T cells from DRB1\*04:05 VKH patients, none of the T cells clones of our DRB1\*14:01,\*15:03VKH patient was specific for a peptide derived from melanocytic proteins TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A and KU-MEL-1. Our tentative conclusion based on the analysis of this only one patient is that the CD4 T lymphocytes, isolated from the CSF during the early phase of the VKH disease, recognize peptides derived from melanocytic proteins other than the six mentioned above. Further search of antigen specificity of T cells from the cerebrospinal fluid of VKH patients might benefit from testing a broader set of antigen-derived melanocytic proteins.

**Disclosures**

The authors have no financial or non-financial competing interests.

**Funding**

This study was financially supported by the Institut Servier, 164 avenue Achille Peretti, 92578 Neuilly-sur-Seine Cedex (France), the French Society of Internal Medicine (SNFMI), and the Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (Belgium). G. Wieërs was supported by a grant from the Fonds National de la Recherche Scientifique (Belgium). None of these funding sources had any role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

**Acknowledgements**

We thank Nathalie Krack for her administrative and secretarial assistance.

## References

- [1] R.W. Read, G.N. Holland, N.A. Rao, K.F. Tabbara, S. Ohno, L. Arellanes-Garcia, P. Pivetti-Pezzi, H.H. Tessler and M. Usui, Revised diagnostic criteria for Vogt-Koyanagi-Harada disease: report of an international committee on nomenclature, *Am. J. Ophthalmol.* 131 (2001) 647-652.
- [2] Y. Shindo, S. Ohno, T. Yamamoto, S. Nakamura and H. Inoko, Complete association of the HLA-DRB1\*04 and -DQB1\*04 alleles with Vogt-Koyanagi-Harada's disease, *Hum. Immunol.* 39 (1994) 169-176.
- [3] J.M. Weisz, G.N. Holland, L.N. Roer, M.S. Park, A.J. Yuge, R.S. Moorthy, D.J. Forster, N.A. Rao and P.I. Terasaki, Association between Vogt-Koyanagi-Harada syndrome and HLA-DR1 and -DR4 in Hispanic patients living in Southern California, *Ophthalmology* 102 (1995) 1012-1015.
- [4] M. Zhao, Y. Jiang and I.W. Abrahams, Association of HLA antigens with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome in a Han Chinese population, *Arch. Ophthalmol.* 109 (1991) 368-370.
- [5] A.C. Goldberg, J.H. Yamamoto, J.M. Chiarella, M.L. Marin, M. Sibirilli, R. Neufeld, C.E. Hirata, E. Olivalves and J. Kalil, HLA-DRB1\*0405 is the predominant allele in Brazilian patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease, *Hum. Immunol.* 59 (1998) 183-188.
- [6] M.H. Kim, M.C. Seong, N.H. Kwak, J.S. Yoo, W. Huh, T.G. Kim and H. Han, Association of HLA with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome in Koreans, *Am. J. Ophthalmol.* 129 (2000) 173-177.
- [7] Y. Shindo, H. Inoko, T. Yamamoto and S. Ohno, HLA-DRB1 typing of Vogt-Koyanagi-Harada's disease by PCR-RFLP and the strong association with DRB1\*0405 and DRB1\*0410, *Br. J. Ophthalmol.* 78 (1994) 223-226.
- [8] A. Greco, M. Fusconi, A. Gallo, R. Turchetta, C. Marinelli, G.F. Macri, A. De Virgilio and M. de Vincentiis, Vogt-Koyanagi-Harada syndrome, *Autoimmun. Rev.* 12 (2013) 1033-1038.
- [9] C. Alaez, M. del Pilar Mora, L. Arellanes, S. Cano, E. Perez-Luque, M.N. Vazquez, A. Olivo, A. Burguete, A. Hernandez, M. Pedroza and C. Gorodezky, Strong association of HLA class II sequences in Mexicans with Vogt-Koyanagi-Harada's disease, *Hum. Immunol.* 60 (1999) 875-882.
- [10] R.D. Levinson, R.F. See, R. Rajalingam, E.F. Reed, M.S. Park, N.A. Rao and G.N. Holland, HLA-DRB1 and -DQB1 alleles in mestizo patients with Vogt-Koyanagi-Harada's disease in Southern California, *Hum. Immunol.* 65 (2004) 1477-1482.
- [11] J.M. Tiercy, S.R. Rathinam, M. Gex-Fabry and E. Baglivo, A shared HLA-DRB1 epitope in the DR beta first domain is associated with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome in Indian patients, *Mol. Vis.* 16 (2010) 353-358.

- [12] K. Norose, A. Yano, F. Aosai and K. Segawa, Immunologic analysis of cerebrospinal fluid lymphocytes in Vogt-Koyanagi-Harada disease, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31 (1990) 1210-1216.
- [13] H. Takase, Y. Futagami, T. Yoshida, K. Kamoi, S. Sugita, Y. Imai and M. Mochizuki, Cytokine profile in aqueous humor and sera of patients with infectious or noninfectious uveitis, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (2006) 1557-1561.
- [14] L. Mao, P. Yang, S. Hou, F. Li and A. Kijlstra, Label-free proteomics reveals decreased expression of CD18 and AKNA in peripheral CD4+ T cells from patients with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome, *PLoS One* 6 (2011) e14616.
- [15] B. Li, P. Yang, H. Zhou, X. Huang, H. Jin, L. Chu, Y. Gao, L. Zhu and A. Kijlstra, Upregulation of T-bet expression in peripheral blood mononuclear cells during Vogt-Koyanagi-Harada disease, *Br. J. Ophthalmol.* 89 (2005) 1410-1412.
- [16] P. Yang, L. Chen, H. Zhou, H. Zhong, H. Wang, X. Huang and A. Kijlstra, Resistance of lymphocytes to Fas-mediated apoptosis in Behcet's disease and Vogt-Koyangi-Harada syndrome, *Ocul. Immunol. Inflamm.* 10 (2002) 47-52.
- [17] Y. Imai, M. Sugita, S. Nakamura, S. Toriyama and S. Ohno, Cytokine production and helper T cell subsets in Vogt-Koyanagi-Harada's disease, *Curr. Eye Res.* 22 (2001) 312-318.
- [18] W. Chi, P. Yang, B. Li, C. Wu, H. Jin, X. Zhu, L. Chen, H. Zhou, X. Huang and A. Kijlstra, IL-23 promotes CD4+ T cells to produce IL-17 in Vogt-Koyanagi-Harada disease, *J. Allergy Clin. Immunol.* 119 (2007) 1218-1224.
- [19] F. Li, P. Yang, X. Liu, C. Wang, S. Hou and A. Kijlstra, Upregulation of interleukin 21 and promotion of interleukin 17 production in chronic or recurrent Vogt-Koyanagi-Harada disease, *Arch. Ophthalmol.* 128 (2010) 1449-1454.
- [20] M.H. Goldgeier, L.E. Klein, S. Klein-Angerer, G. Moellmann and J.J. Nordlund, The distribution of melanocytes in the leptomeninges of the human brain, *J. Invest. Dermatol.* 82 (1984) 235-238.
- [21] B.D. Lohman, C.A. Gustafson, A.M. McKinney, B. Sarikaya and S.C. Silbert, MR imaging of Vogt-Koyanagi-Harada syndrome with leptomeningeal enhancement, *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 32 (2011) E169-171.
- [22] S. Sugiura, Vogt-Koyanagi-Harada disease, *Jpn J. Ophthalmol.* 22 (1978) 9-35.
- [23] A.N. Houghton, Cancer antigens: immune recognition of self and altered self, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 1-4.
- [24] S. Yeh, N.K. Karne, S.P. Kerkar, C.K. Heller, D.C. Palmer, L.A. Johnson, Z. Li, R.J. Bishop, W.T. Wong, R.M. Sherry, J.C. Yang, M.E. Dudley, N.P. Restifo, S.A. Rosenberg and R.B. Nussenblatt, Ocular and systemic autoimmunity after successful tumor-infiltrating lymphocyte immunotherapy for recurrent, metastatic melanoma, *Ophthalmology* 116 (2009) 981-989 e981.

- [25] K. Yamaki, I. Kondo, H. Nakamura, M. Miyano, S. Konno and S. Sakuragi, Ocular and extraocular inflammation induced by immunization of tyrosinase related protein 1 and 2 in Lewis rats, *Exp. Eye Res.* 71 (2000) 361-369.
- [26] L.A. Kim, R.N. Khurana, J.G. Parikh and N.A. Rao, Melanin-laden macrophages in the CSF to diagnose Vogt-Koyanagi-Harada simulating ocular syphilis, *Ocul. Immunol. Inflamm.* 16 (2008) 59-61.
- [27] S. Nakamura, M. Nakazawa, M. Yoshioka, I. Nagano, H. Nakamura, J. Onodera and M. Tamai, Melanin-laden macrophages in cerebrospinal fluid in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome, *Arch. Ophthalmol.* 114 (1996) 1184-1188.
- [28] N. Yu, S. Zhang, T. Sun, K. Kang, M. Guan and L. Xiang, Double-stranded RNA induces melanocyte death via activation of Toll-like receptor 3, *Exp. Dermatol.* 20 (2011) 134-139.
- [29] F.M. Damico, E. Cunha-Neto, A.C. Goldberg, L.K. Iwai, M.L. Marin, J. Hammer, J. Kalil and J.H. Yamamoto, T-cell recognition and cytokine profile induced by melanocyte epitopes in patients with HLA-DRB1\*0405-positive and -negative Vogt-Koyanagi-Harada uveitis, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46 (2005) 2465-2471.
- [30] K. Gocho, I. Kondo and K. Yamaki, Identification of autoreactive T cells in Vogt-Koyanagi-Harada disease, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (2001) 2004-2009.
- [31] K. Yamaki, K. Gocho, K. Hayakawa, I. Kondo and S. Sakuragi, Tyrosinase family proteins are antigens specific to Vogt-Koyanagi-Harada disease, *J. Immunol.* 165 (2000) 7323-7329.
- [32] S. Sugita, H. Takase, C. Taguchi, Y. Imai, K. Kamoi, T. Kawaguchi, Y. Sugamoto, Y. Futagami, K. Itoh and M. Mochizuki, Ocular infiltrating CD4+ T cells from patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease recognize human melanocyte antigens, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (2006) 2547-2554.
- [33] S. Otani, T. Sakurai, K. Yamamoto, T. Fujita, Y. Matsuzaki, Y. Goto, Y. Ando, S. Suzuki, M. Usui, M. Takeuchi and Y. Kawakami, Frequent immune response to a melanocyte specific protein KU-MEL-1 in patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease, *Br. J. Ophthalmol.* 90 (2006) 773-777.
- [34] C.A. Davis and S. Benzer, Generation of cDNA expression libraries enriched for in-frame sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 2128-2132.
- [35] L. van de Corput, P. Chaux, E.D. van der Meijden, E. De Plaen, J.H.F. Falkenburg and P. van der Bruggen, A novel approach to identify antigens recognized by CD4 T cells using complement-opsonized bacteria expressing a cDNA library, *Leukemia* 19 (2005) 279-285.
- [36] S. Sanderson, K. Frauwirth and N. Shastri, Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 7217-7221.

- [37] P. Chaux, V. Vantomme, V. Stroobant, K. Thielemans, J. Corthals, R. Luiten, A.M. Eggermont, T. Boon and P. van der Bruggen, Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 767-777.
- [38] P. van der Bruggen, V. Stroobant, N. Vigneron and B. Van den Eynde, Peptide database: T cell-defined tumor antigens, *Cancer Immun.* (2013) <http://www.cancerimmunity.org/peptide/differentiation>.
- [39] P. Chaux, V. Vantomme, P. Coulie, T. Boon and P. van der Bruggen, Estimation of the frequencies of anti-MAGE-3 cytolytic T lymphocyte precursors in blood from individuals without cancer., *Int. J. Cancer* 77 (1998) 538-542.

**Table 1.** Estimation of the amount of recombinant protein produced by bacteria.

<b>Fusion protein</b>	<b>µg of GST in the GST-fusion protein</b>	<b>pmoles of the GST-fusion protein</b>
TRP1	4	150
TRP2	2	75
tyrosinase	2	75
gp100	8	300
Melan-A	2	75
KU-MEL-1	8	300
MAGE-A3	15	570

Amounts are expressed per milliliter of induced culture. pmoles: picomoles

## LEGENDS

**Fig. 1. Ophthalmologic features of the VKH patient.** (A, B) Fundus shows bilateral exsudative retinal detachments. (C, D) The fluorescein angiogram reveals bilateral multifocal areas of pinpoint leakage at the level of retinal pigment epithelium and optic nerve staining. (E, F) Fundus photograph obtained one year later shows a moderate sunset-glow fundus with diffuse depigmentation of retinal pigment epithelium in both eyes.

**Fig. 2. Western Blot analysis of the recombinant GST-fusion proteins produced in bacteria.** Recombinant GST and GST-fusion proteins were detected with a monoclonal anti-GST antibody. MW: molecular weight ladder is expressed in Kd. (A) Similar amounts of proteins extracted from the bacterial cultures before (NI) and after (I) induction with IPTG, were loaded. The expected molecular weight of the full-length fusion protein is indicated with \*. A protein of 29.9 Kd is expected for empty vector pKE-1. It contains the 26.5 Kd GST sequence with some additional amino acids at the C-terminus. Dimers of the GST protein (~60 Kd) were also observed. (B) The amount of the full-length GST fusion proteins (\*) produced in the bacteria was estimated using purified recombinant GST protein as a reference. Bacterial extracts from 5 and 25 µl induced culture and known amounts of a recombinant GST protein (26.5 Kd) were loaded. The amount (ng) of the GST portion of the full-length fusion protein was visually evaluated in comparison with the purified GST protein, and converted into the corresponding number of moles of GST and hence of the protein fused to GST.

**Fig. 3. Identity of the recombinant GST-fusion proteins produced in bacteria.** Each protein of interest produced in fusion with GST was detected with a relevant specific antibody. The Western Blot profiles show a variety of recombinant protein fragments as previously detected by the monoclonal anti-GST antibody, as shown in Figure 2. (-): bacterial extracts from induced culture of bacteria containing the empty vector pKE-1. (+): bacterial extracts from induced cultures of recombinant bacteria containing the sequence encoding GST-fusion proteins.

**Fig. 4. Recognition of EBV-B cells loaded with MAGE-A3-expressing bacteria.** The antigen-presenting cells (30,000/well) were EBV-B cells obtained from the VKH patient that also express HLA-DP4 molecules. These cells were loaded with complement-opsonized

bacteria, which expressed either MAGE-A3 or Melan-A as a negative control. As positive controls, we used cells loaded with a another recombinant complement-opsonized bacteria producing MAGE-A3 that was previously constructed in our laboratory, cells transduced with a retroviral construct encoding a truncated human invariant chain (Ii) fused with the MAGE-A3 protein (retro-Ii.MAGE-A3), or cells pulsed with MAGE-3.DP4 peptide ACYEFLLWGPRALVTS (24). In total, 5,000 cells of the anti-MAGE-3 T cell clone were added to each well. The amount of IFN- $\gamma$  secreted in the supernatant of the co-culture was measured by ELISA. The results shown represent an average of triplicate co-cultures.

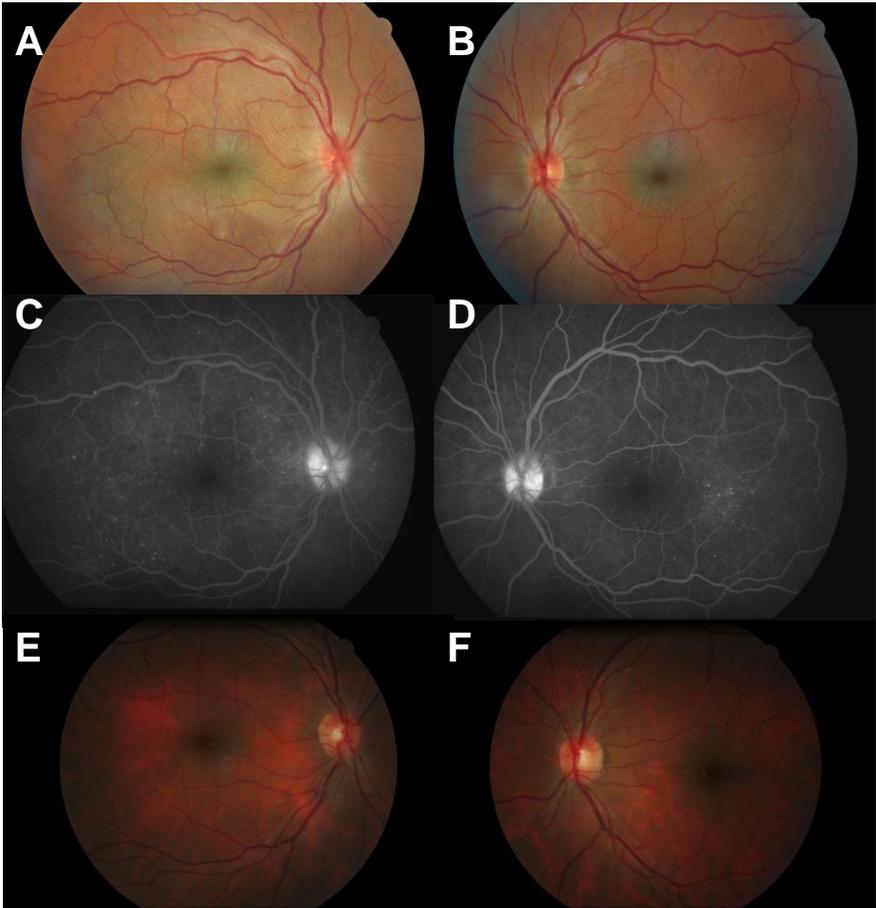
**Fig. 5. Dilution of MAGE-A3-producing bacteria in non relevant bacteria.** (A) After induction of protein expression by IPTG, MAGE-A3-producing bacteria were mixed with Melan-A-producing bacteria, opsonized with complement and incubated overnight with HLA-DP4 EBV-B cells, which were generated from blood cells of the VKH patient. The anti-MAGE-3 T cell clone (5,000 cells/well) were added to the antigen-presenting cells (30,000 cells/well). The amount of IFN- $\gamma$  secreted in the supernatant of overnight co-cultures was measured by ELISA. The results shown represent an average of triplicate co-cultures. (B) EBV-B.retro-Ii.MAGE-A3 cells and HLA-DP4 EBV-B cells loaded with Melan-A-expressing bacteria were used as positive and negative controls, respectively.

**Fig. 6. First screening of CD4 clones for cytokine secretion upon stimulation with melanocytic proteins.** Bacteria coated with complement were grouped in two pools, added to autologous EBV-B cells and incubated overnight. CD4 T cells (5,000/well) were added in monoplicates to EBV-B cells (30,000/well). The amount of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5 and IL-17 in the supernatant of overnight co-cultures was estimated with a multiplex bead-based assay. As positive control, anti-MAGE-3 T cell clone R12C9 was used.

**Fig. 7. Cytokine-secretion assay with selected clones stimulated with individual proteins.** After induction of protein expression by IPTG and opsonization with complement, the bacteria were added to autologous EBV-B cells and incubated overnight. CD4 T cells (5,000/well) were added to EBV-B cells (30,000/well). The amount of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5 and IL-17 in the supernatant of overnight co-cultures was estimated with a multicytokine bioplex kit. As positive control, anti-MAGE-3 T cell clone R12C9 was used. The screening of the clones was performed in triplicates.

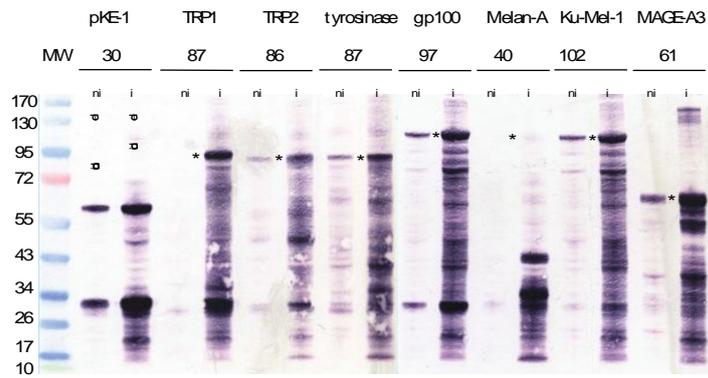
**Fig. 8. Some T cell clones obtained from the cerebrospinal fluid of the VKH patient secrete IL-17.** T cell clones ( $n \geq 107$ ) were stimulated with beads coated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. The amount of IL-17 in the supernatant of overnight co-cultures was measured by multiplex bead-based assay. None of the clones shown in Figures 6 and 7 secreted significant amounts of IL-17.

**Figure 1**

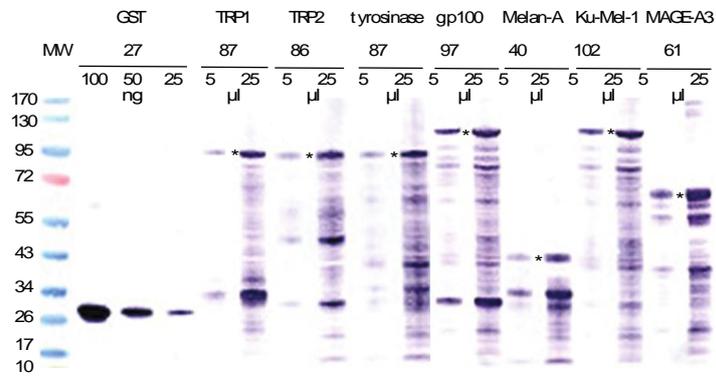


**Figure 2**

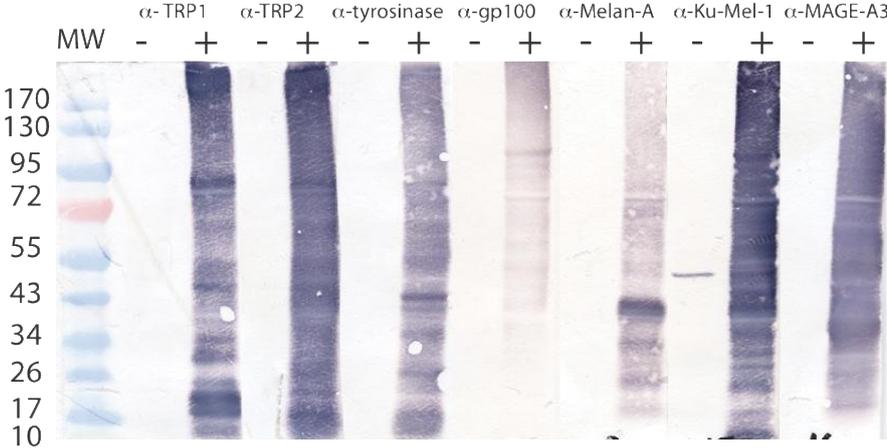
A



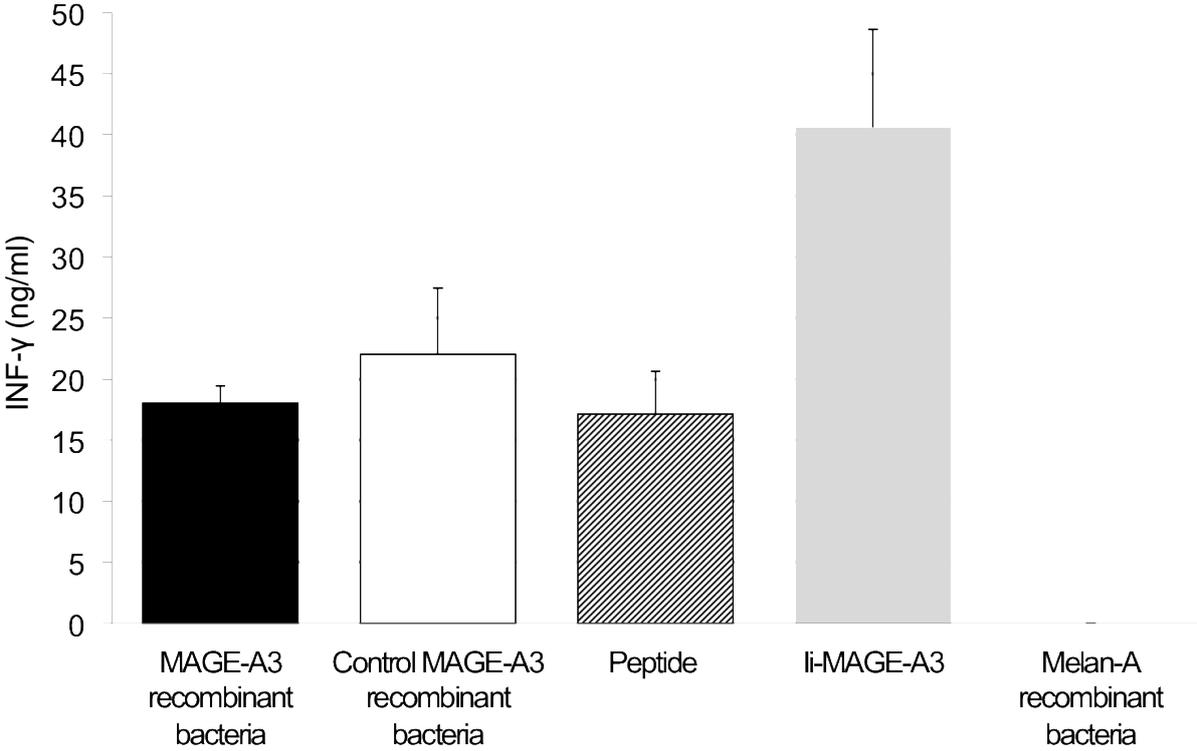
B



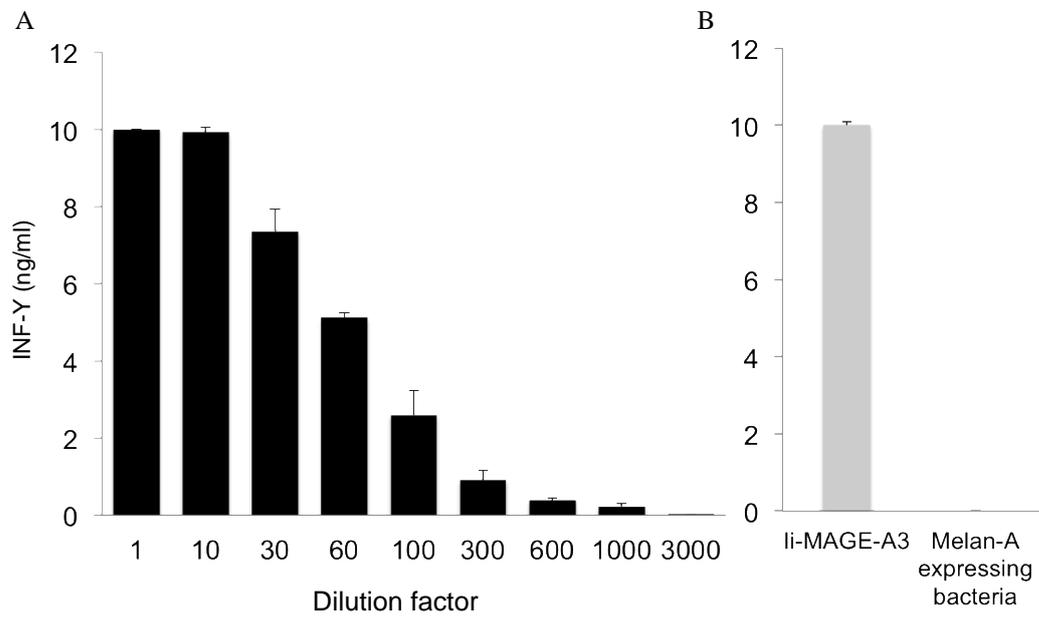
**Figure 3**



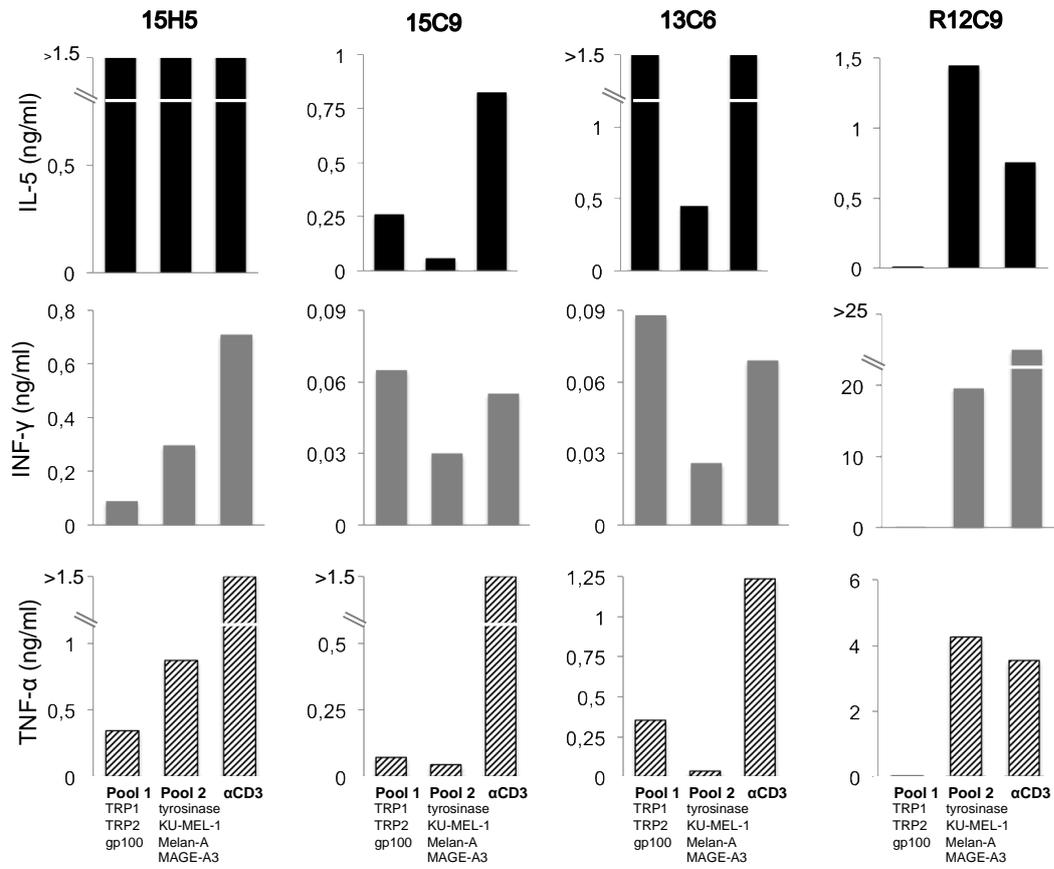
**Figure 4**



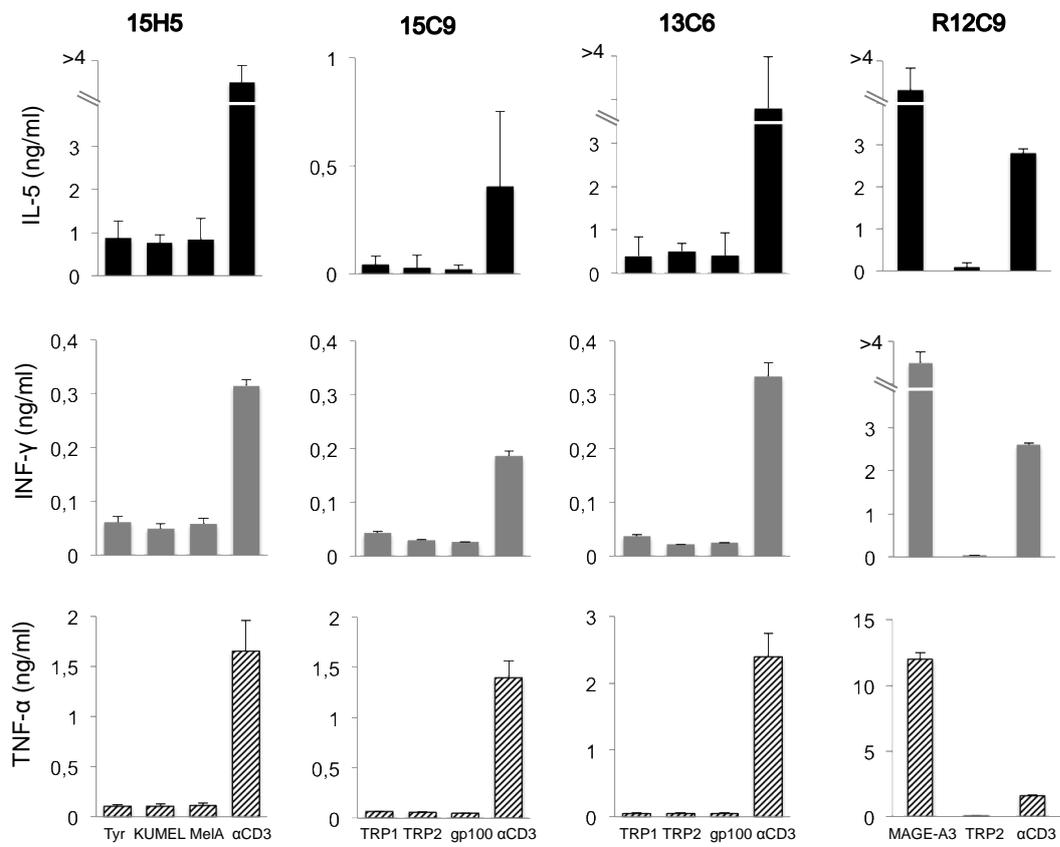
**Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**





---

## RESUME en Français

La maladie de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) est une maladie auto-immune touchant les yeux, les méninges et la peau. Les mélanocytes sont des cellules communes aux 4 organes cibles et sont considérés comme la source des auto-antigènes. L'objectif de ce travail est de déterminer la spécificité antigénique de lymphocytes T CD4 potentiellement auto-réactifs obtenus chez des patients VKH. Lors d'expériences préliminaires, nous n'avons pas réussi à isoler de lymphocytes auto-réactifs dans le sang de 2 patients. Dans le cas d'un troisième patient ayant une uvéoméningite non traitée, 107 clones de lymphocytes T dont 90% étaient CD4+, ont été isolés à partir du liquide cébrospinal. Chacun d'eux a été testé pour sa capacité à sécréter des cytokines après stimulation avec des cellules présentatrices d'antigènes autologues chargées avec l'une des protéines recombinantes mélanocytaires TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A ou KU-MEL-1. Aucun des clones de lymphocytes T n'a été capable de sécréter du TNF- $\alpha$ , de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-5, ou de l'IL-17. Neuf clones sécrétaient de l'IL-17 en réponse à une stimulation non spécifique. Contrairement aux données de la littérature, les clones de lymphocytes T CD4 issus du liquide cébrospinal d'un patient VKH ne reconnaissaient donc pas l'une des six protéines mélanocytaires, suggérant qu'un autre antigène pourrait être impliqué dans le déclenchement de la maladie de VKH.

---

**TITRE en Anglais:** Analysis of the antigens targeted by auto-reactive T cells in patients with a Vogt-Koyanagi-Harada disease

---

## RESUME en Anglais

Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) disease is an autoimmune disease affecting the eye, the meninges, the inner ear and the skin. The melanocytes are the cells common to the four affected tissues and are considered as the source of self-antigens. Our objective was to identify the antigens targeted by potentially autoreactive CD4 T lymphocytes obtained from VKH patients. In preliminary experiments, we failed to isolate self-reactive lymphocytes in the blood of two patients. For a third patient with an untreated uveomeningitis, we isolated 107 T cell clones from his cerebrospinal fluid. Each of the 107 T cell clones, among which ninety percent were CD4<sup>+</sup>, was tested for its ability to secrete cytokines upon contact with autologous presenting cells loaded with either of the following melanocytic proteins: TRP1, TRP2, tyrosinase, gp100, Melan-A or KU-MEL-1. None of the 107 T cell clones was able to specifically secrete TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5, or IL-17 upon contact with autologous B cells loaded with the above-mentioned melanocytic proteins. Nine clones were Th17, as they secreted IL-17 upon non-specific stimulation. Contrary to what would be implied from previous reports, activation of these CD4 T cell clones was not triggered by antigens derived from the six melanocytic proteins. This suggests that still undefined self-antigens are involved during the early phase of VKH disease.

---

**DISCIPLINE:** Biologie moléculaire

---

**MOTS-CLES:** Vogt-Koyanagi-Harada disease – Melanocyte proteins – Self-reactive antigen-specific T CD4 – Antigen specificity – Interleukin 17

---

## INTITULE ET ADRESSE DES LABORATOIRES:

Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels Branch, et de Duve Institute, Université Catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique.

UPRES EA3509. Laboratoire de recherche clinique et thérapeutique. Faculté Léonard de Vinci, Paris Nord 13.