



Déficits congénitaux de l'immunité cellulaire et thérapie cellulaire : l'apport de la thérapie cellulaire dans la prévention des complications survenant au décours des allogreffes de cellules souches hématopoïétiques

Danièle Bensoussan-Lejzerowicz

► To cite this version:

Danièle Bensoussan-Lejzerowicz. Déficits congénitaux de l'immunité cellulaire et thérapie cellulaire : l'apport de la thérapie cellulaire dans la prévention des complications survenant au décours des allogreffes de cellules souches hématopoïétiques. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2007. Français. NNT : 2007NAN11305 . tel-01747445

HAL Id: tel-01747445

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747445>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

ECOLE DOCTORALE “BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT”

2007

**DOCTORAT DE L’UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ NANCY I**

Discipline : **Bioingénierie**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ

**DEFICITS CONGENITAUX DE L’IMMUNITE CELLULAIRE
ET
THERAPIE CELLULAIRE :**

*L’apport de la Thérapie cellulaire dans la prévention des complications
survenant au décours des allogreffes de Cellules souches hématopoïétiques.*

Thèse dirigée par Monsieur le Professeur Jean François STOLTZ

Soutenue le 27 Juin 2007

Membres du Jury :

Professeur Jean François STOLTZ :	Directeur de Thèse
Docteur Anne DURANDY :	<i>Rapporteur</i>
Professeur Pierre ROHRlich :	<i>Rapporteur</i>
Professeur Marina CAVAZZANA-CALVO :	Juge
Professeur Pierre BORDIGONI :	Juge

REMERCIEMENTS

A mon Directeur de Thèse :

Monsieur le Professeur STOLTZ,

Pour son soutien indéfectible et ses encouragements constants. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude ainsi que ma profonde reconnaissance pour la confiance qu'il me témoigne au quotidien.

A mes juges :

Madame le Professeur CAVAZZANA-CALVO,

Pour m'avoir initiée à la Thérapie cellulaire il y a maintenant 10 ans et être restée toujours bienveillante à mon égard. Je la remercie d'avoir accepté sans hésiter d'être auprès de moi pour cette nouvelle étape. Qu'elle trouve dans ces quelques mots l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon amitié.

Monsieur le Professeur BORDIGONI,

Pour son enthousiasme communicatif, ses immenses connaissances qu'il aime à faire partager et son soutien constant à mon égard. Je lui suis profondément reconnaissante de m'avoir fait confiance lorsque j'étais interne et de m'avoir ainsi donné la chance d'évoluer professionnellement dans ces deux domaines passionnants et complémentaires que sont la Thérapie cellulaire et l'Immunologie cellulaire.

A mes rapporteurs :

Madame le Docteur DURANDY,

Je la remercie vivement d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Elle a guidé mes premiers pas en Immunologie et je lui suis reconnaissante d'être à mes côtés pour cette thèse. Je n'oublie pas que je lui dois beaucoup dans ma carrière sur Nancy et lui exprime ici ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur ROHRLICH,

Il m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail qu'il m'avait vivement encouragée à mener à bien, il y a quelques années. Cette conversation d'alors a porté ses fruits et je lui en suis sincèrement reconnaissante. Que ce travail puisse s'ouvrir sur une collaboration entre Besançon et Nancy.

A toute l'équipe de l'UTCT qui m'accompagne au quotidien...

*A Vincent, Françoise, Jacqueline et les autres...
Leurs encouragements ont eu raison de mes doutes !*

A mon mari

A mes enfants, Jérémie, Raphaël et Anaëlle

A ma mère

A la mémoire de mon père

TABLE DES MATIERES

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	8
LISTE DES ABREVIATIONS	16
LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX	18

INTRODUCTION	21
---------------------	-----------

Première partie : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	26
---	-----------

I- PRESENTATION DES TROIS SYNDROMES	28
--	-----------

I-1- Syndromes Hyper IgM ou Défauts de Commutation isotypique

<u>A- SYNDROME HYPER-IGM LIE A L'X (HIGM1)</u>	30
---	-----------

- *MUTATIONS*
- *CONSEQUENCES SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE*
- *CONSEQUENCES CLINIQUES*
-

<u>B- DEFICIT EN CD40 (HIGM3)</u>	33
--	-----------

<u>C- XHM-ED : DYSPLASIE ECTODERMALE ANHYDROTIQUE LIEE A L'X</u>	34
---	-----------

- *MUTATIONS*
- *CONSEQUENCES SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE*
- *CONSEQUENCES CLINIQUES*

<u>D- ELEMENTS BIOLOGIQUES CONTRIBUANT AU DIAGNOSTIC DES SYNDROMES</u>	
---	--

<u>HYPER-IgM</u>	38
-------------------------	-----------

- *RECHERCHE DE L'EXPRESSION DE PROTEINES MEMBRANAIRES PAR CYTOMETRIE EN FLUX.*
- *TEST IN VITRO DE LA CAPACITE DES LYMPHOCYTES B ACTIVES A PROLIFERER ET A PRODUIRE DES IgA, IgG OU IgE APRES STIMULATION PAR UN AGONISTE DU CD40 ET DES CYTOKINES APPROPRIEES*
- *PHENOTYPE DES LYMPHOCYTES B.*
- *AUTRES CARACTERISTIQUES.*

I-2- Le syndrome de Wiskott Aldrich	40
<i>I-2-1 <u>La protéine WASp</u></i>	40
<i>I-2-2 <u>Le gène WASP et les mutations</u></i>	43
<i>I-2-3 <u>Les effets des mutations du gène WASP sur la fonction cellulaire</u></i>	45
<i>I-2-4 <u>Les conséquences cliniques</u></i>	48
<u>1-2-4-1- Anomalies plaquettaires</u>	
<u>1-2-4-2- Eczéma</u>	
<u>1-2-4-3- Infections</u>	
<u>1-2-4-4- Le déficit Immunitaire</u>	
<u>1-2-4-5- Les manifestations auto-immunes</u>	
<u>1-2-4-6- Cancers</u>	
<i>I-2-5 <u>Eléments biologiques diagnostiques</u></i>	51
<u>1-2-5-1 Anomalies plaquettaires</u>	
<u>1-2-5-2 Le TTL au periodate</u>	
<u>1-2-5-3 La recherche de l'expression de la protéine WASP au sein des lymphocytes par la technique de cytométrie en flux</u>	
<u>1-2-5-4 L'étude de la mutation du gène WASP</u>	
I-3- Syndrome de DiGeorge et la délétion 22q11	54
<i>I-3-1 <u>Les mutations</u></i>	54
<i>I-3-2 <u>Les conséquences sur la Réponse Immunitaire</u></i>	55
<u>1-3-2-1 Rappel sur le rôle du thymus dans la maturation des lymphocytes T</u>	56
<u>1-3-2-2 Origine du déficit immunitaire dans le syndrome de DiGeorge</u>	56
<u>1-3-2-3 Caractéristiques du déficit immunitaire dans le DGS.</u>	57
<u>1-3-2-3-1 : Le déficit immunitaire cellulaire</u>	57
<u>A- Le cDGS</u>	57
<u>B- Le pDGS</u>	59
<u>Le nombre de lymphocytes T et leur fonction</u>	59
<u>Les lymphocytes T immatures et les TRECs</u>	61
<u>L'analyse de répertoire Vβ des récepteurs T</u>	62
<u>L'analyse de la longueur des Télomères</u>	63
<u>1-3-2-3-2 : Le déficit immunitaire humoral</u>	63
<u>A- Le cDGS</u>	64
<u>Les Immunoglobulines sériques</u>	64
<u>Les anticorps spécifiques</u>	64
<u>B- Le pDGS</u>	64
<u>Les Immunoglobulines sériques</u>	64
<u>Les anticorps spécifiques</u>	65

<i>I-3-3 Les conséquences cliniques</i>	65
<i>I-3-4 Les éléments biologiques diagnostiques contribuant à poser le diagnostic de cDGS</i>	67
<i>1-3-4-1 Mise en évidence de nouveaux émigrants thymiques</i>	67
<i>1-3-4-2 Analyse des sous populations T par cytométrie en flux</i>	67
<i>1-3-4-3 Tests de transformations lymphocytaires</i>	67
 II- APPROCHES THERAPEUTIQUES DE CES SYNDROMES PAR ALLOGREFFE DE CSH	 68
 II-1- Etat de la littérature sur la greffe de Cellules souches hématopoïétiques dans les Syndromes hyper IgM	 73
<i>II-1-1- Greffe de CSH</i>	73
<i>II-1-1-1 Allogreffes de Moelle osseuse avec conditionnement myéloablatif</i>	73
<i>II-1-1-2 Allogreffes avec conditionnement non myéloablatif</i>	75
<i>II-1-2- Greffe de CSH dans les Dysplasies ectodermales Anhydrotiques avec déficit immunitaire</i>	77
<i>II-1-3- Recommandations du groupe de travail sur les DI de l'EBMT.</i>	78
 II-2- Etat de la littérature sur la greffe de Cellules souches hématopoïétiques dans les Syndromes de Wiskott Aldrich	 81
<i>II-2-1- Greffe de CSH</i>	82
<i>II-2-2- Recommandations du groupe de travail sur les DI de l'EBMT.</i>	90
 II-3- Etat de la littérature sur la greffe de Cellules souches hématopoïétiques dans le Syndromes de DiGeorge	 92
 II-4- Conclusion sur les effets délétères des allogreffes dans ces indications spécifiques	 97

I- PREVENTION DES COMPLICATIONS INFECTIEUSES AU DECOURS DE L'ALLOGREFFE **99**

I-1- Prévention des syndromes lymphoprolifératifs EBV induits **99**

ARTICLE 1 :

Prevention of EBV-induced-B-lymphoproliferative disorder by *ex vivo* marrow B-cell depletion in HLA-phenoidential or non identical T-depleted bone marrow transplantation.

Bensoussan D.*, Cavazzana-Calvo M.*, Jabado N., Haddad E., Yvon E., Virion JM., Le Deist F., Fischer A.

British Journal of Haematology, 1998, 103 (2): 543-551.

102

* Co-auteurs

I-2- Complications d'une cryptosporidiose dans un contexte d'HIGM liée à l'X : apport de l'allogreffe de CSH **111**

ARTICLE 2:

111

Complete recovery from *Cryptosporidium Parvum* infection with Gastroenteritis and Sclerosing Cholangitis after successful Bone Marrow Transplantation in two brothers with X-linked Hyper-IgM Syndrome (HIGM1).

Bensoussan D.*, Dimicoli S*, Latger-Cannard V., Straczek J., Antunes L., Mainard L., Dao A., Barbe F., Araujo C., Clément L., Feugier P., Lecompte T., Stoltz JF., Bordigoni P.

Bone Marrow Transplantation, 2003, 32 (7): 733-737

114

* Co-auteurs

ARTICLE 3: Article collaboratif

118

Treatment of CD40 Ligand deficiency by haematopoietic stem cell transplantation: a survey of the European experience, 1993-2002.

Genery AR., Khawaja K., Veys P., Bredius RGM., Notarangelo LD., Mazzolari E., Fischer A., Landais P., Cavazzana-Calvo M., Friedrich W., Fasth A., Wulffraat NM., Matthes-Martin S., Bensoussan D., Bordigoni P., Lange A., Pagliuca A., Andolina M., Cant AJ., Davies EG.

Blood, 2004, 103: 1152 - 1157.

119

II- PREVENTION DE LA GVHD **125**

II-1- Déplétion T par sélection positive CD34+ dans le WAS **126**

II-2- Déplétion alloréactive **132**

ARTICLE 4 :

Improving immune reconstitution while preventing GVHD in allogeneic stem cell transplantation.

Cavazzana-Calvo M., André-Schmutz I., Hacein-Bey-Abina S., Bensoussan D., Le Deist F., Fisher A.

Seminars in Hematology, 2002, 39 : 32-40 134

II- SIMPLIFICATION DU PROTOCOLE DE GREFFE DANS LE CAS PARTICULIER DU SYNDROME DE DIGEORGE **143**

ARTICLE 5:

T cell immune constitution after peripheral blood mononuclear cell transplantation in complete DiGeorge syndrome.

Bensoussan D., Le Deist F., Latger-Cannard V., Grégoire MJ., Avinens O., Feugier P., Bourdon V., André-Botté C., Schmitt C., Jonveaux P., Eliaou JF., Stoltz JF., Bordigoni P.

British Journal of Haematology, 2002, 117: 899-906 146

ARTICLE 6:

PBMC transplantation in complete DiGeorge syndrome: an eight year update.

Daguindau N., Decot V., Picard C., Latger-Cannard V., Grégoire MJ., Nzietchueng R., Salmon A., Stoltz JF., Bordigoni P., Bensoussan D.

Soumis 154

Troisième partie : DISCUSSION

164

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

175

BIBLIOGRAPHIE

178

ANNEXES

193

ARTICLE 7:

Frequency of thrombocytopenia and large platelets correlate neither with conotruncal cardiac anomalies nor immunologic features in chromosome 22q11.2 deletion syndrome

Latger-Cannard V., Bensoussan D., Gregoire MJ., Marcon F., Cloez JL., Leheup B., Jonveaux P., Lecompte T., Bordigoni P.

European Journal of Pediatrics, 2004, 163:327-328.

194

DEUX ARTICLES COLLABORATIFS SUR UN AUTRE DEFICIT IMMUNITAIRE : LE WHIM Syndrome

203

ARTICLE 8:

The WHIM syndrome shows a peculiar dysgranulopoiesis myelokathexis

Latger-Cannard V., Bensoussan D., Bordigoni P.

British Journal of Haematology, 2006, 132 (5), 669

205

ARTICLE 9 :

WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12

Balabanian K., Lagane B., Pablos JL., Laurent L., Planchenault T., Verola O., Lebbe C., Kerob D., Dupuy A., Hermine O., Nicolas JF., Latger-Cannard V., Bensoussan D., Bordigoni P., Baleux F., Le Deist F., Virelizier JL., Aranzana-Seisdedos F., Bachelier F.

Blood, 2005, 105, 2449-2457

206

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

LISTE DES PUBLICATIONS RELATIVES AU MEMOIRE

PBMC transplantation in complete DiGeorge syndrome: an eight year update

Daguindau N., Decot V., Picard C., Latger-Cannard V., Grégoire MJ., Nzietchueng R., Salmon A., Stoltz JF., Bordigoni P., Bensoussan D.

Soumis

The WHIM syndrome shows a peculiar dysgranulopoiesis: myelokathexis.

Latger-Cannard V., Bensoussan D., Bordigoni P.

British Journal of Haematology. 2006 ;132(6):669.

WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12.

Balabanian K., Lagane B., Pablos JL., Laurent L., Planchenault T., Verola O., Lebbe C., Kerob D., Dupuy A., Hermine O., Nicolas JF., Latger-Cannard V., Bensoussan D., Bordigoni P., Baleux F., Le Deist F., Virelizier JL., Aranzana-Seisdedos F., Bachelerie F.

Blood. 2005 ;105(6):2449-57.

Treatment of CD40 ligand deficiency by hematopoietic stem cell transplantation: a survey of the European experience, 1993-2002.

Genery AR., Khawaja K., Veys P., Bredius RGM., Notarangelo LD., Mazzolari E., Fischer A., Landais P., Cavazzana-Calvo M., Friedrich W., Fasth A., Wulffraat NM., Matthes-Martin S., Bensoussan D., Bordigoni P., Lange A., Pagliuca A., Andolina M., Cant AJ., Davies EG.

Blood. 2004 ;103(3):1152-7.

Frequency of thrombocytopenia and large platelets correlates neither with conotruncal cardiac anomalies nor immunological features in the chromosome 22q11.2 deletion syndrome.

Latger-Cannard V., Bensoussan D., Gregoire MJ., Marcon F., Cloez JL., Leheup B., Jonveaux P., Lecompte T., Bordigoni P.

European Journal of Pediatrics. 2004;163(6):327-8.

Complete recovery from *Cryptosporidium Parvum* infection with Gastroenteritis and Sclerosing Cholangitis after successful Bone Marrow Transplantation in two brothers with X-linked Hyper-IgM Syndrome (HIGM1).

Bensoussan D.*, Dimicoli S*, Latger-Cannard V., Straczek J., Antunes L., Mainard L., Dao A., Barbe F., Araujo C., Clément L., Feugier P., Lecompte T., Stoltz JF., Bordigoni P.

Bone Marrow Transplantation, 2003, 32 (7):733-7.

T cell immune constitution after peripheral blood mononuclear cell transplantation in complete DiGeorge syndrome.

Bensoussan D., Le Deist F., Latger-Cannard V., Grégoire MJ., Avinens O., Feugier P., Bourdon V., André-Botté C., Schmitt C., Jonveaux P., Eliaou JF., Stoltz JF., Bordigoni P.

British Journal of Haematology, 2002, 117: 899-906

Improving immune reconstitution while preventing GVHD in allogeneic stem cell transplantation.

Cavazzana-Calvo M., André-Schmutz I., Hacein-Bey-Abina S., Bensoussan D., Le Deist F., Fisher A.

Seminars in Hematology, 2002, 39: 32-40

Prevention of EBV-induced-B-lymphoproliferative disorder by *ex vivo* marrow B-cell depletion in HLA-phenotypical or non identical T-depleted bone marrow transplantation.

Bensoussan D.*, Cavazzana-Calvo M.*, Jabado N., Haddad E., Yvon E., Virion JM., Le Deist F., Fischer A.

British Journal of Haematology, 1998, 103 (2) : 543-551.

AUTRES PUBLICATIONS

1- Human umbilical vein endothelial cells increase *ex vivo* expansion of human CD34(+) PBPC through IL-6 secretion.

Li N, Eljaafari A, Bensoussan D, Wang Y, Latger-Cannard V, Serrurier B, Boura C, Kennel A, Stoltz J, Feugier P.

Cytotherapy. 2006;8(4):335-42.

2- Mechanobiology and cartilage engineering: the underlying pathophysiological phenomena.

Stoltz JF, de Isla N, Huselstein C, Bensoussan D, Muller S, Decot V.

Biorheology. 2006;43(3-4):171-80. Review.

3- Cell and tissue engineering and clinical applications: an overview

Stoltz JF, Bensoussan D, Decot V, Ciree A, Netter P, Gillet P.

Biomed Mater Eng. 2006;16(4 Suppl):S3-S18. Review

4- Osteopetrotic mouse stroma with thrombopoietin, c-kit ligand, and flk-2 ligand supports long-term mobilized CD34+ hematopoiesis in vitro.

Feugier P, Li N, Jo DY, Shieh JH, MacKenzie KL, Lesesve JF, Latger-Cannard V, Bensoussan D, Crystal RG, Rafii S, Stoltz JF, Moore MA.

Stem Cells Dev. 2005;14(5):505-16.

5- Autologous cell based therapy for treating chronic infarct myocardium

Tran N, Marie PY, Nloga J, Mascali F, Franken P, Lahoutte T, Li Y, Antunes L, El Jaafari A, Bensoussan D, Stoltz JF, Villemot JP.

Clin Hemorheol Microcirc. 2005;33(3):263-8. Review

6- Hematological recovery after autologous stem cell transplantation : importance of post-thaw parameters.

Bensoussan D, Feugier P, Girard F, Alla F, Schuhmacher A, Latger V, Witz F, Carret AS, Lederlin P, Bordigoni P, Janot C.

Transfusion, 2003, 43 :878-84.

7- Rheological properties of healthy and atherosclerotic human arteries

Blondel WC, Lehalle B, Lercher MN, Dumas D, Bensoussan D, Stoltz JF.

Biorheology. 2003;40(1-3):369-76.

8- Spatial distribution of the beta2 integrin (CD11b/CD18) and L-selectin (CD62L) adherence receptors on human neutrophils by Conventional Optical Scanning Microscopy (COSM).

Latger-Cannard V, Dumas D, Bensoussan D, Stoltz JF.

Biorheology. 2003;40:167-72.

9- In vitro study of intracellular IL-1beta production and beta1 integrins expression in stimulated chondrocytes--effect of rhein.

Gigant-Huselstein C, Dumas D, Payan E, Muller S, Bensoussan D, Netter P, Stoltz JF.

Biorheology. 2002;39(1-2):277-85.

10- Quantitative expression of adhesion molecules on CD34+ cells.

Gigant C, Latger-Cannard V, Bensoussan D, Dumas D, Feugier P, Bordigoni P, Stoltz JF.

Journal of Hematotherapy and Stem cell research, 2001, 10 : 807-814

11- Expression quantitative des recepteurs d'adhérence VLA-4, VLA-5, L-Sélectine, MAC-1 et ICAM-1 à la surface des cellules CD34+ : étude de leur fonctionnalité au cours de la greffe de cellules souches.

Gigant C, Latger-Cannard V, Bensoussan D, Dumas D, Feugier P, Bordigoni P, Stoltz JF.
Transfusion Clinique et Biologique, 2001, 8 : 453-459

12- Plenary lecture. New trends in vascular engineering.

Stoltz JF, Blondel W, Bensoussan D, Lehalle B, Wang X, Labrador V.
Clin Hemorheol Microcirc. 2001;24:263-72.

13- Introduction à l'Ingénierie Vasculaire

Stoltz JF, Lehalle B, Blondel W.C.P., Bensoussan D, Paulus F
Journal des Maladies Vasculaires, 2001, 26 (3) : 183-190.

14- Coexpression of CD40 and class II antigen HLA-DR in Graves' disease thyroid epithelial cells.

Faure G, Bensoussan-Lejzerowicz D, Bene MC, Aubert V and J. Leclere.
Clinical Immunology and Immunopathology, 1997, 84 : 212-215.

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

Communications Orales :

7^{ème} réunion annuelle de la Société Française de chirurgie orthopédique et traumatologique

06-09-Novembre 2001

La greffe de Moelle osseuse dans le traitement des pseudarthroses des os longs

F Pfeffer, S. Trétou, D. Bensoussan, R. Traversari, L. Galois, D. Mainard, J.P. Delagoutte

Compte rendu : *Revue de Chirurgie Orthopédique*, 2001.

11th european conference on clinical Hemorheology.

20 – 22 Septembre 2000, Rouen, France.

Quantitative expression of adhesion molecules on CD34+ cells

C. Gigant, V. Latger-Cannard, D. Bensoussan, D. Dumas, P. Feugier, P. Bordigoni, JF. Stoltz

New trends in blood vessels engineering

JF. Stoltz, D. Bensoussan, W. Blondel, B. Lehalle.

Leukocyte adhesion and activation

M. R. Boisseau, P. Nguyen, V. Latger-cannard, D. Dumas, D. Bensoussan, G. Potron, JF. Stoltz
Compte rendu : *Journal des Maladies Vasculaires*, 200, 25, 151

Posters :

8ème Congrès de la Société Française de Greffe de Moelle.

17-20 Octobre 2006, Besançon, France

Reconstitution immunitaire vis-à-vis de l'*Aspergillus fumigatus* après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Bensoussan D., Clement L., Salmon A., Namour F., Machouart M., Latger Cannard V., Decot V., Daguindau N., Andre Botté C., Roederer T., Fortier B., Guéant JL., Lecompte T., Stoltz JF, Bordigoni P.

Congrès de la Société Française de Bioingenierie tissulaire et cellulaire (SFBCT)

19-21 Septembre 2005, St MALO, France

Quantification du diméthylsulfoxyde résiduel après lavage des greffons cellulaires et tissulaires.

V. Decot, P. Houzé, O. Agulles, J-F Stoltz et D. Bensoussan.

XIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies

17-20 Octobre 2004, Versaille, France

Ataxia telangiectasia: Radiosensitivity testing as a help for diagnosis : report of a single center experience.

D. Bensoussan, A. Campidelli, L. Mansuy, A. Salmon, L. Clément, C. Schmit, JF. Stoltz, P. Bordigoni.

Vème Congrès National d'Hémovigilance et de Sécurité Transfusionnelle

12-14 Décembre 2002, Toulouse, France

Allo-immunisation anti-erythrocytaire après allogreffe osseuse

D. Maurière, JP Aymard, C. Cuny, D. Bensoussan, V. Huot-Maire, X. Tinard.

6ème Congrès de la Société Française de Greffe de Moelle.

22-25 Octobre 2002, Vichy, France

Successful bone marrow transplantation in two brothers with hyper IgM syndrome1 (HIGM1)

S. Dimicoli, D. Bensoussan, C Araujo, V. Latger-Cannard, J. Straczek, F. Le Deist, L. Clément, P. Feugier, T. Lecompte, JF Stoltz, P Bordigoni.

Suivi du chimérisme sur sous populations séparées après DLI : à propos d'un cas

D. Bensoussan, MJ Grégoire, L. Clément S. Dimicoli, V. Dorveaux, S. Visanica, P. Feugier, V. Latger-Cannard, C. Andre Botte, P. Jonveaux, JF Stoltz, P Bordigoni.

Xth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies

17-20 Octobre 2002, Weimar, Allemagne

Successful bone marrow transplantation in two brothers with hyper IgM syndrome1 (HIGM1)

S. Dimicoli, D. Bensoussan, C Araujo, V. Latger-Cannard, J. Straczek, F. Le Deist, L. Clément, P. Feugier, T. Lecompte, JF Stoltz, P Bordigoni.

Congrès de la Société Française d'Hématologie

17-19 Mars 2002, Paris, France

Allogreffe de Sang placentaire : expérience monocentrique

D. Bensoussan, L. Clément, V. Latger-Cannard, MJ Grégoire, P. Feugier, C. André-Botté, JF Stoltz, P Bordigoni.

Compte rendu : *Revue Hématologie*, 2002.

Colloque EUROMECH n° 420 : Mechanobiology of cells and tissues

24-26 Avril 2001, Nancy, France

Is the CD34+ cells homing like the multistep cascade adhesion of leukocyte?

Gigant C, Latger-Cannard V, Bensoussan D, Feugier P, Bordigoni P, Stoltz JF.

Detection and spatial distribution of the α_2 integrin (CD11b/CD18) and L-selectin (CD62L) adherence receptors on human neutrophils by Conventional Optical Scanning Microscopy (COSM)

Latger-Cannard V, Dumas D, Bensoussan D, Stoltz JF.

IXth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies

5 - 8 Novembre 2000, Genève, Suisse

Peripheral Blood Mononuclear cells transplantation in complete DiGeorge Syndrome

D. Bensoussan, V. Latger-Cannard, MJ Grégoire, P. Feugier, C. André-Botté, As Carret, JF Stoltz, P Bordigoni.

American Society of Haematology- 42 th Annual Meeting

5 - 9 Décembre 2000, San Francisco, USA.

Peripheral Blood Mononuclear cells transplantation in complete DiGeorge Syndrome

D. Bensoussan, V. Latger-Cannard, MJ Grégoire, P. Feugier, C. André-Botté, As Carret, JF Stoltz, P Bordigoni.

Compte rendu : *Blood*, 2000, 96, abstract 3810

Société Française d'Hématologie

Mars 2000, Paris, France.

Quantification de l'expression des récepteurs d'adhérence à la surface des cellules CD34+ provenant de sang périphérique, de moelle osseuse et de sang de cordon. Application à l'autogreffe dans le myélome.

C. Gigant, V. Latger-Cannard, D. Bensoussan, D. Dumas, P. Feugier, P. Bordigoni, JF. Stoltz

Compte rendu : *Revue Hématologie*, 2000

Congrès de L'Association Française de Cytométrie.

12 - 15 Octobre 1999, Paris, France.

Quantification of adhesion molecules on hematopoietic CD34+ cells

C. Gigant, V. Latger-Cannard, D. Bensoussan, D. Dumas, P. Feugier, JF. Stoltz

Compte rendu : *Analytical Cellular Pathology*, 1999,18,141

4ème Congrès de la Société Française de Greffe de Moelle.

13 - 14 Octobre 1998, Nancy, France.

Production de cellules dendritiques à partir de cellules CD 34+ : Incubation avec la souche EBV B95-8.

D. Bensoussan, J. Champigneulle, V. Latger, B. Serrurier, C. Janot.

Compte rendu : *Haematology and Cell Therapy*, 1998, 40 (5) : 206. Abstract 40.

Autogreffe de Cellules Souches Sanguines : Importance du contrôle de qualité réalisé sur les produits décongelés avant réinjection.

P. Feugier, A. Schuhmacher, F. Alla, D. Bensoussan, AS. Carret, C. Loigerot, B. Serrurier, B. Witz, F. Witz, P. Lederlin, P. Bordigoni, C. Janot.

Compte rendu : *Haematology and Cell Therapy*, 1998, 40 (5) : 210. Abstract 51.

Etude de la corrélation entre la richesse en progéniteurs des Mégacaryocytes (CFU-Mk) dans le greffon et la reconstitution plaquettaire.

D. Bensoussan, P. Feugier, C. Loigerot, B. Serrurier, B. Witz, F. Witz, P. Lederlin, C. Janot.

Compte rendu : *Haematology and Cell Therapy*, 1998, 40 (5) : 210. Abstract 52.

American Society of Haematology- 39 th Annual Meeting

5 - 9 Décembre 1997, San Diego, USA.

Ex vivo B and T cell depletion of partially compatible marrow graft.

D. Bensoussan, M. Cavazzana-Calvo, M. Moskwa, E. Yvon, A. Fischer.

Compte rendu : *Blood*, 1997, 90 : supplement 1. Abstract 2416.

ISHAGE - 3rd International Meeting.
31 Mai - 03 Juin 1997, Bordeaux, France.

Ex vivo B and T cell depletion of partially compatible marrow graft.

D. Bensoussan, M. Cavazzana-Calvo, M. Moskwa, E. Yvon, A. Fischer.

8èmes Journées de l'Internat en Pharmacie et Salon du Laboratoire.

24 - 27 Mars 1997, Paris, France.

Greffes de Moelle Osseuse HLA partiellement incompatible et Phénoïdétique: *Prévention des Syndromes lymphoprolifératifs induits par le virus d'Epstein Barr par déplétion ex vivo du greffon en lymphocytes B.*

D. Bensoussan, M. Cavazzana-Calvo, M. Moskwa, E. Yvon, N. Jabado, E. Haddad, A. Fischer.

1er prix du Poster.

American Society of Haematology- 38 th Annual Meeting.

4 - 8 Décembre 1996, Orlando, USA.

Ex vivo B and T cell depletion.

M. Cavazzana-Calvo, N. Jabado, E. Haddad, D. Bensoussan, M. Moskwa, E. Yvon, A. Fischer.

Compte rendu : *Blood*, 1996, 88 : supplement 1. Abstract 1668.

Journées de l'APHIF 1993.

Evaluation du coût fixe de fabrication d'une préparation en unité centralisée de reconstitution des cytostatiques.

D. Bensoussan, I. Lopez, O. Conort, C. Guérin, G. Hazebroucq.

Journées de l'AP-HP 1993

Evaluation de l'Intérêt d'un système centralisé de reconstitution et de dispensation des médicaments cytostatiques.

I. Lopez, P. Ravaud, D. Bensoussan, B. Amor, G. Hazebroucq

Congrès EURO-IMMUNOANALYSE 92.

Novembre 1992, Lyon, France.

Validation du dosage du cortisol sur le VIDAS^R (Bio Mérieux)

D. Bensoussan, J. Guéchet, J. Giboudeau.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADV :	Adénovirus
AD-EAD :	Dysplasie ectodermale anhydrotique de transmission autosomale dominante
AID :	activation-induced cytidine deaminase
APE :	Endonucléase apyrimidique
BSA :	Bovine serum albumin
BLPD :	Syndrome lymphoprolifératif induit par l'EBV
cDGS :	Syndrome de DiGeorge complet
CD40L :	CD40 Ligand
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CML :	Culture Mixte Lymphocytaire.
CMN :	Cellules Mononucléées
CMV :	Cytomégalovirus
CNT :	Cellules nucléées totales
CSH :	Cellules souches hématopoïétiques
CSP :	Cellules souches périphériques
DI :	Déficit Immunitaire Héritaire
DVMO :	Donneurs volontaires de moelle osseuse
EBMT :	European Bone Marrow Transplantation
EBV :	Virus d'Epstein Barr
ESID :	European Society of Immunodeficiency
G-CSF :	Granulocyte Growth factor
GVHD :	Graft versus Host Disease (Réaction du greffon contre l'hôte)
GVL :	Graft versus Leukemia (Réaction du greffon contre la leucémie)
GVT :	Graft versus Tumor (Réaction du greffon contre la tumeur)
HIGM :	Syndrome Hyper-IgM
HLA :	Human Leucocyte Antigen
ID :	Déficit immunitaire
I- κ B :	Inhibiteur de NF- κ B
IKK γ :	NEMO (modulateur essentiel du NF- κ B)
IVIG :	Immunoglobulines intra-veineuses
MA :	Conditionnement myéloablatif
MO :	Moelle Osseuse

MSC : Mésenchymal Stem Cells (Cellules souches Mésenchymateuses)
 NEMO : modulateur essentiel du NF- κ B
 NF- κ B : Nuclear Factor κ B
 NHEJ : Non homologous End-joining
 NMA : Conditionnement non myéloablatif
 PCR : Polymerase chain reaction
 pDGS : Syndrome de DiGeorge partiel
 PHA : Phytohémagglutinine
 PKC θ : Protéine Kinase C θ
 SAL : Sérum anti-lymphocytaire
 SCID : Severe Combined Immunodeficiency (Déficit Immunitaire Combiné Sévère)
 TcR : Récepteur des lymphocytes T
 TGF β : Transforming Growth Factor β
 TNF α : Tumor necrosis factor α
 TLR : Toll Like Receptor
 TRAF6 : TNF receptor-associated with factor 6
 TREC : T-cell receptor rearrangement excision circles
 Treg : Lymphocytes T régulateurs
 UNG : Uracyle N glycosylase
 VCFS : Syndrome velocardiofacial
 XHM-ED :Dysplasie ectodermale anhydrotique liée à l'X
 WAS : Wiskott Aldrich Syndrome
 WASp : Protéine WAS
 XLT : X Linked Thrombocytopenia

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1 : Représentation schématique de l'interaction CD40L-CD40 et de ses effets sur la maturation de la réponse immunitaire humorale (d'après Notarangelo *et al*, 2006)

Figure 2 : Représentation schématique du gène du CD40L et des mutations identifiées chez les patients européens atteints d'un syndrome hyper IgM lié à l'X (d'après Notarangelo *et al*, 2006)

Figure 3 : Représentation schématique du gène du CD40 et des mutations identifiées chez les patients européens atteints d'un déficit en CD40 (d'après Notarangelo *et al*, 2006)

Figure 4 : Représentation schématique du gène de NEMO et des mutations identifiées chez les patients atteints d'un XHM-ED de par le monde (d'après Ku *et al*, 2005). La région codante s'étend de l'exon 2 à l'exon 10, avec 4 domaines principaux : domaines CC1 et CC2, domaine Leucine Zipper (LZ) et domaine en doigt de zinc (ZF).

Figure 5 : Mécanismes de régulation de WASp

A : Schéma de WASp sous sa forme auto-inhibée

B : Régulation de WASp

(d'après Burns *et al*, 2004)

Figure 6 : Représentation schématique du gène WASP qui code pour une protéine de 12 exons composée de 5 domaines principaux. Mutations identifiées chez 270 familles WAS. Les mutations faux sens sont principalement localisées dans les exons 1 à 4. Délétions, insertions et mutations non sens sont réparties sur toute la longueur du gène. Les mutations au niveau des sites d'épissage sont principalement retrouvées dans les introns 6, 8, 9 et 10. Av Dec : Avec décalage du cadre de lecture, Ss Dec : sans décalage du cadre de lecture.(d'après Ochs *et al*, 2006)

Figure 7: Défauts migratoires des lignées déficientes en WASp (d'après Burns *et al*, 2004)

Figure 8: Analyse par Cytométrie en Flux de l'expression de la protéine WASp dans les lymphocytes du sang périphérique après perméabilisation.

Utilisation d'un anticorps polyclonal 503 de lapin puis d'un second anticorps anti-lapin. Le premier graphe montre une expression normale de WASp dans les cellules d'un témoin normal. Le second montre une absence d'expression de WASp dans le cas d'une délétion avec décalage du cadre de lecture et arrêt prématuré de la transcription. Le troisième montre une expression diminuée de WASp dans le cas d'une mutation faux sens. (d'après Ochs *et al*, 2006).

Figure 9: Déclin des lymphocytes T CD3+ avec l'âge chez les patients et les contrôles. Le nombre de lymphocytes T CD3+ est plus faible chez les patients, quelque soit l'âge mais ont une vitesse de déclin plus lente que chez les contrôles.(d'après Piliero *et al*, 2004)

Figure 10: Expression des CD45RO et CD45RA au sein des lymphocytes T CD4+ chez les patients et les contrôles. L'accumulation de cellules CD45RO est considérablement accélérée chez les patients (A) par rapport aux contrôles (B) (d'après Piliero *et al*, 2004)

Figure 11: Evolution en fonction de l'âge des IgG, IgA et IgM. Les valeurs normales par âge plus ou moins 2 DS sont représentées par les lignes (d'après Sedivà *et al*, 2005)

Figure 12: Courbes de survie de Kaplan Meier en fonction du traitement administré. Proportion de patients survivant par année d'âge. La survie du groupe « Splénectomie seule » est significativement plus élevée que celle du groupe « Pas de splénectomie, Pas d'allogreffe » ($p < 0.0001$) et que la survie du groupe « Allogreffe de MO phénoïdétique » ($p=0.0111$). La survie du groupe « Allogreffe de MO génoidentique » est significativement plus élevée qu celle du groupe « Allogreffe de MO phénoïdétique » ($p < 0.0005$) et que celle du groupe « Splénectomie seule » ($p=0.0268$). (d'après Mullen *et al*, 1993)

Figure 13: Probabilité de survie de 170 patients ayant reçu une allogreffe de MO pour un syndrome de Wiskott Aldrich par type de donneur et par age. Il n'y a pas de différence significativement entre le taux de survie des patients allogreffés en situation génoidentique et celui des enfants de moins de 5 ans allogreffés en situation phénoïdétique. Un taux de survie significativement plus faible est retrouvé dans le groupe « donneur haploïdétique » et dans le groupe « donneur phénoïdétique-patients >5ans » (d'après Filipovitch *et al*, 2001)

Tableau 1 : Manifestations cliniques pouvant être retrouvées chez les patients atteints du syndrome de la délétion 22q11.2 (d'après Sullivan, 2004)

Tableau 2 : Causes de décès après allogreffe de MO pour syndrome de Wiskott Aldrich (d'après Filipovitch *et al*, 2001)

Tableau 3 : Tableau de synthèse des principales expériences d'allogreffes dans le déficit en CD40L publiées depuis 1993

n : Nombre. *Géno* : Génoidentique. *Phéno* : Phénoidentique. *MA* : Conditionnement myéloablatif. *NMA* : Conditionnement non myéloablatif. *Bu* : Busulfan. *Cy* : Cyclophosphamide. *SAL* : Sérum anti-lymphocytaire. *Thio* : Thiotépa. *ICT* : Irradiation corporelle totale. *Fluda* : Fludarabine. *Mel* : Melphalan. *CSA* : Ciclosporine. *MTX* : Méthotrexate. *MMF* : Mycophénolate Mofetil. *Cortic.* : corticoïdes. *MO* : Moelle osseuse. *CSP* : Cellules souches périphériques. *D* : Donneur. *R* : Receveur. *CMV* : Cytomegalovirus.

Tableau 4 : Tableau de synthèses des principales expériences d'allogreffes dans le WAS publiées depuis 1991

Géno : Génoidentique. *Phéno* : Phénoidentique. *Haplo* : Haploidentique. *MA* : Conditionnement myéloablatif. *NMA* : Conditionnement non myéloablatif. *Bu* : Busulfan. *Cy* : Cyclophosphamide. *SAL* : Sérum anti-lymphocytaire. *Thio* : Thiotépa. *ICT* : Irradiation corporelle totale. *Fluda* : Fludarabine. *CSA* : Ciclosporine. *MTX* : Méthotrexate. *MO* : Moelle osseuse. *CSP* : Cellules souches périphériques. *CB* : Sang placentaire. *Infections vir* : Infections virales. *Hémorr cerebr* : Hémorragie cérébrale.

Tableau 5 : Tableau de synthèse des principales expériences d'allogreffes dans le cDGS publiées depuis 1987

n : Nombre. *Géno* : Génoidentique. *Phéno* : Phénoidentique. *Cy* : Cyclophosphamide. *SAL* : Sérum anti-lymphocytaire. *Bu* : Busulfan. *Cy* : Cyclophosphamide. *CSA* : Ciclosporine. *MTX* : Méthotrexate. *MMF* : Mycophénolate Mofetil. *MO* : Moelle osseuse. *PBMNC* : Cellules mononucléées sanguines. *CB* : Sang placentaire. *D* : Donneur. *R* : Receveur. *CMV* : Cytomegalovirus.

INTRODUCTION

Les déficits immunitaires regroupent des pathologies héréditaires caractérisées par un dysfonctionnement ou une absence de réponse immunitaire. Les bases moléculaires et génétiques de plus de 100 déficits immunitaires héréditaires différents ont été découvertes au cours de la dernière décennie permettant d'une part une meilleure connaissance du fonctionnement du système immunitaire et d'autre part de proposer un conseil génétique et un diagnostic pré-natal. Les déficits immunitaires héréditaires évoluent généralement vers des complications létales. Le seul traitement curatif existant à ce jour pour les déficits immunitaires héréditaires les plus graves est l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

La première allogreffe de CSH pour un déficit immunitaire héréditaire (Déficit Immunitaire Combiné Sévère : SCID) a été réalisée en 1968 : il s'agissait d'une allogreffe de moelle osseuse à partir d'un donneur intra familial génoidentique du point de vue des antigènes d'histocompatibilité (HLA). Dans les premières années, seuls les patients possédant un donneur intra familial HLA génoidentique pouvaient bénéficier de ce traitement. A partir de 1981, l'introduction de la déplétion en lymphocytes T du greffon prévenant efficacement la survenue de la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) a permis de proposer la greffe de CSH à partir de donneurs intra-familiaux HLA partiellement identiques (haploidentiques). Enfin, l'inscription d'un plus grand nombre de donneurs volontaires sur les fichiers a conduit à réaliser beaucoup plus de greffes en situation HLA phénoïdentique. Une étude a été publiée par l'équipe du Pr. Fischer en 2003, reprenant l'ensemble des allogreffes réalisées dans les déficits immunitaires entre 1968 et 1999, recensées sur le registre européen des allogreffes dans les Déficiets Immunitaires (Antoine *et al*, 2003). Cette étude reprend 1082 greffes réalisées chez 919 patients (566 chez 475 patients SCID et 512 chez 444 patients atteints de déficits immunitaires autres que SCID). Nous ne rapporterons ici que les conclusions concernant les patients atteints de déficits immunitaires autres que SCID, puisque seuls ceux-ci peuvent être pris en charge sur Nancy. L'étude montre que les allogreffes en situation HLA phénoïdentique donnent des résultats au moins aussi satisfaisants que les allogreffes génoidentiques. En revanche, la survie après allogreffe haploidentique est significativement plus faible. La recherche d'un donneur non apparenté doit donc être privilégiée par rapport à une greffe haploidentique. De plus, les résultats des allogreffes haploidentiques ne se sont pas améliorés au cours du temps. Enfin, aucun rejet tardif associé à une rechute de la maladie n'est survenu, après un suivi d'au moins 20 ans.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à trois grands syndromes associant des déficits de l'immunité cellulaire à d'autres manifestations : le syndrome Hyper IgM, le syndrome de Wiskott Aldrich et le syndrome de DiGeorge.

En effet, le service du Pr Bordigoni est spécialisé dans la prise en charge de déficits immunitaires héréditaires (DI) autres que SCID. A ce jour, ce service a la volonté de devenir Centre de référence régional des déficits immunitaires, ce qui aurait pour conséquence que tous les patients de la région Est, suspects de déficit immunitaire, soient adressés au Centre de Référence de Nancy. Parallèlement, le Pr. Bordigoni dirige l'Unité de Transplantation Médullaire et de Thérapie Cellulaire qui se situe dans les 5 premiers centres d'allogreffes français. En effet, le nombre d'allogreffes de CSH toutes indications confondues (hémopathies malignes et déficits immunitaires) réalisées au CHU de Nancy s'est considérablement accru au cours des 10 dernières années. Il est passé d'une vingtaine à plus de 40 allogreffes en 2006. Cette évolution correspond à un accroissement des indications des allogreffes de CSH notamment du fait de l'avènement des conditionnements non myéloablatifs mais également à un recrutement extra-régional des patients, et parfois international (Maroc, Algérie, Europe de l'Est).

Parallèlement à cette évolution clinique, l'activité de l'Unité de Thérapie Cellulaire et de Tissus (UTCT) a également évolué. De plus, la législation s'est précisée avec la publication fin 1998 de la première version des Bonnes Pratiques de Thérapie Cellulaire. Ce référentiel a permis aux différentes unités de Thérapie cellulaire de mesurer les efforts à fournir pour répondre aux exigences de la loi. Le CHU de Nancy a fait le choix stratégique de développer cette activité en promouvant la construction de nouveaux locaux conformes aux textes de loi. L'activité de Thérapie cellulaire de l'UTCT, qui avait été autorisée par l'AFSSaPS en 2004, a été intégrée dans les nouveaux locaux à partir de Septembre 2005 et l'AFSSaPS a renouvelé l'autorisation de production en Thérapie cellulaire dans ces nouveaux locaux en Juillet 2006. De plus, nous avons développé au sein de l'UTCT, un laboratoire d'Immunologie cellulaire qui réalise des tests fonctionnels mais également des tests spécifiques à chaque déficit immunitaire afin d'apporter une aide contributive au diagnostic des Déficiets immunitaires.

Etant données les activités réalisées au sein de l'UTCT, nous avons eu l'opportunité de contribuer au diagnostic et au traitement de patients présentant des déficits immunitaires héréditaires. Certains de ces cas ont fait l'objet de publications.

Ce travail s'attache, à travers trois modèles de déficits immunitaires héréditaires différents, à montrer que la modification et l'adaptation des protocoles d'allogreffe aux caractéristiques propres à chaque DI, permet de prévenir les complications survenant au décours des greffes de cellules hématopoïétiques allogéniques.

Nous nous sommes, dans un premier temps, intéressés aux complications infectieuses survenant après allogreffes de CSH et plus particulièrement en situation partiellement

incompatible (phénoïdétique ou haploïdétique). Nous avons tout d'abord travaillé sur le modèle du syndrome lymphoprolifératif induit par le virus d'Epstein Barr (EBV). En effet, dans la majorité des cas, les lymphomes EBV qui surviennent après greffe de CSH sont d'origine du donneur. Or l'EBV a la particularité de rester quiescent dans les lymphocytes B. Nous avons donc proposé de réaliser une déplétion en lymphocytes B du greffon afin de prévenir cette complication chez les patients atteints de Déficit Immunitaire.

Puis, nous avons travaillé sur un modèle différent : celui de la cryptosporidiose chez les patients atteints d'HIGM liée à l'X (ou HIGM I). Dans ce contexte, cette infection engendre des complications de type cholangite sclérosante pouvant évoluer vers une insuffisance hépatique grave. Nous avons pu montrer que la mise en œuvre d'une allogreffe de CSH avant toute aggravation de la cryptosporidiose permettait de corriger le déficit immunitaire et surtout de guérir l'infection à *Cryptosporidium parvum*. Nous avons participé à un travail collaboratif européen qui a été à l'origine de l'écriture de recommandations sur les allogreffes de CSH dans les HIGM I.

Nous nous sommes intéressés dans un second temps à une autre complication des allogreffes de CSH : la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD). Cette complication est d'autant plus importante que les incompatibilités HLA entre donneur et receveur sont élevées. La stratégie couramment utilisée pour prévenir cette complication dans des cas d'incompatibilité HLA importante est la déplétion en lymphocytes T du greffon, actuellement obtenue par sélection positive CD34+. Nous illustrerons cet effet de prévention de GVHD à travers un cas de greffe de CSH CD34+ chez un patient atteint du syndrome de Wiskott Aldrich (WAS). Nous verrons grâce à ce modèle les limites de cette technique de sélection positive CD34. Nous présenterons ensuite une nouvelle approche de Thérapie cellulaire ayant pour objectif de préserver le capital en lymphocytes T du greffon en s'affranchissant de l'effet allo-réactif responsable de la GVHD.

Enfin, nous nous sommes intéressés au modèle particulier du Syndrome de DiGeorge (DGS), et à la possibilité de n'administrer que les cellules d'intérêt chez les patients atteints d'un syndrome de DiGeorge complet (cDGS). En effet, dans cette pathologie, il a été montré que seuls les lymphocytes T après allogreffe présentaient un chimérisme majoritairement donneur, les autres lignées cellulaires étant d'origine receveur. De plus ces lymphocytes T ne provenaient pas d'une différenciation à partir des CSH injectées mais d'une expansion des lymphocytes T présents dans le greffon. Nous avons rapporté comment il a été possible de réaliser une greffe de cellules mononucléées du sang périphérique sans effet secondaire, en s'affranchissant du

conditionnement. La simplification de ce protocole d'allogreffe présente l'avantage de pouvoir envisager de réaliser d'autres injections de cellules mononucléées du donneur en cas d'épuisement des lymphocytes T.

**Première partie :
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

Nous allons nous intéresser tout d'abord aux développements récents concernant trois grands syndromes associant des déficits de l'Immunité cellulaire à d'autres manifestations. Selon la cause de ces syndromes, le seul traitement curatif du Déficit Immunitaire à ce jour est la greffe de cellules allogéniques. Ces trois grands syndromes sont :

- les Syndromes Hyper IgM appelés plus récemment les Défauts de Commutation isotypique
- le Syndrome de Wiskott Aldrich
- le Syndrome de DiGeorge

Nous ferons un exposé des connaissances récentes sur les mécanismes de ces déficits Immunitaires.

Puis nous nous intéresserons aux protocoles d'allogreffes qui sont aujourd'hui préconisés dans ces trois modèles. Nous pourrons alors cibler les difficultés rencontrées dans ces protocoles d'allogreffes en fonction du déficit immunitaire.

I- PRESENTATION DES TROIS SYNDROMES

I-1- Syndromes Hyper IgM ou Défauts de Commutation isotypique

Syndromes hyper-IgM (ou HIGM) sont responsables d'un déficit immunitaire primitif rare caractérisé par une diminution ou une absence des IgG, IgA et IgE, un taux normal ou augmenté d'IgM et souvent, une neutropénie associée. Le défaut de production d'immunoglobulines rend les patients affectés sensibles aux infections bactériennes récurrentes. Il s'agit principalement d'un déficit de l'immunité humorale mais où des composantes de l'immunité cellulaire peuvent être touchées. En effet, l'interaction entre lymphocytes T et les lymphocytes B est capitale pour la mise en place et la maturation de la réponse immunitaire humorale.

La molécule CD40 Ligand exprimée par les lymphocytes T CD4+ activés interagit avec son récepteur CD40 exprimé par les lymphocytes B activés par l'antigène, engendrant ainsi des signaux clés pour la prolifération et la différenciation des lymphocytes B, au sein des organes lymphoïdes secondaires. Suite à ces signaux, des centres germinatifs sont générés. Ces centres germinatifs constituent un microenvironnement hautement spécialisé requis pour l'étape de maturation finale des lymphocytes B soit vers des cellules mémoires soit vers des plasmocytes sécrétant des anticorps de haute affinité. Des événements fondamentaux pour la maturation de la réponse humorale surviennent dans les centres germinatifs :

- les ***Hypermutations somatiques*** correspondant à une accumulation massive de mutations dans l'exon codant pour la région variable. Ce processus a pour conséquence la génération d'anticorps de haute affinité pour l'antigène en permettant la sélection des cellules B exprimant à leur surface une immunoglobuline de haute affinité.

- la ***Commutation isotypique*** qui remplace les exons codant pour la partie constante de la chaîne lourde des immunoglobulines, ce qui a pour conséquence de déterminer les fonctions effectrices des anticorps, notamment la fixation du complément.

Ces deux événements modifiant l'information génique sont critiques pour permettre une réponse humorale efficace.

- la ***Mémoire de la réponse immunitaire*** avec production de lymphocytes B mémoires de phénotype IgM+IgD+CD27+ permettant une réponse plus rapide lors d'une deuxième présentation de l'antigène.

Le CD40 Ligand, se lie également au CD40 exprimé par les monocytes, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules épithéliales.

Plusieurs causes moléculaires sont aujourd'hui connues pour expliquer ces syndromes HIGM :

- ***Les syndromes Hyper-IgM causés par des défauts de la voie CD40-CD40 ligand***

- **Syndrome hyper-IgM lié à l'X** (anciennement appelé HIGM 1) : il s'agit d'une mutation du gène codant pour le CD40 Ligand (ou CD154).
- **Déficit en CD40** (anciennement appelé HIGM 3) sur les lymphocytes B et autres cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, monocytes).
- **XHM-ED, lié à l'X (dysplasie ectodermale anhydrotique)**

- ***Les Défauts intrinsèques aux cellules B en commutation isotypique et en hypermutations somatiques :***

- **Syndrome HIGM autosomique récessif** (anciennement appelé HIGM 2) : il s'agit d'un déficit en *activation-induced cytidine deaminase*, une enzyme agissant sur le transcrit lors de la génération du mRNA (mRNA editing enzyme) et qui désamine une cytidine du mRNA d'une endonucléase impliquée à la fois dans la commutation isotypique et dans les hypermutations somatiques. Toutefois, AID agirait aussi directement sur l'ADN pour désaminer une cytidine en un Uracyle. AID agirait sur les transcrits de l'ADN double brin contenant les séquences cibles de commutation isotypique et d'hypermutations somatiques. (Revy *et al*, 2000 ; Honjo *et al*, 2002).
- **Déficit en AID par mutations dans la région C-terminale** : absence de *commutation isotypique* mais *hypermutations somatiques* non touchées (Ta *et al*, 2003).
- **Déficit en AID autosomique dominant** (Imai *et al*, 2005).
- **Déficit en UNG** il s'agit d'un déficit en *Uracyle N glycosylase* (Imai *et al*, 2003 a).
- **Autres déficits non encore définis au plan moléculaire** (anciennement appelé HIGM 4) : Le déficit moléculaire n'est pas encore identifié mais se situerait en aval de l'AID et entraînerait un déficit en *commutation isotypique* mais pas en *hypermutations somatiques* (Imai *et al*, 2003 b ; Durandy *et al*, 2003).

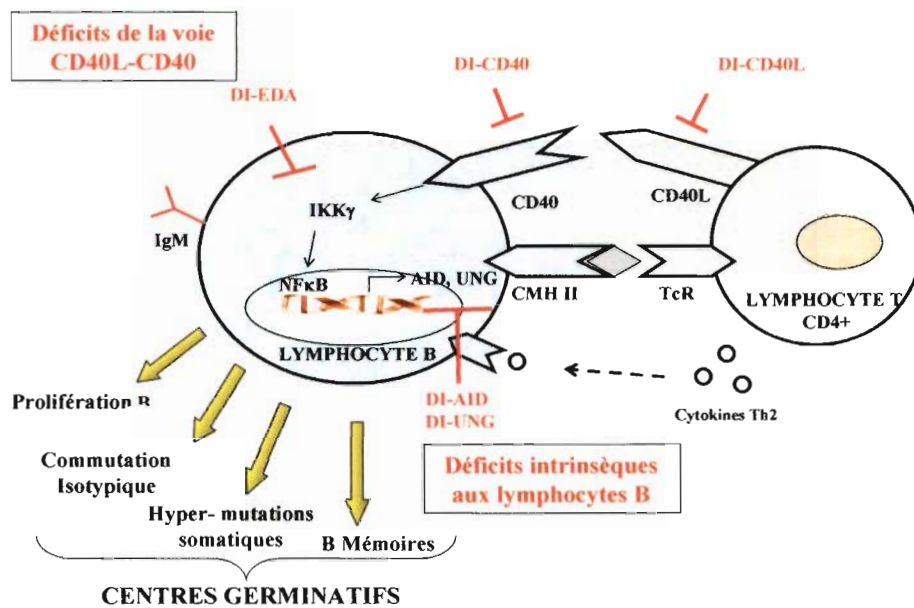


Figure 1 : Représentation schématique de l'interaction CD40L-CD40 et de ses effets sur la maturation de la réponse immunitaire humorale (d'après Notarangelo *et al*, 2006)

Seuls les syndromes Hyper-IgM causés par des défauts de la voie CD40-CD40 ligand peuvent être traités par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Nous évoquerons dans ce travail uniquement les trois déficits immunitaires mentionnés ci-dessus qui ont pour point commun l'altération de la voie de signalisation CD40-CD40Ligand.

A- SYNDROME HYPER-IgM LIE A L'X (HIGM1)

- MUTATIONS

Le syndrome Hyper IgM lié à l'X est lié à une mutation du gène codant pour le CD40 ligand (CD40L, encore appelé Gp39 ou CD154), situé en Xq26. Le CD40L est une glycoprotéine membranaire de type II de 261 acides aminés principalement exprimée par les lymphocytes T CD4+ activés. Le CD40L est un membre de la superfamille du TNF α (Hollenbaugh *et al*, 1992). Le gène codant pour le CD40L est constitué de cinq exons et de quatre introns répartis sur 12 kb (Villa *et al*, 1994; Seyama *et al*, 1996). La perte de la fonction du CD40L est le plus souvent secondaire à des mutations spécifiques dans la région codant pour la protéine plutôt qu'à une expression aberrante du gène (Seyama *et al*, 1998). Les mutations observées ont souvent pour

conséquence un défaut d'interaction fonctionnelle entre CD40L et CD40. Les mutations retrouvées sont les suivantes (Notarangelo *et al*, 1996):

- *mutations faux-sens* localisées principalement (mais non exclusivement dans la région extra-cellulaire 3'codant pour le domaine de liaison au CD40 (dans 39.5% des cas).
- *délétions d'une base* (16.3%)
- *insertions* (10.5%)
- *délétions importantes* (3.5%)
- *mutations non-sens* (18.6%)
- *défaut de site d'épissage* (9.3%)

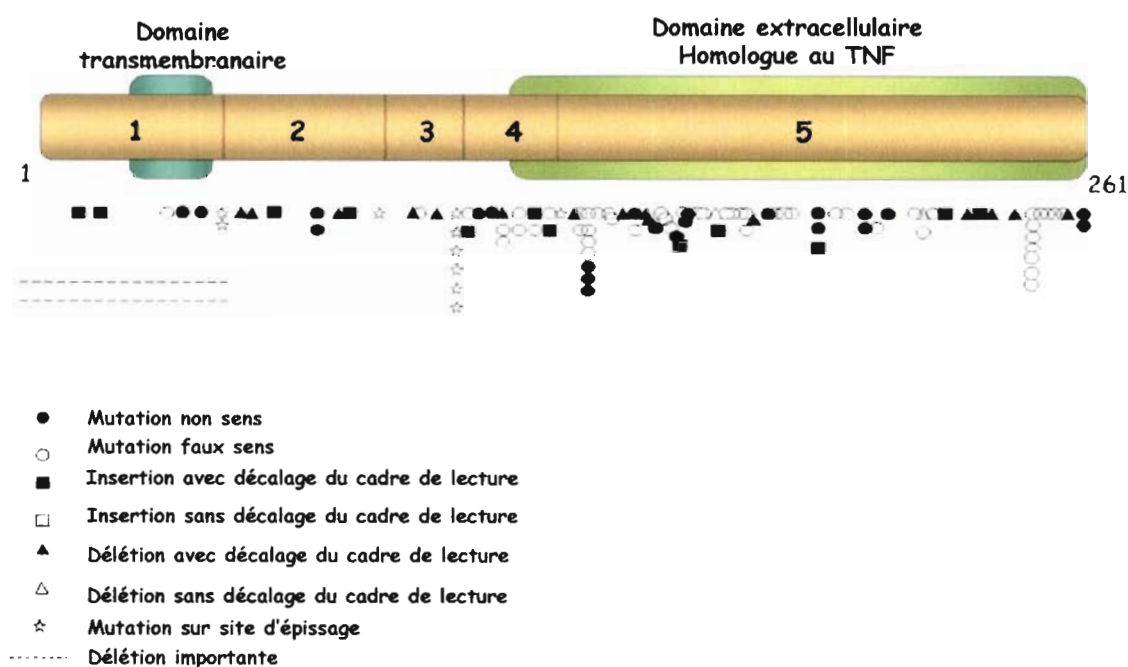


Figure 2 : Représentation schématique du gène du CD40L et des mutations identifiées chez les patients européens atteints d'un syndrome hyper IgM lié à l'X (d'après Notarangelo *et al*, 2006)

Les garçons sont exclusivement touchés par cette pathologie bien qu'un déficit d'expression en CD40L a été décrit chez une petite fille qui présentait une forme partielle secondaire à un biais de lyonisation du chromosome X (De Saint Basile *et al*, 1999). Un second cas de déficit d'expression de CD40L chez une petite fille a été récemment rapporté dans la littérature (Imai *et al*, 2006). Il s'agit d'une translocation réciproque entre le chromosome X et le chromosome 14 avec un point de cassure se situant dans l'intron 4 du CD40L et une inactivation du chromosome X normal. Selon les auteurs, le chromosome X ayant subi la translocation n'est pas inactivé afin d'éviter d'inactiver le bras long du chromosome 14 et de conduire à une monosomie 14q.

Chez une minorité de patients, des mutations moins importantes, qui permettent un certain degré de liaison au CD40, sont associées à une évolution clinique moins sévère.

- CONSEQUENCES SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE

Le défaut d'expression du CD40L empêche la constitution d'un répertoire secondaire d'anticorps ce qui a pour conséquences une synthèse quasi-exclusive d'IgM par absence de commutation isotypique, une absence de maturation d'affinité et une mémoire immunitaire faible. Cependant, les lymphocytes B sont intrinsèquement normaux et peuvent produire des IgG, IgA et IgE après activation *in vitro* par des agonistes du CD40 et les cytokines appropriées.

Le défaut d'expression de CD40L à la surface des lymphocytes T a des conséquences également sur les interactions lymphocytes T- monocytes ou cellules dendritiques et perturbe la réponse immunitaire cellulaire ce qui engendre une susceptibilité accrue des patients aux infections opportunistes qui ne peuvent pas être prévenues par injections d'immunoglobulines intraveineuses (Durandy *et al*, 2001).

Il a été rapporté, par ailleurs, que même dans le cas de déficit complet en CD40L, des lymphocytes B mémoires IgM+IgD+CD27+ bien que rares présentent des hypermutations somatiques (Weller *et al*, 2001). La présence de ces cellules suggère que les hypermutations somatiques peuvent se produire en l'absence de l'interaction CD40-CD40L. Cette sous-population B pourrait provenir de la zone marginale des cellules B de la rate qui présente le même phénotype. Chez la souris, il a été montré que cette sous-population B joue un rôle dans la réponse anticorps indépendante des lymphocytes T avec production d'anticorps contre les antigènes polysaccharidiques bactériens (Martin *et al*, 2000 et Fagarasan *et al*, 2000).

- CONSEQUENCES CLINIQUES

Sur le plan clinique, les syndromes Hyper IgM liés à l’X se manifestent dès la première année de vie par des infections récidivantes, notamment du tractus respiratoire, liées principalement à des germes tels que *Pneumocystis jiroveci*, *Cryptosporidium parvum*, leishmanies, histoplasmes, mycobactéries, bacilles gram négatifs et virus tels que les enterovirus, adenovirus et cytomegalovirus (Levy *et al*, 1997; Wilkenstein *et al*, 2003).

De plus, ces patients sont plus fréquemment sujets à développer des néoplasies : lymphomes et cancers, notamment digestifs. En effet, les cholangiocarcinomes, les carcinomes hépato-cellulaires et les adénocarcinomes sont des complications fréquentes. Ces tumeurs surviennent plus souvent quand ces patients souffrent de cryptosporidiose (70% des cas), ou lorsqu’il y a une atteinte hépatique sévère et/ou prolongée (plus de 80% des cas). Cependant, elles peuvent ne pas être liées à une infection. Ceci peut s’expliquer par un mauvais contrôle immunitaire du processus tumoral du fait de l’interaction défectueuse entre cellules présentatrices d’antigènes et lymphocytes T.

Enfin, des associations avec des pathologies auto-immunes sont fréquemment décrites comme par exemple des arthrites, des thrombocytopénies, des anémies hémolytiques, des hypoparathyroïdies ou des néphrites.

B- DEFICIT EN CD40 (HIGM3)

Ferrari *et al* ont les premiers décrit trois patients de deux familles consanguines présentant un syndrome hyper IgM avec des infections bactériennes et opportunistes comme dans le syndrome hyper IgM lié à l’X (Ferrari *et al*, 2002). A ce jour, 4 familles sont décrites avec un déficit en CD40 (Kutukculer *et al*, 2003 ; Notarangelo *et al*, observations non publiées). Dans tous les cas, la transmission est autosomique récessive. L’absence de commutation isotypique n’est pas consécutive à un défaut d’expression de CD40 ligand. Ni les lymphocytes B, ni les monocytes des patients n’expriment le CD40 à cause de mutations sur les deux allèles du gène du CD40.

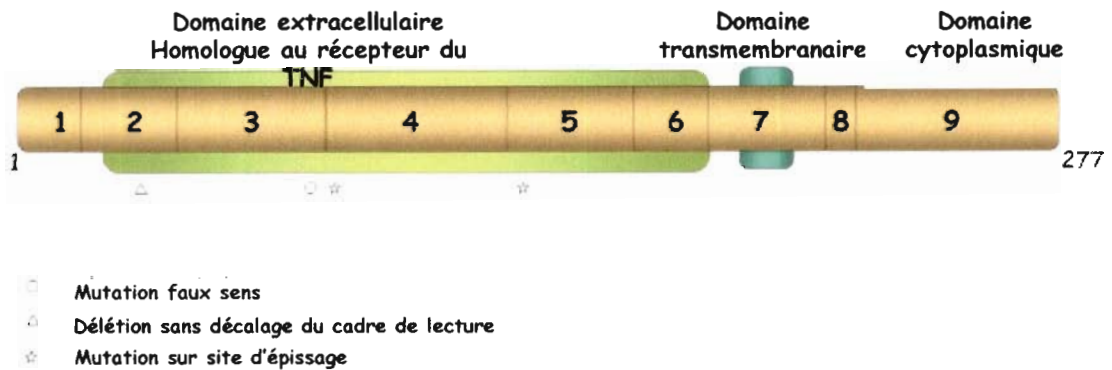


Figure 3 : Représentation schématique du gène du CD40 et des mutations identifiées chez les patients européens atteints d'un déficit en CD40 (d'après Notarangelo *et al*, 2006)

Les conséquences sur la réponse immunitaire et le phénotype clinique des patients atteints d'un syndrome Hyper-IgM lié à l'X ou d'un déficit en CD 40 est identique.

C- XHM-ED : DYSPLASIE ECTODERMALE ANHYDROTIQUE LIEE A L'X

La dysplasie ectodermale anhydrotique peut résulter de mutations au niveau du gène du récepteur de l'ectodysplasine (*DL*) ou du gène de l'ectodysplasine (*EDI* ou *EDA*) et est caractérisée par l'absence ou l'hypoplasie des cheveux, des dents et des glandes sudatives. Ces mutations ne sont pas associées à un déficit immunitaire. Dans le cas de la dysplasie ectodermale anhydrotique liée à l'X, ces mutations ne sont pas impliquées et un déficit immunitaire est associé. Il s'agit d'un syndrome hyper-IgM lié à l'X avec dysplasie hypohydrotique de l'ectoderme. Sa fréquence est estimée à 1 sur 250 000 naissances de garçons en vie (Orange *et al*, 2004). Enfin, il existe une dysplasie ectodermale anhydrotique de transmission autosomique dominante (AD-EDA-ID), associée à un déficit immunitaire sévère (Courtois *et al*, 2003).

- MUTATIONS

XHM-ED est dû à des mutations hypomorphiques du gène du modulateur essentiel du facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor κ B) : NEMO ou IKK γ , situé en Xq28 (Zonana, *et al*, 2000 ; Jain *et al*, 2001 ; Doffinger *et al*, 2001 ; Ku *et al*, 2005). La transmission est autosomique récessive. Le gène *NEMO* est composé de 4 régions principales dont l'une code pour un domaine

en doigt de zinc (domaine clé des interactions protéine-ADN) sur laquelle est retrouvée la majorité des mutations, bien qu'il y ait quelques mutations ponctuelles sur les autres domaines (Orstavik *et al*, 2006).

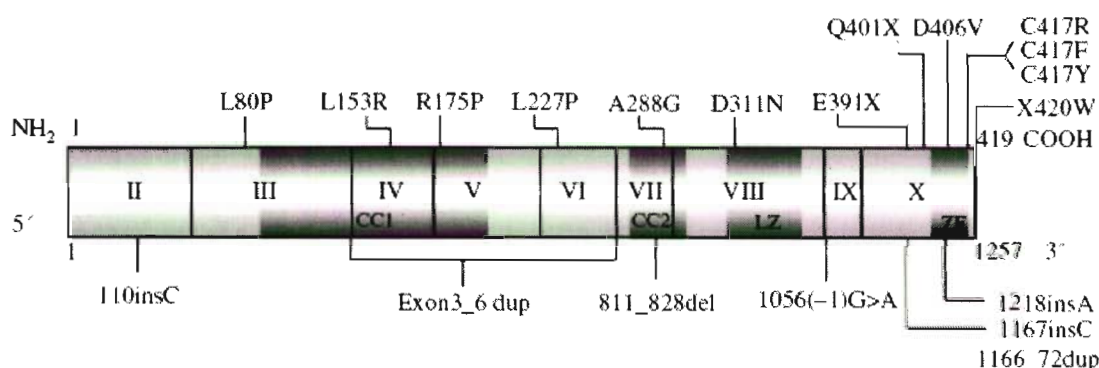


Figure 4 : Représentation schématique du gène de NEMO et des mutations identifiées chez 36 patients atteints d'un XHM-ED de par le monde (d'après Ku *et al*, 2005). La région codante s'étend de l'exon 2 à l'exon 10, avec 4 régions codant pour les domaines principaux de la protéine: domaines CC1 et CC2 (CC : coiled-coiled, codant pour 2 hélices α enroulées l'une autour de l'autre), domaine Leucine Zipper (LZ) et domaine en doigt de zinc (ZF).

La mutation la plus fréquemment décrite dans la région codant pour le domaine en doigt de zinc est C417R qui entraîne un blocage complet de la production d'anticorps spécifiques (Doffinger *et al*, 2001 ; Jain *et al*, 2001 ; Orange *et al*, 2004). Cependant, d'autres mutations dans ce domaine permettent la production de certains anticorps spécifiques. Par ailleurs, les mutations dans le domaine Leucine Zipper, laissant le domaine en doigt de zinc intact engendrent un déficit immunitaire sans affecter le développement ectodermique. Enfin, les mutations affectant les sites d'épissage conduiraient à un phénotype clinique plus clément (Uzel *et al*, 2005).

Dans l'AD-EDA-ID, c'est le gène codant pour la protéine I- κ B α , inhibiteur de NF κ B, qui est muté (Ku *et al*, 2005). La seule mutation décrite à ce jour a pour conséquence l'absence de phosphorylation de I- κ B α et le blocage de sa dégradation secondaire (Courtois *et al*, 2003).

- CONSEQUENCES SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE

NEMO (ou IKK γ) se lie à deux enzymes IKK α et IKK β (deux protéines kinases) pour former le complexe IKK. NEMO ne possède pas d'activité enzymatique par lui-même mais il joue le rôle de support pour les autres IKK. La transduction du signal transmis par plusieurs couples ligands-récepteurs est assurée par NF κ B.

Si l'on s'intéresse au couple CD40L-CD40, l'interaction du ligand et de son récepteur induit l'activation de TRAF6 (TNF receptor-associated with factor 6), protéine intracellulaire associée au CD40, qui induit à son tour l'activité kinase du complexe IKK qui phosphoryle et dégrade l'inhibiteur de NF- κ B : I- κ B α . NF- κ B ainsi libre peut être transloqué dans le noyau où il initie la transcription de plusieurs gènes cibles impliqués dans la commutation isotypique et les hypermutations somatiques. Parmi les gènes dont les produits jouent un rôle dans la commutation isotypique et dont l'expression n'est pas induite après activation par le CD40L chez les patients atteints d'XHM-ED, il y a *LYL1* (impliqué dans le recrutement d'une enzyme permettant la recombinaison au cours de la commutation isotypique), *MRE11* et *RAD 50* (impliqués dans les clivages d'ADN double brins) et *LIG4* (impliqué dans la réparation de l'ADN) (Jain *et al*, 2004).

Le défaut d'activation du facteur NEMO dans le syndrome XHM-ED est à l'origine d'un déficit de l'immunité humorale et cellulaire. En effet, il empêche la transcription des gènes d'immunoglobulines dans les lymphocytes B. Les taux d'immunoglobulines sont variables avec souvent une nette diminution des IgG, une augmentation des IgM et une absence d'anticorps anti-polysaccharides. On observe une absence complète de cellules B mémoires et un phénotype immature : IgD+CD27-. Chez les patients présentant une mutation dans le domaine en doigt de zinc, il a été observé une absence d'hypermutations somatiques et de commutation isotypique, ce qui peut s'expliquer par le rôle critique de ce domaine dans l'activation de NF κ B médiée par le CD40 (Jain *et al*, 2004).

L'immunité cellulaire est perturbée puisqu'il n'y a pas de sécrétion d'IL12, ni de TNF α par les monocytes et les cellules présentatrices de l'antigène en réponse à une stimulation par le lipopolysaccharide, ligand du Toll Like Receptor 4 (TLR 4). De plus, la cytotoxicité NK est perturbée. On voit que le déficit immunitaire résulte également d'une altération de l'activation de NEMO en réponse aux signaux transmis par les TLRs, le récepteur de l'IL1 et le récepteur du TNF α .

En conséquence, le déficit immunitaire d'XHM-ED est une combinaison d'une perturbation de l'immunité innée et d'une déficience de l'immunité acquise du fait d'une altération de la

signalisation médiée par NFκB, facteur de transcription commun à plusieurs couples ligands-récepteurs (Uzel, *et al*, 2005).

Dans l'AD-EDA-ID, le déficit immunitaire est beaucoup plus sévère avec une absence de lymphocytes T mémoires et une réponse proliférative altérée des lymphocytes T au CD3 et aux antigènes.

L'association avec une dysplasie ectodermale chez ces patients est due à un signal défectueux via le récepteur de l'ectodysplasine (DL) exprimé sur les tissus dérivés de l'ectoderme et appartenant comme le CD40 à la superfamille des récepteurs de TNF, qui dépend également de NEMO et du facteur de transcription NF-κB.

- CONSEQUENCES CLINIQUES

Les patients sont victimes d'infections récidivantes, parfois mortelles, à bactéries pyogènes encapsulées (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*). Ces infections affectent non seulement les tissus périphériques (peau, tractus respiratoire, tractus digestif) mais également les organes profonds (par exemple : foie, os). Des infections à mycobactérie atypiques (par exemple : *Mycobacterium avium*) sont souvent retrouvées dans les 3 premières années de vie. Des infections virales (notamment à Herpes simplex virus ou à Cytomégalo virus) et des infections fongiques à germes opportunistes (principalement à *Pneumocystis jiroveci*) ont également été observées. Ces patients ont une prédilection pour les méningites et les sepsis sévères. A côté du déficit immunitaire, la dysplasie ectodermique se manifeste par une hypotrichose ou une atrichose avec des cheveux clairsemés, des malformations dentaires (incisives coniques) engendrant un faciès caractéristique et une absence presque complète de sudation.

Le pronostic vital de ces patients est faible puisqu'à peu près la moitié des patients rapportés dans la littérature sont décédés.

L'expression clinique de l'AD-EDA-ID est encore plus sévère, du fait principalement d'un déficit immunitaire plus étendu et plus profond.

D- ELEMENTS BIOLOGIQUES CONTRIBUANT AU DIAGNOSTIC DES SYNDROMES

HYPER-IgM

- RECHERCHE DE L'EXPRESSION DE PROTEINES MEMBRANAIRES PAR CYTOMETRIE EN FLUX
 1. recherche de l'expression du CD40 Ligand à la surface des lymphocytes T activés (activation courte par mitogène)
 2. Recherche de l'expression du CD40 à la surface des lymphocytes B.
- TEST IN VITRO DE LA CAPACITE DES LYMPHOCYTES B ACTIVES A PROLIFERER ET A PRODUIRE DES IGA, IGG OU IGE APRES STIMULATION PAR UN AGONISTE DU CD40 ET DES CYTOKINES APPROPRIEES

Selon le déficit moléculaire impliqué, le profil de réponse à ce test sera différent :

- 1- **Déficit en CD40L** : les cellules B sont capables d'induire une commutation isotypique *in vitro* après activation.
- 2- **Déficit en CD40** : Les agonistes du CD40 sont incapables d'induire une commutation isotypique des cellules B *in vitro* après activation.
- 3- **XHM-ED** : les cellules B sont capables de façon variable selon les patients de faire une commutation isotypique *in vitro* après activation (Durandy *et al*, observation non publiée). Il en est de même pour les hypermutations somatiques absentes chez certains patients et retrouvées chez d'autres. Ce test n'apporte là qu'une contribution modérée au diagnostic.
- 4- **Déficit en AID autosomique récessif ou autosomique dominant** : les lymphocytes B de patients atteints d'un déficit en AID prolifèrent normalement mais il y a une absence de production d'IgA, IgG ou IgE.

- PHENOTYPE DES LYMPHOCYTES B

- 1- **Déficit en CD40L** : Les lymphocytes B expriment à leur surface des IgM et des IgD. Dans la plupart des cas, les lymphocytes B mémoires (CD27+) sont en faible proportion.
- 2- **Déficit en CD40** : Les lymphocytes B mémoires (CD27+) sont en faible proportion.
- 3- **XHM-ED** : Défaut en cellules B mémoires (IgD-CD27+) et excès en cellules B naïves IgM+IgD+.

4- **AID** : Le nombre de cellules B circulants est normal mais les cellules B expriment uniquement des IgM et des IgD de surface. La proportion de lymphocytes B mémoires est normale mais ils expriment tous des IgM de surface (pas de commutation isotypique) : CD27+.

- AUTRES CARACTERISTIQUES

La recherche de la mutation du gène impliqué permet de poser de façon certaine le diagnostic. Cependant, ceci n'est à ce jour réalisé que dans quelques laboratoires, spécialisés dans ces syndromes.

L'absence de mutations somatiques est une caractéristique des patients atteints du déficit en AID.

I-2- Le syndrome de Wiskott Aldrich

Le Syndrome de Wiskott Aldrich (WAS) décrit en 1937 (Wiskott, 1937) puis en 1954 (Aldrich *et al*, 1954) est une maladie récessive liée à l’X, rare (1/100000 naissances), se déclarant principalement dans la petite enfance. Ce syndrome associe une thrombopénie, un eczéma et des infections récurrentes (Sullivan *et al*, 1994). Ces infections récurrentes résultent d’anomalies immunologiques affectant à la fois la réponse aux antigènes polysaccharidiques et la réponse cellulaire. De plus, un risque accru d’autoimmunité et de cancer est associé à ce syndrome (Dupuis Girod *et al*, 2003).

En 1994, le gène *WASP* codant pour la protéine WASp a été identifié comme le gène déficient dans le syndrome de Wiskott Aldrich (Derry *et al*, 1994). La mutation du gène *WASP* est également impliquée dans la Thrombopénie liée à l’X (ou XLT pour X Linked Thrombocytopenia) un désordre congénital caractérisé par une thrombopénie et de petites plaquettes mais n’associant pas les autres symptômes du WAS (Villa *et al*, 1995).

I-2-1 La protéine WASp

La protéine WASp est exprimée seulement dans le cytosol des cellules hématopoïétiques et est directement responsable de la mobilité du cytosquelette au décours des diverses activités cellulaires. Le rôle de la protéine WASp est de permettre la polymérisation de l’actine en réponse à différents signaux, au moment et à l’endroit appropriés. L’actine possède des propriétés dynamiques intrinsèques grâce à sa capacité de former un long polymère à partir de monomères (Golsteyn *et al*, 2000).

La protéine WASp est constituée de 502 acides aminés et est caractérisée par :

- **un domaine C-terminal** : appelé région **VCA** (pour Verprolin homology, Central, Acidic). Il s’agit du **Domaine actif** de la protéine qui est capable d’activer le complexe d’Actin Related Protein 2/3 (Arp2/3) et d’initier la formation de nouveaux filaments d’actine (Golsteyn *et al*, 2000).
- **un domaine riche en Proline (PPPP)**: permet l’interaction avec diverses protéines régulatrices notamment des protéines à domaine SH3 telles que les *Protéines tyrosines Kinases* (PTK) permettant la régulation de WASp par phosphorylation

- **un domaine CRIB** (Cdc42/Rac interactive binding) **d'interaction avec Cdc42** (une GTPase): cette interaction permet d'induire les filopodes et stimule l'activité de WASp pour la polymérisation de l'actine. De plus, c'est la liaison de CRIB avec Cdc42 qui permet de faire passer la protéine WASp sous sa forme active. Sans cette interaction, la protéine adopte une structure en « épingle à cheveux fermée » où le domaine VCA ne peut interagir avec le complexe Arp2/3
- **un domaine basique** : qui se lie au phosphatidylinositol (4, 5) biphosphate (PIP2) et qui agit en synergie avec Cdc42 pour activer pleinement WASp.
- **un résidu tyrosine (Y291) unique cible de phosphorylation** : cette phosphorylation intervient après la stimulation des plaquettes par le collagène, ou la stimulation du récepteur T (TcR), par exemple. Elle joue un rôle important dans la polymérisation de l'actine et la formation de la synapse immunologique (Badour *et al*, 2004)
- **un domaine N-terminal** : appelé EVH1 (pour Ena/VASP homology1). Ce domaine se lie à la protéine WIP (*WASP-interacting protein*) qui stabilise les filaments d'actine et régule la polymérisation de l'actine (Ramesh *et al*, 1997).

Sa structure est représentée sur la figure ci-après : elle existe sous une forme auto-inhibée (A) et sous une forme active après phosphorylation (B) :

Tous ces domaines confèrent à WASp la capacité de répondre à différents signaux via différentes interactions moléculaires (Ochs *et al*, 2006).

I-2-2 Le gène WASP et les mutations

Le gène codant pour la protéine WASp est localisé en Xp11-22 et consiste en 12 exons contenant 1823 paires de base. Plus de 300 mutations ont été rapportées dans le gène *WASP* réparties sur les 12 exons mais plus nombreuses sur les 4 premiers.

Selon Imai *et al*, on retrouve :

- *mutations faux-sens* : la protéine WASp est de taille normale mais de niveau d'expression variable.
- *mutations non-sens* : la protéine WASp est soit absente soit tronquée et ne peut être détectée
- *délétions/insertions* : absence de la protéine du fait du décalage du cadre de lecture et arrêt prématuré de la transcription
- *mutations du site d'épissage* : résultat variable sur l'expression de la protéine.

Plus récemment, Ochs *et al* ont rapporté l'ensemble des mutations identifiées chez 270 familles WAS (Figure 6). Depuis, d'autres mutations ont été décrites (Kim *et al*, 2006; Proust *et al*, 2007; Andreu *et al*, 2007). Parmi ces nouvelles mutations, figure celle responsable du syndrome que Wiskott a décrit chez 3 frères en 1937 (Binder *et al*, 2006).

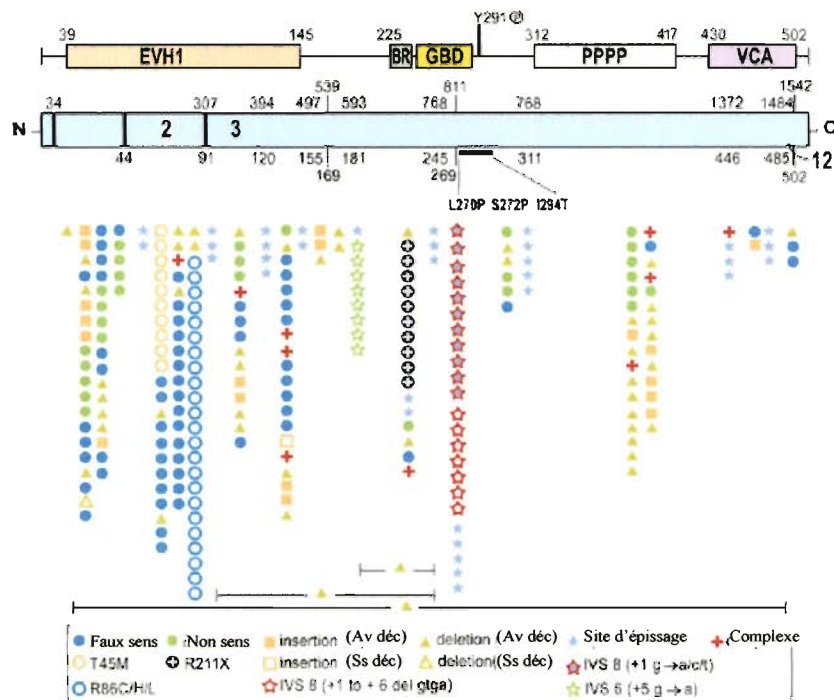


Figure 6 : Représentation schématique du gène WASP qui code pour une protéine de 12 exons composée de 5 domaines principaux. Mutations identifiées chez 270 familles WAS.

Les mutations faux sens sont principalement localisées dans les exons 1 à 4. Délétions, insertions et mutations non sens sont réparties sur toute la longueur du gène. Les mutations au niveau des sites d'épissage sont principalement retrouvées dans les introns 6, 8, 9 et 10. **Av Dec** : Avec décalage du cadre de lecture, **Ss Dec** : sans décalage du cadre de lecture (d'après Ochs *et al*, 2006).

La plupart des mutations du gène *WASP* engendrent la perte de la fonction protéique. Il semble cependant que la gravité de l'expression clinique de la maladie soit fonction de la sévérité ou de la localisation du défaut moléculaire ou probablement de facteurs génétiques secondaires ou de facteurs environnementaux. En effet, plusieurs équipes ont rapporté une corrélation entre phénotype clinique et génotype (Wengler *et al*, 1995, Lemathieu *et al*, 1999) mais un tel lien n'a pas été retrouvé par d'autres équipes (Schindelhauer *et al*, 1996). Selon Imai *et al*, la difficulté à établir un lien phénotype clinique / génotype réside dans la nécessité de collecter scrupuleusement des données cliniques au cours du temps (Imai *et al*, 2004). Son équipe a travaillé sur une cohorte de 50 patients avec mutations du gène *WASP* présentant soit un WAS soit un XLT. Le suivi clinique rigoureux des patients a permis de montrer une corrélation entre le phénotype clinique, l'étendue de la mutation et la présence ou l'absence de WASp dans les lignées EBV dérivées à partir des cellules des patients. L'absence de protéine WASp entraîne un phénotype clinique sévère et au niveau moléculaire l'arrêt total de la polymérisation de l'actine

par le complexe Arp2/3. L'expression d'une protéine tronquée est également associée à un phénotype sévère. En revanche, la présence d'une protéine de taille normale est généralement associée à un phénotype moins grave. Dans l'étude d'Imai *et al*, les patients avec une protéine de taille normale présentaient significativement moins d'infections, moins d'eczéma, pas de cancer et une survie plus longue. Parmi les patients avec un phénotype d'XLT, 21/23 exprimaient une protéine de taille normale (contre 6/27 pour le phénotype WAS). Cependant, cette corrélation n'est pas absolue et des patients, possédant une protéine de taille normale, pouvaient présenter un phénotype clinique sévère. Cela dépend certainement de la fonctionnalité résiduelle de la protéine après mutation et également de facteurs génétiques et environnementaux.

Une étude similaire a été réalisée par les équipes de Seattle et de Brescia portant sur 262 patients (Jin *et al*, 2004). De nouveau, les patients qui expriment une protéine WASp de taille normale ont un phénotype d'XLT alors que les patients qui ont une protéine WASp absente ou tronquée ont un phénotype WAS ($p < 0.001$). Les auteurs montrent que la fréquence et la gravité des infections, l'étendue de l'eczéma et la progression vers des maladies auto-immunes et malignes est très étroitement corrélée avec l'absence de protéine WASp dans les lymphocytes des patients (seule population cellulaire analysée dans cette étude). Toutefois cette corrélation n'est pas absolue comme dans l'étude d'Imai *et al*.

Par ailleurs, il a été montré que les mutations situées au niveau du site de liaison de Cdc42 engendraient non pas un syndrome de Wiskott Aldrich ni un XLT mais une neutropénie congénitale liée à l'X avec myélodysplasie (Deveindt *et al*, 2001 ; Ancliff *et al*, 2006). Les mutations dans cette région ont pour conséquence la perte de la capacité d'autoinhibition de la protéine WASp et de ce fait la production d'une protéine WASp mutante constitutivement active.

I-2-3 Les effets des mutations du gène WASP sur la fonction cellulaire (d'après Burns *et al*, 2004)

- *sur le développement et la mise en place de l'hématopoïèse* : Des expériences chez la souris déficiente en protéine WASp ont montré que WASp semble importante dans la migration des cellules progénitrices du foie fœtal vers la moelle osseuse. Cependant, il ne semble pas y avoir de défaut de l'hématopoïèse. C'est pourquoi, les auteurs suggèrent que chez les femmes vectrices de la maladie, l'apparente inactivation aléatoire d'un chromosome X dans les précurseurs CD34+ résulte en fait de l'incapacité de ces cellules souches qui ont un allèle *WASP* muté à migrer du foie fœtal vers la moelle osseuse.

- *sur la microthrombopénie* : il s'agit d'un signe constant retrouvé dans toute pathologie associée à WASp. La protéine WASp mutante est absente des plaquettes, quelque soit la

mutation en cause et en dépit d'une expression partielle dans les autres lignées cellulaires, probablement du fait d'une grande instabilité protéique. De plus, la destruction périphérique par la rate favorise la thrombopénie. Cependant, il semble que les microplaquettes échappent à cette élimination splénique. Bien que la mégacaryopoïèse semble normale *in vitro*, le déficit en structures du cytosquelette (telles que les filopodes) peut entraver l'adhésion des mégacaryocytes sur la surface endothéliale ainsi que les projections cytoplasmiques trans-endothéliales dans la lumière vasculaire conduisant à la formation des pro-plaquettes. Plus récemment, une étude chez la souris a conduit à proposer un rôle inhibiteur de WASp sur la mégacaryopoïèse en empêchant la formation prématurée de pro-plaquettes au sein de la moelle osseuse (Sabri *et al*, 2006).

- *sur la synapse immunologique* : la synapse immunologique consiste en un contact cellulaire entre la cellule T et la cellule présentatrice de l'antigène mettant en jeu progressivement autour du TcR un ensemble de molécules de co-stimulation et leurs ligands. Tous les récepteurs engagés dans la synapse immunologique se regroupent dans la zone de contact inter-cellulaire. La formation d'une telle structure est impossible dans les cellules T déficientes en WASp. De plus la signalisation au sein des lymphocytes T est déficiente avec des difficultés à recruter la PKC θ et le défaut d'influx calcique après activation T. Ceci conduit à des réponses prolifératives anormales. Toutefois, d'autres études retrouvent une altération modérée des réponses prolifératives chez les patients atteints de WAS (Molina *et al*, 1993).

- *sur le développement thymique* : le rôle de WASp est encore mal défini. Cependant quelques études post-mortem ont pu rapporter des hypoplasies et des involutions thymiques à des degrés variables (Cooper *et al*, 1968). Une étude sur un modèle murin a montré un blocage dans la progression entre le compartiment des doubles négatives (CD4-CD8-) et celui des doubles positives (CD4+CD8+) ainsi qu'une anomalie dans la prolifération des thymocytes (Zang *et al*, 1999). Des résultats contradictoires ont cependant été rapportés par une autre équipe (Snapper *et al*, 1998).

De plus, il semble clair que la protéine WASp joue un rôle dans la prolifération des cellules T, leur survie, leur fonction et leur mobilité. Il a en effet été montré que l'interaction cdc42-WASP est indispensable à l'effet de la chémokine SDF1 (CXCL12) sur l'induction de la polymérisation de l'actine dans les lymphocytes T (Haddad *et al*, 2001). Toutefois cette interaction semble importante pour définir la direction dans laquelle doit se faire le mouvement mais non pour la locomotion elle-même.

- *sur les lymphocytes T régulateurs* : La présence de pathologies autoimmunes dans le WAS a conduit à se poser la question de la production et de la fonction des lymphocytes T

régulateurs naturels (nTreg). Maillard *et al*, ont montré dans un modèle murin WASP-/- que la protéine WASp joue un rôle important dans l'homéostasie des nTregs (Maillard *et al*, 2006). Elle intervient dans la migration des nTregs du thymus vers les organes périphériques et dans la fonction des nTregs (défaut de production d'IL10). L'équipe de Marangoni a montré chez la souris et chez des patients atteints de WAS que WASp jouait un rôle fondamental dans l'activation et la fonction suppressive des nTregs mais n'intervenait pas dans leur différenciation (Marangoni *et al*, 2006). De plus, un défaut de production en TGF β par ces cellules a été mis en évidence, contribuant à l'altération de la fonction suppressive des nTregs.

- *sur la fonction des cellules B* : les cellules B de patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich ont une mobilité et des réponses migratoires et d'adhésion diminuées. Chez la souris, le déficit en WASp conduit à une réponse immunitaire perturbée dans la rate par altération du recrutement des cellules B, de la formation des centres germinatifs et de la production d'anticorps (Westerberg *et al*, 2005). La réponse anticorps aux antigènes T dépendants est diminuée alors qu'elle est totalement abolie aux antigènes T-indépendants. La protéine WASp est cruciale pour une réponse optimale des cellules B et joue un rôle pivot dans la réponse immunitaire humorale primaire.

- *sur les cellules NK et leur activité cytotoxique* : La protéine WASp est exprimée dans les cellules NK et localisée dans la synapse immunologique activatrice avec l'actine F. (Orange *et al*, 2002). Une protéine WASp fonctionnelle est nécessaire pour la cytotoxicité des cellules NK. Le réarrangement du cytosquelette est un préalable à la mobilisation de la perforine. La susceptibilité des patients atteints de WAS aux infections à Herpesvirus et au développement de cancers peut en partie résulter de cette altération des fonctions des cellules NK.

- *sur les cellules phagocytaires et les cellules dendritiques* : les cellules dendritiques (DC) possèdent des propriétés migratoires particulièrement développées. Si la migration est contrôlée par de nombreux facteurs extrinsèques comme les chémokines, la mobilité des DC et leur ancrage dans les tissus est dépendant de la régulation dynamique du cytosquelette d'actine. Les anomalies de mobilité des cellules dendritiques peuvent avoir des conséquences très importantes sur la réponse immunitaire : par exemple, si les DC ne parviennent pas à migrer de la périphérie jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, elles ne pourront pas contribuer à générer une réponse immunitaire cellulaire spécifique. Ceci a pu être démontré dans un modèle murin (Noronha *et al*, 2005).

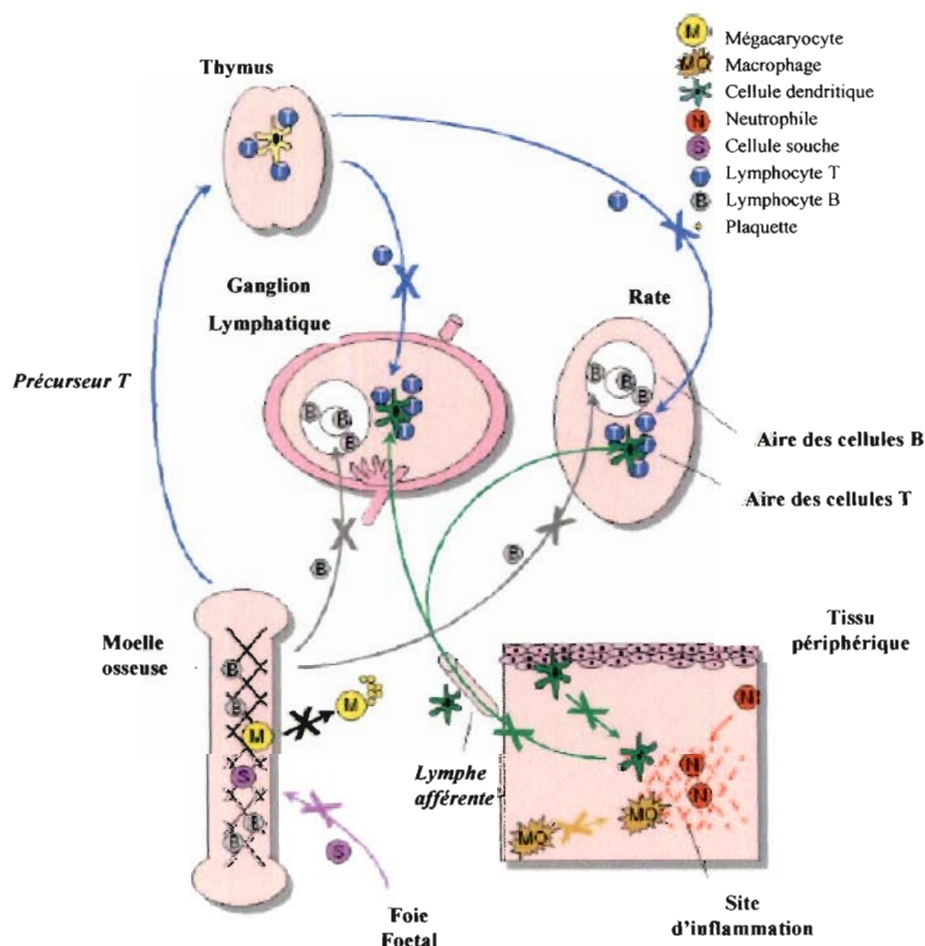


Figure 7: Défauts migratoires des lignées déficientes en WASp (d'après Burns *et al*, 2004)

I-2-4 Les conséquences cliniques

1-2-4-1- Anomalies plaquettaires

Les manifestations cliniques de thrombopénie étaient présentes chez 84% des patients d'une large cohorte de WAS étudiée rétrospectivement (Sullivan *et al*, 1994) : pétéchies et purpura (78%), hématurie et méléna (28%), épistaxis (16%) et saignements gingivaux (6%). Des hémorragies intra-craniennes ont été observées dans 2% des cas. Le déficit fonctionnel plaquettaire, la thrombopénie (5 à 50 $10^9/l$) et le petit volume plaquettaire (entre 3.8 à 5 fl ; normale : 7.1 à 10.5 fl) sont systématiquement retrouvés chez les patients avec une mutation du gène *WASP*. La transfusion plaquettaire est généralement efficace avec une bonne recirculation plaquettaire et une élimination normale. Par ailleurs, l'étude de Mullen portant sur 62 patients

atteints de WAS souligne l'efficacité de la splénectomie qui permet de résorber la thrombopénie et d'augmenter la médiane de survie des patients de 4 ans à 25 ans (Mullen *et al*, 1993).

1-2-4-2- Eczéma

La présence d'un eczéma sévère ou non est rapportée chez 81 % des patients WAS (Sullivan *et al*, 1994). En revanche les patients atteints d'XLT peuvent présenter un eczéma léger et transitoire ou pas d'eczéma du tout. Les antigènes bactériens semblent jouer un rôle important dans la persistance d'eczémas chroniques, car le traitement par antibiotiques systémiques contribue largement à faire régresser cet eczéma (Ochs *et al*, 1998). On peut toutefois noter qu'il est très difficile de prendre en considération ce signe clinique chez le jeune enfant, étant donné la fréquence d'eczémas dans cette population.

1-2-4-3- Infections

Les infections du tractus respiratoire sont fréquentes et comprennent : des otites (78% des patients WAS) des sinusites (24%) des pneumonies (45%) (Sullivan *et al*, 1994).

Dans la même étude, sont rapportés des sepsis (24%), des méningites (7%) et des diarrhées infectieuses (13%).

Les infections virales sévères sont moins fréquentes mais on retrouve notamment la varicelle avec des manifestations systémiques sévères ou des infections à *Herpes simplex* virus chez 12% des patients WAS.

Les infections à *Pneumocystis jiroveci* sont peu fréquentes (9% des patients WAS) ainsi que les infections fongiques (10% des patients WAS) qui sont principalement représentées par des infections à *Candida*.

Les patients présentant un phénotype WAS non sévère ressemblant à l'XLT présentent peu ou pas d'infections sévères (Ochs *et al*, 1998).

1-2-4-4- Le déficit Immunitaire

La gravité du déficit immunitaire peut varier d'une famille à l'autre. Il touche à la fois les lymphocytes T et les lymphocytes B. Au cours de l'enfance le nombre de lymphocytes circulants est normal. La lymphopénie apparaît progressivement à partir de 6 à 8 ans.

Sur le plan humoral, on note des taux d'IgG normaux, d'IgM diminués et d'IgA et d'IgE augmentés. La réponse anticorps est normale vis-à-vis de certains antigènes mais insuffisantes vis-à-vis d'autres notamment vis-à-vis des antigènes polysaccharidiques.

L'altération de la fonction T est suggérée par une réponse nettement altérée mais non abolie de la réponse proliférative aux mitogènes ou aux cellules allogéniques. En revanche, la

réponse au periodate est totalement abolie et constitue un outil simple de diagnostic d'un WAS (Siminovitch *et al*, 1995) (cf rubrique éléments biologiques diagnostiques). De plus, les tests cutanés d'hypersensibilité retardée sont anormaux dans 90 % des cas.

Les polynucléaires neutrophiles présentent des fonctions normales mais répondent insuffisamment aux agents chimotactiques (Ochs *et al*, 1998).

1-2-4-5- Les manifestations auto-immunes

Les manifestations auto-immunes sont observées chez 40 % des patients. La manifestation la plus fréquente est l'anémie hémolytique, puis la thrombopénie auto-immune, la vasculite, la maladie rénale, le purpura d'Henoch-Schönlein, et la maladie inflammatoire du tube digestif.

Plus rarement sont retrouvées d'autres manifestations auto-immunes telles que la neutropénie, la dermatomyosite ou l'uvéite (Sullivan *et al*, 1994).

1-2-4-6- Cancers

Les cancers apparaissent généralement après l'âge de 20 ans, même s'ils peuvent parfois survenir dans l'enfance (Cotelingam *et al*, 1985). Les cancers les plus fréquents sont des lymphomes B induits par le virus d'Epstein Barr, ce qui suggère un lien direct avec les déficit immunitaire (Ochs *et al*, 2006). Dans l'étude rétrospective de Sullivan, 13% des patients WAS présentaient un cancer et l'âge moyen d'apparition du cancer était de 9,5 ans. Ces cancers étaient principalement des cancers lymphoréticulaires à l'exception de 3 cas sur 21. Le pronostic de ces cancers est très mauvais : 1 patient sur 21 en vie à 2 ans du diagnostic.

Dans le cas de l'XLT, les données sont insuffisantes pour prédire l'incidence des cancers mais leur fréquence est plus faible que dans le WAS.

I-2-5 Eléments biologiques diagnostiques

1-2-5-1 Anomalies plaquettaires

L'observation morphologique des plaquettes à la recherche de la microthrombopénie au cours d'un hémogramme est une étape essentielle du diagnostic (Latger Cannard *et al*, 2005).

1-2-5-2 Le TTL au periodate

Contrairement aux Tests de transformation lymphocytaire (TTL) réalisés avec des mitogènes classiques (Phytohémagglutinine PHA, Phorbol Myristate Acétate et Ionomycine PMA-iono, Pokeweed PWM, etc ...) qui sont perturbés dans la moitié des cas de WAS, la réponse proliférative au periodate est totalement abolie (Sullivan *et al*, 1994 ; Siminovitch *et al*, 1995). Ce test s'appuie sur une littérature ancienne et controversée faisant référence à une expression altérée de la glycoprotéine membranaire CD43 à la surface des lymphocytes (Greer *et al*, 1989 ; Remold-O'Donnel *et al*, 1984). La molécule CD43 est une sialoglycoprotéine fortement O-glycosylée qui joue un rôle de molécule anti-adhésion et qui exerce un rôle protecteur sur les lymphocytes circulants. Chez les patients atteints de WAS, la perte de la molécule CD43 à la surface des lymphocytes T prédispose les cellules à des réactions d'adhésion, à des réactions d'activation et à l'élimination prématurée de la circulation. De plus, il semble que CD43 délivre aux lymphocytes T un signal de co-stimulation dans le contexte de la synapse immunologique (Remold-O'Donnel *et al*, 1996). Le lien entre le déficit en protéine WASp et le défaut d'expression de CD43 n'est pas évident. Cependant, l'absence de WASp affecte l'ancrage et la présentation de molécules à la surface des cellules. Toutefois, depuis la mise en évidence de WASp, le rôle de CD43 dans le WAS n'a plus été étudié. Cependant, le TTL au periodate apporte une contribution au diagnostic, souvent difficile à poser, de WAS. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à ce test.

Le periodate est un agent mitogénique qui cible les résidus sialiques terminaux sur les glycoprotéines membranaires comme le CD43 (Greer *et al*, 1989). Chez les patients atteints de WAS, cette réponse proliférative au periodate est totalement abolie alors que la prolifération aux mitogènes classiques est diminuée ou normale mais non abolie. L'équipe de Siminovitch *et al* a montré que cette abolition de la réponse proliférative T au periodate était spécifique des patients atteints de WAS. Elle peut être retrouvée chez les patients atteints de SCID mais elle est alors accompagnée d'une abolition ou d'une diminution très marquée de la réponse proliférative aux autres mitogènes.

Nous avons mis au point ce test dans le laboratoire d'Immunologie de l'UTCT et avons pu réaliser le diagnostic de deux patients atteints de WAS.

1-2-5-3 La recherche de l'expression de la protéine WASP au sein des lymphocytes par la technique de cytométrie en flux

Cette technique a été développée par Yamada *et al* et recherche l'expression de la protéine WASP dans les lymphocytes T après perméabilisation (Yamada *et al*, 1999).

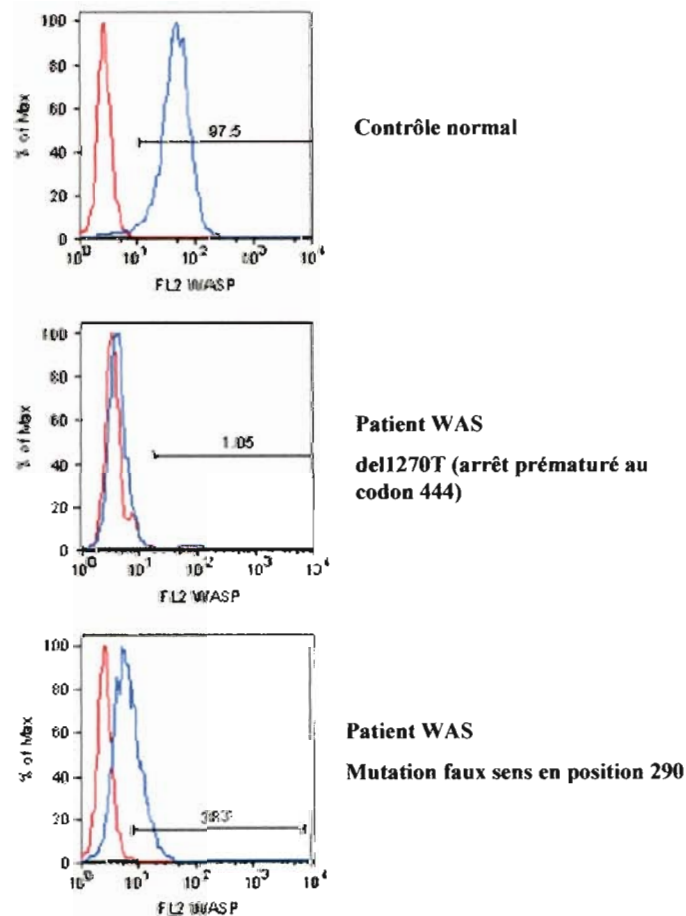


Figure 8: Analyse par Cytométrie en Flux de l'expression de la protéine WASp dans les lymphocytes du sang périphérique après perméabilisation.

Utilisation d'un anticorps polyclonal 503 de lapin puis d'un second anticorps anti-lapin. Le premier graphe montre une expression normale de WASp dans les cellules d'un témoin normal. Le second montre une absence d'expression de WASp dans le cas d'une délétion avec décalage du cadre de lecture et arrêt prématuré de la transcription. Le troisième montre une expression diminuée de WASp dans le cas d'une mutation faux sens. (d'après Ochs *et al*, 2006).

1-2-5-4 L'étude de la mutation du gène *WASP*

C'est la seule façon de poser un diagnostic définitif. Cette étude s'avère indispensable pour affirmer le diagnostic surtout dans les formes atypiques de WAS où la protéine est présente (Ochs et al, 1998).

I-3- Syndrome de DiGeorge et la délétion 22q11

Le Syndrome de DiGeorge (DGS) résulte d'une altération du développement embryonnaire des troisième et quatrième arcs branchiaux. L'expression clinique de ce syndrome est extrêmement hétérogène associant notamment un défaut au niveau du thymus, des parathyroïdes et des anomalies du tronc cardiaque. Ces organes et tissus sont embryologiquement issus de cellules de la crête neurale dans la région rhomboencéphalique postérieure. Selon le degré de déficit immunitaire engendré par l'aplasie thymique, on parle de syndrome de DiGeorge partiel ou complet.

Ce syndrome est aujourd'hui inclus dans une entité beaucoup plus large : incluant également le syndrome velocardiofacial (VCFS) qui associe des anomalies cardiaques et des dysmorphies faciales. Actuellement, les similitudes et les recoupements phénotypiques entre le DGS et le VCFS ainsi que leur association avec la délétion 22q11.2 conduit à les regrouper sous l'entité plus générale de *Syndrome de la délétion 22q11.2*. A noter que le regroupement de maladies qui impliquent une délétion 22q11.2 a également été appelé CATCH 22, un acronyme des caractéristiques principales de ces syndromes (Cardiac defects, Abnormal facies, Thymic hypoplasia/aplasia, Cleft palate, Hypocalcemia, deletion 22q11).

I-3-1 Les mutations

Le syndrome de la délétion 22q11.2 est le plus fréquent des syndromes de microdélétion avec une incidence estimée de 1/4000 naissances vivantes. Une délétion de 3 millions de paires de bases (Mb) est retrouvée à l'état hétérozygote chez 90% des patients et une délétion de 1.5 Mb chez 7 % des patients avec délétion 22q11.2 (Edelmann *et al*, 1999). La plupart de ces délétions incluent la perte d'un ensemble de gènes définissant la région critique minimale du syndrome de DiGeorge : cette région critique minimale est restreinte à 250 kb et comprend 24 à 30 gènes. Certains de ces gènes sont candidats pour expliquer le phénotype observé chez les patients atteints du syndrome de DiGeorge. L'un d'entre eux est *HIRA*, codant pour une protéine analogue aux protéines répresseurs de gènes d'histone identifiées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Wilming *et al*, 1997). Cependant, chez la souris haplo-insuffisante pour ce gène, aucune anomalie n'a été observée. On peut toutefois imaginer que l'haplo-insuffisance d'un

même gène n'ait pas la même traduction phénotypique chez l'homme et chez la souris (Lipinski *et al*, 1999). Le second gène candidat est *UFDIL* codant pour une protéine analogue à celle impliquée dans la dégradation des protéines ubiquitinées chez la levure. Il a été montré que l'haplo-insuffisance de *UFDIL* chez la souris entraînait le même défaut cardiaque et crano-facial que dans le syndrome de DiGeorge (Schinke *et al*, 1999). Cependant, ces données sont assez controversées (Lipinski *et al*, 1999).

Plus récemment, une mutation du gène *TBX1* a été retrouvée chez deux patients atteints d'un syndrome de DiGeorge complet sans délétion 22q11.2 (Yagi *et al*, 2003}. *TBX1* se trouve dans la région 22q11.2 et code pour un facteur de transcription requis pour le développement cardiaque. Ce gène semble être le meilleur candidat, *TBX1* étant délété dans tous les cas de délétion 22q11.2 et le phénotype du modèle murin mutant étant similaire à celui observé chez les patients atteints du syndrome de DiGeorge (Baldini *et al*, 2003). De plus, comme nous l'avons vu, 2 patients atteints d'un syndrome de DiGeorge sans délétion 22q11 ont une mutation du gène *TBX1* (Yagi *et al*, 2003}.

Dans certains cas de Syndrome de DiGeorge une hémizygotie pour 10p13 est parfois retrouvée (Daw *et al*, 1999).

I-3-2 Les conséquences sur la Réponse Immunitaire

Le déficit immunitaire est une des composantes du syndrome de DiGeorge retrouvée de façon variable selon les patients. Il est secondaire à l'aplasie ou l'hypoplasie thymique, organe fondamental dans le développement des lymphocytes T (Jawad *et al*, 2001). Cependant, seuls les patients atteints d'un syndrome de DiGeorge complet avec absence du thymus présentent un déficit marqué de l'immunité cellulaire. Pour les autres, le déficit de l'immunité cellulaire est beaucoup moins marqué. En effet, ce déficit immunitaire est maintenant étudié depuis 50 ans et a pour caractéristique d'être extrêmement variable : de l'absence de lymphocytes T lors d'aplasie thymique complète à un nombre de lymphocytes T normal. La fonction des lymphocytes T est préservée, même si les tests de prolifération aux mitogènes sont souvent diminués lorsque le nombre de lymphocytes T est faible (Bastian *et al*, 1989). Des déficits en IgA, des hypogammaglobulinémies et des défauts de production d'anticorps fonctionnels ont été décrits

occasionnellement et semblent être secondaires au déficit en lymphocytes T (Junker, *et al*, 1995 ; Smith *et al*, 1998; Gennery *et al*, 2002).

1-3-2-1 Rappel sur le rôle du thymus dans la maturation des lymphocytes T (Spits *et al*, 2002)

Le rôle du thymus est de permettre la maturation des lymphocytes T c'est-à-dire l'acquisition d'un récepteur T (TcR) fonctionnel capable de reconnaître les peptides antigéniques étrangers lorsqu'ils sont présentés dans le contexte HLA du soi. Le rôle du thymus est également d'assurer l'élimination de clones T autoréactifs.

Les thymocytes arrivent de la moelle osseuse dans la zone corticale du thymus. Ils sont à ce stade triples négatifs CD3- CD4- CD8-. La première étape de la maturation des lymphocytes T se situe dans la recombinaison des gènes qui codent pour les chaînes α et β du TcR. De nombreux thymocytes sont éliminés à ce stade car ils ne parviennent pas à effectuer des réarrangements productifs. Lorsqu'un TcR fonctionnel est exprimé à la surface du thymocyte (devenu double positif à ce stade : CD4+CD8+), il rencontre alors les molécules HLA du soi à la surface des cellules épithéliales corticales. Seuls les thymocytes possédant un TcR capable de reconnaître les molécules HLA du soi passent cette étape nommée la sélection positive. La dernière étape de sélection située dans la zone cortico-médullaire consiste en la présentation aux TcR de peptides du soi (tous ceux présents dans le thymus) dans le contexte HLA du soi. A ce stade, tous les thymocytes sont voués à l'apoptose. Seuls ceux dont le TcR ne rencontre pas de ligand passeront cette étape appelée sélection négative. En revanche, tous les thymocytes dont le TcR reconnaît un peptide du soi sont éliminés. Les thymocytes ayant passé cette dernière étape de sélection se retrouvent dans la zone médullaire du thymus et perdent soit le CD4 soit le CD8 pour devenir simples positifs. Ils sont alors prêts à quitter le thymus pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires lieux de la réponse immunitaire. Ces lymphocytes T qui sortent tout juste du thymus sont appelés des « nouveaux émigrants thymiques » et présentent dans leur noyau une petite portion d'ADN circulaire provenant de la recombinaison des gènes du TcR appelée TREC (T-cell receptor rearrangement excision circles) qu'ils vont perdre au cours des divisions cellulaires. La présence de ces TREC est le témoin d'une production thymique.

1-3-2-2 Origine du déficit immunitaire dans le syndrome de DiGeorge.

Chez les patients atteints d'un syndrome de DiGeorge complet, le thymus est souvent absent et l'immunité cellulaire fortement altérée. En revanche, chez les patients atteints d'un syndrome de DiGeorge partiel, l'impact variable sur l'immunité cellulaire est probablement dû à

la migration anormale des structures thymiques au cours de l'embryogénèse (Sediva *et al*, 2005). Une étude rétrospective a d'ailleurs été réalisée chez des enfants présentant les caractéristiques d'un syndrome de DiGeorge et a pu montrer des localisations aberrantes du tissu thymique, principalement au niveau du rétro-pharynx (Shah *et al*, 2001). Chez les patients atteints de DiGeorge partiel il semble très probable que le thymus ne soit pas absent mais plutôt localisé de façon aberrante. L'absence de thymus ou la localisation aberrante du thymus entraîne des perturbations plus ou moins graves de la thymopoïèse à l'origine des perturbations de l'immunité cellulaire. L'équipe de Sediva *et al*, a réalisé une étude sur 34 enfants atteints d'un syndrome de DiGeorge partiel. Ils n'ont pas pu mettre en évidence de localisation aberrante des structures thymiques faute de technique simple de détection *in vivo*. Cependant, cette équipe a pu observer les signes d'un développement progressif mais retardé des cellules T. Ces résultats laissent penser que les structures thymiques résiduelles, même localisées de façon aberrantes restent en partie fonctionnelles. Une autre hypothèse est que le thymus, bien qu'important n'est pas indispensable dans le développement des lymphocytes T, comme cela a pu être montré récemment chez la souris (Martinic *et al*, 2003). Cependant, cette dernière hypothèse ne permet pas d'expliquer l'absence totale de lymphocytes T observée chez certains patients atteints d'un syndrome de DiGeorge complet.

1-3-2-3 Caractéristiques du déficit immunitaire dans le syndrome de DiGeorge.

Nous allons analyser successivement le déficit immunitaire cellulaire et le déficit immunitaire humoral et nous envisagerons pour chacun le phénotype complet puis le phénotype partiel du syndrome de DiGeorge.

1-3-2-3-1 : Le déficit immunitaire cellulaire

A- Le cDGS

Les patients atteints de cDGS présentent une lymphopénie T majeure liée à l'absence de thymus. Il n'est pas rare que cette lymphopénie T soit masquée par une production de lymphocytes T n'ayant pas mûri dans le thymus. L'analyse de ces lymphocytes T révèle un caractère oligoclonal, résultant d'une expansion périphérique d'un nombre limité de clones T et pouvant conduire à une expression clinique comparable à celle du syndrome d'Ommen (Pirovano *et al*, 2003). Ces cas posent le problème du diagnostic différentiel notamment avec le pDGS, car ils nécessitent un traitement par greffe de cellules allogéniques ou par greffe de tissus thymiques (Markert *et al*, 2004). L'observation de tels cas, appelés *cDGS atypiques*, a conduit à redéfinir les critères biologiques permettant de poser le diagnostic de cDGS.

Markert *et al* rapportent, en 2004, les cas de 5 patients atteints de cDGS présentant des taux de lymphocytes T normaux ou diminués, mais évoluant favorablement dans le temps, associés à des réponses prolifératives normales ou diminuées mais là encore évoluant parfois favorablement avec le temps. Les auteurs suggèrent alors que les cDGS soient définis à l'aide de paramètres biologiques rendant compte de l'absence ou de la faiblesse du rendement thymique : les lymphocytes T naïfs co-exprimant CD45RA et CD62L et les TRECs. En effet, les 5 patients présentés dans cette étude ont des lymphocytes T circulants capables de répondre aux mitogènes. En revanche, le taux de CD3+ CD45RA+ CD62L+ est inférieur à 50/mm³ et les TRECs < 1000/10⁶ cellules T (réalisé chez 3 patients sur 5 où aucun TRECs n'a été détecté). Pirovano *et al* rapportent le cas d'un enfant atteint de cDGS présentant un nombre de TRECs très faible comparé à la moyenne des TRECs décelés chez 10 enfants en bonne santé du même âge : 2213 TRECs/10⁶ lymphocytes versus 196 689 TRECs/10⁶ lymphocytes (Pirovano *et al*, 2003). Ce chiffre est supérieur au critère donné par Markert *et al*, mais reste toutefois très faible.

Les publications antérieures aux travaux de Markert et de Pirovano ne prennent en compte pour la définition du cDGS que le taux de lymphocytes T CD4+ et l'absence de réponse proliférative à la PHA. Ces seuls critères peuvent ne pas être réunis chez certains patients atteints de cDGS atypique, comme nous l'avons vu précédemment, et à l'opposé peuvent conduire à poser abusivement le diagnostic de cDGS. L'équipe de Bastian avait proposé en 1989 les critères biologiques suivants de définition du cDGS :

- CD4+ < 400/mm³

et - Index de Transformation à la PHA < 10.

Les auteurs ont décrit une cohorte de 18 patients atteints de DGS (Bastian *et al*, 1989). Parmi eux, 4 patients montrant un profond déficit en lymphocytes T persistant dans le temps ont été étiquetés cDGS. Cependant, au regard des publications actuelles, la proportion de cDGS paraît très élevée. Le nombre de lymphocytes CD4+ est extrêmement diminué chez ces 4 patients, alors que le nombre de lymphocytes CD8+ est peu altéré. Sur le plan fonctionnel, l'étude de la prolifération aux mitogènes *in vitro* montre une fonction altérée (index de transformation avec la PHA < 10) persistante dans le temps.

La même année, Muller *et al*, ont également décrit une population de 16 enfants, 13 atteints de pDGS et 3 de cDGS (Muller *et al*, 1989). A nouveau, la proportion de cDGS paraît excessivement élevée. Un seul patient atteint de cDGS a été étudié et les pourcentages retrouvés et le nombre de lymphocytes pour chacune des sous populations étaient normaux. En revanche, la réponse proliférative à la PHA des enfants atteints de cDGS était significativement plus faible que celle de ceux atteints de pDGS (p<0.02).

Collard *et al* en 1999 ont décrit le cas d'un enfant atteint de cDGS. La population CD3+ a été analysée de J5 ($0/\text{mm}^3$) à J167 ($604/\text{mm}^3$), les cellules étant exclusivement CD4+ à J167 du fait probablement d'une expansion oligoclonale. La réponse proliférative aux différents mitogènes était extrêmement faible.

Dans les études récentes, l'analyse du répertoire a été rapportée par deux équipes dans le cDGS. Collard *et al* ont étudié dans le cadre d'un cas clinique les familles TCR V β 1 à 10 et ont observé une expression restreinte des réarrangements du TCR au sein de chaque famille (Collard *et al*, 1999). Dans un autre cas clinique, le profil inhabituel du répertoire V β est décrit avec expansion de certaines familles (notamment TCR V β 14) et au contraire contraction d'autres (notamment TCRV β 8) (Pirovano *et al*, 2003). Les auteurs confirment la présence de cellules T mono/oligoclonales.

B- Le pDGS

Le nombre de lymphocytes T et leur fonction

Plusieurs études ont été réalisées sur des patients atteints de pDGS. L'équipe de Sullivan a suivi 19 patients de la naissance à l'âge d'un an et a montré que le nombre de lymphocytes T était souvent plus faible que chez les sujets contrôle à la naissance mais non significativement différent à 1 an (Sullivan *et al*, 1999). La réponse proliférative à la PHA était largement préservée. Puis, la même équipe a rapporté une étude portant sur 195 patients répartis en 4 tranches d'âge différents (0-6mois, 6-38 mois, 38-109 mois, et > 109 mois). Dans chaque tranche d'âge, le nombre de lymphocytes T était plus faible que les valeurs contrôles normales. Cependant, le déclin au cours du temps du nombre de lymphocytes T était plus lent que dans le groupe contrôle (Jawad *et al*, 2001). Ces résultats sont confirmés par l'équipe de Chinen qui a réalisé une analyse des lymphocytes T sur 45 enfants atteints de pDGS de 1 mois à 10 ans. Le nombre de lymphocytes T s'est révélé inférieur aux contrôles quel que soit l'âge mais la diminution avec le temps était plus faible que chez les contrôles. De plus, la réponse proliférative aux mitogènes était normale pour 41 patients, diminuée initialement pour 4 patients puis se normalisant dans le temps pour 2 patients qui ont pu être recontrôlés (Chinen *et al*, 2003). L'équipe de Sedivà rapporte une étude portant sur 34 enfants atteints de pDGS suivis de la naissance à 19 ans. Le nombre de lymphocytes CD3+ est initialement significativement diminué par rapport aux valeurs normales pour l'âge mais se normalise habituellement vers 24 à 36 mois (Sedivà *et al*, 2005). Par ailleurs, les auteurs retrouvent une prolifération spontanée et à la PHA

augmentée chez les enfants de moins de 24 mois par rapport aux contrôles. Au-delà de l'âge de 2 ans, cette différence n'apparaît plus.

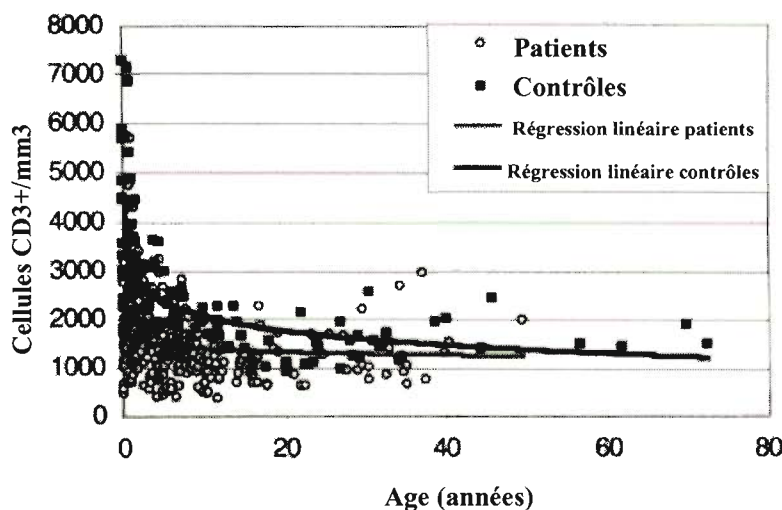


Figure 9: Déclin des lymphocytes T CD3+ avec l'âge chez les patients et les contrôles. Le nombre de lymphocytes T CD3+ est plus faible chez les patients, quelque soit l'âge mais ont une vitesse de déclin plus lente que chez les contrôles (d'après Piliero *et al*, 2004)

Parmi les études plus anciennes, Bastian *et al* décrivent pour 14 patients atteints de pDGS, que le nombre de lymphocytes T était initialement normal sauf dans 2 cas qui se sont normalisés avec le temps. Sur le plan fonctionnel, aucune altération n'a été mise en évidence et la fonction est restée normale après 12 mois de suivi (Bastian *et al*, 1989). Muller *et al* observent dans la moitié des cas d'une série de 13 patients atteints de pDGS une diminution du pourcentage de lymphocytes CD3+ ainsi que du pourcentage de CD4+. Le pourcentage de CD8+ n'est pas altéré à l'exception d'un patient et le rapport CD4/CD8 est inversé chez 2 patients. Ces résultats ne sont pas retrouvés par Durandy *et al* qui montrent à la même époque que les lymphocytes T CD8+ des nouveaux nés et des enfants atteints de pDGS ont une différenciation retardée dans le temps (Durandy *et al*, 1986). Les discordances viennent peut-être du fait que les données sont exprimées en pourcentage et non en valeur absolue dans l'étude de Muller *et al*.

Les lymphocytes T immatures et les TRECs

L'équipe de Pierdominici *et al*, a réalisé une très belle étude chez 9 patients atteints de pDGS. Ils retrouvent une fréquence de cellules T CD4+ naïves CD45RA+CD62L+

significativement diminuée par rapport à des témoins sains de même âge : $59 \pm 15\%$ vs $74 \pm 10\%$ ($p = 0.01$) et parallèlement une augmentation significative de la fréquence des cellules T CD4+ mémoires (CD45RA-CD62L+ et CD45RA-CD62L-) : $40 \pm 15\%$ vs $25 \pm 10\%$ ($p = 0.01$) (Pierdominici *et al*, 2003). En revanche, parmi les lymphocytes T CD8+, seule la population mémoire est retrouvée significativement augmentée : $28 \pm 16\%$ vs $14 \pm 7\%$ ($p = 0.02$). L'étude des TRECs révèle des taux de TRECs significativement plus faibles chez les patients pDGS que chez les contrôles du même âge, tant sur la population CD4+ (45 ± 31 vs 210 ± 80 copies/100ng d'ADN) que CD8+ (57 ± 33 vs 190 ± 95 copies/100ng d'ADN). Cependant, (même si les unités ne sont pas les mêmes que ci-dessus), on s'aperçoit que la proportion de TRECs retrouvée chez les pDGS par rapport aux contrôles est bien supérieure à ce qui est retrouvé chez les cDGS (30 à 38% vs 1%). L'équipe de Sullivan rapporte des résultats similaires dans une étude portant sur 409 patients avec délétion 22q11.2 et de phénotype pDGS. Les auteurs décrivent un déclin accru des lymphocytes T CD4+ naïfs CD4+CD45RA+ au cours du temps comparé au groupe témoin (Piliero *et al*, 2004).

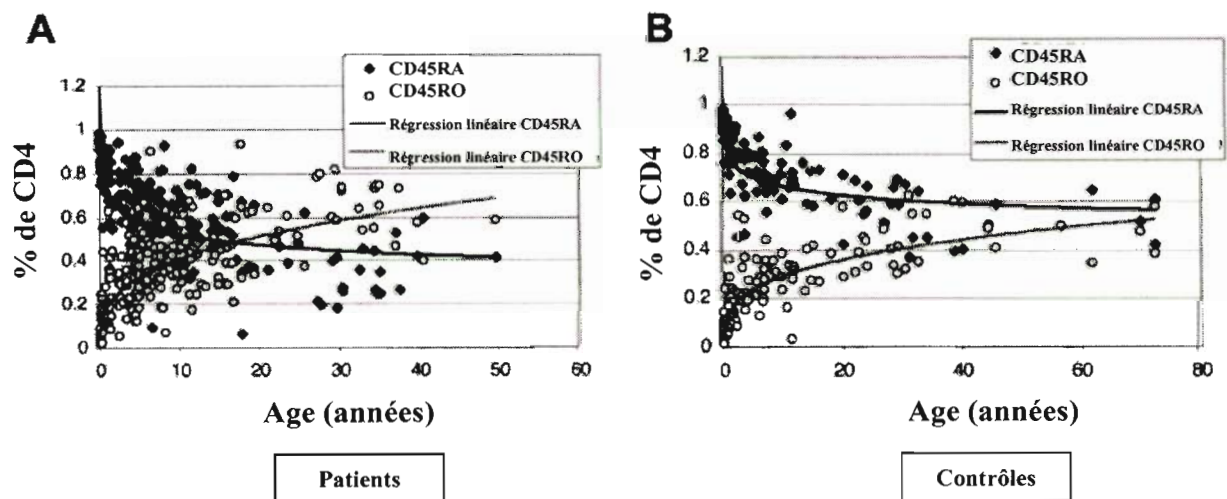


Figure 10: Expression des CD45RO et CD45RA au sein des lymphocytes T CD4+ chez les patients et les contrôles. L'accumulation de cellules CD45RO est considérablement accélérée chez les patients (A) par rapport aux contrôles (B) (d'après Piliero *et al*, 2004)

L'analyse des TRECs au sein de la population CD4+CD45RA+ a montré une diminution par rapport au groupe témoin du nombre de TRECs : 7491 TRECs/ μ g d'ADN vs 19594 TRECs/ μ g d'ADN ($p = 0.0017$) (soit environ 38% du témoin). Enfin, dans l'étude de Cancrini *et al*, portant sur 7 enfants atteints de pDGS, une diminution du nombre de cellules T CD4+CD45RA+ est retrouvée chez 3 enfants sur 7 (Cancrini *et al*, 2005). De façon très

surprenante, les taux de TRECs sont particulièrement affectés chez tous les patients et sont comparables pour la population CD4+ à ceux des cDGS présentés par Markert *et al*:

- dans la population CD4+ : < 50 TRECs/10⁶ lymphocytes T CD4+ (vs 29 242 TRECs/10⁶ lymphocytes T CD4+ dans le groupe témoin) (< 1%)
- dans la population CD8+ : de < 50 à 3984 TRECs/10⁶ lymphocytes T CD8+ (vs 20 760 TRECs/10⁶ lymphocytes T CD8+ dans le groupe témoin) (de < 1% à 19%)

L'analyse de répertoire V β des récepteurs T

L'analyse du répertoire V β des récepteurs T chez les patients atteints de pDGS est variable selon les études. Sedivà *et al*, rapportent chez 34 enfants un répertoire T polyclonal (étudié par cytométrie en flux) et signalent une légère augmentation du pourcentage de V β 16 et une légère diminution du pourcentage de V β 2, 17 et 18 (Sedivà *et al*, 2005).

En revanche, 3 autres auteurs montrent des altérations majeures du répertoire T. Pierdominici *et al*, décrivent par analyse en cytométrie en flux des altérations plus importantes au sein des CD8+ que des CD4+ :

- une expansion des sous familles V β 7.2, 11 et 13.1 au sein des CD4+ et aucune délétion de sous familles
- une expansion des sous familles V β 1 et 11 au sein des CD8+ et une délétion des sous familles V β 7.2 chez un patient et V β 18 chez un autre (Pierdominici *et al*, 2003).

L'étude des CDR3 montre que le répertoire est restreint pour 54% des sous familles V β des CD4+ et pour 60% des sous familles V β des CD8+. De même, Sullivan *et al* rapportent une analyse des CDR3 sur 7 patients sans distinction entre les populations CD4+ et CD8+, révélant un nombre de sous familles oligoclonales 2 fois plus important que dans le groupe contrôle (5.3 vs 2.4, p = 0.179) et un nombre de familles V β manquantes 10 fois plus élevé que dans le groupe contrôle (2.7 vs 0.3, p = 0.0008) (Sullivan *et al*, 2004). Enfin, Cancrini *et al*, décrivent un répertoire T avec profil polyclonal normal au sein des CD4+ sauf chez 3 patients sur 7 où apparaissent des altérations de certaines familles (10%, ou 21% ou 23% d'altérations selon les patients) (Cancrini *et al*, 2005). En revanche, le répertoire T est très perturbé au sein des CD8+ chez tous les patients (de 74% à 100% d'altérations selon les patients). Cependant, après 1 à 2 ans, le pourcentage de familles altérées diminue. A noter qu'une plus grande expansion (mais non significative) a été observée dans la sous population CD8+ chez les patients ayant eu des

infections récurrentes. Toutefois, les auteurs concluent que le répertoire altéré des CD8+ reflète un défaut au niveau du développement des lymphocytes T et n'est pas secondaire à des stimulations antigéniques conduisant à des expansions clonales.

L'analyse de la longueur des Télomères

Un seul auteur rapporte ce type d'étude chez des patients atteints de pDGS. Le rendement thymique étant diminué chez ces patients, le maintien dans le temps d'un nombre de lymphocytes T dans les limites de la normale peut être lié à une expansion accrue des clones T. En effet, les auteurs montrent chez 7 patients une longueur moyenne des télomères au sein de la population CD4+CD45RA+ significativement plus faible que dans un groupe témoin d'âge équivalent (7.8 kb en moyenne vs 9.0 kb en moyenne chez les témoins, $p = 0.05$) (Piliero *et al*, 2004). Cette différence correspond approximativement à 5 divisions cellulaires.

En conclusion, toutes ces données révèlent un défaut de production thymique des lymphocytes T (partiel dans le pDGS et complet dans le cDGS). Ce défaut est compensé par une prolifération accrue de certains clones de lymphocytes T (expansion clonale) afin de maintenir un nombre de lymphocytes T légèrement plus faible que chez les témoins sains. Nous avons vu cependant que dans les pDGS la conversion des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T mémoires est accrue avec l'âge, de même que la délétion de certaines familles V β . Ceci peut avoir des conséquences fonctionnelles puisque les réponses T secondaires sont perturbées chez les sujets adultes soit à cause du répertoire T perturbé, soit à cause de télomères trop courts ne permettant plus la division cellulaire. Ainsi, les patients les plus âgés ont un nombre de lymphocytes T qui paraît normal mais une fonction proliférative et une diversité du répertoire altérée (Sullivan *et al*, 2004).

1-3-2-3-2 : Le déficit immunitaire humoral

Le déficit immunitaire humoral est généralement considéré comme secondaire au déficit cellulaire.

A- Le cDGS

Les Immunoglobulines sériques

Les auteurs s'accordent à dire que le taux d'IgG n'est pas informatif car il s'agit dans un premier temps le plus souvent d'une transmission materno-fœtale puis, les patients sont sous substitution d'Ig IV principalement dans les cDGS. Il est alors difficile de se faire une idée précise de la variation des autres isotypes (Pirovano *et al*, 2003 ; Collard *et al*, 1999). Toutefois,

parmi les cas cliniques décrits dans la littérature, on retrouve des patients atteints de cDGS avec des taux d'immunoglobulines normaux quelque soit l'isotype (Al-Tamemi *et al*, 2006). En revanche, Muller *et al*, ont pu montrer que les patients atteints de cDGS présentaient un SD-score négatif pour tous les isotypes à l'exception des IgG certainement d'origine maternelle. (Le SD score permet de comparer les taux d'Immunoglobulines indépendamment de l'âge, les valeurs normales se situant entre -2 et +2, une valeur à 0 représentant le 50^{ème} percentile pour un age donné).

Les anticorps spécifiques

Bastian *et al*, montrent que sur les 4 enfants atteints d'un cDGS, aucun ne peut produire des anticorps spécifiques et ils suggèrent en 1989 que l'étude de cette réponse spécifique est certainement très utile pour contribuer à la caractérisation du DGS (Bastian *et al*, 1989). Parallèlement, Muller *et al*, ont étudié la réponse anticorps à la BSA (Bovine serum albumin) et ont montré l'absence d'activité anti-BSA chez les 3 patients atteints de cDGS (Muller *et al*, 1989). Nous avons nous-mêmes décrit le cas d'un enfant atteint de cDGS qui ne produisait pas d'anticorps après vaccinations répétées (Bensoussan *et al*, 2002).

B- Le pDGS

Les Immunoglobulines sériques

Parmi les patients atteints de pDGS, 6 patients sur 13 présentaient des scores positifs pour tous les isotypes, 2 pour tous les isotypes sauf les IgE, 2 pour IgA et IgG mais des scores négatifs pour IgM et IgE (Muller *et al*, 1989). Plus récemment, Sedivà *et al*, ont confirmé que chez les patients atteints de pDGS, le déficit humoral n'était pas profond. Ils ont toutefois observé une petite diminution des IgA chez 12 patients sur 34 et une petite diminution des IgM chez 11 patients sur 34 (Sedivà *et al*, 2005). Ce déficit ne s'est pas amandé au cours du suivi de 72 mois pour 5 enfants.

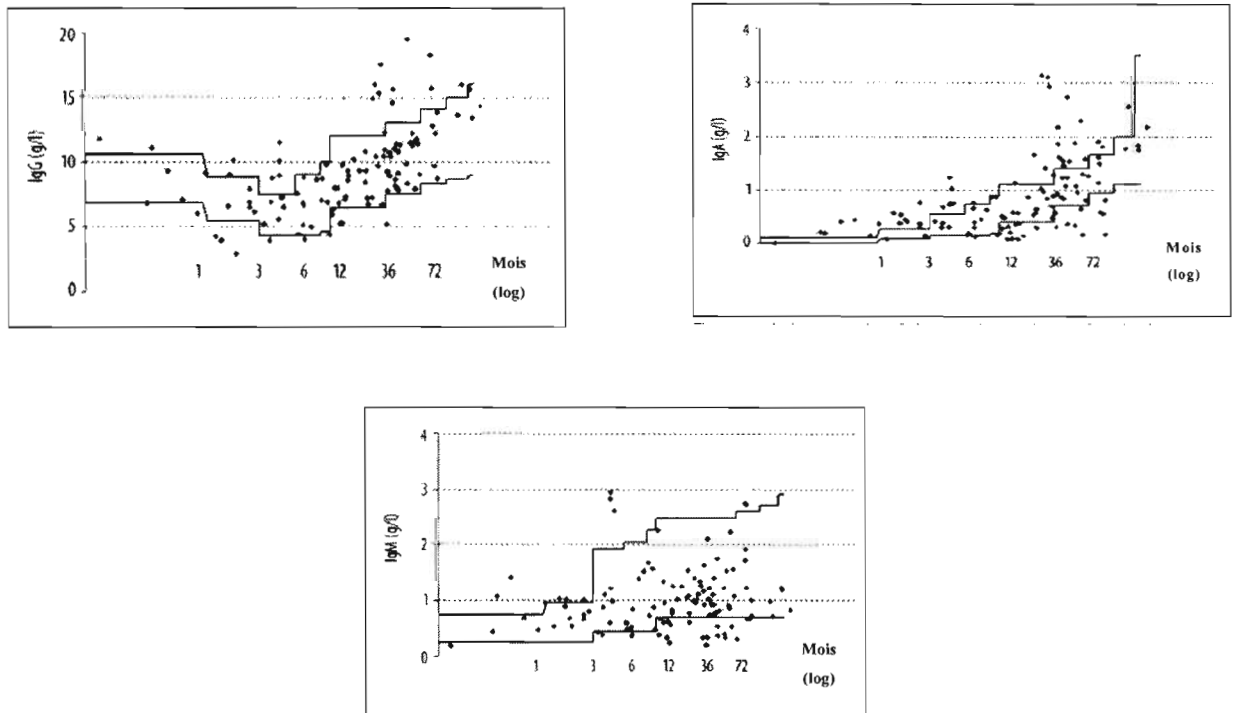


Figure 11: Evolution en fonction de l'âge des IgG, IgA et IgM. Les valeurs normales par âge plus ou moins 2 DS sont représentées par les lignes (d'après Sedivà *et al*, 2005)

Les anticorps spécifiques

Dans le cas des pDGS, les réponses spécifiques sont variables d'un individu à l'autre. Certains auteurs rapportent dans leur série 4 patients sur 13 qui produisent des taux élevés d'anticorps spécifiques (Muller *et al*, 1989). De la même façon, dans une autre étude 3 enfants sur 7 sont incapables de produire des anticorps spécifiques après vaccination (Cancrini *et al*, 2005).

I-3-3 Les conséquences cliniques

La présentation clinique des patients présentant une délétion 22q11.2 est extrêmement variable d'un patient à l'autre. Sullivan, en 2004, a réalisé une synthèse de toutes les présentations cliniques décrites dans la littérature à ce jour qui sont reprises dans le tableau 2.

Présentation clinique	Fréquence (%)
Anomalies cardiaques	49-83
Tétralogie de Fallot	17-22
Arc aortique interrompu	14-15
Défaut ventriculo-septal	13-14
Tronc artériel commun	7-9
Hypocalcémie	17-60
Déficit en hormone de croissance	4
Anomalies palatines	69-100
Fente palatine	9-11
Fente palatine sous muqueuse	5-16
Insuffisance vélopharyngée	27-32
Luette bifide	5
Anomalies rénales	36-37
Absent/dysplasique	17
Obstruction	10
Reflux	4
Anomalies ophtalmologiques	7-70
Vaisseaux rétiens tortueux	58
Embryotoxons postérieurs	69
Anomalies dentaires : sorties retardées, etc..	2.5
Anomalies squelettiques	17-19
Anomalies vertébrales	19
Anomalies des extrémités inférieures	15
Retard d'élocution	79-84
Comportement/problèmes psychiatriques	9-50
Hyperactivité, défaut d'attention	25
Schizophrénie	6-30

Tableau 1 : Manifestations cliniques pouvant être retrouvées chez les patients atteints du syndrome de la délétion 22q11.2 (d'après Sullivan, 2004)

Toutefois, les principaux signes cliniques décrits chez les patients atteints de DGS sont présentés par Muller *et al* en 1988. Tous les enfants étudiés (16/16) présentent des anomalies faciales caractéristiques : implantation basse des oreilles, lèvre supérieure en avant accentuée par un petit menton. Des anomalies cardiaques sont également décrites chez 14/16 patients (défaut ventriculaire, tétralogie de Fallot et tronc artériel commun). L'hypocalcémie, consécutive à un hypoparathyroïdisme a été rapportée chez 11/16 enfants. Tous les enfants de cette étude présentent un retard psychomoteur modéré à sévère et des difficultés dans l'apprentissage. L'absence ou l'hypoplasie thymique a déjà été largement discutée dans le chapitre précédent ainsi que ses effets sur la réponse immunitaire. Les conséquences directes sont les risques

infectieux associés, le développement de maladie autoimmune à plus long terme et potentiellement de pathologie tumorale (Sullivan *et al*, 2004).

I-3-4 Les éléments biologiques diagnostiques contribuant à poser le diagnostic de cDGS

Comme nous l'avons mentionné précédemment, il n'est pas toujours aisé de poser le diagnostic de cDGS. Or, une fois ce diagnostic posé, il est nécessaire de proposer aux patients sans délai un traitement soit par injection de cellules allogéniques soit par greffe de tissus thymiques.

Il semble clair après la revue bibliographique que nous venons de faire que seule la mise en évidence d'une altération majeure de la production de nouveaux émigrants thymiques permet de poser le diagnostic de cDGS.

1-3-4-1 Mise en évidence de nouveaux émigrants thymiques

La technique initialement utilisée et toujours d'actualité est la technique des TRECs (T-cell receptor rearrangement excision circles). Cette technique n'est pas réalisée dans tous les laboratoires et est actuellement supplantée par une technique de cytométrie en flux utilisant le marquage : CD31+CD45RA+/CD4+ (Kimming *et al*, 2002).

1-3-4-2 Analyse des sous populations lymphocytaires T par cytométrie en flux

1-3-4-3 Tests de transformations lymphocytaires

Ces deux derniers éléments ont été largement évoqués précédemment et leurs limites clairement démontrées.

II- APPROCHES THERAPEUTIQUES DE CES SYNDROMES PAR ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) se situent, pour la majorité, dans la moelle des os plats (vertèbres, côtes, sternum, bassin), des os longs (fémur...), et circulent, pour un petit nombre, dans le sang. Elles présentent un antigène témoin de leur immaturité, l'antigène CD34. Les CSH sont des précurseurs de tous les types cellulaires du tissu sanguin. Leur durée de vie est indéterminée. Elles sont définies comme pluripotentes (car trop matures pour être totipotentes), et quiescentes, car lors de la mitose, une des cellules filles se différencie, et l'autre reste au stade immature pour renouveler le stock de CSH.

L'allogreffe de CSH permet de remplacer, par des CSH normales provenant d'un donneur sain, un tissu hématopoïétique déficient (cas des Déficits Immunitaires), ou envahi par des cellules malignes. Cependant les réactions d'alloréactivité bi-directionnelles imposent de respecter une compatibilité sur le plan des antigènes majeurs d'histocompatibilité (HLA) de classe I (A, B, C) et de classe II (DR et DQ). Les antigènes HLA DP sont pris en considération pour des malades à haut risque de rejet. Les typages HLA réalisés initialement par techniques sérologiques se sont considérablement affinés ces dernières années par l'apport des techniques de Biologie Moléculaire et sont devenus des typages de Haute Résolution.

Les différents types de donneurs à partir desquels il est possible de réaliser une allogreffe sont soit :

- *des donneurs génoidentiques* présentant une compatibilité HLA complète avec le receveur. Cependant, seuls 25 à 30% des patients nécessitant une greffe disposent d'un donneur génoidentique.

- *des donneurs phénoïdentiques* : Ce sont des donneurs non apparentés recensés sur un fichier de donneurs volontaires de moelle osseuse (DVMO) ou un fichier de sang de cordon. Les DVMO sont inscrits dans un registre national consultable par tous les pays du monde, par l'intermédiaire d'un organisme de tutelle (l'Agence de BioMédecine en France). Les antigènes HLA du donneur doivent être les plus proches possibles de ceux du malade. La compatibilité retenue le plus fréquemment pour le choix d'un DVMO est 10/10^{ème} voire 9/10^{ème} (c'est à dire 10

antigènes ou 9 HLA identiques entre donneur et receveur) et pour le choix d'un sang de cordon entre 4/6^{ème} et 6/6^{ème} (seule une identité A, B et DR est recherchée).

- *des donneurs haploidentiques* : Ce sont les donneurs intra-familiaux (père ou mère) qui possèdent un haplotype HLA différent du receveur.

Les différents types de greffons à partir desquels il est possible de réaliser une allogreffe sont soit :

- *La Moelle Osseuse*

Il s'agit de la source principale de CSH pour les greffes allogéniques. L'aspiration se fait sous anesthésie générale au niveau des crêtes iliaques postérieures (antérieures et du sternum si nécessaire), sur anticoagulant. La moelle osseuse (MO) est ensuite traitée par filtration pour éliminer les particules osseuses et graisseuses, et éventuellement par centrifugation pour concentrer les cellules mononucléées (CMN). Un greffon de bonne qualité contient environ 2.10^8 cellules nucléées totales / kg de poids du receveur.

- *Les cellules souches périphériques* :

Les cellules souches périphériques (CSP) sont très souvent utilisées dans les greffes autologues et de plus en plus dans des allogreffes. Des facteurs de croissance sont administrés au donneur pour favoriser la mobilisation et la sortie des progéniteurs hématopoïétiques de la MO vers le sang. Le G-CSF est le facteur le plus fréquemment utilisé. Il a une action sur les polynucléaires neutrophiles qui vont produire des enzymes permettant de cliver les liaisons entre les CSH et leur environnement médullaire. Les CD34+ migrent alors pour se retrouver dans le sang. Cette méthode de collection des cellules CD34+ ne nécessite pas d'anesthésie générale. La totalité du volume sanguin du donneur est traité au moins 2 fois, et réinjecté en circuit fermé.

- *Le sang de cordon ou sang placentaire* :

Cette source de CSH est utilisée dans les greffes allogéniques. Le sang contenu dans le placenta et recueilli à travers la veine ombilicale du cordon est riche en CSH. Ces cellules présentent une immaturité immunitaire relative diminuant les risques de réaction du greffon contre l'hôte (GVHD).

La disparité au niveau de antigènes Majeurs ou mineurs HLA peut être à l'origine de la réaction d'alloréactivité qui peut s'exercer dans les 2 sens et engendrer des effets délétères (rejet ou GVHD), mais aussi l'effet thérapeutique du greffon dans le cas d'hémopathies malignes (réaction du greffon contre la leucémie, GVL) ou dans le cas de tumeurs solides (réaction du

greffon contre la tumeur : GVT). Nous ne décrivons que les réactions de rejet et de GVHD ainsi que leurs conséquences cliniques mais pas l'effet GVL qui ne concerne pas les allogreffes réalisées dans les Déficits Immunitaires Héréditaires.

1) Le rejet :

Les CSH injectées ne parviennent pas à s'établir de façon permanente chez le receveur. Le rejet est médié par les lymphocytes T du receveur selon un mécanisme d'alloréactivité directe. Le rejet peut être causé par l'injection d'une dose insuffisante de CSH qui ne parviennent pas prendre le dessus sur un nombre trop élevé de cellules immunocompétentes chez le receveur. Afin de limiter l'impact des cellules immunitaires du receveur et les risques de rejet du greffon, le patient reçoit avant la greffe un conditionnement de greffe.

Pour diminuer les risques de rejet, différentes stratégies de conditionnements sont possibles ; le conditionnement myéloablatif, et le conditionnement non myéloablatif.

- Le conditionnement myéloablatif (MA)

Le conditionnement MA vise à détruire la moelle du receveur afin d'éliminer les cellules du receveur. Les stratégies mises en œuvre pour atteindre ce degré d'immunodéficience sont le plus souvent la chimiothérapie, la radiothérapie et l'administration d'immunosuppresseurs. L'équipe du Pr A. Fischer à Necker a également utilisé en complément des anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules d'adhésion LFA1 et CD2 (de J-3 à J+10 de la greffe) ayant pour effet de diminuer les réactions d'alloréactivité. En effet, les premières interactions entre lymphocytes T et cellules présentatrices d'antigène se font par le biais des molécules d'adhésion. Ce n'est que dans un second temps qu'entre en jeu le récepteur T. C'est pourquoi l'utilisation de ces anticorps anti-molécules d'adhésion permet de prévenir efficacement le rejet de greffe.

Les cellules immunocompétentes du malade sont également éliminées, ce qui diminue les risques de rejet. Le receveur est dans un état d'immunodéficience complète, ce qui permet aux cellules du donneur de s'implanter plus facilement chez le receveur. Cependant la toxicité du conditionnement est forte et dans certains cas irréversible. De plus, il a été clairement montré que dans les Hémopathies malignes, l'effet thérapeutique de l'allogreffe n'était pas lié au conditionnement mais bien à l'effet GVL du greffon. C'est pourquoi sont apparus dans la fin des années 1990 des conditionnements moins toxiques ayant pour but de favoriser la tolérance du receveur vis-à-vis du greffon afin que l'effet GVL puisse s'exercer. Ces conditionnements ont été utilisés également dans les allogreffes réalisées dans d'autres indications que les Hémopathies

malignes comme par exemple dans les Déficits Immunitaires Héréditaires, du fait de leur moindre toxicité.

- Le conditionnement non myéloablatif (NMA)

L'objectif d'un conditionnement NMA n'est pas la destruction de la MO, mais, théoriquement, l'induction d'un état de tolérance immunologique du receveur vis à vis du greffon. Ainsi, les doses de chimiothérapie ou de radiothérapie myéloablatives utilisées sont très réduites, ce qui a pour corollaire de diminuer considérablement la toxicité du conditionnement. Toutefois, on peut souligner qu'il existe plusieurs niveaux de conditionnements entre les conditionnements MA et les conditionnements NMA avec des degrés de myélablation plus ou moins importants. Dans les conditionnements NMA, l'immunomodulation est obtenue par la Fludarabine et le Sérum anti-lymphocytaire (SAL). On peut toutefois noter que l'effet du SAL persistant plusieurs jours après administration, il exerce un effet de déplétion T *in vivo* sur le greffon et contribue aussi à la prévention de la GVHD.

2) La réaction du greffon contre l'hôte :

La réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) aiguë qui survient dans les 3 premiers mois post-greffe est une réaction des lymphocytes T immunocompétents du greffon contre les tissus du receveur. Les tissus cibles sont principalement la peau, le tube digestif, le foie et le tissu hématopoïétique. Il existe également une forme chronique de GVHD qui survient après J100 et peut toucher tous les organes et les tissus.

Les éléments déclencheurs de cette réaction sont la disparité HLA, et la sécrétion de cytokines.

Pour prévenir la GVHD, il est d'usage d'administrer des immunosuppresseurs (cyclosporine, corticoïdes...). Dans les cas d'incompatibilité HLA importante (notamment en situation haploidentique), il est nécessaire de dépler *ex vivo* le greffon en lymphocytes T.

La conséquence principale de ces réactions d'alloréactivité est la lenteur de la reconstitution immunitaire. Elle est en effet liée aux disparités HLA entre donneur et receveur, au conditionnement du patient, au type de greffon et à la survenue d'une GVHD nécessitant l'utilisation d'immunosuppresseurs. De plus, une fois greffés, les lymphocytes doivent être éduqués au sein du thymus du malade, qui est involué chez l'adulte, et peut être endommagé par la chimiothérapie.

Pendant la période du conditionnement et dans les premiers mois post-greffe, le patient traverse une phase d'immunodéficience aiguë, ce qui augmente les risques d'infections

opportunistes. Les infections sont les principales complications post-greffes. Les virus sont décrits comme étant les plus fréquents agents infectieux suivis par les bactéries et les champignons. Un an post-greffe, environ 68 % des greffés en CSP, et 65 % de greffés en MO ont déjà subi un épisode infectieux (viral, bactérien ou fongique). Parmi les virus, sont fréquemment mis en cause le Cytomégalovirus (CMV), le virus d'Epstein Barr (EBV) et l'Adénovirus (ADV). L'arsenal thérapeutique à disposition se révèle parfois insuffisant notamment dans les infections à EBV et dans les adénoviroses, rendant ces infections létales dans un contexte d'immunodépression majeure.

II-1- Etat de la littérature sur la greffe de CSH dans les Syndromes hyper IgM

Parmi tous les déficits moléculaires décrits à l'origine du syndrome Hyper IgM, seul le déficit en CD40L est susceptible d'être traité par allogreffe de CSH, à ce jour. Toutefois, le déficit en CD40, présentant le même tableau clinique que le déficit en CD40L, mais beaucoup plus rare est également un bon candidat pour l'allogreffe de CSH. Enfin, il a été récemment rapporté la première allogreffe de CSH permettant de traiter le déficit immunitaire chez un enfant atteint d'une dysplasie ectodermale anhydrotique de transmission autosomique dominante (AD-EDA-ID) (Dupuis-Girod *et al*, 2007). Nous reprendrons cet article et discuterons les perspectives de traitement du déficit immunitaire par allogreffes de CSH qui s'ouvrent pour XHM-ED.

Tous les patients atteints d'un déficit en CD40L reçoivent un traitement de substitution par des Immunoglobulines intra-veineuses (IVIG), une antibioprophylaxie contre les infections à *Pneumocystis jiroveci* et du G-CSF pour les neutropénies sévères symptomatiques (Levy *et al*, 1997). Cependant, ce traitement substitutif se révèle souvent insuffisant à long terme et l'apparition d'une atteinte hépatique, souvent corrélée à la présence de *Cryptosporidium parvum* est de très mauvais pronostic.

II-1-1- Greffe de CSH dans les Syndromes Hyper IgM avec déficit en CD40L

II-1-1-1 Allogreffes de Moelle osseuse (MO) avec conditionnement myéloablatif

La première allogreffe de MO pour un déficit en CD40L a été réalisée en 1993 par Fasth en situation génoidentique avec conditionnement myéloablatif (Fasth *et al*, 1993). Puis une deuxième expérience est rapportée en 1995 par l'équipe de Necker où la greffe de MO génoidentique a été proposée à un enfant de 7 ans ayant des antécédents d'infection à *Pneumocystis jiroveci* et ayant une histoire familiale sévère de ce déficit immunitaire (Thomas *et al*, 1995). Un conditionnement myéloablatif composé de Busulfan 20 mg/kg et cyclophosphamide 200 mg/kg a été administré. La prévention de la GVHD a été assurée par l'association ciclosporine et méthotrexate court. La greffe s'est déroulée sans complication et a permis la résolution du déficit en CD40L. Plusieurs autres expériences isolées de greffe génoidentique ont ensuite été rapportées dans la littérature, préconisant le même conditionnement et la même prophylaxie de la GVHD que précédemment (Bordigoni *et al*, 1998 ; Kato *et al*, 1999 ; Kawai *et al*, 1999 et Duplantier *et al*, 2001). Dans tous les cas, la greffe a été proposée

Auteurs	Donneur	n	Contexte clinique	Conditionnement	Prophylaxie GVHD	Greffon	Survie Globale	Chimérisme	GVHD	Cause de décès	Commentaires
Fasth <i>et al</i> , 1993	Géno (1 Ag MM)	1		MA	T-déplétion	MO	0	100% D	GVHD chronique	GVHD chronique	Correction du déficit en CD40L
Thomas <i>et al</i> , 1995	Géno	1	- ATCD infections : <i>Pneumocystis jiroveci</i> - Histoire familiale	MA (Bu-Cy)	CSA + MTX court	MO	1	100% D	0		Correction du déficit en CD40L. Arrêt des problèmes infectieux. Peu d'informations sur ces patients.
Buckley <i>et al</i> , 1996	Géno	2				MO	1/2				
	Haplo	3					1/3				
Bordigoni <i>et al</i> , 1998	Géno	1	- Infections opportunistes - Cholangite sclérosante - Maladie inflammatoire chronique	MA (Bu-Cy)	CSA + MTX	MO	1		0		Correction du déficit en CD40L, de la cholangite sclérosante et de la maladie inflammatoire.
Scholl <i>et al</i> , 1998	Géno	1	- Neutropénie sévère - Infections fréquentes	MA (ICT-Cy)	CSA + MTX court	MO	1	> 95% D	I résolutive sous cortic.		Correction du déficit en CD40L et de la neutropénie sévère.
Kato <i>et al</i> , 1999	Géno	1	- Neutropénie sévère - Infections opportunistes - Histoire familiale	MA (Bu-Cy) + SAL	CSA + MTX court	MO	1	100% D	0		Correction du déficit en CD40L
Kawai <i>et al</i> , 1999	Géno	1		MA (Bu-Cy)	CSA + MTX court	MO	1	100% D	1		Correction du déficit en CD40L
Duplantier <i>et al</i> , 2001	Géno	1	- Infections fréquentes	MA (Bu-Cy)	CSA + MTX court	MO	1	> 90% D (70% B, 90% T, 95% PNN)	0		Correction du déficit en CD40L
Khawaja <i>et al</i> , 2001	Géno	2	- ATCD infections : <i>Pneumocystis jiroveci</i> : 2/2 <i>Cryptosporidium parvum</i> : 2/2 - Atteinte hépatique avancée : 2/2	MA (Bu-Cy) Dose de Bu plus faible	CSA	MO	0	100% D : 1/2 non évaluable : 1/2	IV : 2/2	- Défaillance hépatique + GVHD : 2/2 (infection à <i>Cryptosporidium Parvum</i>)	- Une atteinte hépatique avec infect° à <i>Cryptosporidium parvum</i> = facteur de risque majeur pour l'allogreffe de CSH.
	Phéno	5	- ATCD infections : <i>Pneumocystis jiroveci</i> : 5/5 <i>Cryptosporidium parvum</i> : 2/5 - Atteinte hépatique avancée : 1	MA (Bu-Cy) : 5/6 + anti-LFA1 : 1/5 NMA (Fluda-Mel-SAL) : 1/6	CSA + T-déplétion : sélection CD34 : 4/6 CAMPATH : 2/6	MO	4/6	100% D : 4/6 Partiel : 2/6	III : 1/6	- Adénovirose invasive : 1/6 - cryptosporidiose : 1/6 Rq : décès des patients les plus âgés.	- Décès d'atteinte hépatique sévère malgré un conditionnement NMA chez 1 patient.
Leone <i>et al</i> , 2002	Géno	1	- ATCD infections : <i>Pneumocystis jiroveci</i>	MA (Bu-Thio-Fluda-Cy)	CSA	MO	1	100% D	0		Correction du déficit en CD40L
Genery <i>et al</i> , 2004	Géno	14	- ATCD infections : <i>Pneumocystis jiroveci</i> : 16/38 <i>Cryptosporidium parvum</i> : 19/38	MA (Bu-Cy : 11/14 Bu-Thio-Fluda-Cy : 1/14) NMA (Fluda-Mel+/-SAL) : 2/14	CSA : 33/38 + MTX court : 10/33 + MMF : 1/33 Autres (MMF seul, tacrolimus etc..) : 5/38	MO	26/38 (68%) de 1.2 à 9.3 ans	100% R : 4/38 Chimérisme complet ou partiel : 34/38	≥ II : 4	12/38 d'infections : - infection à <i>Cryptosporidium Parvum</i> : 6/12	- Une atteinte pulmonaire avt greffe : faible survie post greffe. - Incompatibilité HLA : résultats de greffe moins bons qu'en situation phénoïdétique sans incompatibilité HLA.
	Phéno	24	- Atteinte hépatique : 20/38 cholangite sclérosante : 12/20 cholangite + cirrhose : 3/20 autres : 5/20	MA (Bu ou ICT-Cy-SAL ou antiLFA1 +/- anti-CD2) : 20/24 NMA : 4/24	+ T déplétion : 12/24				≥ II : 9	- CMV disséminé : 3/12 - Adénovirose : 1/12 - Aspergillose : 2/12	
Amrolia <i>et al</i> , 2000	Phéno	2	- Cholangite sclérosante : 2/2 - ATCD transplantat° hépatique : 1/2 - <i>Cryptosporidium parvum</i> : 1/2	NMA (Fluda-Mel+/-SAL) : 2/2	CSA + cortic. : 1/2 Tacrolimus + cortic : 1/2	MO	2/2	100% D	0 ou I résolutive sous cortic		Correction du déficit en CD40L
Jacobsohn <i>et al</i> , 2004	Géno	2	- ATCD infections : <i>Cryptosporidium parvum</i> : 2/2 - Cholangiopathie.	NMA (Fluda-Mel+/-SAL)	CSA	CSP	2/2	100% D : 1/2 Chimérisme mixte stable : 1/2 (40 à 50% D sur les T)	0		Conditionnement NMA: succès Correction du déficit en CD40L Conditionnement NMA: succès

Tableau 4 : Tableau de synthèse des principales expériences d'allogreffes dans le déficit en CD40L publiées depuis 1993

n : Nombre. *Géno* : Génoïdétique. *Phéno* : Phénoïdétique. *MA* : Conditionnement myéloablatif. *NMA* : Conditionnement non myéloablatif. *Bu* : Busulfan. *Cy* : Cyclophosphamide. *SAL* : Sérum anti-lymphocytaire. *Thio* : Thiotépa. *ICT* : Irradiation corporelle totale. *Fluda* : Fludarabine. *Mel* : Melphalan. *CSA* : Ciclosporine. *MTX* : Méthotrexate. *MMF* : Mycophénolate Mofetil. *Cortic.* : corticoïdes. *MO* : Moelle osseuse. *CSP* : Cellules souches périphériques. *D* : Donneur. *R* : Receveur. *CMV* : Cytomegalovirus.

aux patients (âgé de 8 mois à 11 ans selon les études) devant un tableau clinique grave lié soit à des infections opportunistes sévères (pneumonie à *Pneumocystis jiroveci*, par exemple), soit à une cholangite sclérosante, soit à une maladie inflammatoire chronique et sévère des intestins. Toutes ces allogreffes ont été un succès avec prise de greffe et résolution du déficit en CD40L, absence de complication post-greffe et reconstitution immunitaire complète. Une autre équipe a rapporté un cas clinique d'allogreffe de MO génoidentique avec un conditionnement myéloablatif différent : ICT (Irradiation corporelle totale) 12Gy et Cyclophosphamide 4500 mg/m² (Scholl *et al*, 1998). Le choix de l'irradiation par rapport à l'utilisation du Busulfan a été motivé par la difficulté, selon les auteurs, à maintenir des taux constants de Busulfan chez les patients pédiatriques afin d'obtenir une myéloablation avec une toxicité acceptable. Le recours à l'allogreffe a été préconisé ici car le patient présentait une neutropénie sévère chronique et des infections fréquentes. Un autre cas a été publié par Leone *et al* en 2002, où une allogreffe de MO a été réalisée chez un enfant qui avait présenté une infection à *Pneumocystis jiroveci*.

Des expériences un peu différentes ont également été rapportées dans la littérature. Dans une étude de survie de la greffe de MO pour déficit immunitaire, 6 patients atteints de déficit en CD40L ont été inclus (Buckley *et al*, 1996). Deux d'entre eux ont reçu une allogreffe de MO génoidentique et 3 d'entre eux ont reçu une allogreffe intra-familiale haplo-identique. Dans chacun des deux groupes il n'y a qu'un survivant. Malheureusement, nous n'avons pas plus de détail sur ces allogreffes. L'équipe de Khawaja a rapporté le cas de 8 enfants atteints de déficit en CD40L dont 7 ont été allogreffés après un conditionnement myéloablatif identique à celui proposé par l'équipe du Pr A. Fischer à Necker mais avec une dose de Busulfan un peu plus faible (16 mg/kg) (Khawaja *et al*, 2001). Un patient a reçu en plus des anticorps anti-LFA1. Pour 2 patients sur 7, l'allogreffe a été réalisée avec de la MO totale en situation génoidentique et pour 5 sur 7 avec de la MO d'origine phénoïdentique ayant subi une déplétion en lymphocytes T soit par CAMPATH soit par sélection positive CD34+. Quatre patients sont en vie et en bonne santé et 3 sont décédés : 2 du groupe génoidentique et 1 du groupe phénoïdentique. Le point commun entre ces 3 patients était une pathologie hépatique avancée avec présence de *Cryptosporidium parvum* chez 2 d'entre eux. Cette étude a souligné que l'existence d'une atteinte hépatique avant la greffe semblait être un facteur de risque de l'allogreffe de CSH dans cette indication plus important que le degré d'incompatibilité HLA entre donneur et receveur. La même équipe a publié plus récemment une étude européenne reprenant toutes les allogreffes de MO réalisée entre 1993 et 2002, à laquelle nous avons participé et qui est présenté dans la partie Résultats (Gennery *et al*, 2004). Trente huit cas sont repris dont 15 d'entre eux avaient déjà été publiés. La source de MO était génoidentique dans 14 cas, phénoïdentique provenant d'un donneur ficher

dans 22 cas (dont 15 10/10 et 7 9/10) et phénoïdétique provenant d'un donneur intra-familial dans 2 cas. Douze greffons ont été déplétés en lymphocytes T. La majorité des patients a reçu un conditionnement myéloablatif, tel qu'il a déjà été présenté précédemment ; seuls 6 patients avec atteinte hépatique préalable ont reçu un conditionnement non myéloablatif. Sur ces 38 patients, 68% sont en vie et 58% sont guéris (3 patients ont eu une reconstitution autologue). Les 12 décès observés (32%) sont associés à des infections : à *Cryptosporidium parvum* (6 patients) pré-existant à la greffe et ayant fait l'objet d'une prophylaxie lors de la greffe dans la majorité des cas, à CMV (3 patients), à Adenovirus (1 patient) et à *Aspergillus* (2 patients). Sur les 12 patients décédés, 8 présentaient une maladie hépatique avant la greffe comparé à 12 sur 26 patients en vie. Cependant dans cette étude, seuls deux paramètres se sont révélés statistiquement significatifs :

- une atteinte pulmonaire pré-existant à la greffe est associée à une faible survie ($p = 0.0002$). En revanche, une pneumonie à *Pneumocystis jiroveci* n'augmente pas la mortalité. Les auteurs suggèrent qu'une atteinte pulmonaire est prédictive d'infections virales ou fongiques latentes.
- les allogreffes réalisées en situation d'incompatibilité d'un antigène HLA donnent de moins bons résultats que les allogreffes phénoïdétiques sans incompatibilité HLA (4 décès et une reconstitution autologue sur 7 dans le premier cas vs 3 décès et 2 reconstitutions autologues dans le second cas, $p = 0.02$)

II-1-1-2 Allogreffes avec conditionnement non myéloablatif

Les premières allogreffes avec conditionnement non myéloablatif ont été rapportées dans une étude portant sur 8 patients atteints de déficit immunitaire dont 2 d'un déficit en CD40L (Amrolia *et al*, 2000). Tous les deux présentaient une cholangite sclérosante avant la greffe. Le cas de l'un d'entre eux a été rapporté en détail dans une autre publication que nous reprenons ici (Hadzic *et al*, 2000). Le diagnostic de syndrome hyper IgM avait été posé chez un enfant à l'âge de 3 ans, dans le contexte d'un frère décédé d'une pneumonie à *Pneumocystis jiroveci*. Les fonctions hépatiques de l'enfant étaient initialement normales mais ont commencé à se détériorer vers l'âge de 5 ans. A l'âge de 10 ans, une biopsie hépatique a suggéré une cholangite sclérosante et deux ans plus tard une cholangiopathie intra et extra- hépatique a été mise en évidence. Une allogreffe de MO n'a pas pu être proposée en l'absence de donneur génodentique. A l'âge de 18 ans, l'état clinique du patient s'est considérablement détérioré ce qui a conduit à proposer une transplantation hépatique. Trente quatre jours après la transplantation hépatique, une allogreffe

de MO phénoïdique a été réalisée après un conditionnement non myéloablatif : Fludarabine 150 mg/m² et Melphalan 100 mg/m². La prophylaxie de la GVHD comprenait du sérum anti-lymphocytaire, de la méthylprednisolone et de la ciclosporine. Le patient est sorti du secteur de greffe à J118 dans de bonnes conditions cliniques et son état a continué de s'améliorer. Le deuxième patient a été greffé à l'âge de 11 ans et a développé 15 jours après la greffe une cryptosporidiose qui s'est résolue avec la prise de greffe et l'administration de paromomycine/azithromycine. Les deux patients ont parfaitement évolué cliniquement et biologiquement.

Sur la base de cette expérience, 6 patients de l'étude européenne ont reçu un conditionnement non myéloablatif (Gennery *et al*, 2004) car ils présentaient une atteinte hépatique avant la greffe. Les résultats ne sont pas statistiquement différents des patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif avec atteinte hépatique : 3 patients en vie / 6 vs 8/12, respectivement.

Parallèlement, une autre équipe a publié le cas de deux patients avec cholangiopathie diagnostiquée sur biopsie hépatique et antécédent d'infection à *Cryptosporidium parvum*, ayant été traités par allogreffe de CSP après conditionnement non myéloablatif (Jacobsohn *et al*, 2004). Un chimérisme mixte stable chez l'un des patients et un chimérisme complet chez l'autre ont permis la correction du déficit en CD40L et parallèlement la résolution de la cholangiopathie.

La question principale que soulève cette revue bibliographique est de savoir quel est le moment optimal pour proposer l'allogreffe de CSH. En effet, beaucoup de patients atteints d'un déficit en CD40L vivent pratiquement normalement sous traitement substitutif. Toutefois, le succès des allogreffes de CSH en l'absence d'atteinte hépatique est de 72% selon l'étude européenne (Gennery *et al*, 2004). Les auteurs proposent d'administrer le traitement substitutif et de surveiller étroitement les paramètres hépatiques afin d'être en mesure de proposer la greffe avant que l'atteinte hépatique ne soit trop importante. Parmi les paramètres à observer la recherche de *Cryptosporidium parvum*, fréquemment mis en cause doit être réalisée et nécessite des outils sensibles de détection précoce comme la PCR. Dans ces situations, il pourrait être intéressant de proposer un conditionnement non myéloablatif. Une alternative à cette attitude serait de proposer la greffe très tôt avant toute atteinte hépatique avec un conditionnement myéloablatif. L'administration d'un traitement ou d'une prophylaxie vis-à-vis du *Cryptosporidium parvum* peut également être discutée en considérant toutefois le bénéfice apporté.

A ce jour, les études ne contiennent pas suffisamment de patients pour déterminer quelle est la stratégie optimale. C'est pourquoi, il est nécessaire de réaliser des études à l'échelle européenne.

II-1-2- Greffe de CSH dans les Dysplasies ectodermales Anhydrotiques avec déficit immunitaire

Le faible pronostic vital des enfants atteints de cette pathologie conduit à se poser la question du rationnel d'un traitement du déficit immunitaire par allogreffe de CSH. La première expérience d'une allogreffe de CSH chez un enfant atteint d'un AD-EDA-ID a été rapportée récemment et a été un succès (Dupuis-Girod *et al*, 2007). Devant la sévérité du déficit immunitaire, l'enfant a été allogreffé à l'âge d'un an en situation haploidentique avec la moelle osseuse de sa mère. Un conditionnement myéloablatif composé de Busulfan (20 mg/kg) et de Cyclophosphamide (200 mg/kg) a été administré. Le greffon médullaire a été déplété en lymphocytes T par sélection positive CD34+ et le nombre de cellules injecté de 7.5×10^6 CD34/kg et de 3.5×10^5 CD3/kg. L'enfant a également reçu des anticorps anti-LFA1 et anti-CD2 au décours de la greffe afin de prévenir le rejet et la GVHD. Après la greffe, l'état clinique du patient s'est considérablement amélioré avec disparition de tous les signes digestifs et l'arrêt de la nutrition parentérale. La récupération immunitaire a été complète et les signes cliniques secondaires au déficit immunitaire se sont résolus. Les auteurs rapportent un suivi de 7 ans pour ce patient avec absence de GVHD, un chimérisme complet et une récupération immunitaire stables dans le temps. En revanche, la greffe n'a pas évité la survenue des signes cliniques liés aux anomalies de développement de la dysplasie ectodermale anhydrotique. Les auteurs concluent que l'allogreffe de CSH doit être considérée comme le traitement de choix pour l'AD-EDA-ID mais probablement aussi pour XHM-ED, malgré une expérience peu encourageante d'une allogreffe réalisée chez un enfant atteint d'un déficit en NEMO et décédé 11 jours après allogreffe d'une maladie veino-occlusive liée à la toxicité du conditionnement. Toutefois, les auteurs suggèrent de mener des études pilotes afin de déterminer si les patients atteints d'XHM-ED et présentant un phénotype clinique sévère peuvent être traités par allogreffe de CSH.

II-1-3-Recommandations du groupe de travail sur les DI de l'EBMT pour les allogreffes dans les syndromes Hyper IgM avec déficit en CD40 Ligand.

Ces recommandations ont été proposées en Septembre 2003 lors d'une « Working Party » sous l'égide de l'EBMT (European Bone Marrow Transplantation) et de l'ESID (European Society of Immunodeficiency) par l'équipe Graham Davies et Andrew Gennery. Elles ont ensuite été révisées et formalisées en 2004 puis déposées sur le site de l'ESID. Elles ont été retranscrites en français ci-après.

II-1-2-1 Prise en charge optimale des nouveaux cas diagnostiqués

Les auteurs recommandent une attention toute particulière sur les points suivants lors de la prise en charge d'un patient chez lequel est diagnostiqué un déficit en CD40L.

- Mise en place d'une prophylaxie de la pneumonie à *Pneumocystis jiroveci*
- Administration d'Immunoglobulines par voie Intra-veineuse (IVIG)
- Détection des infections à *Cryptosporidium parvum* (par PCR)
- Utilisation d'eau bouillie ou filtrée
- Administration éventuelle d'une prophylaxie anti-microbienne
- Surveillance régulière d'une éventuelle atteinte des organes.
- Réalisation du groupe HLA du patient.

II-1-2-2 Surveillance régulière d'une éventuelle atteinte hépatique

Comme nous l'avons vu précédemment, le degré de l'atteinte hépatique conditionne le succès de l'allogreffe.

- Dosages réguliers des enzymes hépatiques : transaminases et Gamma GT.
- Echographie hépatique au moins une fois par an.
- Recherche de *Cryptosporidium parvum* dans les selles
- Si besoin poursuivre les investigations avec :
 - une cholango-IRM
 - une biopsie hépatique

II-1-2-3 Quand réaliser l'allogreffe de CSH ?

Pour les auteurs, cela dépend du type de donneur disponible pour le patient.

- En présence d'un donneur intrafamilial génoidentique au patient, l'allogreffe doit être réalisée au diagnostic et en l'absence de toute complication.

- En présence d'un donneur non apparenté compatible 10/10 allélique, l'allogreffe peut être réalisée au diagnostic et de toute façon dès la survenue des premières complications.
- En présence d'un donneur non apparenté partiellement incompatible, l'allogreffe ne doit être réalisée qu'à partir du moment où les premières complications surviennent.
- En présence d'un donneur haploidentique, les auteurs des recommandations n'en ont aucune expérience et suggèrent qu'une telle alternative ne soit considérée que s'il y a une atteinte évolutive d'un organe.

II-1-2-4 Le Conditionnement

- En l'absence d'atteinte organique, il est possible de choisir soit un conditionnement myéloablatif (Busulphan et Cyclophosphamide) soit un conditionnement non myéloablatif (Fludarabine, Melphalan, Sérum anti-lymphocytaire ou CAMPATH (Alemtuzumab))
- En présence d'une atteinte organique avérée (touchant le plus souvent les poumons et/le foie), les auteurs recommandent exclusivement un conditionnement non myéloablatif.

II-1-2-5 La déplétion lymphocytaire T

- La déplétion T a été utilisée avec succès dans de nombreux cas. Cependant, les auteurs déconseillent ce traitement du greffon si possible du fait d'un risque d'évolution incontrôlée d'infection à *Cryptosporidium parvum*.
- Ce type de traitement doit être réservé dans le cas où une allogreffe en situation haploidentique est envisagée.

II-1-2-6 Prophylaxie vis-à-vis des infections à *Cryptosporidium parvum* au décours de la procédure d'allogreffe de CSH

- Les auteurs précisent que cette prophylaxie n'a pas fait la preuve de son efficacité jusqu'alors dans les allogreffes de CSH
- Trois molécules peuvent être utilisées
 - Azithromycine
 - Nitazoxamide

- Paromomycine, potentiellement ototoxique et pouvant être absorbé par le tractus gastro-intestinal si une mucite survient.

L’Azithromycine et le Nitazoxamide ont une plus faible toxicité : il est possible d’observer une altération des transaminases avec le Nitazoxamide.

Les auteurs proposent l’attitude thérapeutique suivante :

- en l’absence de *Cryptosporidium parvum* (PCR negative) : Azithromycine seul
- en présence de *Cryptosporidium parvum* (ou avec des antécédents d’infection à *Cryptosporidium parvum* : Azithromycine associée à une autre molécule
- Adjonction d’une troisième molécule si une cryptosporidiose manifeste survient.

II-1-2-7 Complications pouvant conduire à envisager une allogreffe de CSH

- Anomalies histologiques ou radiologiques hépatiques en faveur d’une cholangite sclérosante
- Atteinte pulmonaire à type de bronchiectasies
- Entéropathie
- Neutropénie réfractaire
- Excrétion persistante de *Cryptosporidium parvum*
- Infection à Toxoplasme

II-2- Etat de la littérature sur la greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques dans les Syndromes de Wiskott Aldrich

L'espérance de vie des enfants atteints de WAS en l'absence de traitement était initialement inférieure à 3 ans. (Wiskott *et al*, 1937 ; Aldrich *et al*, 1954). L'apport de différentes thérapeutiques a permis de considérablement accroître ce chiffre.

La splénectomie permet d'augmenter le taux de plaquettes et de réduire le risque hémorragique. Cependant, le risque de décès par infection est augmenté. C'est pourquoi il est nécessaire d'associer à ce geste une antibiothérapie prophylactique tout au long de la vie du patient (Ochs *et al*, 1998, Burns *et al*, 2004). L'administration de gammaglobulines intraveineuses (IVIG) est également préconisée car les patients atteints de WAS ne développent pas d'anticorps vis-à-vis des antigènes polysaccharidiques.

Cependant, le seul traitement définitif du WAS est la greffe de CSH que nous allons détailler ci-après.

En 2003, Conley *et al* ont examiné les pratiques thérapeutiques de toutes les équipes européennes et américaines ayant pris en charge des patients atteints de WAS (Conley *et al*, 2003). Le choix thérapeutique le plus couramment utilisé par les centres prenant en charge plus de 10 patients atteints de WAS est la greffe de CSH en situation génoidentique lorsqu'un donneur familial est disponible. Sinon, pour les autres centres, ou si aucun donneur n'est possible, la splénectomie est envisagée notamment si les saignements sont importants ou si le taux de plaquettes est inférieur à $20\,000/\text{mm}^3$. En 1993, une étude a clairement montré le bénéfice de la splénectomie (Mullen *et al*, 1993). Sur une étude incluant 62 cas, ils ont montré que la médiane de survie du groupe de patients sans splénectomie était de 4 ans alors qu'elle était augmentée à 25 ans dans le groupe avec splénectomie. De plus, elle permettait de résorber complètement la thrombopénie (27,88 G/l en moyenne avant splénectomie et 262,80 G/l en moyenne après splénectomie). Cependant, le risque de décès par infection après splénectomie persiste même s'il a été considérablement diminué avec l'addition de la antibiothérapie prophylactique (5 patients/32 présentant une infection sous prophylaxie vs 7 patients/7 présentant une infection sans antibiothérapie prophylactique).

Toutefois, cette même étude, permet clairement de démontrer en terme de survie le bénéfice de la greffe de CSH génoidentique intra-familiale sur la splénectomie et sur la greffe de CSH phénoïdentique.

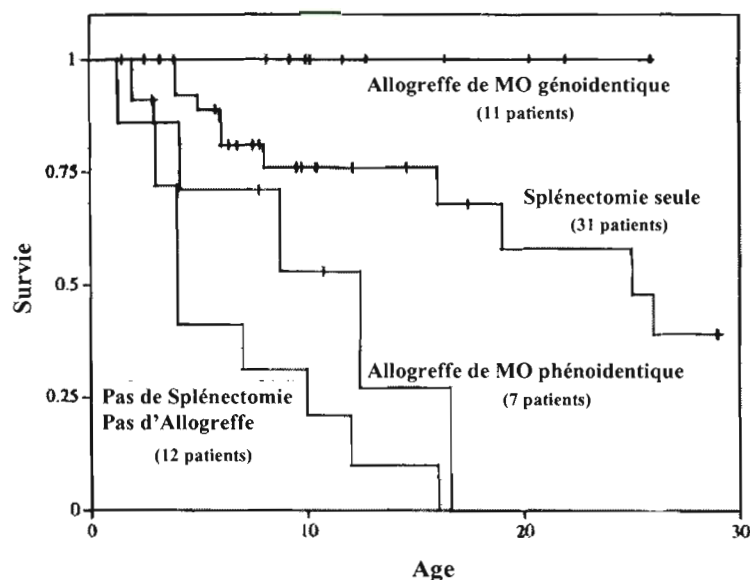


Figure 12: Courbes de survie de Kaplan Meier en fonction du traitement administré.

Proportion de patients survivant par année d'âge. La survie du groupe « Splénectomie seule » est significativement plus élevée que celle du groupe « Pas de splénectomie, Pas d'allogreffe » ($p < 0.0001$) et que la survie du groupe « Allogreffe de MO phénoïdentique » ($p = 0.0111$). La survie du groupe « Allogreffe de MO génoidentique » est significativement plus élevée que celle du groupe « Allogreffe de MO phénoïdentique » ($p < 0.0005$) et que celle du groupe « Splénectomie seule » ($p = 0.0268$). (d'après Mullen *et al*, 1993)

Il est clair que même si la splénectomie apporte un gain en terme de survie, seule la greffe de CSH génoidentique permet de guérir la maladie, comme nous l'avons mentionné plus haut. Cependant, les pratiques de greffe ayant considérablement évolué nous allons analyser à travers la littérature de ces dernières années ce qu'il est aujourd'hui possible de proposer à des patients qui ne possèdent pas de donneur génoidentique. De plus, nous verrons l'impact de la splénectomie sur la survenue des complications après greffe de CSH et discuterons le rationnel de ce geste chez des patients susceptibles de recevoir une allogreffe de CSH.

II-2-1- Greffe de CSH (Tableau 4)

Dans les années 1990, plusieurs études ont comparé les résultats de greffes génoidentiques avec des greffes en situation haploïdentique. L'équipe d'O'Reilly a publié les résultats de 17 patients atteints de WAS dont 11 ont reçu une allogreffe génoidentique et 6 une allogreffe haploïdentique (Brochstein *et al*, 1991). Tous les patients ont reçu un conditionnement myéloablatif composé de l'association Busulfan et cyclophosphamide en situation génoidentique et de TBI avec haute dose de cytarabine en situation haploïdentique. Parmi les 11 patients ayant reçu une allogreffe génoidentique, 10 sont en vie et vont bien 28 à 145 mois post-greffe. Un patient est décédé d'une GVH chronique et d'une pneumopathie interstitielle à CMV dans les 10 mois qui ont suivi la greffe. En revanche, sur les 6 patients ayant reçu une greffe haploïdentique, un seul est en vie 52 mois post-greffe. Les causes de décès sont les lymphomes (3 cas), la GVH

chronique extensive (1 cas) et une pancytopenie progressive associée à une infection à *Candida* (1 cas). Les auteurs concluent que lorsqu'un donneur génoidentique existe, la greffe de CSH représente le traitement de choix du WAS. En revanche, les résultats obtenus en situation haploidentique ne sont pas concluants. L'équipe du Pr A. Fischer à Necker a publié ses résultats en 1996 et parvient à la même conclusion (Ozsahin *et al*, 1996). Sur 28 allogreffes réalisées, 10 l'ont été en situation génoidentique, 17 en situation haploidentique et 1 en situation phénoidentique. Le conditionnement a été pour tous composé de Busulfan et cyclophosphamide (sauf pour les greffes antérieures à 1981 où l'ICT a été utilisée à la place du Busulfan). Dans le contexte des greffes haploidentiques, où les patients ont reçu un greffon déplété en lymphocytes T, le conditionnement a été renforcé avec du sérum anti-lymphocytaire ou des anticorps anti-LFA1 seuls ou associés à des anticorps anti-CD2. Sur les 10 patients ayant reçu une allogreffe génoidentique, 8 sont en vie à long terme et 2 sont décédés (parmi ceux ayant reçu une ICT), l'un d'une GVHD grade IV et l'autre d'une encéphalite virale. En revanche, sur les 16 patients ayant reçu une greffe haploidentique, seuls 6 sont en vie. Ces patients sont décédés d'infection (notamment lymphome EBV induit) du fait d'un déficit immunitaire prolongé post-greffe. Toutefois, cette étude souligne le biais de sélection des patients : tous les patients possédant un donneur génoidentique sont allogreffés indépendamment du degré de gravité du syndrome de WAS, alors que seuls ceux présentant des complications importantes du WAS sont orientés vers une greffe haploidentique.

A partir des années 2000, les publications sur les allogreffes en situation phénoidentique se sont multipliées. En effet, les progrès réalisés dans la compatibilité HLA entre Donneur et receveur (typage de haute résolution), dans le choix des greffons ainsi que dans le choix des conditionnements ont contribué à l'amélioration des résultats, notamment dans le WAS. L'équipe de Filipovitch rapporte l'expérience de 20 années d'allogreffes dans le WAS portant sur 170 patients du registre américain (Filipovitch *et al*, 2001). Cinquante cinq patients ont reçu une allogreffe génoidentique, 48 une allogreffe haploidentique et 67 une allogreffe phénoidentique. La plupart des patients avait moins de 5 ans (79%). La majorité des patients ont reçu un conditionnement sans ICT (1/4 des patients recevant un greffon haploidentique ou phénoidentique ont eu de l'ICT dans leur conditionnement). La prévention de la GVHD a été assurée par l'administration de méthotrexate ou de ciclosporine ou des deux, associées dans 54% des greffes haploidentiques et dans 17% des greffes phénoidentiques à la déplétion en lymphocytes T du greffon. Les résultats en terme de survie sont variables selon le type de donneur : 87% en situation génoidentique, 52 % en situation haploidentique et 71 % en situation phénoidentique. Toutefois, le taux de survie des patients de moins de 5 ans allogreffés en

situation phénoïdentique n'est pas différent de celui des patients allogreffés en situation génoïdentique.

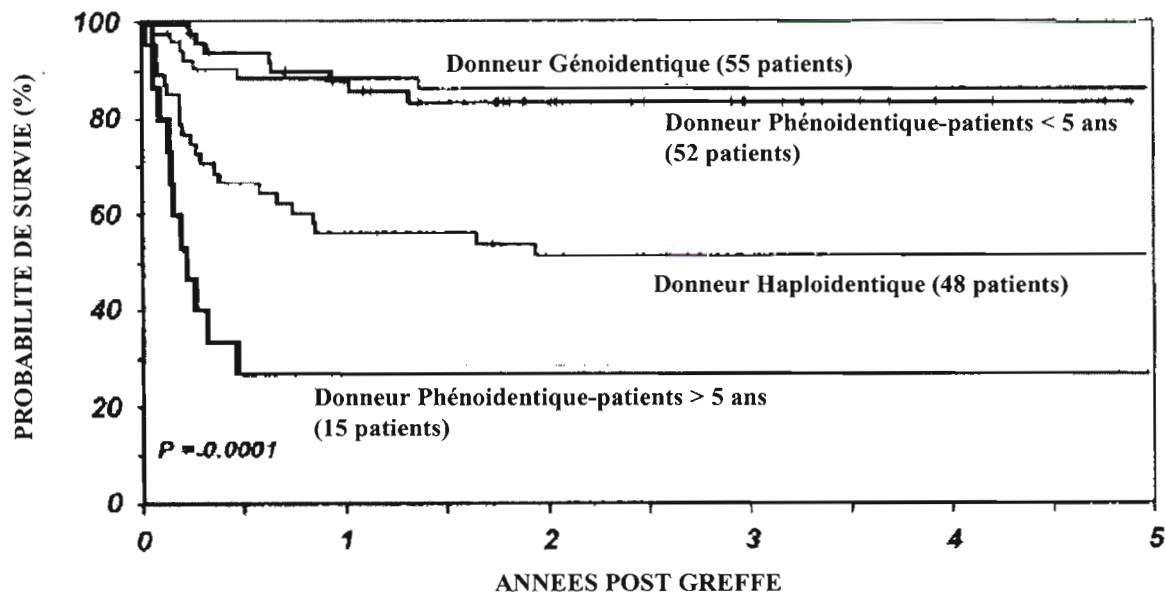


Figure 13 : Probabilité de survie de 170 patients ayant reçu une allogreffe de MO pour un syndrome de Wiskott Aldrich par type de donneur et par âge. Il n'y a pas de différence significativement entre le taux de survie des patients allogreffés en situation génoïdentique et celui des enfants de moins de 5 ans allogreffés en situation phénoïdentique. Un taux de survie significativement plus faible est retrouvé dans le groupe « donneur haploïdentique » et dans le groupe « donneur phénoïdentique-patients >5ans » (d'après Filipovitch *et al*, 2001)

Les causes de décès des patients sont différentes selon le type de greffe : principalement infectieuses et malignes (lymphomes EBV induits) en situation haploïdentique et majoritairement liées à la GVHD en situation phénoïdentique.

Causes de décès	Donneur Génoïdentique	Donneur Haploïdentique	Donneur phénoïdentique
Non prise de greffe	1	4	1
Cancers	0	5	1
GVHD +/- Pneumopathie interstitielle	0	4	7
Pneumopathie interstitielle	1	0	2
Infection	1	6	3
Défaillance multiviscérale	1	1	2
Hémorragie	2	0	2
Inconnue ou manquante	1	3	2

Tableau 2 : Causes de décès après allogreffe de MO pour syndrome de Wiskott Aldrich (d'après Filipovitch *et al*, 2001).

L'équipe d'Imai rapporte une expérience d'allogreffes portant sur 15 patients : (Imai *et al*, 2004). Une greffe a été réalisée avec un donneur génoïdentique, une avec un donneur

haploidentique et 13 en situation phénoidentique (dont 3 à partir de sangs placentaires). Tous les patients sont en vie en moyenne à 2.2 ans à l'exception d'un seul décédé d'un lymphome EBV-induit. Chez deux patients sur trois ayant rejeté leur greffon, une deuxième greffe a été un succès. Peu de détails sont donnés sur les conditions de greffe dans cette étude mais on peut toutefois observer les bons résultats obtenus principalement en situation phénoidentique. Toutefois, une étude récente publiée par cette même équipe rapporte leurs 20 ans d'expérience d'allogreffes dans les déficits immunitaires héréditaires (Tsuji *et al*, 2006). Onze patients atteints de WAS sont inclus dans cette étude. Deux ont été allogreffés en situation génoidentique, 4 en situation haploidentique et 6 en situation phénoidentique (dont 2 sangs placentaires). La majorité des patients ont reçu un conditionnement composé de Busulfan et cyclophosphamide, complété dans les situations phénoidentiques par du sérum anti-lymphocytaire. Cinq patients ont reçu de l'ICT à la place du Busulfan. La prévention de la GVHD a été assurée par l'association ciclosporine-méthotrexate. De plus, les patients allogreffés en situation haploidentique ont reçu un greffon déplété en lymphocytes T. Huit patients sur 11 sont en vie (après 98 à 5109 jours): 2/2 en situation génoidentique, 5/6 en situation phénoidentique (un patient allogreffé avec un sang placentaire est décédé d'une microangiopathie thrombotique.) et 2/4 en situation haploidentique. Les auteurs suggèrent un rôle bénéfique du sérum anti-lymphocytaire dans le conditionnement. Cependant, des études prospectives portant sur un plus grand nombre de patients seraient nécessaires pour le confirmer.

Une autre étude rapporte 3 allogreffes phénoidentiques avec sang placentaire (2 avec une identité HLA 4/6 et 1 avec une identité HLA 5/6) (Knutsen *et al*, 2003). Les patients ont reçu un conditionnement composé de Busulfan, cyclophosphamide et sérum anti-lymphocytaire. La prévention de la GVHD a été assurée par l'association Ciclosporine et corticoïdes. Les 3 allogreffes ont été un succès. Seul 1 patient a développé une GVHD de grade II résolutive après addition d'anti-IL2R. Une reconstitution hématologique et immunologique a été observée chez les 3 patients.

Une étude récente fait état d'une série japonaise de 57 patients, d'âge médian 1.6 ans, atteints de WAS allogreffés en situation génoidentique (11 patients/57), haploidentique (10/57) et phénoidentique (21/57 avec de la MO et 15/57 avec un sang placentaire) (Kobayashi *et al*, 2006). Les patients ont tous reçu un conditionnement composé de Busulfan et cyclophosphamide et complété avec du SAL pour 20 d'entre eux. Les auteurs montrent une survie globale à 5 ans de 81.8% en situation génoidentique et de 80% en situation phénoidentique que le greffon soit de la MO ou un sang placentaire. En revanche, la survie globale à 5 ans en situation haploidentique est de 38%. Les auteurs recommandent d'allogreffer les patients qui ne disposent pas d'un donneur

génoidentique, en situation phénoïdentique indifféremment avec de MO ou un sang placentaire. Dans cette étude, comme dans celle de Filipovitch *et al*, les patients de plus de 5 ans présentent une survie globale significativement inférieure à celle des enfants de moins de 5 ans. Les auteurs suggèrent de ne pas attendre pour allogreffer les patients une fois le diagnostic de WAS posé. L'utilisation de sangs placentaires immédiatement disponibles contribue à réduire le temps de latence entre le diagnostic et la greffe.

Une autre étude récente rapporte l'expérience du centre de Brescia où ont été allogreffés 23 patients atteints de WAS (Pai *et al*, 2006). Quatre patients ont été allogreffés en situation génoidentique, 2 en situation haploïdentique et 16 en situation phénoïdentique. Tous ont reçu, après administration d'un conditionnement myéloablatif, un greffon de MO, à l'exception d'un patient qui a reçu un sang placentaire génoidentique. La survie globale de tous les patients est de 78.2% (suivi de 3 mois à 132 mois) et des patients allogreffés en situation phénoïdentique est de 81.2%. Les patients allogreffés en situation haploïdentique sont décédés. Les auteurs soulignent la très bonne tolérance des allogreffes phénoïdentiques avec survenue de GVHD dans 5 cas sur 16, toutes de grade I ou II. Ils montrent également que 6 patients (allogreffés en situation phénoïdentique) sur les 18 en vie présentent un chimérisme mixte stable : 4 sur toutes les lignées sanguines et 2 sur la lignée myéloïde exclusivement. De plus, lorsqu'une reconstitution autologue survient dans la lignée myéloïde, elle est accompagnée d'une mauvaise reconstitution plaquettaire. Cette observation conduit les auteurs à souligner que les conditionnements non myéloablatifs peuvent s'avérer insuffisants pour traiter correctement la thrombopénie.

Enfin, une étude collaborative de l'ESID et de l'EBMT fait état du suivi au long cours de 96 patients allogreffés pour un WAS et en vie 2 ans après la greffe (Oszahin *et al*, révision positive à Blood). Quarante cinq patients ont été allogreffés en situation génoidentique, 19 en situation haploïdentique et 32 en situation phénoïdentique. Les patients ont reçu, après un conditionnement myéloablatif (85 cas/96), un greffon de MO, de CSP (13 cas) ou de sang placentaire (3 cas). La survie sans événement à 7 ans est de 88% dans le groupe génoidentique, 55% dans le groupe haploïdentique et 71% dans le groupe phénoïdentique. Des manifestations autoimmunes indépendantes de toute GVHD chronique ont été observées dans 20% des cas et ont été corrélées à un chimérisme mixte post-greffe. Par ailleurs, cette étude montre que la survenue d'infections sévères après greffe est associée à la splénectomie. Cette observation conduit les auteurs à contre-indiquer la splénectomie chez les patients susceptibles de recevoir une allogreffe de CSH.

Deux expériences isolées ont été rapportées : l'une sur l'utilisation de CSP génoidentiques à la place de la MO et l'autre sur l'utilisation d'une « Mégadose » de CD34+ à partir de CSP

phénoïdétiques 9/10 (Hongeng *et al*, 1999 ; Schwinger *et al*, 2000). Dans cette deuxième expérience, le patient a reçu 24.5×10^6 CD34/kg et 1×10^4 CD3/kg. Ces deux expériences d'utilisation de CSP à la place de la MO ont été des succès.

Nous avons vu jusqu'ici l'importance d'utiliser un conditionnement myéloablatif du fait de la forte immunité résiduelle chez les receveurs pouvant entraver la prise de la greffe. De plus les études récentes semblent montrer qu'un chimérisme mixte (souvent obtenu après un conditionnement non myéloablatif) est associé à une mauvaise reconstitution plaquettaire et à une incidence élevée de survenue de manifestations autoimmunes. Toutefois, nous avons retrouvé dans la littérature une expérience d'allogreffe avec conditionnement non myéloablatif chez un patient de 26 ans, atteint de WAS et ayant de lourds antécédents infectieux ainsi qu'une atteinte pulmonaire (Longhurst *et al*, 2002). Le conditionnement était constitué de CAMPATH 1H, de Fludarabine et de Cyclophosphamide. Un chimérisme mixte stable a été observé sur les lymphocytes T ainsi qu'un chimérisme majoritairement receveur sur les polynucléaires. Toutefois, la restauration de l'immunité et la résolution du déficit immunitaire ont été obtenues chez ce patient sans complication majeure post-greffe.

En conclusion de cette revue bibliographique sur les allogreffes dans le WAS on peut retenir les points suivants :

- Il est important d'allogreffer le plus tôt possible, les patients, une fois le diagnostic posé, les résultats des allogreffes en terme de survie étant meilleurs avant l'âge de 5 ans.
- Il est préférable de ne pas réaliser de splénectomie chez un patient susceptible d'être allogreffé, ce geste étant associé à la survenue d'infections après allogreffe de CSH.
- Un conditionnement myéloablatif semble préférable du fait de la forte immunité résiduelle chez les patients d'une part et du fait des complications liées à la présence d'un chimérisme mixte après greffe (mauvaise reconstitution plaquettaire et manifestations autoimmunes). Les conditionnements non myéloablatifs ne doivent être réservés qu'à des situations cliniques particulières.
- Les allogreffes en situation génoidentiques et phénoïdétiques présentent aujourd'hui les mêmes taux de succès avec des survies globales comparables. Lorsqu'un donneur familial génoidentique n'est pas disponible, la recherche d'un donneur phénoïdétique doit être rapidement entreprise. En effet, toutes les études s'accordent à montrer le bénéfice d'une greffe avec donneur phénoïdétique sur une greffe avec un donneur intra familial haploïdentique.
- Le type de greffon peut être indifféremment de la MO des CSP ou du sang placentaire. La plus grande expérience est avec de la MO.

A ce jour, plusieurs équipes s'intéressent à la Thérapie Génique dans le WAS. Comme dans le SCID lié à l'X, les cellules transduites par la protéine WASP ont un avantage de survie par rapport aux cellules déficientes en WASP. Des études pré-cliniques ont montré qu'une transduction rétrovirale ou lentivirale permet de corriger le déficit chez la souris Knock out pour WASP ainsi que dans des lignées cellulaires humaines avec une augmentation de la polymérisation de l'actine et la correction au plan fonctionnel des cellules T après transduction (Strom *et al*, 2003 ; Dupré *et al*, 2006). L'intérêt de cette stratégie serait d'apporter des CSH d'origine autologue, évitant ainsi les complications notamment infectieuses et la GVHD retrouvées en situation phénoïdétique et surtout haploïdétique.

Auteurs	Donneur	n	Conditionnement	Prophylaxie GVHD	Greffon	Survie Globale	Chimérisme Mixte	GVHD	Cause de décès	Commentaires
Brochstein et al, 1991	Géno	11	MA (Bu-Cy)		MO	10/11 (28 à 145 mois)			cGVHD et Pneumopathie Interstitielle	
	Haplo	6	MA (ICT-Cytarabine)		MO	1/6 (52 mois)			Lymphomes : 3 GVHD : 1 Pancytopenie : 1 Encéphalite vir. : 1 GVHD : 1	
Oszahin et al, 1996	Géno	10	MA (Bu-Cy) ICT-Cy avant 1981		MO	8/10 (1.5 à 16.5 ans)	2/10	≥II : 4		Mauvais résultats des allogreffes haploidentiques
	Haplo	17	MA (Bu-Cy) + SAL ou Anti-LFA1+/- Anti-CD2	T-déplétion	MO	6/15	5/12 évaluable	≥ II : 5	Infections vir. : 8 Thrombopénie : 1	
	Phéno	1		T-déplétion	MO	1/1				
Filipovitch et al, 2001	Géno	55	MA (Bu-Cy) ou ICT : 4/55	CSA et/ou MTX	MO	87%		≥II : 16%	majoritairement	Taux de survie des patients allogreffés en situation phénoïdétique avant 5 ans identique à celui après greffe génoïdétique
	Haplo	48	MA (Bu-Cy) ou ICT : 11/48	CSA et/ou MTX +T- déplétion : 26	MO	52%		≥II : 30%	Infections	
	Phéno	67	MA (Bu-Cy) ou ICT : 14/67	CSA et/ou MTX +T-déplétion : 11	MO	71% < 5 ans : 87% > 5ans : 24%		≥II : 56%	GVHD	
Tsuji et al, 2006	Géno	2	MA (Bu-Cy)	CSA et/ou MTX	MO	2/2		≥II : 0		Rôle bénéfique du SAL à confirmer dans une étude prospective.
	Haplo	4	MA (Bu-Cy ou ICT-Cy)	+ T-déplétion	MO	2/4		≥II : 0	Infections vir. : 2	
	Phéno	6	+ SAL		MO : 4/6 CB : 2/6	5/6		≥II : 2/6	Microangiopathie thrombotique : 1	
Knutsen et al, 2005	Phéno	3	MA (Bu-Cy –SAL)	CSA + Corticoïdes		3/3		≥II : 1		CB : bons résultats. Risque transmission EBV diminué.
Kobayashi et al, 2006	Géno	11	MA (Bu-Cy) +SAL : 2	CSA et/ou MTX	MO et CSP	81.8% (5 ans)		≥II : 3	14 décès au total	- Meilleure survie quand allogreffe avant 5 ans. - Très bons résultats des allogreffes phénoïdétiques MO ou CB.
	Haplo	10	MA (Bu-Cy) ou ICT: 3 + SAL : 1	CSA et/ou MTX	MO et CSP	37.5% (5 ans)		≥II : 4	Infections : 9 GVHD : 3 Saignements : 1 Microangiopathie thrombotique : 1	
	Phéno	36	MA (Bu-Cy) ou ICT: 10 + SAL : 17	CSA et/ou MTX	MO : 21 CB : 15	80% (5 ans)		≥II : 14		
Pai et al, 2006	Géno	4	MA (Bu-Cy)	CSA	MO CB : 1/4	100% (3 à 132 mois)	0	≥II : 0		Chimérisme mixte associé à une faible reconstitution plaquettaire.
	Haplo	2	MA (Bu-Cy) + Thio/Campath ou + Thio/SAL.	CSA + T-déplétion	MO	0	non évaluable	≥II : 0	Infections vir. : 1 Hémorr. cérébr. : 1	Efficacité des conditionnements NMA sur la thrombopénie ?
	Phéno	16	MA (Bu-Cy) + SAL : 13	CSA	MO	81.2% (3 à 132 mois)	6/13	≥II : 1	Infections vir. : 3	

Oszahin et al, (Révision positive à Blood)	Géno	45	MA (Bu-Cy)	CSA et/ou MTX	MO CB : 3	88% (7ans)	4	cGVHD : 2	- Corrélation entre chimérisme mixte et manifestations autoimmunes. - Corrélation entre splénectomie et infections post greffe.
	Haplo	19	MA (Bu-Cy) + SAL ou Anti-LFA1 +/- Anti-CD2 : 13	CSA et/ou MTX + T-déplétion	MO CSP	55% (7ans)	5	cGVHD : 2 cGVHD : 3	
	Phéno	32	MA (Bu-Cy) + SAL ou Anti-LFA1 +/- Anti-CD2 : 25	CSA et/ou MTX + T-déplétion : 5	MO CSP	71% (7 ans)	9	3 décès tardifs : infections : 2 Addison : 1	
Longhurst et al, 2002	Phéno	1	NMA Fluda+Campath+Cy	CSA	MO	1/1	1 stable	1	Restoration de l'immunité

Tableau 3 : Tableau de synthèses des principales expériences d'allogreffes dans le WAS publiées depuis 1991

n : Nombre. *Géno* : Génoidentique. *Phéno* : Phénoidentique. *Haplo* : Haploidentique. *MA* : Conditionnement myéloablatif. *NMA* : Conditionnement non myéloablatif. *Bu* : Busulfan. *Cy* : Cyclophosphamide. *SAL* : Sérum anti-lymphocytaire. *Thio* : Thiotépa. *ICT* : Irradiation corporelle totale. *Fluda* : Fludarabine. *CSA* : Ciclosporine. *MTX* : Méthotrexate. *MO* : Moelle osseuse. *CSP* : Cellules souches périphériques. *CB* : Sang placentaire. *Infections vir* : Infections virales. *Hémorr cerebr* : Hémorragie cérébrale.

II-2-2- Recommandations du groupe de travail sur les DI de l'EBMT pour les allogreffes dans les syndromes de Wiskott Aldrich.

Ces recommandations (communes à trois autres déficits immunitaires : le Déficit immunitaire combiné, le Déficit en adhésion leucocytaire et le Déficit en Purine nucléoside phosphorylase) ont été proposées également en Septembre 2003 lors d'une « Working Party » sous l'égide de l'EBMT (European Bone Marrow Transplantation) et de l'ESID (European Society of Immunodeficiency) par l'équipe Wilhelm Friedrich. Elles ont ensuite été révisées et formalisées en 2004 puis déposées sur le site de l'ESID. Elles ont été retranscrites en français ci-après.

II-2-2-1 Donneur Génoidentique intra-familial

- Conditionnement par Busulfan (16 à 20mg/kg en dose totale selon l'âge de J-10 à J-7) et Cyclophosphamide (50 mg/kg/j pendant 4 jours de J -5 à -J2)
- Pas de déplétion T du greffon
- Pas d'administration de serum anti-lymphocytaire
- Ciclosporine seule (sans Méthotrexate associé) en prévention de la GVHD

II-2-2-2 Donneur non apparenté ou intra-familial

- Option 1: *Sans déplétion T*

- Conditionnement par Busulfan (16 à 20mg/kg en dose totale selon l'âge) puis Cyclophosphamide (50 mg/kg/j pendant 4 jours)
- Administration de sérum anti-lymphocytaire
- Prévention de la GVHD par Ciclosporine et Méthotrexate

- Option 2: *Avec déplétion T*

- Conditionnement pas Busulfan (16 à 20mg/kg en dose totale selon l'âge), Fludarabine (40mg/m²/j pendant 4 jours) et Cyclophosphamide (60 mg/kg/j pendant 2 jours).
- Administration de sérum anti-lymphocytaire (2,5 mg/kg/j pendant 4 jours, total 10 mg/kg)

- Prévention de la GVHD par la déplétion T. Pas d'addition de Ciclosporine ou de Méthotrexate.

- Option 3: *Conditionnement non myéloablatif*

II-2-2-3 Donneur Haploidentique intra-familial

- Conditionnement pas Busulfan (16 à 20mg/kg en dose totale selon l'âge), Fludarabine (40mg/m²/j pendant 4 jours) et Cyclophosphamide (60 mg/kg/j pendant 2 jours).
- Administration de sérum anti-lymphocytaire (2,5 mg/kg/j pendant 4 jours, total 10 mg/kg)
- Prévention de la GVHD par déplétion T. Pas d'addition de Ciclosporine ou de Méthotrexate.

II-3- Etat de la littérature sur la greffe de Cellules souches hématopoïétiques dans le Syndromes de DiGeorge

Dans ce chapitre, nous ferons une synthèse de la littérature sur la greffe de cellules hématopoïétiques allogéniques mais également sur la greffe de tissus thymiques prélevés après la naissance et cultivés *in vitro* avant implantation. Ces traitements n'ont été pratiqués que chez des patients atteints d'un déficit immunitaire profond ne se corrigeant pas avec le temps et qualifiés de cDGS. Les patients atteints de pDGS ne nécessitent pas de tels traitements.

La première allogreffe de moelle osseuse (MO) fut rapportée dans la littérature en 1987 et réalisée chez une petite fille atteinte de cDGS, âgée de 7 mois environ (Goldsobel *et al*, 1987). Le donneur était un frère de la patiente, présentant une incompatibilité HLA-DR. Le nombre de cellules nucléées totales (CNT) injectées était de $1.2 \cdot 10^9/\text{kg}$. Aucun conditionnement ni aucune prophylaxie de la GVHD n'ont été administrés. La prise du greffon n'a été observée que sur les lymphocytes T (100% XY) alors que sur les autres populations les cellules étaient 100% receveur (par exemple les lymphocytes B). L'évolution clinique de la patiente a été très favorable et les fonctions immunitaires *in vitro* se sont considérablement améliorées. Nous avons pu avoir des informations cliniques récentes sur la patiente : elle est âgée de 24 ans, en bonne santé avec quelques infections parfois sévères (une pneumonie l'année passée). Au plan immunitaire, elle a des taux protecteurs d'anticorps anti-pneumococciques, un ratio CD4/CD8 : 1, et un répertoire T avec des CDR3 de taille restreinte comparé au témoin.

La deuxième allogreffe de MO a été rapportée en 1989 et il s'agissait d'un cas identique à celui décrit précédemment : une petite fille atteinte de cDGS, âgée de 5 mois allogreffée avec son frère génoidentique, en l'absence de tout conditionnement et de toute prévention de la GVHD (Borzy *et al*, 1989). La prise de greffe n'a été objectivée que sur les lymphocytes T (100% XY) mais pas sur les autres populations cellulaires (par exemple Lymphocytes B 100% XX). L'évolution clinique et la reconstitution immunitaire périphérique ont été là aussi spectaculaires.

Cinq autres allogreffes de MO ont été rapportées dans la littérature mais sans détail (Buckley *et al*, 1994).

Puis en 1998, est rapportée le 8^{ème} cas d'allogreffe de MO dans la littérature. Il s'agit cette fois d'un garçon de 13 mois, allogreffé avec son frère génoidentique et recevant $8 \cdot 10^8$ CNT/kg (Matsumoto *et al*, 1998). L'enfant a reçu un conditionnement constitué uniquement de sérum anti-lymphocytaire afin de prévenir tout risque de rejet du fait de la présence d'un faible pourcentage de lymphocytes T résiduels chez le receveur. La prophylaxie de la GVH a été assurée par l'association ciclosporine A et méthotrexate court. Cependant, aucune prise n'a pu

être objectivée à la suite de cette allogreffe (chimérisme 100 % receveur à J55). Une deuxième allogreffe a alors été réalisée lorsque l'enfant avait 19 mois, avec le même donneur, et une dose de 6×10^8 CNT/kg a été réinjectée. Un conditionnement plus fort a été administré (Busulfan 16 mg/kg et Cyclophosphamide 120 mg/kg). La prophylaxie de la GVHD était la même que pour la première allogreffe. Les auteurs décrivent une prise de greffe et un chimérisme complet de type donneur sur la MO et même la présence de cellules CD4+CD45RA+ en augmentation après l'allogreffe, prouvant que des cellules proviennent du thymus. Ils concluent à la présence chez ce patient comme peut-être chez certains autre cDGS d'un résidu thymique non fonctionnel qui se trouve activé par l'interaction avec les lymphocytes T injectés dans le greffon. Dans un tel contexte, un conditionnement avant l'allogreffe se révèle nécessaire.

Sur la base des deux premières expériences d'allogreffes de MO citées ci-dessus, où seule une prise sur les lymphocytes T avaient été obtenue, l'équipe de Bowers *et al*, a proposé de ne réinjecter que des cellules mononucléées du sang périphérique d'un donneur génoidentique au patient, âgé de 7 semaines au moment du diagnostic de cDGS (Bowers *et al*, 1998). L'enfant a reçu tout d'abord 4×10^6 CD3/kg, sans administration préalable de conditionnement ni de prophylaxie de la GvHD. Aucun effet secondaire n'a été observé et les fonctions immunitaires se sont améliorées. Après 20 semaines, le taux de lymphocytes T CD4+ a commencé à décroître et une deuxième dose de lymphocytes a été réinjectée : 2×10^7 CD3/kg permettant de restaurer un taux normal de CD3+ circulants. Les auteurs ont ainsi montré que les lymphocytes T allogéniques peuvent prendre chez le receveur et reconstituer les fonctions immunitaires d'un patient athymique. Ces lymphocytes greffés permettent d'obtenir des réponses immunitaires cellulaires et humorales vis-à-vis des antigènes auxquels le donneur avait été exposé avant le prélèvement. Ce type d'injection permet d'envisager un traitement simple du cDGS, qui peut être réitéré si besoin. Nous nous sommes basés sur cet article pour envisager le traitement d'un enfant atteint de cDGS que nous présentons dans le chapitre « Résultats ».

Depuis, deux expériences similaires ont été rapportées. Celle de l'équipe de W. Friedrich en situation génoidentique et celle de Janda *et al* en situation non apparentée partiellement compatible (Hoenig *et al*, 2004 ; Janda *et al*, 2007). Ces deux expériences ont conduit à une prise exclusive sur les lymphocytes T et à une correction des fonctions immunitaires et humorales.

Plus récemment, un cas de greffe phénoïdentique avec sang placentaire a été rapporté. Il s'agit d'un garçon de 5 mois ½ atteint de cDGS allogreffé avec un sang placentaire contenant 10.3×10^8 CNT sans conditionnement mais avec une prophylaxie de la GVHD reposant sur la ciclosporine (5 mg/kg/j) (Ohtsuka *et al*, 2004). Le patient présentait avant la greffe un état

Auteurs	Donneur	n	Age	Conditionnement	Prophylaxie GVHD	Greffon	Survie Globale	Chimérisme	GVHD	Cause de décès	Commentaires
Goldsobel <i>et al</i> , 1987	Géno (Incompat. HLA-DR)	1	7 mois	0	0	MO	I (à 24 ans)	100% D sur T 100% R sur B et PNN	0		Correction des fonctions immunitaires. Répertoire T avec sous familles Vβ de taille restreinte.
Borzy <i>et al</i> , 1989	Géno	1	5 mois	0	0	MO	I (à 2 ans)	100% D sur T 100% R sur B	0		Correction des fonctions immunitaires. Expansion post-thymique des cellules T du greffon probable.
Buckley <i>et al</i> , 1994	Géno	5				MO					Pas d'informations sur ces patients.
Matsumoto <i>et al</i> 1998	Géno	1	13 mois	SAL (présence de T	CSA + MTX court	MO	I	100% R	0		Absence de prise lors de la 1 ^{ère} greffe.
	Géno (2 ^{ème} greffe)	1	19 mois	résiduels) MA (Bu-Cy)	CSA + MTX court	MO	I (à 7 mois)	100% D	0		Apparition de CD4+CD45RA+ : possible présence d'un résidu thymique.
Bowers <i>et al</i> , 1998	Géno	1	7 semaines	0	0	PBMNC	I	45 à 55 % D	0.	Infection à CMV (antérieure à la greffe)	Correction des fonctions immunitaires cellulaires et humores (contre les Ag auxquels le D a été exposé)
Bensoussan <i>et al</i> , 2002	Géno	1	4 ans	0	CSA + MMF	PBMNC	I (à 8 ans)	45 à 50 % D sur T 100% R sur B et PNN	I Spontanément résolutive		Correction des fonctions immunitaires cellulaires et humores Répertoire T avec quelques sous familles Vβ surexprimées au dépens d'autres.
Ohtsuka <i>et al</i> , 2004	Phéno	1	5 mois 1/2	0	CSA	CB	0	100% D	I		Efficacité de l'allogreffe de CB mis réalisée trop tard compte tenu de l'infection à CMV.
Al-Tamemi <i>et al</i> , 2006	Géno	1	5 mois	0		MO	I	95% D sur T			Correction des fonctions immunitaires cellulaires et humores
Hoenig <i>et al</i> , 2004	Géno	1	4 mois	0	0	PBMNC 1 10 ⁶ CD3/kg répété 3 fois	I (à 2 ans)	100% D sur T	I Spontanément résolutive		Correction des fonctions immunitaires cellulaires et humores. 25% des T sont CD45RA+. Répertoire T diversifié (idem donneur).
Janda <i>et al</i> , 2007	Phéno 8/10 identique	1	6 mois	0	1- 0 2- CSA	2 PBMNC 1- 1.1 10 ⁶ CD3/kg 2- 0.9 10 ⁶ CD3/kg (36 jours après)	I	100% D sur T 100% R sur B, NK, Monocytes	1- II/III (résolutive sous SAL + CSA+ corticoïdes) 2- hépatique (résolutive sous SAL + CSA+ corticoïdes)		Correction des fonctions immunitaires cellulaires et humores

Tableau 5 : Tableau de synthèse des principales expériences d'allogreffes dans le cDGS publiées depuis 1987

n : Nombre. *Géno* : Génoidentique. *Phéno* : Phénoïdentique. Cyclophosphamide. *SAL* : Sérum anti-lymphocytaire. *Bu* : Busulfan. *Cy* : Cyclophosphamide. *CSA* : Ciclosporine. *MTX* : Méthotrexate. *MMF* : Mycophénolate Mofetil. *MO* : Moelle osseuse. *PBMNC* : Cellules mononucléées sanguines. *CB* : Sang placentaire. *D* : Donneur. *R* : Receveur. *CMV* : Cytomegalovirus.

clinique infectieux sérieux (fièvre, diarrhée, toux, pneumopathie interstitielle, gastroentérite, etc..) et une charge virale CMV élevée malgré l'association Gancyclovir-Foscarnet-IVIG. Dans les 20 jours qui ont suivi l'allogreffe, l'état clinique du patient s'est amélioré, le nombre de lymphocytes T a augmenté et la charge virale CMV a diminué. Cependant, l'utilisation de corticoïdes du fait d'une aggravation de la détresse respiratoire et de la diarrhée a conduit à une ré-augmentation de la charge virale CMV et à une détérioration de l'état clinique conduisant au décès du patient. Les auteurs concluent à l'efficacité de l'allogreffe de cellules souches de sang placentaire mais précisent qu'elle aurait dû être réalisée avant que l'infection CMV ne devienne systémique et chronique.

Enfin, un dernier cas d'allogreffe de MO génoidentique sans conditionnement a été rapporté tout récemment chez un enfant présentant un cDGS (Al-Tamemi S.*et al*, 2006). L'étude du chimérisme effectuée deux ans après la greffe montre que 95% des cellules CD3+ sont d'origine du donneur. Les fonctions immunitaires se sont également normalisées.

Parallèlement aux travaux sur l'injection de cellules hématopoïétiques allogéniques, une équipe s'est plus particulièrement investie dans la greffe de tissus thymiques après culture *in vitro*. Ces tissus thymiques sont prélevés chez des enfants de moins de 6 mois qui subissent une chirurgie cardiaque et pour lesquels le tissu thymique a été extrait afin que le chirurgien puisse exposer le champ opératoire. Une fois prélevé, le tissu thymique est découpé en morceaux de 1 mm d'épaisseur déposés sur des filtres de 5 µm de porosité eux-mêmes placés sur des éponges stériles (Markert *et al*, 1997). Ces éponges stériles sont ensuite mises en culture à 37°C, 5% de CO2 en présence de deoxyguanosine (afin de dépléter les thymocytes des tissus thymiques) pendant 12 à 21 jours. Puis, les fragments de tissu sont réimplantés au niveau de la cuisse dans le quadriceps (Rice *et al*, 2004).

La plupart des publications faisant état de ce type de transplantation pour des déficits immunitaires combinés sévères rapportent des résultats très décevants (Reece *et al*, 1981 ; Dictor *et al*, 1984 ; Borzy *et al*, 1979). La première transplantation de tissu thymique post-natal réalisée avec succès dans le cDGS a été rapportée en 1997 chez un enfant âgé de quelques mois et a montré que dans les 4 à 5 mois qui ont suivi cette transplantation, les lymphocytes T ont atteint un niveau légèrement inférieur à la normale et sont devenus capables de répondre aux stimulations mitogéniques et antigéniques *in vitro* (Markert *et al*, 1997). Le taux de lymphocytes CD4+CD45RA+, représentant les lymphocytes T naïfs receveurs a augmenté de façon très importante jusqu'à se stabiliser à un taux normal. Enfin, sur le plan clinique, l'enfant n'a plus fait d'infections.

Une deuxième publication a rapporté 5 cas de cDGS ne présentant pas de lymphocytes T circulants traités par transplantation de tissu thymique post-natal (Markert *et al*, 1999). Après la transplantation thymique, un nombre croissant de lymphocytes T ont été observé chez 4 patients sur 5, une réponse aux mitogènes a été détectée vers J30 pour 3 patients sur 5 et beaucoup plus tardivement pour 1 autre patient (8 mois environ). Chez deux patients où la quantification des TRECs a pu être réalisée, de nouveaux émigrants thymiques ont été observés après transplantation, alors qu'ils étaient indétectables avant le traitement. Les auteurs concluent que la reconstitution des fonctions lymphocytaires T est secondaire à la transplantation de tissu thymique. Pour la première fois, la présence de lymphocytes T d'origine du donneur est rapportée chez 3 patients sur 5 : chez un patient, en très large proportion et chez les 2 autres en faible proportion. Il faut signaler que les tissus thymiques ne sont pas compatibles sur le plan des antigènes HLA avec les receveurs. Cependant, aucune réaction de GVHD n'a été observée cliniquement ou sur les biopsies. Les auteurs attribuent cette absence de GVHD à l'immaturité des cellules du donneur dans les greffons thymiques et à l'éventuelle altération des fonctions des lymphocytes T au cours de la culture. Cependant aucun signe de GVHD ou de rejet n'a été mis en évidence. L'absence de GvHD résulte peut-être du fait de l'immaturité des thymocytes du donneur présents dans le greffon thymique. La période de culture *in vitro* a, de plus, pu altérer les fonctions des lymphocytes T. Sur ces 5 enfants, 3 sont décédés à J45, J66 et J130 respectivement. Sur la base de cette expérience, les auteurs listent les facteurs de risques conduisant à l'échec des transplantations de tissus thymiques : la ventilation mécanique, les infections à CMV et la corticothérapie.

La même équipe complète quelques années plus tard cette expérience en présentant 12 enfants atteints de cDGS sans lymphocytes T circulants et recevant un traitement par transplantation de tissu thymique post-natal (Markert *et al*, 2003). Un taux de survie de 58% est atteint dans cette série, considéré par les auteurs comme remarquable étant donné la sévérité de la pathologie initiale et le faible taux de survie qui lui est attribué du fait notamment des pathologies associées au déficit immunitaire. Une reconstitution immunitaire T similaire à celle observée chez les 5 premiers patients est retrouvée dans cette série, avec la présence de nouveaux émigrants thymiques. L'étude du répertoire V β par immunoscope montre la normalisation des profils entre 8 et 12 mois après transplantation chez 6 patients sur 7 vivants. Sur le plan clinique, les patients ont présenté principalement des infections dans les 100 premiers jours post transplantation. Après 100 jours, les complications observées sont principalement liées aux autres anomalies présentes dans le cDGS. Toutefois des manifestations autoimmunes se sont développées chez 2 enfants (2 épisodes de thrombopénie chez un enfant et une hypothyroïdie à

J427 et une alopécie à J838 chez l'autre enfant). Comme nous l'avons rappelé précédemment, les fonctions thymiques sont, notamment, d'assurer la sélection positive des thymocytes afin d'instaurer la restriction aux molécules HLA exprimées par l'épithélium thymique, puis la sélection négative des thymocytes par la présence de cellules présentatrices d'antigènes (APC) afin d'éviter les manifestations auto-immunes. Dans le cas particulier de ces transplantations de tissu thymique allogénique, il semble que la sélection positive soit assurée vis-à-vis des Ag HLA du donneur par l'épithélium thymique et vis-à-vis des Ag HLA de l'hôte par des fibroblastes de l'hôte qui sont présents sur le site d'implantation thymique et qui se développent au sein du greffon. La sélection négative serait quant à elle réalisée à la fois vis-à-vis des APC du donneur présentes dans le greffon thymique et vis-à-vis des APC de l'hôte qui ont migré dans le greffon thymique. Ceci apporte un éclairage complémentaire sur l'absence de réaction de GVHD lors de ces transplantations.

Plus récemment, la même équipe a rapporté une série de transplantation de tissu thymique post-natal chez 6 enfants présentant un cDGS : 4 d'entre eux présentaient une forme atypique de cDGS caractérisée par la présence de lymphocytes T en périphérie, capables de proliférer *in vitro*, qui ont un répertoire T restreint, issus d'une expansion périphérique en l'absence de toute éducation thymique (Markert *et al*, 2004,1). Sur le plan clinique, ces patients développent un rash et une lymphadénopathie (Market *et al*, 2004,2). Ces patients sont capables potentiellement de rejeter le greffon thymique si aucune immunosuppression n'est administrée avant la transplantation. Dans cette série, les patients ont reçu du SAL avant la transplantation. Dans cette étude, les cellules T oligoclonales préalables à la transplantation ont diminué dans les 2 à 4 semaines après le traitement par SAL. Des cellules T naïves normales sont apparues à partir de 4 mois post-transplantation (comme dans les études présentées précédemment). Le taux de survie est de 5 enfants sur 6, un décès étant dû à une infection à RSV présent avant la transplantation. La reconstitution immunitaire T a été conforme aux précédentes séries avec apparition d'un répertoire T polyclonal d'origine receveur et la mise en évidence d'une thymopoïèse sur toutes les biopsies des greffons allogéniques.

Enfin, la même équipe vient de publier une revue des 54 patients atteints de cDGS inclus dans un protocole de transplantation thymique (Markert *et al*, 2007). A ce jour, 33 des 44 patients (75%) ayant reçu une transplantation thymique sont en vie. La totalité des patients testés après 1 an ont un répertoire T polyclonal. Les principales complications observées sont des manifestations autoimmunes. Les décès survenus sont majoritairement de cause infectieuse et non secondaires à la transplantation thymique.

II-4- Conclusion sur les effets délétères des allogreffes dans ces indications spécifiques

Nous avons pu observer au décours de cette revue bibliographique sur les traitements préconisés dans les 3 déficits immunitaires que nous avons sélectionnés que la greffe de cellules hématopoïétiques allogéniques occupe une place importante.

En effet, c'est à ce jour la seule façon de corriger définitivement un déficit en CD40 Ligand ou un syndrome de WAS. Ceci est moins vrai pour le syndrome de DiGeorge, même si l'apport en terme de survie est important.

Toutefois, nous avons pu voir que cette démarche thérapeutique n'est pas toujours évidente, et qu'il est souvent délicat de décider à quel moment elle doit être mise en œuvre. En effet, ces syndromes ont des degrés d'expression extrêmement variables qui font hésiter les médecins greffeurs avant d'initier une thérapeutique non dénuée d'effets secondaires.

Parmi les effets secondaires que nous avons évoqués au cours de cette revue bibliographique, nous en retiendrons les plus récurrents :

- les infections : les infections à EBV ont largement été évoquées comme cause de décès post-greffe haploidentique dans le WAS. Dans les syndromes HIGM, l'agent infectieux le plus souvent mis en cause a été le *Cryptosporidium parvum*, souvent la cause de complications hépatiques qui, si elles sont trop avancées au moment de l'allogreffe conduisent à l'échec de la greffe.
- La réaction du greffon contre l'hôte : nous avons vu que c'était la cause majeure de décès dans les allogreffes phénoïdiques réalisées dans le WAS. Toutefois, la prévention de la GVHD classique nécessite la prise en considération de l'intensité du conditionnement. En effet, la déplétion T préconisée dans les allogreffes haploidentiques ne peut être envisagée que si le conditionnement réalisé est fortement myéloablatif afin d'éviter tout risque de non prise lié à une persistance immunitaire du receveur.
- Les effets délétères du conditionnement : nous en avons moins parlé dans cette revue bibliographique mais nous avons pu voir que les équipes commencent à s'orienter pour les déficits immunitaires vers des conditionnements non myéloablatifs afin de limiter les séquelles liés aux conditionnements myéloablatifs. De plus, les auteurs ont montré dans le déficit en CD40L et dans le WAS qu'une prise partielle du greffon était suffisante pour corriger le déficit immunitaire. Toutefois, il semble qu'un chimérisme mixte ne soit pas souhaitable dans le WAS.

Deuxième partie : RESULTATS

I- PREVENTION DES COMPLICATIONS INFECTIEUSES AU DECOURS DE L'ALLOGREFFE

I-1- Prévention des syndromes lymphoprolifératifs EBV induits

ARTICLE 1 :

Prevention of EBV-induced-B-lymphoproliferative disorder by *ex vivo* marrow B-cell depletion in HLA-phenotypical or non identical T-depleted bone marrow transplantation.

Bensoussan D.*, Cavazzana-Calvo M.*, Jabado N., Haddad E., Yvon E., Virion JM., Le Deist F., Fischer A.

British Journal of Haematology, 1998, 103 (2) : 543-551.

* Co-auteurs

Ce travail a été initié en 1995, dans le laboratoire de Thérapie cellulaire du Pr M. Cavazzana-Calvo à l'Hôpital Necker. A cette époque, la survenue des syndromes lymphoprolifératifs induits par le virus d'Epstein Barr (BLPD) après allogreffe de CSH en situation haploidentique était d'autant plus redoutée que les traitements présentaient peu d'efficacité (les anticorps anti-CD20 n'étaient pas encore disponibles). En situation haploidentique, la prévention de la GVHD était assurée par déplétion T (anticorps anti-CD2 et anti-CD7 et lyse complément dépendante). Le greffon réinjecté était composé de tous les types cellulaires (notamment CSH, monocytes, cellules NK, lymphocytes B) et de lymphocytes T en quantité très faible. Or, le virus d'Epstein Barr reste quiescent dans les lymphocytes B de tous les individus ayant fait une primo-infection (90% des adultes). La réplication du virus est contenue par l'immunité T spécifique chez tous les individus immunocompétents. Dans le contexte de l'allogreffe, les greffons injectés contenaient des lymphocytes B porteurs de l'EBV mais pas assez de lymphocytes T spécifiques anti-EBV. C'est pourquoi, nous avons proposé d'associer à la déplétion T du greffon, une déplétion B afin de diminuer la charge virale EBV injectée et de limiter les risques de lymphoprolifération. Ce travail a été initié lorsque j'étais interne dans le service du Pr Cavazzana-Calvo et a été poursuivi pendant 18 mois. J'ai pu participer au traitement des greffons de quelques patients. J'ai réalisé le recueil de données biologiques et cliniques qui a conduit à l'étude comparative présentée dans l'article ci-après. Nous avons pu observer que dans le groupe de patients ayant reçu un greffon déplété en lymphocytes T et B aucun BLPD n'est survenu alors que dans le groupe témoin de patients ayant reçu un greffon déplété uniquement en lymphocytes T, 7 BLPD ont été recensés. Nous avons pu conclure que la déplétion B est un moyen efficace et simple pour la prévention des EBV- BLPD.

METHODE :

Deux groupes de 19 patients ont été étudiés : un groupe d'étude (d'Avril 1995 à Novembre 1996) ayant reçu un greffon déplété en lymphocytes T et en lymphocytes B et un groupe contrôle (à partir de Décembre 1992) ayant reçu un greffon déplété en lymphocytes T uniquement.

Dans le groupe d'étude, l'âge moyen était de 37.9 mois. Treize enfants étaient atteints d'un déficit immunitaire congénital et 6 d'une hémopathie maligne. Onze enfants ont bénéficié d'un donneur haploidentique (père ou mère) alors que 8 enfants ont bénéficié d'un donneur phénoidentique. Les sérologies EBV des donneurs étaient positives dans 17 cas et inconnues dans les 2 autres cas.

Dans le groupe contrôle l'âge moyen était de 35.1 mois. Seize patients étaient atteints d'un déficit immunitaire congénital et 3 d'une hémopathie maligne. Quinze enfants ont bénéficié d'un donneur haploidentique et 4 d'un donneur phénoidentique. Les sérologies EBV des donneurs étaient positives dans 17 cas, négative dans un cas et inconnue dans un cas. Les patients des deux groupes ont reçu des conditionnements de greffe myéloablatifs adaptés à chaque pathologie.

Tous les greffons médullaires ont été déplétés en lymphocytes T afin de prévenir les réactions de GVHD. La déplétion T *ex vivo* du greffon a été réalisée avec des anticorps monoclonaux : anti-CD2 (B-E2, mouse IgG2b, Diaclone, Besançon, France) et anti-CD7 (B-B7, mouse IgG2b, Diaclone, Besançon, France) plus de complément de lapin produit par l'ETS de Besançon. Le nombre de lymphocytes T injectés aux patients du groupe d'étude était significativement plus faible que le nombre de lymphocytes T injectés aux patients du groupe contrôle : respectivement $1.5 \cdot 10^5 \text{CD3/kg}$ et $3.6 \cdot 10^5 \text{CD3/kg}$ ($p < 0.02$). Le nombre moyen de cellules CD34⁺ injectées aux patients des deux groupes n'était pas significativement différent : $6.95 \cdot 10^6 \text{CD34/kg}$ pour le groupe d'étude et $10.4 \cdot 10^6 \text{CD34/kg}$ pour le groupe contrôle. Cependant, ce paramètre n'avait été évalué que pour 3 greffons du groupe contrôle.

Les patients du groupe d'étude ont reçu un greffon médullaire également déplété en lymphocytes B. Onze greffons ont été déplétés par une technique de lyse dépendante du complément de lapin avec des anticorps monoclonaux anti-CD19 (B-G23, mouse IgG2b, Diaclone, Besançon, France). Les huit autres greffons ont été déplétés en lymphocytes B par une technique de billes immunomagnétiques : Max SepTM (Magnetic cell separation system, Baxter), après incubation avec un anticorps anti-CD19 (R 9909, Baxter, Munich, Germany) et

un anticorps anti-CD20 (R 9920, Baxter) puis avec des billes immunomagnétiques Dynal. Le nombre moyen de lymphocytes B injectés aux patients du groupe d'étude était de $0.5 \pm 0.85 \times 10^6$ CD22/kg (de 0.016 à 5.2×10^6 CD22/kg). Les déplétions B les plus importantes ont été obtenues avec la technique immunomagnétique.

DISCUSSION :

Nous avons pu montrer dans ce travail que la déplétion B était une méthode simple et non délétère pour le greffon. Nous avons observé dans cette étude qu'une déplétion B de 1 Log (en médiane 0.5×10^6 cellules B/kg) était efficace et suffisante pour prévenir la survenue d'un EBV-BLPD.

L'utilisation de produits d'origine animale (comme le complément de bébé lapin) chez l'homme n'a plus été autorisée lorsque les activités de thérapie cellulaire ont été encadrées par la législation. La seule technique disponible permettant de réaliser une déplétion T sans produit d'origine animale a été pendant longtemps et est encore aujourd'hui la sélection positive CD34+ par méthode immunomagnétique. Cette technique permet de réaliser une déplétion de tous les types cellulaires autres que CD34+ et notamment une déplétion T et B. Cependant, la société Miltenyi propose aujourd'hui une déplétion T efficace avec des anticorps anti-CD3 par méthode immunomagnétique, associée à une déplétion B systématique du fait de la présence d'anticorps anti-CD19. A la lumière de cet exemple, on constate qu'aujourd'hui il n'est plus envisageable de réaliser une déplétion T sans y associer une déplétion B, moyen de prévention efficace de la survenue des EBV-BLPD.

Prevention of EBV-induced B-lymphoproliferative disorder by *ex vivo* marrow B-cell depletion in HLA-phenoidential or non-identical T-depleted bone marrow transplantation

M. CAVAZZANA-CALVO,¹ D. BENSOUSSAN,¹ N. JABADO,² E. HADDAD,² E. YVON,¹ M. MOSKWA,¹ A. TACHET DES COMBES,³ M. BUISSON,⁴ P. MORAND,⁴ J. M. VIRION,⁵ F. LE DEIST² AND A. FISCHER²
¹Etablissement de Transfusion Sanguine-Hôpital Necker, Paris, ²Unité d'Immuno-Hématologie Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, ³Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Necker, Paris, ⁴Laboratoire de Virologie Médicale et Moléculaire (RIAP), C.H.U. de Grenoble, et ⁵Service Informatique Médicale Épidémiologie et Statistique du CHU de Nancy, France

Received 10 April 1998; accepted for publication 13 July 1998

Summary. HLA-mismatched bone marrow transplantation (BMT) is hampered by three major complications: graft rejection, acute graft-versus-host disease (aGVHD) and delayed immune reconstitution. Infusion of anti-LEA1 plus anti-CD2 monoclonal antibodies (MAb), combined with *ex-vivo* T-cell depletion of the graft, was efficient in preventing graft rejection and aGVHD. Nevertheless, disease-free survival was limited by the high frequency of lethal infections, including EBV-induced lymphoproliferative disease (BLPD), which originates mostly from donor B cells, with an incidence of 5–30%. To decrease the rate of this complication, *ex-vivo* B-cell depletion was attempted.

This study compares a group of 19 patients who received a T- and B-cell-depleted marrow from an HLA-mismatched related donor with a retrospective control group of 19

patients, who had received T-cell-depleted marrow by the same method. The level of T-cell depletion was similar in the two groups. For B-cell depletion, two different methods were compared. The median number of B cells infused in the study group was 0.46/kg. Engraftment and aGVHD incidence were similar in the two groups. No EBV donor-derived BPLD occurred in the study group, compared with seven in the control group, four of whom died because of EBV-BPLD. Event-free survival was significantly different between the two groups. We conclude that *ex-vivo* B-cell depletion of the graft may be a useful means of preventing EBV-BPLD, and warrants further study on a larger group of patients.

Keywords: mismatched BMT, EBV lymphoproliferative disorder, B-cell depletion, prevention of BLPD.

Allogeneic stem cell marrow transplantation (BMT) is increasingly used as a treatment for haematological neoplasias, syndromes of bone marrow failure and congenital disorders of the lymphohaemopoietic system (Thomas, 1983; Bortin & Rimm, 1986). This treatment was initially restricted to patients with an HLA-identical sibling. However, HLA-identical bone marrow transplantation is available to only approximately 20–30% of potential transplant candidates because of the lack of HLA-identical related donors (Westoff, 1986). The use of HLA-phenoidential unrelated donors has extended the possibility of BMT in 30–50% of patients according to the degree of incompatibility accepted (Hansen *et al.*, 1980; Beatty *et al.*, 1985; Kernan *et al.*, 1993;

Spencer *et al.*, 1995). However, HLA-nonidentical BMT from a related donor remains the only therapeutic option for patients who lack an HLA-identical related or compatible unrelated donor (Przeplorka *et al.*, 1996).

Graft-versus-host disease (GVHD) remains a major problem in this setting. T-cell depletion of stem cells reduces the incidence and severity of this complication (Beatty *et al.*, 1988; Blazar *et al.*, 1997; Ash *et al.*, 1990). However, it increases the risk of graft rejection and persistent immunodeficiency. The risk of rejection can be reduced by increasing the number of infused stem cells by using mobilization with G-CSF (Aversa *et al.*, 1994) or by the administration of immunosuppressive reagents such as anti-thymocyte globulins (ATG), Campath-1G (Hale & Waldmann, 1996) or monoclonal antibodies directed against adhesion molecules: anti-LEA1 and anti-CD2 (Jabado *et al.*, 1996; Cavazzana-Calvo *et al.*, 1996). The significant delay in immune reconstitution remains a major problem in

Correspondence: Dr Marina Cavazzana-Calvo, Etablissement de Transfusion Sanguine, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 rue de Sévres, 75743 Paris Cedex 15, France.

this setting. It is due to the removal of mature T cells from donor marrow (Keever *et al.* 1989; Roux *et al.* 1996), *in vivo* immunosuppression and HLA disparity between donor and recipient possibly resulting in suboptimal interaction between antigen-presenting cells and immune system effector cells. It contributes to a dramatic incidence of viral life-threatening infections following transplantation. Cytomegalovirus (CMV) and Epstein Barr virus (EBV) are the most frequently responsible agents. CMV was the most frequent cause of death until antiviral agents started to be used prophylactically and therapeutically, reducing the incidence of CMV pneumonia (Wang *et al.* 1996; Schmidt *et al.* 1991; Koehler *et al.* 1997; Forman & Zaia, 1994; Goodrich *et al.* 1994).

However, EBV remains a problem with an incidence of EBV-related B-cell lymphoproliferative disorders (BLPD) following T-cell-depleted HLA mismatched or phenotypical BMT ranging from 5% to 30% in most series (Zutter *et al.* 1988; Shapiro *et al.* 1988b). Different treatments have been proposed including chemotherapy, gancyclovir, interferon alpha (IFN α) together with gamma globulins (Shapiro *et al.* 1988a), anti B-cell monoclonal antibodies (Benkerrou *et al.* 1993; Blanche *et al.* 1988; Fischer *et al.* 1991), injection of donor T cells if donor (Papadopoulos *et al.* 1994) and recipient are HLA compatible or EBV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) (Heslop *et al.* 1994). Although some of these therapeutic strategies have been shown to be partially effective, the present risk of mortality associated with EBV-BLPD remains high.

Since most EBV-BLPD stems from donor B cells, we have investigated *ex-vivo* B-cell depletion in an effort to reduce EBV-BLPD incidence after HLA mismatched or phenotypical BMT.

In this report we present the results of a comparative study between a study group of 19 patients receiving T- and B-cell-depleted bone marrow and a control group of 19 patients receiving T-cell-depleted bone marrow.

PATIENTS AND METHODS

Patients. The study group consisted of 19 consecutive children who were transplanted with T- and B-cell-depleted marrow between April 1995 and November 1996, at Unité d'Immunologie et Hématologie Pédiatrique, Hôpital Necker, Paris. The characteristics of the patients are shown in Table 1. The mean age was 37.9 months (range 3 months to 12 years) and mean weight was 13.4 kg (6–33 kg). 13 patients had an inherited condition and six had malignant disease. Donors were related to recipients (father or mother) in 11 cases and were matched unrelated in eight cases. Extended HLA serotyping and genotyping for A, B, DR and DQ was performed in recipients and potential donors. The selection of related donors was primarily based on the results of HLA typing. EBV serology of the donors was positive in 17 cases and unknown in two cases. EBV recipient serology was negative in seven cases and positive in 12 cases.

The control group consisted of 19 consecutive patients

Table 1. Study group patients characteristics and outcome.

Pt	Diagnosis*	Age (months)	Weight (kg)	HLA incompatibility†	Conditioning regimen‡	EBV-BLPD	Survival
1	T-cell ID	30	12.3	3 Ag	Cy/Bu/Ab	—	Alive (900+ d)
2	SCID-X1	10	8.2	3 Ag	Cy/Bu/Ab	—	Alive (660+ d)
3	T-cell ID	120	28	3 Ag	Cy/Bu/Ab/Thio	—	Died (90 d)
4	SCID-X1	5	6.5	1 Ag	Ab	—	Alive (600+ d)
5	ALL α (4,11) CR1	7	7.5	2 Ag	Bu/Ab/Thio/Mel	—	Died (150 d)
6	ALL α (4,11) CR1	8	8.3	MUD	Bu/Ab/Thio/Mel	—	Died (83 d)
7	ALL α (4,11) CR1	3	7.7	2 Ag	Bu/Ab/Thio/Mel	—	Died (240 d)
8	PHL	4.5	6.3	2 Ag	Cy/Bu/Ab/ATG	—	Alive (665+ d)
9	PHL	24	11.3	MUD	Cy/Bu/Ab/ATG	—	Alive (600+ d)
10	Amegakaryocytosis	36	14.7	3 Ag	Cy/Bu/Ab/Thio	—	Died (101 d)
11	PHL	10	6.5	MUD	Cy/Bu/Ab/ATG	—	Alive (420+ d)
12	SCID-X1	64	16.5	MUD	Cy/Bu/Ab/ATG	+	Died (70 d)
13	CD40-ligand deficiency	144	33	MUD	Cy/Bu/Ab	—	Died (150 d)
14	ALL CR1	27	15	3 Ag	Cy/Bu	—	Died (150 d)
15	Myelodysplasia	31	13.3	MUD	Cy/Bu	—	Alive (390+ d)
16	Griscelli disease§	28	12.5	3 Ag	Cy/Bu/Ab	—	Alive (380+ d)
17	T-cell ID	6	6	MUD	Cy/Bu/Ab	—	Alive (350+ d)
18	CD40-ligand deficiency	146	29.3	MUD	Cy/Bu/Ab	—	Alive (360+ d)
19	ALL α (11,19) CR1	18	11	1 Ag	Cy/Bu/Thio/Ab	—	Died (14 d)

*T-cell ID = T-cell immunodeficiency; SCID = severe combined immunodeficiency; ALL = acute lymphoblastic leukaemia; PHL = familial haemophagocytic lymphohistiocytosis.

†MUD = Matched unrelated donor; Ag = HLA antigens.

‡Cy = cyclophosphamide; Bu = busulphan; Ab = anti-LEA1 and anti-CD2 monoclonal antibodies; Mel = melphalan; ATG = anti-thymocyte globulin.

§Griscelli syndrome (Klein *et al.* 1994).

Table II. Control group patients characteristics and outcome.

Pt	Diagnosis*	Age (months)	Weight (kg)	HLA incompatibility†	Conditioning regimen‡	HBV-BLPD	Survival
A	AML 7	19	11.3	3 Ag	Cy/Bu/Ab	–	Alive (1530+ d)
B	NHL pre-B	36	11.8	2 Ag	TBI/Ara/Mel	–	Alive (1140+ d)
C	WAS	65	18	MUD	Cy/Bu/Ab	+	Died (80 d)
D	CHS	36	16.5	MUD	Cy/Bu/Ab/VP 16	–	Alive (1040+ d)
E	OP	6	6.3	1 Ag	Cy/Bu/Ab	–	Died (60 d)
F	SCID-X1	48	12	2 Ag	Cy/Bu/Ab	+	Alive (980+ d)
G	SCID-X1	42	15	MUD	Cy/Bu/Ab/Thio	+	Alive (700+ d)
H	SCID-X1	4	6	1 Ag	Cy/Bu/Ab	–	Alive (1740+ d)
I	Hurler's disease	12	10	3 Ag	Cy/Bu/Ab/ATG	–	Died (36 d)
J	ALL (t(9;11) CR1	10	6.5	3 Ag	Cy/Bu/Ab	–	Died (72 d)
K	SCID-X1	25	9.3	3 Ag	Cy/Bu/Ab	+	Died (94 d)
L	SCID-X1	12	10	3 Ag	Anti/Ab/ATG	+	Died (150 d)
M	T-cell ID	96	20	3 Ag	Cy200/Bu 20/Ab	–	Died (60 d)
N	HLA class II deficiency	60	15.5	3 Ag	Cy/Bu/Ab/ATG	–	Died (21 d)
O	XLP	108	34	MUD	Cy/Bu/Ab/VP 16	–	Died (80 d)
P	SCID-X1	10	8.5	2 Ag	Cy/Bu/Ab	+	Died (100 d)
Q	SCID-X1	1	3.7	3 Ag	Cy/Bu/Ab	–	Alive (815+ d)
R	FHL	72	23	3 Ag	Cy/Bu/Ab/ATG	+	Alive (700+ d)
S	Fas deficiency	5	8.2	3 Ag	Cy/Bu/Ab	–	Alive (905+ d)

* AML = acute myeloid leukaemia; NHL = non-Hodgkin lymphoma; WAS = Wiskott-Aldrich syndrome; CHS = Chediak-Higashi syndrome; OP = osteopetrosis; SCID = severe combined immunodeficiency; ALL = acute lymphoblastic leukaemia; T-cell ID = T-cell immunodeficiency; FHL = familial haemophagocytic lymphohistiocytosis.

† MUD = Matched unrelated donor; Ag = HLA antigens.

‡ Cy = cyclophosphamide; Bu = busulphan; Ab = anti-LEA1 and anti-CD2 monoclonal antibodies; Mel = melphalan; VP 16 = etoposide; ATG = anti-thymocyte globulin; Thio = thiotepa.

who were transplanted between December 1992 and August 1995 with T-cell-depleted bone marrow, except for three patients who underwent a second BMT in November 1995; to limit graft manipulations in these high-risk situations, B-cell depletion was not performed. The characteristics of the patients are summarized in Table II. Mean age was 35.1 months (range 1–108 months) and mean weight was 12.9 kg (range 3.7–34 kg). 16 patients had an inherited condition and three had malignant disease. For four patients a second BMT was performed because of the failure of the first BMT. The second BMT only was considered. Donors were related to the recipients in 15 cases and were matched unrelated in four cases. EBV serology of the donors was positive in 17 cases, negative in one case, and unknown in one case. EBV recipient serology was negative in seven cases, positive in 10 cases, and unknown in two.

Conditioning regimen (Tables I and II). The conditioning regimen for children with inherited diseases consisted of busulphan (20 mg/kg total dose for children aged < 6 years or 16 mg/kg for children aged > 6 years, from day –9 to day –6) and cyclophosphamide (200 mg/kg total dose from day –5 to day –2). Patients with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis, Chediak-Higashi syndrome or osteopetrosis additionally received etoposide 900 mg/m² (five patients), thiotepa 300 mg/kg (two patients of the study group), or antithymocyte globulins (seven patients). Patients with severe combined immunodeficiency (SCID) received

busulphan (8 mg/kg) and cyclophosphamide or a non-conditioning regimen.

The conditioning regimen for malignant disease consisted of busulphan (16 mg/kg total dose or 20 mg/kg from day –9 to day –6), melphalan 140 mg/m² and thiotepa 10 mg/kg or cytarabine 18 g/m².

In all cases prevention of graft rejection consisted of the use of an anti-LEA1 monoclonal antibody (MAb) (25.3, mouse IgG1, Pasteur Merieux, Paris, France), and an anti-CD2 MAb (B-E2, mouse IgG2g, Diaclone, Besançon, France). Both antibodies were administered at a dose of 0.2 mg/kg/d from day –3 to day +10 (25.3) or from day –2 to day +11 (B-E2), for a total of 14 injections.

T-cell depletion. All donor marrows were T-cell depleted. Anti-CD2 (B-E2, mouse IgG2b, Diaclone, Besançon, France) and anti-CD7 (B-B7, mouse IgG2b, Diaclone, Besançon, France) monoclonal antibodies plus rabbit complement (ETS Besançon, France) were used for *ex vivo* T-cell depletion in all cases from both the study and control groups.

B-cell depletion. 11 bone marrow samples were B-cell depleted by the complement-dependent lysis technique using an anti-CD19 MoAb (B-G23, IgG2b, Diaclone, Besançon, France). The next eight donor marrows were B-cell depleted by immunomagnetic beads (Max SepTM Magnetic cell separation system, Baxter). Bone marrow mononuclear cells were incubated with anti-CD19 (R 9909, Baxter, Munich, Germany) and anti-CD20 (R 9920, Baxter) MoAb, then

with immunomagnetic beads. A magnetic field retained cells coated to the beads.

Immunofluorescence. T and B lymphocytes and CD34⁺ cells were enumerated, before and after depletion, by binding fluorescent-conjugated MAbs to human cell surface antigen (CD3, CD19, CD22, CD23, CD34). FACScan analysis was thereafter performed (Becton Dickinson, Mountain View, Calif.).

Limiting dilution assay (LDA) (Taswell, 1981). Decreasing numbers of mononuclear cells (MNC) from a bone marrow sample before depletion (80, 40, 20, 10, 5 and 2.5 cells/well) and after depletion (4000, 2000, 1000, 500 and 250 cells/well) were seeded in 96 round-bottom microplates with 5×10^4 irradiated MNC/well from a healthy donor, in a total volume of 200 μ l. 24 replicates for each dilution were seeded. Phytohaemagglutinin P (Difco, Detroit, Michigan, U.S.A.) and IL2 (Tebu, Le Perray en Yvelines, France) were added to the culture at a final concentration of 20 μ g/ml and 40 IU/ml, respectively. The cultures were incubated at 37°C in 5% CO₂ for 10 d. After this delay, negative wells, where no cell proliferation could be observed, were enumerated for each dilution. The Poisson law gave the cell number (x) for which, in 37% of the wells, no clone developed. This number, x , corresponded to the number of T lymphocytes.

Colony-forming cell assay. Bone marrow samples before and after depletion were plated in 35 mm Petri dishes at 1×10^4 cells/ml in a methylcellulose medium supplemented in glutamine (HCC 4431, Stem Cell Technology Inc., Vancouver, BC, Canada) and 100 μ M 2-mercaptoethanol, erythropoietin 50 μ l, lineage 5637 supernatant (Pogh, 1978) 75 μ l and α MEM 25 μ l. Colonies were scored on day 14 and classified morphologically as described previously (Coulombel et al, 1983).

Detection of EBV. For qualitative PCR, samples were homogenized in NET buffer (10 mmol/l tris-HCl, pH 8; 10 mmol/l EDTA, pH 7.4; 100 mmol/l NaCl), and digested with proteinase K (100 μ g/ml) in the presence of 0.5% SDS at 37°C. DNA was obtained after phenol/chloroform extraction and precipitated with ethanol (2.5 vol) in the presence of sodium acetate (3 mol/l, 0.1 vol). After centrifugation at 7000 g for 30 min, DNA was dissolved in sterile water and stored at -20°C. For DNA amplification, a pair of primers BW1 (nucleotides position 14613–14632) and BW2 (nucleotides position 14834–14853) within the *Bam*HI repeated sequence of the B95-8 cell line were used to amplify a fragment of 240 bp. DNA (1 μ g) was denatured at 94°C for 8 min and amplification was carried out by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s and primer extension at 72°C for 60 s in a 2400 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus). After the last cycle, primer extension was continued for 8 min to allow all templates to be completed. After electrophoresis on a 2% agarose gel, DNA was transferred onto a positively charged nylon membrane (Hybond, Amersham) and hybridized with a ³²P-ATP-labelled probe BW3 (nucleotides position 14655–14684). This technique has a sensitivity of three copies/150 000 cells.

Assessment of BMT outcome. GVHD was graded according to Glucksberg et al (1974) and confirmed whenever possible

by histological studies. Engraftment and chimaerism were studied by means of HLA typing, karyotype analysis in cases with sex mismatch, red cell phenotyping in case of ABO disparity between donor and recipients, and microsatellites or Y-chromosome-specific probes (Socie et al, 1992; Nakahori et al, 1986).

Statistical analysis. The nonparametric Mann and Whitney test was used to compare graft quality between study and control groups. The χ^2 test (Pearson or Fischer exact test, two tailed) was used to compare the clinical outcome (engraftment, GVHD and EBV-BLPD incidence) between patients of the two groups. For all tests, a *P* value < 0.05 was considered significant. One year survival and event-free (where event is EBV-BLPD) survival analysis was performed using the Kaplan-Meier method. Analysis was performed after a follow-up of 1 year because too many patients had been censored and no more events could be detected.

RESULTS

B-cell depletion (Table III)

The median number of infused B cells, estimated by the immunofluorescence method with an anti-CD22 MAb, was $0.5 \pm 0.85 \times 10^6$ CD22⁺/kg (range 0.016 – 5.2×10^6 CD22⁺/kg) for 17 evaluable marrow samples. The median magnitude of depletion was 1 ± 0.8 log (range 0.2 – 2.46). When B-cell depletion was performed by complement-dependent lysis, the median number of infused B cells varied among the 10 evaluable patients. For 8/10 evaluable patients $0.65 \pm 0.36 \times 10^6$ CD22⁺/kg (range 0.4 – 0.95×10^6 CD22⁺/kg) was infused. The median magnitude of depletion was 0.93 ± 0.29 log for these eight patients (range 0.46 – 1.47). In two cases $4.90 \pm 0.3 \times 10^6$ CD22⁺/kg were infused (median magnitude of depletion 0.34 ± 0.14 log). When immunomagnetic B-cell depletion was performed, the median number of infused B cells was $0.06 \pm 0.74 \times 10^6$ CD22⁺/kg (range 0.016 – 1.95×10^6 CD22⁺/kg), in seven evaluable cases, with a median magnitude of depletion of 1.63 ± 0.63 log (range 0.7 – 2.46 log). Comparative analysis of median B-cell depletion magnitude achieved by each technique shows that immunomagnetic depletion was more efficient, i.e. 1.63 log versus 0.93 log ($P < 0.01$) and more reproducible than complement-dependent lysis depletion. Complement-dependent lysis depletion was not successful in two cases. Comparative analysis with the control group could only be performed for patient R who had 4.4×10^6 CD22⁺/kg reinfused after T-cell depletion (magnitude of depletion of 0.38 log).

Retrospective EBV-PCR analysis of seven bone marrow samples from the study group before and after T- and immunomagnetic B-cell depletion was performed. In two cases (samples 15 and 16), EBV-PCR detected a signal before depletion and not after. Sample 14 was EBV-PCR positive both before and after a 1.5 log B-cell depletion. In the next four samples (samples 5, 17, 18 and 19), EBV-PCR was negative both before and after B-cell depletion (Fig 1). Serological status was unknown for sample 18 and positive for the other three. Only sample 19 was depleted by complement-dependent lysis.

Table III. Study group marrow samples characteristics.

Pt	Technique of B-cell depletion	No. of B cells infused ($\times 10^6/\text{kg}$)	MNC ($\times 10^8/\text{kg}$)	No. of T cells infused ($10^5/\text{kg}$)		CFU-GM/kg ($\times 10^4/\text{kg}$)	BFU-H/kg ($\times 10^4/\text{kg}$)	CD34 ⁺ ($10^6/\text{kg}$)
				xCD3(IP)	LDA			
1	CD19/CD20 Ab-beads	ND	0.83	2.5	ND	ND	ND	ND
2	CD19 Ab-complement	0.8	1.63	0	0.14	176	134	13
3	CD19 Ab-complement	0.95	0.68	3.4	0.17	98	43.5	7.3
4	CD19 Ab-complement	ND	1.5	1.5	0.023	90	81	ND
5	CD19/CD20 Ab-beads	1.45	1.32	1.45	0.065	272	142	23
6	CD19 Ab-complement	0.5	1	5	ND	188	150	7.5
7	CD19/CD20 Ab-beads	1.95	0.65	1.3	0.4	52	97.5	5.2
8	CD19 Ab-complement	0.4	2.05	2	1.2	303	131	19.5
9	CD19 Ab-complement	4.6	1.1	5	0.7	11	ND	6.8
10	CD19 Ab-complement	0.83	1	3	0.02	108	40	4.7
11	CD19 Ab-complement	5.2	1.3	2.6	0.02	62.4	31	26.8
12	CD19 Ab-complement	0.26	0.4	2.4	ND	75.2	44.5	17.6
13	CD19 Ab-complement	0.5	0.3	0.6	ND	50	19.8	4.1
14	CD19/CD20 Ab-beads	0.06	0.4	0.2	0.1	84	32	2.8
15	CD19/CD20 Ab-beads	0.016	0.8	0.4	0.019	115.8	32	5.9
16	CD19/CD20 Ab-beads	0.023	0.5	1.3	ND	52.2	22	5.4
17	CD19/CD20 Ab-beads	0.1	1	0.5	ND	124	52	3.1
18	CD19/CD20 Ab-beads	0.056	0.6	1.1	ND	38.5	4.5	7.1
19	CD19/ Ab-complement	0.85	1	1.5	0.36	14	6	ND
Median		0.50	1.00	1.50	0.12	87	43.50	6.95
IQR		0.85	0.57	1.70	0.35	69.9	66.50	9.07
CD19/CD20Ab-beads								
Median		0.06						
IQR		0.74						
CD19 Ab-complement								
Median		0.82						
IQR		0.43						

* IP = immunofluorescence; LDA = limiting dilution assay; ND = not done; IQR = interquartile range.

As a control, retrospective EBV-PCR analysis of six bone marrow samples from the control group, before and after T-cell depletion was also performed (data not shown). In one case (sample N), PCR detected a signal before and after T-cell depletion. In two cases (samples H and S), EBV-PCR was negative before and positive after T-cell depletion. In the next three samples (E, Q and O), EBV-PCR was negative both before and after T-cell depletion. In no case did T-cell depletion alone result in the loss of EBV detection by PCR.

Composition of marrow samples after B-cell depletion (Table III)

Residual T lymphocytes and CD34⁺ cell were estimated. The median number of MNC infused was not significantly different between study and control groups: $1.00 \times 10^8/\text{kg}$ in the study group and $1.37 \times 10^8/\text{kg}$ in the control group respectively. This result indicated that B-cell depletion did not result in any further significant increase in cell loss. The median number of infused T cells, estimated by immunofluorescence with an anti-CD3 MAb, was significantly, albeit moderately, lower in the study group than in the control group: $1.5 \times 10^5/\text{kg}$ and $3.6 \times 10^5/\text{kg}$ respectively ($P < 0.02$). This difference was also found in LDA: $0.12 \times 10^5/\text{kg}$ in the

study group and $1.05 \times 10^5/\text{kg}$ in the control group respectively ($P < 0.02$). Immunofluorescence staining over-estimated T-cell number as compared with the results obtained by LDA.

Median CD34⁺ cell numbers were not significantly different between the study and the control group, i.e. $6.95 \times 10^6/\text{kg}$ in the study group and $10.4 \times 10^6/\text{kg}$ in the control group. However, this was measured only in three control group marrow samples. Likewise, CFU-GM and BFU-E median numbers were not significantly different between each group: $87.0 \times 10^4/\text{kg}$ CFU-GM and $43.5 \times 10^4/\text{kg}$ BFU-E in the study group and $65.2 \times 10^4/\text{kg}$ CFU-GM and $40.6 \times 10^4/\text{kg}$ BFU-E in the control group respectively.

Clinical outcome

Engraftment and haematological reconstitution. The median time required to achieve a peripheral-blood granulocyte count $> 0.5 \times 10^9/\text{l}$ was 16.4 d in the study group and 21.9 d in the control group. Engraftment of donor cells was achieved in 14/18 (74%) cases of the study group (one patient died 14 d after BMT). In the control group engraftment rate was 15/18 (83%) (one patient died 21 d after BMT). These results were not significantly different and

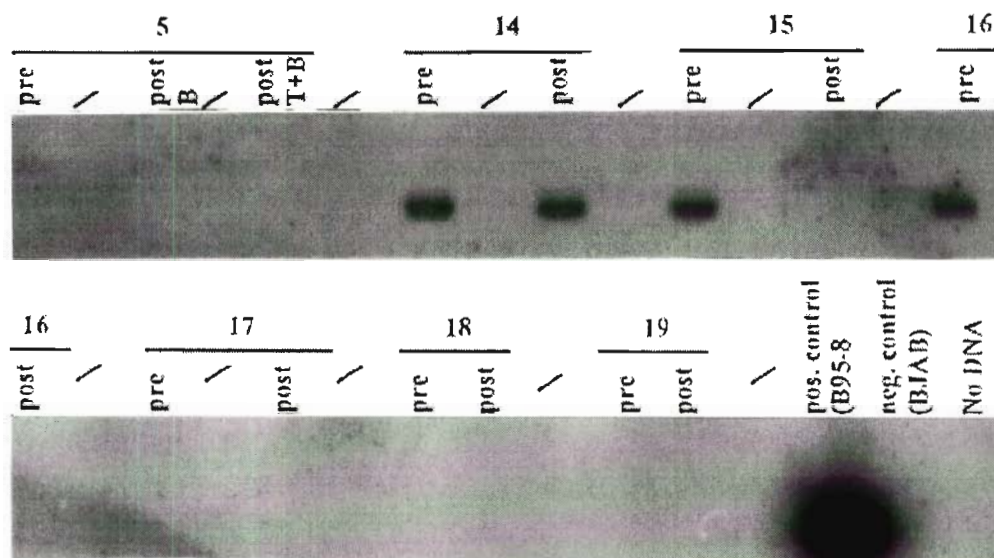


Fig 1. EBV genome detection by PCR in pre- and post-transplantation samples. The samples used for this study (i.e. 5, 14, 15, 16, 17, 18 and 19) correspond to the patient numbers in Table 1. B-cell depletion for sample 19 was performed using a CD19 Ab-complement-dependent lysis technique. For the others samples, B-cell depletion was performed with immunomagnetic beads technique.

indicated that B-cell depletion had no detectable effect on marrow engraftment.

GVHD. Incidence of acute GVHD (aGVHD) was not significantly different in the two groups. However, the severity of aGVHD in the study group appeared higher than in the control group. aGVHD of grades II–IV occurred in 7/14 study group patients (50%), three with grade $\geq$ III aGVHD refractory to intensive immunosuppressive treatment with steroids, cyclosporine, anti-IL2 receptor Mab (Hervé *et al*, 1990) or anti-thymoglobulins (ATG). The control group incidence of aGVHD grade $\geq$ II was 40% (6/15). All cases of aGVHD resolved completely following standard immunosuppressive treatment (cyclosporin A and steroids) with the exception of one patient who additionally required the use of the anti-IL2 receptor MoAb and, later, ATG. Chronic GVHD occurred in 5/14 patients (35.7%) and was lethal in two in the study group. None of the patients in the control group had cGVHD.

Infectious complications and EBV-BLPD. In the study group 7/19 patients (36.8%) developed severe infectious complications. Three patients were infected at the time of BMT. Two of these patients died after BMT due to ongoing infection. None of the patients developed an EBV-BLPD of donor origin. One patient presented with graft failure 28 d after BMT. Simultaneously to autologous reconstitution, he developed an hepatic EBV-BLPD. EBV-B cells were shown to be of host origin, the patient died 70 d after BMT with widespread EBV-BLPD. This patient had severe EBV infection prior to BMT because of his primary immunodeficiency.

In the control group, 11/19 patients (58%) had an infectious complication. EBV-BLPD occurred in 7/19 patients (37%) from B cells of donor origin and was the cause of death in four cases (21%), 94–150 d after BMT. For

example, patient R, who was transplanted with a graft from a donor with a positive EBV serology, containing 4.4×10^6 CD22⁺/kg, developed an EBV-BLPD which was successfully treated with an anti-IL6 antibody. Incidence of EBV-BLPD was significantly higher in the control group than in the study group ($P < 0.02$). When statistical analysis was performed only on patients with inherited conditions, susceptible to higher risk for such a complication, incidence of EBV-BLPD remained significantly increased in the control group compared to the study group ($P < 0.05$).

Immunological reconstitution. In the study group, CD3⁺ lymphocyte counts $> 0.5 \times 10^9/l$ were achieved after an average of 89 (± 40) d in nine evaluable patients. Mitogen- and antigen-induced responses were observed after a mean of 102 (± 27) and of 184 (± 41) d for seven evaluable patients, respectively. All patients in the study group received i.v. immunoglobulin during the first year following transplantation (mean 10 months ± 4.4). Ig substitution was then stopped except in one severe combined immunodeficiency (SCID) patient who had persistent hypogammaglobulinaemia.

In the control group, CD3⁺ lymphocyte counts $> 0.5 \times 10^9/l$ were achieved after an average of 85 (± 10) d in eight evaluable patients. Mitogen- and antigen-induced responses were observed after a mean of 90 (± 24) and of 189 (± 80) d for eight evaluable patients respectively. Two SCID patients in this control group still receive i.v. Ig treatment > 2 years after transplantation. The other evaluable patients received i.v. Ig for a mean time of 10 months (± 3) ($n = 6$). There was no difference in the kinetics of T- or B-cell reconstitution between the two groups.

Survival. 10 patients in the study group (52.6%) remain alive, and eight of these show sustained engraftment with a

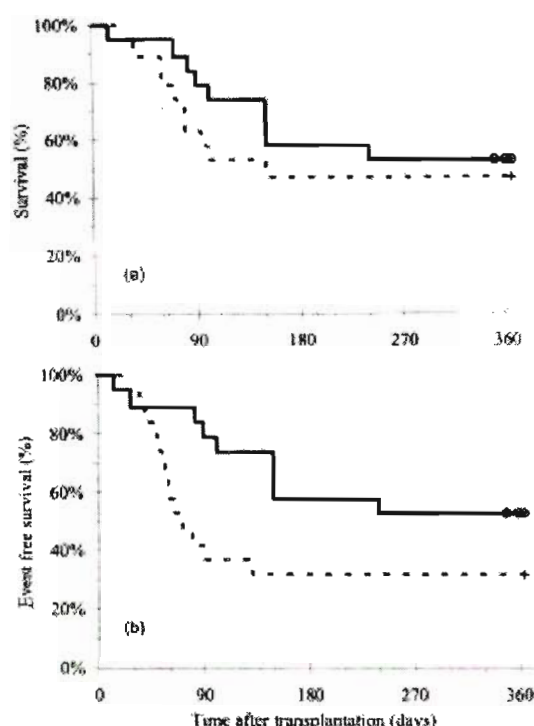


Fig. 2. (a) Survival probability of patients from the study group and control group; (b) event-free survival. Survival and event-free survival (where event is EBV-BLPD) were calculated by using the Kaplan-Meier method. —: Study group; +: censored patients in the study group; - - - -: Control group; +: censored patients in the control group.

median follow-up of 548 d (range 380–900 d). Nine of the patients had an inherited condition and one myelodysplasia. Two patients with autologous reconstitution remain alive (350 d). In the control group, nine patients (47.3%) are alive (700 d to 5 years). One-year survival is not significantly different between the two groups (52.6% for the study group and 47.3% in the control group) (Fig. 2a). On the other hand, 1 year event-free survival rate in the study group is significantly higher than in the control group: 53% and 32% respectively ($P = 0.04$) (Fig. 2b).

In the study group the causes of death were GVHD in three cases, infectious complications in three cases, relapse of haematological malignancies in two cases and veno-occlusive disease in one case. In the control group the causes of death were infectious complications in eight cases, relapse in one case and graft failure in one case.

DISCUSSION

Since the frequency and severity of EBV-BLPD is high following T-depleted HLA mismatched or phenoidentical BMT (Benkerrou *et al.*, 1993), we assessed the feasibility and efficacy of two methods of B-cell depletion of marrow samples

to prevent occurrence of EBV-BLPD. Indeed, as proliferating B lymphocytes are mostly of donor origin, B-cell depletion of the marrow was considered a potentially preventive approach to this problem. In this comparative study, using two different techniques, the efficiency and reproducibility of B-cell depletion in preventing EBV-BLPD was studied. Secondly, the influence of B-cell depletion was assessed on graft quality and clinical outcome.

A median B-cell depletion of 1 log was sufficient to prevent EBV-BLPD in this study. No EBV-BLPD from donor origin occurred in the study group compared to seven in the control group, which led to four deaths. In the study group, one patient died from EBV-BLPD after an autologous reconstitution. This patient had presented with an atypical form of SCID characterized by an increased radiosensitivity of bone marrow progenitor cells and a sibling who had died from EBV lymphoma. We believe that the lymphoma in this patient was due in part to the particular underlying disease.

Bone marrow B cells seem to be the most important source of EBV for recipients, since the risks associated with transfusion products is reduced by viral filtration and leucocyte depletion of red cell and platelet concentrates. EBV-PCR was performed in our study as Rooney *et al.* (1995) showed that EBV-DNA detection in peripheral blood was predictive of EBV-BLPD. EBV-PCR negativity after graft manipulation could be observed only in the study group which demonstrated B-cell depletion specificity and efficiency. However, as few samples were studied, EBV-DNA detection in grafts cannot be considered as predictive of EBV-BLPD. Comparing the two techniques of B-cell depletion used in this study, immunomagnetic B-cell depletion was found to be more efficient and more reproducible than complement-dependent lysis. It was difficult to establish whether the better results obtained using the immunomagnetic method were associated with the use of two monoclonal antibodies. The idea of using a combination of monoclonal antibodies and complement was based on an attempt to decrease the number of manipulation steps. The absence of reproducibility on one hand and the low magnitude of B-cell depletion on the other made it necessary for us to investigate an alternative method. B-cell depletion by immunomagnetic beads is largely used in the autologous BMT setting in order to decrease tumour cell contamination of the graft (Shimazaki *et al.*, 1988). We therefore used the same technology in an allogeneic setting and obtained reproducible results with the desired magnitude of B-cell depletion.

We analysed whether this double selection could have any negative effects on graft composition and/or on clinical outcome. With regards to bone marrow composition, MNC median number was not significantly different between study and control groups. Nevertheless, T-cell median number was significantly lower in the study group compared with the control group. This was not due to unspecific cell loss caused by an increased number of graft manipulations as the MNC number was not affected. It is more likely that the elimination of B cells lead to increased graft purity, and improved the accessibility of T cells. It is of note, as already reported in previous studies (Kernan *et al.*, 1986), that when residual T cells constitute <0.5% of total cells

and when a complement-dependent lysis is used, the quantification of T-cell depletion must be realized by limiting dilution assay. Indeed, complement-dependent lysis continued after complement wash, explaining the discrepancy between immunofluorescence studies performed immediately after the incubation and the limiting dilution assays results. CFU-GM, BFU-E and CD 34⁺ content of the graft was similar between the two groups, showing that the methods used were specifically directed against mature T and B lymphocytes.

With regards to the clinical outcome, the same engraftment rate was found in both groups of patients. Unexpectedly, a greater incidence of severe lethal aGVHD in the study group was observed in spite of a significantly lower T-cell number having been infused into these patients. This observation might be in part explained by the fact that half of the patients of the study group received a reinforced conditioning regimen containing thiopeta as an additional drug.

The kinetics of immunological reconstitution was not further delayed in the study group compared with the control group. The overall incidence of infections was lower in the study group than in the control group and this was essentially due to the decrease in the EBV-BLPD in this group of patients and confirms that bone marrow B cells containing EBV genome represent the main source of post-transplantation EBV-BLPD. This clinical observation agrees with the decreased incidence of EBV-BLPD in patients infused with a bone marrow depletion by Campath-1M antibody which recognizes an antigen expressed on the surface of both mature B and T cells (Hale & Waldman, 1994). Moreover, 1 year event-free survival was higher in the study group than in the control group.

In conclusion, B-cell depletion of the graft seemed to be efficient in this group of patients in preventing EBV-BLPD without side-effects, provided that fewer than a median of 0.5×10^6 B cells were infused to recipients. This result needs confirmation in a comparative clinical trial which should include a higher number of high-risk patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the medical and nursing staff who cared for the patients. We are also indebted to Baxter Co. Cellular Therapies for fruitful collaboration. We thank Miss Mahika Tiouri for typing the manuscript, and Dr Jane Peake for checking it. This work was supported by grants from Inserm, Fondation de France, Direction de la Recherche Clinique de l'AP-HP, and from Association de la Recherche sur le Cancer.

M. Cavazzana-Calvo and D. Bensussan contributed equally to the work.

REFERENCES

- Ash, R.C., Casper, J.T., Chitambar, C.R., Hansen, R., Bunin, N., Truitt, R., Lauton, C., Murray, K., Hunter, J., Baxter-Lowe, L.A., Gotschall, J., Oldham, K., Anderson, T., Camitta, B. & Mentove, J. (1990) Successful allogeneic transplantation of T-cell depleted bone marrow from closely HLA-matched unrelated donors. *New England Journal of Medicine*, **8**, 485–494.
- Aversa, F., Tabilio, A., Terenzi, A., Velardi, A., Falzetti, E., Giannoni, C., Iacucci, R., Zel, T., Martelli, M.P., Gambelunghe, C., Rossetti, M., Caputo, P.E., Latini, P., Aristei, C., Raymond, C., Reisner, Y. & Martelli, M. (1994) Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical 'three-loci' incompatible transplants in leukemia patients by adding of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood*, **84**, 3948–3955.
- Beatty, P.G., Clift, R.A., Mickelson, E.M., Nisperos, B., Flournoy, N., Martin, P., Sanders, J., Stewart, P., Buckner, D., Storb, R., Thomas, D. & Hansen, J. (1985) Marrow transplantation from related donors other than HLA identical siblings. *New England Journal of Medicine*, **13**, 765–771.
- Beatty, P.G., Dahlberg, S., Mickelson, E.M., Nisperos, B., Opelz, G., Martin, P.J. & Hansen, J.A. (1988) Probability of finding HLA-matched unrelated marrow donors. *Transplantation*, **45**, 714–718.
- Benkerrou, M., Durandy, A. & Fischer, A. (1993) Therapy for transplanted lymphoproliferative diseases. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **7**, 467–475.
- Blanche, S., Le Deist, F., Weber, F., Lenoir, G., Fischer, A.M., Brochier, J., Bouchet, C., Delage, M., Griscelli, C. & Fischer, A. (1988) Treatment of severe Epstein Barr virus-induced polyclonal B-lymphocyte proliferation by anti-B-cell monoclonal antibodies. *Annals of Medicine*, **108**, 199–203.
- Blazar, B.R., Kornigold, R. & Valleria, D.A. (1997) Recent advances in graft-versus-host disease (GVHD) prevention. *Immunological Reviews*, **157**, 79–109.
- Bortin, M.M. & Rimm, A.A. (1986) Increasing utilization of bone marrow transplantation. *Transplantation*, **42**, 229–234.
- Cavazzana-Calvo, M., Bordignon, P., Michel, G., Esperou, H., Souillet, G., Leblanc, T., Stephan, J.L., Vannier, J.R., Mechinaud, E., Reiffers, J., Vilmer, E., Landman-Parker, J., Benkerrou, M., Baruchel, A., Pico, J., Bernaudin, F., Bergeron, C., Plouvier, E., Thomas, C., Widjenes, J., Lacour, B., Blanche, S. & Fischer, A. (1996) A phase II trial of partially incompatible bone marrow transplantation for high-risk acute lymphoblastic leukaemia in children: prevention of graft rejection with anti-LFA-1 and anti-CD2 antibodies. *British Journal of Haematology*, **93**, 131–138.
- Coulombel, L., Eaves, A.C. & Eaves, C.J. (1983) Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer. *Blood*, **62**, 291–297.
- Fischer, A., Blanche, S., Le Deist, F., Bordignon, P., Garnier, J.L., Naudet, P., Morinet, F., Le Deist, E., Fischer, A.M., Griscelli, C. & Hirt, M. (1991) Anti-B-cells monoclonal antibodies in the treatment of severe B-cell lymphoproliferative syndrome following bone marrow and organ transplantation. *New England Journal of Medicine*, **324**, 1451–1456.
- Fogh, J. (1978) Cultivation, characterization and identification of human tumor cells with emphasis on kidney, testis and bladder tumors. *National Cancer Institute Monograph*, **49**, 5–9.
- Forman, S.J. & Zaia, J.A. (1994) Treatment and prevention of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: where do we stand? *Blood*, **83**, 2392–2398.
- Glucksberg, H., Storb, R., Fefer, A., Buckner, C.D., Neiman, P.E., Clift, R.A., Lerner, K.G. & Thomas, E.D. (1974) Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation*, **18**, 295–304.
- Goodrich, J.M., Boeckh, M. & Bowden, R. (1994) Strategies for the prevention of cytomegalovirus disease after marrow transplantation. *Clinical Infectious Disease*, **19**, 287–298.

- Hale, F. & Waldmann, H. (1994) Control of graft versus host disease and graft rejection by T-cell depletion of donor and recipient with CAMPATH-1 antibodies: results of matched sibling transplants for malignant diseases. *Bone Marrow Transplantation*, 13, 597–611.
- Hale, G. & Waldmann, H. (1996) Recent results using CAMPATH-1 antibodies to control GVHD and graft rejection. *Bone Marrow Transplantation*, 17, 305–308.
- Hansen, J.A., Clift, R.A., Thomas, E.D., Buckner, C.D., Storb, R. & Gilett, E.R. (1980) Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia. *New England Journal of Medicine*, 303, 565–567.
- Hervé, P., Widjenes, J., Bergerat, J.P., Bordignon, P., Milpied, N., Cahn, J.Y., Clément, C., Béliard, R., Morel-Fourrier, B., Racadot, E., Troussard, X., Benz-Lemoine, E., Gaud, C., Legros, M., Attal, M., Kloff, M. & Peters, A. (1990) Treatment of corticosteroid resistant acute graft-versus-host disease by in vivo administration of anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody (B-B10). *Blood*, 75, 1017–1023.
- Heslop, H., Brenner, M. & Rooney, C. (1994) Clinical protocol: administration of neomycin resistance gene marked EBV specific cytotoxic lymphocytes to recipients of mismatched related or phenotypically similar unrelated donor marrow grafts. *Human Gene Therapy*, 5, 384–397.
- Jabado, N., Le Deist, E., Cant, A., De Graeff-Meesters, B.R., Fasth, A., Morgan, G., Vellodi, A., Hale, G., Bujan, W., Thomas, C., Cavazzana-Calvo, M., Widjenes, J. & Fischer, A. (1996) Bone marrow transplantation from genetically HLA-nonidentical donors in children with fatal inherited disorders excluding severe combined immunodeficiencies: use of two monoclonal antibodies to prevent graft rejection. *Pediatrics*, 98, 420–428.
- Keever, C., Small, T., Flomenberg, N., Heller, G., Felke, K., Black, P., Pecora, A., Gillio, A., Kernan, N.A. & O'Reilly, R.J. (1989) Immune reconstitution following bone marrow transplantation: comparison of recipients of T-cell depleted marrow with recipients of conventional marrow grafts. *Blood*, 73, 1340–1350.
- Kernan, N., Barch, G., Ash, R., Beatty, P., Champlin, R., Filipovich, A., Gajewski, J., Hansen, J., Henslee-Downey, J., McCullough, J., McGlave, P., Perkins, H., Phillips, G., Sanders, J., Stronck, D., Thomas, E.D. & Blume, K. (1993) Retrospective analysis of 462 unrelated marrow transplants facilitated by The National Marrow Donor Program (NMDP) for treatment of acquired and congenital disorders of the lymphohematopoietic system and congenital metabolic disorders. *New England Journal of Medicine*, 328, 593–602.
- Kernan, N., Collins, N.H., Juliano, L., Cartagena, T., Dupont, B. & O'Reilly, R.J. (1986) Clonable T lymphocytes in T-cell depleted bone marrow transplants correlate with development of graft versus-host disease. *Blood*, 68, 770–773.
- Klein, C., Philippe, N., Le Deist, E., Pralag, S., Prost, C., Durandy, A., Fischer, A. & Griscelli, C. (1994) Partial albinism with immunodeficiency (Griscelli syndrome). *Journal of Pediatrics*, 125, 886–895.
- Koehler, M., St. George, K., Ehrlich, G., Mirro, J., Neudorf, S.M. & Rinaldo, C. (1997) Prevention of CMV disease in allogeneic BMT recipients by cytomegalovirus antigenemia-guided preemptive ganciclovir therapy. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 19, 43–47.
- Nakahori, Y., Miatani, K., Yamada, M. & Nakagome, Y. (1986) A human chromosome specific repeated DNA family (DY21) consists of a tandem assay pentanucleotides. *Nucleic Acids Research*, 14, 7569–7571.
- Papadopoulos, E., Ladanyi, M., Emanuel, D., Mackinnon, S., Boulad, F., Carabasi, M.H., Castro-Malaspina, H., Childs, B.H., Gillio, A.P., Small, T.N., Young, J.W., Kernan, N.A. & O'Reilly, R.J. (1994) Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *New England Journal of Medicine*, 330, 1185–1191.
- Przeponka, D., Ippoliti, C., Khouri, I., Woo, M., Mehra, R., Le Bherz, D., Giralt, S., Gajewski, J., Fischer, H., Fritzsche, H., Deissroth, A.B., Cleary, K., Champlin, R., Van Besien, K., Andersson, B., Mahler, R. & Fitzsimmons, W. (1996) Tacrolimus and minidose methotrexate for prevention of acute graft-versus-host disease after matched unrelated donor marrow transplantation. *Blood*, 88, 4383–4389.
- Rooney, C., Loftin, S., Holladay, M., Brenner, M., Krance, R. & Heslop, H. (1995) Early identification of Epstein-Barr virus-associated post-transplantation lymphoproliferative disease. *British Journal of Haematology*, 89, 98–103.
- Roux, E., Helg, C., Dumont-Girard, P., Chapuis, B., Jeanneret, M. & Roosnek, E. (1996) Analysis of T-cell repopulation after allogeneic bone marrow transplantation: significant differences between recipients of T-cell depleted and unmanipulated grafts. *Blood*, 87, 3984–3992.
- Schmidt, G.M., Horak, D.A., Niland, J.C., Duncan, S.R., Forman, S.J., Zaia, J.A., and the City of Hope-Stanford-Syntex CMV Study Group (1991) A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplants. *New England Journal of Medicine*, 324, 1005–1011.
- Shapiro, R.S., Chauvenet, A., McGuire, W., Pearson, A., Craft, A., McGlave, P. & Filipovich, A. (1988a) Treatment of B-cell lymphoproliferative disorders with interferon alpha and intravenous gammaglobulin. *New England Journal of Medicine*, 318, 1334.
- Shapiro, R.S., McClain, K., Frizzera, G., Gajl-Peczalska, K.J., Kersey, J.H., Blazar, B.R., Arthur, D., Patton, D., Greenberg, J., Burke, B., Ramsay, N., McGlave, P. & Filipovich, A. (1988b) Epstein Barr virus associated B cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation. *Blood*, 71, 1234–1243.
- Shimazaki, C., Wisniewski, D.A., Scheinberg, P., Atzpodien, J., Strite, A., Gulati, S., Fried, J., Wisniewski, R., Wang, C.Y. & Clarkson, B.D. (1988) Elimination of myeloma cells from bone marrow by using monoclonal antibodies and magnetic immunobeads. *Blood*, 72, 1248–1252.
- Socie, G., Landman, J., Gluckman, E., Devergie, A., Raynal, B., Esperou, H. & Brison, O. (1992) Short-term study of chimaerism after bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia. *British Journal of Haematology*, 80, 391–398.
- Spencer, A., Szydlo, R.M., Brookes, P.A., Kaminski, E., Rule, S., Van Rhee, F., Ward, K.N., Hale, G., Waldmann, H., Hows, J.M., Batchelor, J.R. & Goldman, J. (1995) Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia with volunteer unrelated donors using ex vivo or in vivo T-cell depletion: major prognostic impact of HLA class I identity between donor and recipient. *Blood*, 86, 3590–3597.
- Taswell, C. (1981) Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis. *Journal of Immunology*, 126, 1614–1619.
- Thomas, E.D. (1983) Karnofski memorial lecture: marrow transplantation for malignant disease. *Journal of Clinical Oncology*, 1, 517–531.
- Wang, F.Z., Dahl, H., Linde, A., Brytting, M., Ehrnst, A. & Ljungman, P. (1996) Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 88, 3615–3620.
- Westoff, C. (1986) Fertility in the United States. *Science*, 234, 557–559.
- Zutter, M.M., Martin, P.J., Sale, G.E., Shulman, H.M. & Fisher, L., Thomas, E.D. & Durnam, D.M. (1988) Epstein-Barr virus lymphoproliferation after bone marrow transplantation. *Blood*, 72, 520–529.

I-2- Complication d'une cryptosporidiose dans un contexte d'HIGM liée à l'X : apport de l'allogreffe de CSH.

ARTICLE 2:

Complete recovery from *Cryptosporidium Parvum* infection with Gastroenteritis and Sclerosing Cholangitis after successful Bone Marrow Transplantation in two brothers with X-linked Hyper-IgM Syndrome (HIGM1).

Bensoussan D*, Dimicoli S*, Latger-Cannard V., Straczek J., Antunes L., Mainard L., Dao A., Barbe F., Araujo C., Clément L., Feugier P., Lecompte T., Stoltz JF., Bordigoni P.

Bone Marrow Transplantation, 2003, 32 (7): 733-737

* Co-auteurs

Deux enfants issus de la même fratrie âgés de 6 et 8 ans, ont reçu une allogreffe de CSH médullaires génoidentique dans un contexte d'HIGM liée à l'X (ou HIGM1). Le déficit complet en CD40L à la surface des lymphocytes T activés a été mis en évidence par notre laboratoire en collaboration avec le service d'Hématologie biologique du CHU de Nancy. La détermination de la mutation sur le gène du CD40L a permis de confirmer le diagnostic. Les deux enfants étaient traités par Immunoglobulines IV ainsi qu'avec une prophylaxie contre *Pneumocystis jiroveci* jusqu'au jour où ils ont développé une infection à *Cryptosporidium parvum*, évoluant pour l'un vers une cholangite sclérosante et pour l'autre vers une cholangiopathie. L'aggravation clinique des enfants et la présence d'un donneur génoidentique pour chacun des enfants au sein de la fratrie ont contribué à proposer rapidement une allogreffe de CSH.

METHODE :

Le conditionnement de greffe a consisté en Busulfan (16mg/kg) suivi de Cyclophosphamide (200 mg/kg). La prophylaxie de la GVHD a reposé sur du Méthotrexate court et de la ciclosporine A. Les deux enfants ont reçu des Immunoglobulines IV pendant 1 an post-greffe et un traitement anti-cryptosporidiose (Paromomycine 500mg/j et Azithromycine 500 mg/j).

Les greffons de CSH médullaires ont été préparés au sein de l'UTCT par nos soins et ont consisté pour l'enfant le plus âgé en $1.6 \cdot 10^8$ cellules nucléées/kg et $3.36 \cdot 10^6$ CD34+/kg et pour l'enfant le plus jeune en $0.78 \cdot 10^8$ cellules nucléées/kg et $5.8 \cdot 10^6$ CD34+/kg.

L'étude de l'expression du CD40L après greffe ainsi que le suivi de la reconstitution immunitaire cellulaire ont été réalisés à l'UTCT en collaboration avec le service d'Hématologie Biologique.

RESULTATS ET DISCUSSION :

L'évolution clinique des enfants après greffe a été très simple. Le premier a présenté une sinusite alors que le second a présenté une maladie veino occlusive et une GVHD de grade II intestinale résolutive sous corticoïdes. L'infection à *Cryptosporidium parvum* a disparu rapidement après la greffe chez les 2 enfants et les fonctions hépatiques se sont normalisées à J60. L'expression de CD40L à la surface des lymphocytes T activés a été étudiée à J200 post greffe et s'est révélée normale pour les 2 enfants. La reconstitution immunitaire est intervenue progressivement au décours de la première année post-greffe.

L'absence de lésion hépatique sévère au moment de l'allogreffe a probablement été le facteur déterminant le succès de ces allogreffes. Dans ces conditions, l'allogreffe de CSH s'est révélée efficace pour permettre la résolution de l'infection à *Cryptosporidium parvum*. Il semble nécessaire pour obtenir cet effet que l'allogreffe de CSH n'intervienne pas trop tard dans l'évolution de l'infection et des dommages qu'elle engendre. Les moyens médicamenteux pour limiter cette infection sont peu efficaces, même si nous rapportons une expérience concluante avec le Nitazoxamide, et ne donnent que peu délai pour l'organisation de l'allogreffe. Un moyen d'anticiper sur la survenue de l'infection à *Cryptosporidium parvum* est de rechercher régulièrement par PCR la présence d'une réplication du parasite. Ceci fait partie des recommandations de prise en charge d'un patient atteint d'un HIGM1.



Case Report

Complete recovery from *Cryptosporidium parvum* infection with gastroenteritis and sclerosing cholangitis after successful bone marrow transplantation in two brothers with X-linked hyper-IgM syndrome

S Dimicoli¹, D Bensoussan¹, V Latger-Cannard², J Straczek³, L Antunes⁴, L Mainard⁵, A Dao⁶, F Barbe³, C Araujo⁷, L Clément⁷, P Feugier⁷, T Lecompte², JF Stoltz¹ and P Bordignon⁷

¹Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, CHU de Nancy, Allée du Morvan, 54511 Vandœuvre les Nancy, France; ²Laboratoire d'Hématologie Biologique, CHU de Nancy, Allée du Morvan, 54511 Vandœuvre les Nancy, France; ³Laboratoire de Biochimie, CHU de Nancy, Allée du Morvan, 54511 Vandœuvre les Nancy, France; ⁴Laboratoire d'Anatomo-Pathologie, CHU de Nancy, Allée du Morvan, 54511 Vandœuvre les Nancy, France; ⁵Service de Radiologie Pédiatrique, CHU de Nancy, Allée du Morvan, 54511 Vandœuvre les Nancy, France; ⁶Laboratoire de Parasitologie et Mycologie CHU de Nancy, Allée du Morvan, 54511 Vandœuvre les Nancy, France; ⁷Service de Médecine infantile 2, CHU de Nancy, Allée du Morvan, 54511 Vandœuvre les Nancy, France

Summary:

We describe two brothers who suffered from hyper-IgM syndrome (HIGM1) with similar clinical features: recurrent infections, especially *cryptosporidium* gastroenteritis with cholangitis. Their activated T cells did not express CD40L. Nucleotide sequencing revealed a mutation in both boys with respect to intron 4 and exon 5 boundaries of the CD40L gene in Xq26. They underwent successful bone marrow transplantation (BMT) from HLA-genotypical siblings. The *Cryptosporidium* infection and cholangitis resolved thereafter. At 6 months after BMT, expression of CD40L on activated T lymphocytes was normal. After 1 year, both boys are well, and immune reconstitution has improved. Based on these two successful experiences, BMT with a genotypical sibling seems a reasonable therapeutic approach for HIGM1, if *Cryptosporidium* infection occurs.

Bone Marrow Transplantation (2003) 32, 733–737.
doi:10.1038/sj.bmt.1704211

Keywords: X-linked immunodeficiency with hyper-IgM; CD40 Ligand; *cryptosporidium parvum* gastroenteritis; sclerosing cholangitis

Hyper-IgM Syndrome (HIGM1) is a primary immunodeficiency associated with mutations in the gene encoding the CD40L, located at Xq26. Patients suffer recurrent sinopulmonary and gastrointestinal infections, opportunistic infections due to *Pneumocystis carinii*, *Cryptosporidium*

parvum, *Histoplasma capsulata* and *Leishmania*. Dysimmunity and malignancy are classical complications.^{1,2}

CD40L, a membrane glycoprotein, is transiently expressed on activated CD4+ and CD8+ T cells, mast cells, basophils, eosinophils and platelets. CD40, the CD40L receptor, is a member of the TNF receptor family found on B cells, monocytes, dendritic cells, epithelial cells, fibroblasts and some malignant cells. CD40 expression can also be induced on different cells by gamma interferon (IFN γ).^{3,4} Thus, a potential mechanism contributing to *C. parvum* immunity could be a direct triggering of apoptosis in CD40+ infected cells by CD40L expressed on activated T cells. More recently, Hayward *et al.*⁵ have shown in a mouse model that CD40 expression on intestinal epithelial cells is not required for *C. parvum* clearance. Moreover, *C. parvum* infection can be cleared only when CD40 is present on dendritic and mononuclear phagocyte cells. Interleukin 12 production by these antigen-presenting cells leads activated T cells (via CD40-CD40L pathway) to produce TH1 cytokines such as IFN γ .

C. parvum, a coccidian parasite, infects the intestine and sometimes the respiratory tract. In immunocompromised patients, it may cause severe intestinal fluid loss, with dehydration, chronic diarrhea and malnutrition. Several antimicrobial treatments have been tried but none has proven effective. As previously reported by Hayward *et al.*,⁵ patients with HIGM1 are at increased risk of cholangiopathy, especially with *C. parvum* infection.

Curative therapy of HIGM1 relies on bone marrow transplantation (BMT), from an HLA-matched sibling, as first reported by Thomas *et al.*,^{6,7} or from matched unrelated donors.⁸ However, the presence of *C. parvum* infection, especially when complicated by sclerosing cholangitis, impairs the results of BMT. Khawaja *et al.*⁹ reported three cases where patients suffering from severe *C. parvum* infection died soon after BMT.⁹

Correspondence: Dr D Bensoussan, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, CHU de Nancy, Allée du Morvan, 54511 Vandœuvre-Les-Nancy.
E-mail: d.bensoussan@chu-nancy.fr

The first two authors contributed equally to this work

Received 6 November 2002; accepted 8 April 2003

In this report, we describe two brothers with HIGM1 who were both suffering from severe *C. parvum* infection with gastroenteritis and sclerosing cholangitis. They underwent successful BMT from a genotypical HLA sibling and recovered from the *C. parvum* infection.

Materials and methods

Case report

Two brothers, had a family history of immune deficiency: two cousins suffered from HIGM1, one of whom died of diffuse *C. parvum* infection despite an HLA-sibling allogeneic bone marrow transplant together with an orthotopic liver transplant.

Thanks to family screening, the two brothers were diagnosed with HIGM1, confirmed by the absence of CD40L expression on activated T lymphocytes. Sequencing of PCR-amplified CD40L genomic DNA revealed the same mutation for the two brothers: a 10-nucleotide deletion (gTGTACAGT) and a dinucleotide insertion (aa) at the intron 4/exon5 boundary. This mutation predicts a premature termination of translation and generation of a truncated protein. The brothers presented similar clinical features. Treatment was initiated with intravenous (i.v.) immunoglobulin and *P. carinii* prophylaxis.

At 6 years of age, brother A had *Cryptosporidium* gastroenteritis with sclerosing cholangitis resulting in persistent diarrhea and severe weight loss requiring continuous enteral nutrition. The sclerosing cholangitis worsened and at MR-cholangiography, dilated extra and intrahepatic bile ducts were observed. Needle liver biopsy revealed sclerosing cholangitis with prominent peri-portal concentric fibrosis, eosinophilic infiltration but no biliary cirrhosis (Figure 1). Liver function tests were abnormal (Table 1). Alkaline phosphatase was elevated and serum aspartate and alanine amino transferase were six times above normal. There was also chronic, but not severe, neutropenia and eosinophilia.

Brother B had recurrent common sinus infections. At the age of 8 years, he also suffered from a *Cryptosporidium* infection with cholangiopathy, requiring enteral nutrition. The results of MR-cholangiography were similar to those of A (Figure 2). Needle liver biopsy revealed cholangitis with mild, nonconcentric, fibrotic enlargement of the portal tracts and eosinophilic infiltration. Liver function tests were also abnormal. Alkaline phosphatase was elevated and



Figure 1 Sclerosing cholangitis due to *Cryptosporidium* infection. A large bile duct is surrounded by a cuff of edematous, inflamed fibrous tissue with an onion-skin appearance (arrow). Unaffected interlobular portal tract (arrow head). Needle biopsy, H&E.

serum aspartate and alanine amino transferase levels were five times above normal. Neutropenia and eosinophilia were also present.

After considering the poor prognosis of this disease, especially when it is complicated by *Cryptosporidium* infection, and given the family history, the parents gave informed consent for their two sons to undergo BMT. The donors were two different HLA-identical sisters.

The boys were conditioned with busulfan (4 mg/kg body weight per day for 4 days) followed by cyclophosphamide (50 mg/kg body weight per day for 4 days). Graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis consisted of short-term methotrexate (15 mg/m² on day 1 and 10 mg/m² on days 3, 6, 11 after BMT), and cyclosporine A (3 mg/kg/day as a continuous i.v. infusion on days -1 to +30 and 6.25 mg/kg twice daily from days 31 to 180 post-BMT). Infection prophylaxis included isolation in a laminar air-flow unit, oral administration of nonabsorbable antibiotics and treatment with i.v. immunoglobulins for 1 year (200 mg/kg weekly for 3 months and then 400 mg/kg per month). The boys continued with enteral nutrition and anti-*Cryptosporidium* treatment (paromomycin 500 mg/day and azithromycin 500 mg/day).

Table 1 Liver function tests (patient A)

	Before <i>C. parvum</i> infection	Before BMT	Day of BMT	Day +15 post BMT	Day +30 post BMT	Day +60 post BMT	Normal values
ALP	423	962	397	893	586	279	70-260 U/l
Total bilirubin	2	2	2	18	8	2	2-11 mg/l
Direct bilirubin	1	1	1	9	2	1	<5 mg/l
ALT	31	175	46	12	8	12	5-40 U/l
AST	16	99	72	31	31	26	5-35 U/l
5'-nucleotidase	3	40	7	44	26	6	0-9 U/l
LDH	356	595	534	739	801	695	210-400 U/l

ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine amino transferase, AST: aspartate amino transferase.



Figure 2 (a) MR-Cholangiogram from patient B at 7 years of age, before *Cryptosporidium* infection, intra- and extrahepatic bile ducts (→) are normal according to age. (b) At 8 years of age during *Cryptosporidium* infection, MR-Cholangiogram shows dilated extra- and intrahepatic bile ducts with strictures of intrahepatic bile ducts. (c) At 19 months after BMT, MR-Cholangiogram shows stabilization of cholangitis and a decrease in the dilatation.

On 27 July 2001, B received 1.6×10^8 nucleated marrow cells/kg and 3.36×10^6 CD34⁺ cells/kg, and A received 0.78×10^8 nucleated marrow cells/kg, and 5.8×10^6 CD34⁺ cells/kg on 3 August 2001.

Cryptosporidium detection

- (1) Immunofluorescence detection
Stools were prepared and processed using the monofluokit *Cryptosporidium* (Sanofi Pasteur, France), based on fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal antibodies directed against the oocyst wall. *Cryptosporidium* sp oocysts (5–7 µm) were detected by fluorescence microscopy.
- (2) PCR detection
Stools were processed and DNA was extracted with QI Amp stool MiniKit (Quiagen). The reaction was performed using primers SB012F and SBR012R that amplified a 458 bp fragment specific for *C. parvum*.¹⁰

Results

Clinical course after BMT

The clinical course for A was uneventful. At day 17, his absolute neutrophil count was over 500 per cubic millimeter and platelet counts were self-sustaining at levels above 50 000/µl at day 26. Neither GVHD nor veno-occlusive disease was observed. He had suffered from sinusitis (no organism identified) successfully treated by i.v. antibiotherapy. The *Cryptosporidium* infection disappeared soon after engraftment and was undetectable after day 60, despite immunological defects due to the allograft procedure. At 4 months after BMT, MR-cholangiography was significantly improved. After 19 months, stabilization of the cholangitis and decreased dilatation of the extra and intrahepatic bile ducts was confirmed (Figure 2). Liver function tests normalized by day 60 post-BMT (Table 1). On day 200 post BMT, the quantitative and qualitative expression of CD40L on T cells was normal. DNA analysis revealed that 100% of lymphocytes and polynuclear cells were of donor origin. Immune functions have improved regularly. Today, the patient is well, requires no parenteral nutrition, has had no further infection, no GVHD, and is going to school.

At day 10, B had sinusitis that resolved with i.v. antibiotics. At day 13, he had grade 2 veno-occlusive disease that resolved with appropriate treatment. At day 49, he developed acute GVHD of the gut, successfully treated by corticotherapy. On day 15, an absolute neutrophil count higher than 500 per cubic millimeter was observed, and platelet counts were above 50 000/µl at day 20. *Cryptosporidium* was detectable until day 16 after BMT and then, as with his brother, the infection resolved. Results of MR-cholangiogram analysis and liver function tests were similar to those of A. On day 200 post BMT, quantitative and qualitative expression of CD40L on T cells was normal. DNA analysis revealed that 100% lymphocytes and polynuclear cells were of donor origin. Immune functions have improved regularly.

Today, the patient is well, requires no parenteral nutrition, has had no infections, no recurrence of GVHD, and is going to school.

Immunological reconstitution

At 1 month after cessation of i.v. immunoglobulin, normal production of IgM, IgG, IgG subclasses and specific antibodies to tetanus and diphtheria toxoid occurred. The same time course of lymphocyte reconstitution was observed in the two brothers. The T-cell count, normal before BMT, improved gradually and was completely normal 19 months post BMT ($1618 \times 10^6/l$ for A and $1123 \times 10^6/l$ for B). The T-cell subset, evidence of thymic function (CD4⁺ CD45RA⁺) simultaneously reached normal levels ($412 \times 10^6/l$ for A and $312 \times 10^6/l$ for B). The absolute B-cell count, low before BMT, normalized within the first year after BMT. Moreover, memory B cells (CD19⁺ CD27⁺), absent before BMT, were first observed 1 year post BMT.

Before BMT, *in vitro* proliferative responses to T-cell mitogens were normal but no proliferative response to

tetanus toxoid antigen could be observed. At 1 year post BMT, response to mitogen completely normalized. The same normalization was observed after stimulation with tetanus toxoid antigen.

Discussion

We describe two brothers with HIGM1. Both had a severe form of *Cryptosporidium* infection with sclerosing cholangitis requiring continuous enteral nutrition. Both underwent successful BMT without serious complications. Despite weak immune defences, the *Cryptosporidium* infection did not worsen but disappeared soon after BMT. After 1 year, immune reconstitution has gradually improved and both patients are currently well with a good quality of life.

The absence of serious lesions in the liver or other organs allowed us to perform a standard BMT with myeloablative conditioning. This was not the case for the cousin who also suffered from HIGM1, complicated by frequent pulmonary infections which caused bronchiectasis. He also had a *C. parvum* infection with liver lesions including sclerosing cholangitis. At the age of 12 years, he underwent orthotopic liver transplantation, followed by BMT. This was unsuccessful and he died of diffuse *C. parvum* infection with pulmonary and hepatic failure. This was probably due to the parasite, the advanced sclerosing cholangitis, as well as to the pulmonary insufficiency and patient's age at BMT. Owing to this case, the two brothers underwent BMT at a younger age, before serious lesions had occurred and in the absence of any other organ injury.

Khawaja *et al*⁹ reported two HIGM1 patients with severe liver disease and *C. parvum* infection, both of whom died soon after myeloablative BMT. One had chronic *Cryptosporidium* infection with diarrhea, sclerosing cholangitis, cirrhosis and pancreatitis, requiring total parenteral nutrition. After BMT, he died from fulminant liver failure associated with veno-occlusive disease, *Cryptosporidium* infestation, and GVHD. The other had a similar clinical pattern, and also extensive bilateral bronchiectasis. On the other hand, Amrolia *et al*⁸ reported nonmyeloablative stem cell transplants on eight patients with congenital immunodeficiency and severe organ dysfunction. Two, who suffered from HIGM1 with sclerosing cholangitis, were successfully treated. One of these had a *Cryptosporidium* infection before BMT that cleared after transplantation, suggesting significant recovery of functional immunity. However, Khawaja *et al*⁹ described an HIGM1 patient with a severe *Cryptosporidium* infection who died soon after nonmyeloablative BMT. He had cryptosporidial ascending cholangitis with portal inflammation, confirmed by liver histology. The *Cryptosporidium* enteritis worsened after BMT and this, together with a capillary leak syndrome, resulted in the patient's death. When severe liver failure is associated with HIGM1, orthotopic liver transplantation, together with nonmyeloablative BMT, could be an option. Hadzic *et al*¹¹ reported the successful treatment of an 18-year-old HIGM1 patient with serious cirrhosis: they accomplished combined correc-

tion of the primary immune defect and secondary liver complications. Martinez Ibanez *et al*¹² described three HIGM1 patients with sclerosing cholangitis who underwent only liver transplantation and suffered relapse of sclerosing cholangitis 10, 18 and 25 months later.¹² Owing to the T-cell deficiency, HIGM1 patients are predisposed to autoimmune disease triggered by opportunistic infections. Thus, in HIGM1 patients, a liver transplant alone cannot prevent sclerosing cholangitis relapse and must be accompanied by a BMT to correct immune defect.^{12,13}

When *Cryptosporidium* infection occurs during the wait for a transplant, antimicrobial treatment can be initiated. Many treatments have been studied in AIDS patients, including Paromomycin, Clarithromycin, Azithromycin and Sinefungine, but without any demonstrable benefit. In our two patients, Paromomycin did not clear the *Cryptosporidium* infection. As previously mentioned, the CD40L-CD40 pathway is vital for *C. parvum* clearance.⁴ However, we have successfully used Nitazoxanide in a child with *Cryptosporidium* infection secondary to cord blood transplantation for acute myeloblastic leukemia (unpublished). This may be an interesting alternative antimicrobial treatment. Additional intravenous CD40L could be useful in temporary *Cryptosporidium* infection management, although Vestereng *et al*¹⁴ did not observe *P. carinii* clearance using recombinant CD40L in SCID mice.

Optimal HIGM1 management appears a challenge when severe hepatic lesions occur, especially in the presence of *C. parvum*.^{8,9,11,12,13} Myeloablative, or perhaps nonmyeloablative stem cell transplantation, should be performed as soon as *C. parvum* infection occurs. In cases of advanced hepatic damage, liver transplantation together with nonmyeloablative BMT should be considered. Nitazoxanide could decrease *C. parvum* infection before BMT, limiting conditioning regimen toxicity, and could be maintained during the profound post BMT immunodeficiency. Regular liver function checks and early *C. parvum* detection would be helpful for HIGM1 patients. PCR analysis together with immunofluorescence studies seem promising and sensitive tools for early parasite detection.¹⁰ PCR sensitivity could be improved by using competitive, quantitative or nested PCR. Early diagnosis could allow clinicians to consider BMT—especially when a genodiscordant sibling is available—before any severe hepatic lesions occur.

Acknowledgements

We thank Mrs D Binot Saintot and S Lapuyade for their excellent technical assistance.

References

- 1 Puck JM. A disease gene for autosomal hyper-IgM syndrome: more genes associated with more immunodeficiencies. *Clin Immunol* 2000; 97: 191–192.
- 2 Fuleihan RL. Hyper IgM syndrome: the other side of the coin. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13: 528–532.
- 3 Fries KM, Sempowski GD, Gaspari AA *et al*. CD40 expression by human fibroblasts. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 77: 42–51.

- 4 Hayward AR, Levy J, Facchetti F *et al*. Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver, and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *J Immunol* 1997; **158**: 977-983.
- 5 Hayward AR, Cosyns M, Jones M, Ponnuraj EM. Marrow-derived CD40-positive cells are required for mice to clear *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 2000; **69**: 1630-1634.
- 6 Thomas C, De Saint Basile G, Le Deist F *et al*. Brief report: correction of X-linked hyper-IgM syndrome by allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1995; **333**: 126-129.
- 7 Bordigoni P, Auburtin B, Carret AS *et al*. Bone marrow transplantation as treatment for X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Bone Marrow Transplant* 1998; **22**: 1111-1114.
- 8 Amrolia P, Gaspar H, Hassan A *et al*. Nonmyeloablative stem cell transplantation for congenital immunodeficiencies. *Blood* 2000; **96**: 1239-1246.
- 9 Khawaja K, Gennery AR, Flood TJ *et al*. Bone marrow transplantation for CD40 ligand deficiency: a single centre experience. *Arch Dis Child* 2001; **84**: 508-511.
- 10 Wu Z, Nagano I, Matsuo A, Uga S *et al*. Specific PCR primers for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity. *Mol Cell Probes* 2000; **14**: 33-39.
- 11 Hadzie N, Pagliuca A, Rela M *et al*. Correction of the hyper-IgM syndrome after liver and bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 2000; **342**: 320-324.
- 12 Martinez Ibanez V, Espanol T, Matamoros N *et al*. Relapse of sclerosing cholangitis after liver transplant in patients with hyper-IgM syndrome. *Transplant Proc* 1997; **29**: 432-433.
- 13 Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C *et al*. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr* 1997; **131**: 47-54.
- 14 Vestereng VH, Kovacs JA. Recombinant CD40 ligand administration does not decrease intensity of *Pneumocystis carinii* infection in SCID mice. *J Eukaryot Microbiol* 2001; (Suppl.): 153S-154S.

ARTICLE 3: Article collaboratif

Treatment of CD40 Ligand deficiency by haematopoietic stem cell transplantation: a survey of the european experience, 1993-2002.

Genery AR, Khawaja K, Veys P, Bredius RGM, Notarangelo LD, Mazzolari E, Fischer A, Landais P, Cavazzana-Calvo M, Friedrich W, Fasth A, Wulffraat NM, Matthes-Martin S, Bensoussan D, Bordigoni P, Lange A, Pagliuca A, Andolina M, Cant AJ, Davies EG.

Blood, 2004, 103: 1152 - 1157.

Il s'agit d'une analyse rétrospective portant sur 38 patients européens ayant reçu une allogreffe de CSH pour un déficit en CD40 Ligand, dans 8 pays européens entre 1993 et 2002. Les deux enfants dont les expériences d'allogreffe génoidentique ont été rapportées précédemment, sont inclus dans cette étude ainsi que le patient dont l'histoire clinique avait été publiée en 1998 par le Pr Bordigoni (Bordigoni *et al*, 1998).

Nous avons longuement discuté cet article dans notre revue bibliographique ; il s'agit en effet de la seule étude incluant un grand nombre de patients. De ce fait, les conditions d'allogreffe sont très différentes d'un patient à l'autre : conditionnement myéloablatif ou non myéloablatif, allogreffe de MO génoidentique ou phénoïdentique avec ou sans déplétion T. De même, le degré de l'atteinte hépatique ainsi que la prévention des infections à *Cryptosporidium parvum* varient d'un patient à l'autre.

La moitié des décès observés dans cette étude sont liés à une infection à *Cryptosporidium parvum* présente avant la greffe. Cependant, aucune corrélation statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre une infection à *Cryptosporidium parvum* ou une atteinte hépatique et la survie post-greffe. En effet, seuls deux paramètres ont une incidence statistiquement significative sur la survie post-greffe :

- une atteinte pulmonaire pré-existant à la greffe est associée à une faible survie ($p = 0.0002$) mais une pneumonie à *Pneumocystis jiroveci* n'augmente pas la mortalité.
- les allogreffes réalisées en situation d'incompatibilité d'un antigène HLA donnent de moins bons résultats que les allogreffes phénoïdentiques sans incompatibilité HLA ($p = 0.02$).

D'autres études seront nécessaires pour mettre en évidence les facteurs influençant la survie post-greffe. Cette étude a, quant à elle, pu montrer que l'allogreffe de CSH permet de guérir 60 % des patients atteints d'un déficit en CD40L, une atteinte pulmonaire pré-existant à la greffe étant le facteur apparaissant comme le plus péjoratif pour la survie des patients.

Treatment of CD40 ligand deficiency by hematopoietic stem cell transplantation: a survey of the European experience, 1993-2002

Andrew R. Gennery, Khulood Khawaja, Paul Veys, Robbert G. M. Bredius, Luigi D. Notarangelo, Evelina Mazzolari, Alain Fischer, Paul Landais, Marina Cavazzana-Calvo, Wilhelm Friedrich, Anders Fasth, Nibb M. Wulffraat, Susanne Matthes-Martin, Danielle Bensussan, Pierre Bordignon, Andrzej Lange, Antonio Pagliuca, Marino Andolina, Andrew J. Cant, and E. Graham Davies, for the European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation and the European Society for Immunodeficiency

CD40 ligand (CD40L) deficiency causes recurrent sinopulmonary infection, *Pneumocystis carinii* pneumonia, and *Cryptosporidium parvum* infection. Approximately 40% to 50% of patients survive to the third decade; long-term survival is unclear. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is curative. We present a retrospective analysis of 38 European patients undergoing HSCT for CD40L deficiency in 8 European countries between 1993 and 2002. Donor stem cell source included 14 HLA-identical siblings, 22 un-

related donors, and 2 phenotypically matched parental stem cells (12 T-cell depleted). Of the patients, 34 engrafted and 26 (68%) survived; 3 had autologous reconstitution, 22 (58%) were cured, and 1 engrafted but has poor T-cell immune reconstitution. There were 18 evaluated patients who responded to vaccination. Of the patients, 12 (32%) died from infection-related complications, with severe cryptosporidiosis in 6. Grades 2 to 4 graft-versus-host disease (GVHD) associated with infection occurred in 6 of 12

fatal cases. HSCT cured 58% of patients, 72% of those without hepatic disease. Early T-cell function following whole marrow HSCT may limit cryptosporidial disease, but survival was similar after T-cell-depleted HSCT. Preexisting lung damage was the most important adverse risk factor. Further studies will determine optimal timing and type of HSCT. (Blood. 2004; 103:1152-1157)

© 2004 by The American Society of Hematology

Introduction

CD40 ligand (CD40L) deficiency (X-linked hyper-immunoglobulin M1 [HIGM1]) is a rare X-linked primary T-lymphocyte immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding for the CD40L glycoprotein (CD154) expressed on the surface of activated T lymphocytes.¹⁻³ CD40 ligand interacts with the CD40 surface molecule constitutively expressed on B lymphocytes and cells of the monocyte/macrophage lineage as well as epithelial cells.³ Interaction between CD40L/CD40 is critical in initiating the immunoglobulin isotype class switch from IgM to IgG, IgA, and IgE in B cells and also has an important role in monocyte/macrophage activation.

Clinical manifestations include recurrent bacterial sinopulmonary infection, as well as pneumonia due to infection with *Pneumocystis carinii*. Susceptibility to gastrointestinal infection with protozoa such as *Cryptosporidium parvum* may lead to sclerosing cholangitis, cirrhosis, and cholangiocarcinoma.⁴ Fatal viral infections including cytomegalovirus (CMV) and enteroviral meningoencephalitis are rarely reported complications.⁵ Affected patients typically have very low or absent levels of IgG and IgA and normal or high levels of IgM. Neutropenia affects up to 50% of patients⁶ and autoimmune disease also occurs.⁷ In a recent analysis

of 126 patients reported to the European Society for Immunodeficiency (ESID) registry, approximately one sixth developed hepatic disease, associated with cryptosporidial infection in more than 50%.⁷ Survival to the fourth decade is 50%,⁷ but the number of cases available for analysis in the older age group is very small, and the chances of long-term survival are still unclear.

A significant proportion of affected boys still die in early adult life despite supportive therapy with immunoglobulin replacement and antibiotic prophylaxis.⁸ Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has the potential to cure this T-cell immunodeficiency.⁹⁻¹⁷ A particular problem during transplantation is reactivation of cryptosporidial infection resulting in diarrhea and acute cholangiopathy. In a study using molecular techniques to detect asymptomatic carriage of cryptosporidial species in primary immunodeficiency patients, 5 of 12 patients with CD40L deficiency were chronically colonized, of whom only 1 had a known history of infection. Reactivated cryptosporidial disease occurred in all 3 patients who underwent HSCT and was fatal in 1.¹⁸ Indications for HSCT in CD40L deficiency are still not clearly defined. In this retrospective study of patients with CD40L deficiency who underwent HSCT, complications and outcome were analyzed

From Newcastle General Hospital, Newcastle upon Tyne, United Kingdom; Great Ormond Street Hospital, London, United Kingdom; Leiden University Medical Centre, Leiden, the Netherlands; University of Brescia, Brescia, Italy; Necker Hospital, Paris, France; University Children's Hospital, Ulm, Germany; Göteborg University, Göteborg, Sweden; The Wilhelmina Children's Hospital, Utrecht, the Netherlands; St Anna Children's Hospital, Vienna, Austria; The Children's Hospital, Vandoeuvre-Les-Nancy, France; the Lower Silesian Center for Cellular Transplantation, Wrocław, Poland; King's College Hospital, London, United Kingdom; and the Pediatric Clinic, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) Burlo Garofolo, Trieste, Italy.

Submitted June 25, 2003; accepted September 25, 2003. Prepublished online as

Blood First Edition Paper, October 2, 2003; DOI 10.1182/blood-2003-05-2014.

A complete list of the members of the European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation and the European Society for Immunodeficiencies appears in the "Appendix."

Reprints: A. R. Gennery, Newcastle General Hospital, Westgate Rd, Newcastle upon Tyne, NE4 6BE United Kingdom; e-mail: a.r.gennery@ncl.ac.uk.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2004 by The American Society of Hematology

according to the presence or absence of risk factors at transplantation, and, in particular, source and degree of matching of donor stem cells, evidence of preexisting infection, and hepatic or lung damage.

Patients, materials, and methods

Data collection

European centers known to have performed HSCT for this condition were identified from the Working Party on Inborn Errors of the European Group for Blood and Marrow Transplantation and from the European Society for Immunodeficiency (ESID) database on CD40L deficiency. A retrospective analysis of data from 38 patients with CD40L deficiency who underwent transplantation in 13 centers in 8 European countries between 1993 and 2002 was performed with follow-up between 1.2 to 9.3 years (median, 3.4 years). Data from 15 patients have been previously published.^{2,10,12,14,19-22}

Patient characteristics

Patient characteristics are shown in Table 1. All patients showed absence of CD40L on activated mononuclear cells. The detailed methodology varied in

different centers but always involved activation with mitogens and/or ionomycin followed by fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis after labeling with anti-CD40L and simultaneous labeling with another T-cell activation marker (CD25 or CD69) as a control for cellular activation. The diagnosis was confirmed by mutation analysis in all but one patient (patient 35).²³ Cryptosporidium detection was performed by standard light microscopy after staining either with a modified Zeihl-Neelsen method or using a fluorescent antibody. In 8 patients (patients 17, 20, 22, 23, 26, 36, 37, and patient 33 after HSCT only) polymerase chain reaction (PCR) techniques were also used.

Clinical characteristics

There were 16 patients who had suffered *Pneumocystis carinii* pneumonia; 6 had bronchiectasis on computed tomography scan prior to transplantation, 4 of whom had had *Pneumocystis carinii* pneumonia (Table 1). One had intrapulmonary calcification. There were 19 patients who had documented previous cryptosporidial infection; in 1 patient (patient 29), *Cryptosporidium parvum* was first detected following chemotherapy conditioning. Of the patients, 13 had normal hepatic function and ultrasound imaging and did not undergo hepatic biopsy; 6 (patients 2, 13, 16, 21, 22, and 33) in whom hepatic biopsy was normal had normal hepatic ultrasound imaging, 2 of whom (patients 21 and 22) also had mildly abnormal hepatic function. The

Table 1. Clinical characteristics of European patients with CD40 ligand deficiency

Case	Age at Tx, y	PCP	Respiratory status	Liver histology	Cryptosporidium infection
1	1	+	Normal	Not evaluated	-
2	1.2	+	Normal	Normal	-
3	2	+	Normal	Not evaluated	-
4	2	+	Normal	Not evaluated	-
5	3	-	Normal	Not evaluated	-
6	3.5	+	Normal	Not evaluated	-
7	3.75	-	Normal	Sclerosing cholangitis	+
8	4	-	Normal	Not evaluated	-
9	4	-	Normal	Not evaluated	-
10	4	-	Normal	Cirrhosis	+
11	4	+	Bronchiectasis	Not evaluated	-
12	4.5	+	Normal	Not evaluated	+
13	4.5	-	Normal	Normal	-
14	4.5	-	Normal	Not evaluated	-
15	7	-	Normal	Sclerosing cholangitis	+
16	7	+	Normal	Normal	-
17	7.3	-	Normal	Sclerosing cholangitis	+
18	8	+	Normal	Sclerosing cholangitis	+
19	8	-	Bronchiectasis	Portal inflammation	+
20	8.7	-	Normal	Sclerosing cholangitis	+
21	9.5	-	Normal	Normal	-
22	9.5	+	Normal	Normal	+
23	10	+	Normal	Sclerosing cholangitis	-
24	10	-	Normal	Sclerosing cholangitis/cirrhosis	+
25	11	+	Normal	Sclerosing cholangitis	+
26	11.5	-	Normal	Sclerosing cholangitis	+
27	11.5	+	Bronchiectasis	Sclerosing cholangitis/cirrhosis	+
28	11.5	-	Normal	Not evaluated	-
29	13	+	Bronchiectasis	Portal inflammation	+
30	13	-	Normal	Sclerosing cholangitis	+
31	14	-	Normal	Fibrosis	+
32	14	+	Bronchiectasis	Sclerosing cholangitis	+
33	15	-	Normal	Normal	-
34	15.7	-	Normal	Sclerosing cholangitis	+
35	16	+	Intrapulmonary calcification	Sclerosing cholangitis atypical sarcoma	-
36	16.5	-	Normal	Sclerosing cholangitis	+
37	18	-	Normal	Sclerosing cholangitis/cirrhosis	-
38	19	-	Bronchiectasis	Not evaluated	-

Tx indicates transplantation; PCP, *Pneumocystis carinii* pneumonia.

*Positive on PCR testing only.

remaining 20 patients who had abnormal hepatic function, ultrasound imaging, or endoscopic retrograde cholangiopancreatography had histologic hepatic disease: sclerosing cholangitis only (12), sclerosing cholangitis and hepatic cirrhosis (3), fibrosis (1), portal inflammation (2), cirrhosis (1), and sarcoma (1). There were 3 patients who underwent elective orthotopic hepatic transplantation at 4, 5, and 26 weeks prior to hematopoietic stem cell transplantation (patients 24, 37, and 27, respectively) because of preexisting cirrhosis and hepatic failure, and 1 patient at 14 weeks prior to hematopoietic stem cell transplantation (patient 35) because of an atypical sarcoma. One patient had inflammatory bowel disease and seronegative polyarthritis (patient 23). There were 6 patients who had severe failure to thrive (patients 16, 33, 30, 32, 35, and 38), of whom 4 required long-term total parenteral nutrition (patients 23, 30, 35, and 38). All patients received immunoglobulin replacement therapy and had normal trough IgG levels prior to transplantation.

Transplantation

Age at transplantation ranged from 1 to 19 years (median, 8.4 years). There were 27 patients who received cytoreductive conditioning with 16 to 20 mg/kg busulfan and 200 mg/kg cyclophosphamide. 3 of whom received additional anti-leukocyte function antigen-1 (LFA-1) and anti-CD2 antibodies and 12 rabbit antithymocyte globulin (ATG). Other regimens included the following: 16 mg/kg busulfan, 200 mg/kg cyclophosphamide, and alemtuzumab (1 patient); fludarabine and melphalan with ATG administered immediately before and after stem cell infusion (resulting in *in vivo* T-cell depletion; 5 patients, 1 of whom also received total lymphoid irradiation); fludarabine and melphalan with alemtuzumab administered immediately before and after stem cell infusion (2 patients); total body irradiation with partial hepatic shielding and cyclophosphamide (1 patient); 12 mg/kg busulfan, 20 mg/kg thiotepa, 20 mg/m² fludarabine, and 60 mg/kg cyclophosphamide (1 patient); and fludarabine and melphalan alone (1 patient). The choice of conditioning regimen was institutionally dependent.

HLA matching of donor and recipient was confirmed by serology and molecular typing. There were 14 patients who received whole marrow from HLA-identical sibling donors; 22 received unrelated donor hematopoietic stem cells, of which 15 were full (10/10) matches and 7 mismatched at one major antigen. Of the patients, 2 received phenotypically matched related hematopoietic stem cells from a parent, and 12 patients received T-cell-depleted grafts (11 unrelated donor and 1 phenotypically matched related donor), 2 by addition of CAMPATH-1M to the marrow *in vitro*, and 9 by CD34⁺ stem cell enrichment.

For graft-versus-host disease prophylaxis, 33 patients received cyclosporin A, of whom 10 also received methotrexate, and 1, additional mofetil mycophenolate. Of these 33 patients, 3 additionally received methylprednisolone, 1 of whom also received ATG as graft-versus-host disease (GvHD) prophylaxis. There were 2 patients who received mycophenolate mofetil, and 1 received basiliximab in addition to cyclosporin A; 1 patient received tacrolimus alone, 3 patients given CD34⁺-enriched stem cells and 1 receiving whole marrow did not receive GvHD prophylaxis. All patients were isolated in Hepar-filtered or laminar flow facilities. Before or during transplantation, 25 received azithromycin alone or azithromycin and paromomycin as anticytosporeidial prophylaxis or treatment. One patient (patient 34) received nitazoxanide treatment for cryptosporidiosis at the time of transplantation.

Statistical analysis

The log-rank test was used to compare cumulative survival between different groups. Statistical analyses were performed using GB-STAT (version 6.5PFC; Dynamic Microsystems, Silver Spring, MD).

Results

Engraftment

As demonstrated by molecular genetic analysis, 34 patients engrafted with full or partial donor chimerism. There were 4 patients

who had autologous reconstitution (patients 8, 18, 25, and 34), of whom 3 continue with antibiotic prophylaxis and immunoglobulin replacement. The fourth patient (patient 8) engrafted after a further conditioned transplantation using whole marrow from a different unrelated donor. Patient 33 developed 100% engraftment with grade 2 GvHD but has persistent very low T-cell numbers with a minimal amount of CD40L expression despite a stem cell top up.

Following the initial transplantation, 4 patients received "boost" infusions. One patient (patient 8) received an unconditioned donor stem cell infusion after the second transplantation because of lack of donor T-cell chimerism despite full donor chimerism in other cell lineages. One patient (patient 16) received an unconditioned donor cell infusion, and 2 patients (patients 12 and 33) received an unconditioned donor stem-cell-enriched infusion for failing chimerism. One patient (patient 35) received 3 donor lymphocyte infusions for lack of donor T-cell chimerism despite full donor chimerism in other cell lineages.

Infection

Patient 31 developed probable enteroviral encephalitis, treated with pleconaril, but has residual neurologic impairment. Patient 8 developed disseminated adenovirus type 31 infection during the second transplantation, treated unsuccessfully with intravenous ribavirin and cidofovir. Patient 34 developed Epstein-Barr viral infection treated with foscarnet and rituximab. All 12 patients who did not survive died from complications relating to infection, including cryptosporidiosis, CMV, and aspergillus infection.

Adverse events

Despite hepatic disease in 20 patients, veno-occlusive disease (VOD) occurred in only 4 (patients 1, 19, 30, and 32). Significant acute graft-versus-host disease (GvHD) (grades 2-4) occurred in 14 patients and was associated with a fatal outcome in 6 with preexisting infection (adenovirus in 1, cryptosporidiosis in 2, cryptosporidiosis, adenovirus and aspergillosis in 1, aspergillosis in 1, and CMV in 1; Table 2). One patient (patient 36) underwent orthotopic hepatic transplantation following hematopoietic stem cell transplantation, because of fulminant hepatic failure, but died of pulmonary cryptosporidiosis. Of 4 patients who underwent elective orthotopic hepatic transplantation prior to hematopoietic stem cell transplantation, 3 died. One developed hepatic graft rejection following hematopoietic stem cell transplantation and died from ongoing cryptosporidial, adenoviral, and aspergillus infection secondary to immunosuppression (patient 27). One patient failed to engraft donor T lymphocytes, despite full donor chimerism in all other hematopoietic cell lineages and 3 donor lymphocyte infusions following HSCT, and died of aspergillosis (patient 35). The other patient showed no evidence of hepatic growth following HSCT and so underwent a second orthotopic hepatic transplantation but died from overwhelming cryptosporidiosis (patient 24).

Survival

There are 26 patients (68%) who are alive and well with a follow-up of 1.2 to 9.3 years (median, 3.4 years) (Table 3).

Overall, 22 (58%) patients are cured and express CD40L on activated lymphocytes; 20 no longer receive replacement immunoglobulin, 18 (82%) of whom have been assessed and shown to respond to vaccination with *Haemophilus influenzae* type B and tetanus antigens, and 1 of whom is being evaluated.

deficiency; nonsurvivors

case	Age at Tx, y	Donor	T-cell depletion	Conditioning	GVHD	Cause of death
1	1	MUD	NE	bu/MTG	NI	CMV
11	4	MUD	NE	bu/CIH	3 S, G	Adenovirus/GVHD
15	7	MUD	CD34 ⁺	bu/MTG	NI	Aspergillus
24	10	MUD	NE	thimel	NI	CP
27	11.5	MUD	NE	bu/FLA-1/CD2	2 S, L	CP/aspergillus/adenovirus
28	11.5	MUD	NE	bu/CI	NI	CMV
29	13	MUD	Campha	bu/MTG	NI	CP
33	13	MUD	NE	bu/CI	3 S, L	CP
32	14	MUD	NE	thimel/MTG	4 L	CP/GVHD
35	16	MUD	CD34 ⁺	thimel/ATG/TL	2 S	Aspergillus
36	16.5	MUD	CD34 ⁺	CI/TL	1 S	CP/graft rejection/liver failure, LT
38	19	MUD	NI	bu/CI	3 S, G, L	CMV/GVHD

GVHD indicates graft versus host disease grades 1 to 4; ILV.D., matched unrelated donor 10 to 10; C.H., alternative donor; s.kin, g.gut; M.S.D., matched sibling donor; nu, nucleated; neu, megakaryo; C.M.V., cytomegalovirus; ILV.D.T., matched unrelated donor 10 to 10; bu, busulfan; g.y, cyclophosphamide; A.T.G., rabbit antithymocyte globulin; and LT, liver transplantation.

All 12 deaths (32%) were associated with infection (Table 2). 6 patients had severe cytospoidal infection, 1 of whom had consistent aspergillosis and adenoviral infection. All of these patients had known previous cytospoidal infection and 5 of 6 received cytotopoidal prophylaxis. Of the remaining 6 patients, 3 had disseminated CMV infection, 1 had overwhelming adenovirus infection, and 2 had disseminated aspergillosis. Of 12 non-survivors, 8 had preexisting hepatic disease versus 12 of 26 survivors. Of 14 patients receiving matched sibling donor HSC transplants, 5 died, compared with 4 of 12 receiving T-cell-depleted mismatched unrelated donor HSC transplants. Of the 6 patients with preexisting statistical difference between survivors and non-survivors for both

Table 3. Transplantation characteristics of European patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation for CD40 ligand deficiency; survivors

Case	Age at Tx, y	Donor	T-cell depletion	Conditioning	GvHD	Follow-up, y
2	12	MUD	NE	busulfan/busy	NI	2
3	2	MUD	CD34-	busy/ATG	NI	2.8
4	2	MUD	NI	busy/ATG	1S	3.3
5	3	MUD	Campath	busy/LFA-1/CD2	NI	5.8
6	3.5	MUD	NI	busy	NI	9.3
7	3.75	MUD	CD34-	busy/ATG	2S, 1L	3.3
8	4	MUD	CD34-	busy/CD34	NI	1.2
9	4	MUD-	CD34-	busy/ATG	2S	2
10	4	MUD	NI	busy	NI	4
11	4.5	MUD	CD34-	busy/ATG	NI	3.3
12	4.5	MUD	CD34-	busy/ATG	NI	3.8
13	4.5	MUD	NI	busy/ATG	2S	3.5
14	4.5	MUD	NI	busy	NI	3.5
16	7	MUD-	CD34+	busy/ATG	NI	4
17	7.3	MUD	NI	busy	NI	1.6
18	8	MUD	CD34+	busy/ATG	NI	2
19	8	MUD	NI	busy/ATG	NI	2.8
20	8.7	MUD	NI	busy	2G	1.6
21	9.5	MUD	NI	busy	NI	A/R, 5.4
22	9.5	MUD	NI	busy	1S	5
23	10	MUD	NI	busy	NI	6.5
25	11	MUD	NI	busy/LFA-1/CD2	NI	A/R, 6.3
26	11.5	MUD	NI	busy/ATG	1S	4.5
31	14	MUD	NI	busy/ATG	2S	2.5
33	15	MUD	NI	busy/CD34	2S, 1L	3
34	15.7	MUD-	NI	busy/ATG	1S, 1L	A/R, 1.7
37	18	MUD	NI	busy/ATG	2L	4.5

GvHD indicates graft versus host disease grades; i.d., MSD, matched sibling donor; b.i., busulfan; thio, thiopurine; fu, fludarabine; cy, cyclophosphamide; MUD, matched unrelated donor; 10 of 10, CDR4+, CD45+ stem cell selection; T84, rabbit antihuman myeloid/glycine⁻ carbohydrate⁻ antigen 9 or 10; MRD, phenotypically matched related donor; G, gut AEs; antibody, L, liver; met, metastasis; C1H, chimerism; MUD-, matched unrelated donor; reconstitution patient failed to engraft and remains well on IVIG, and TBI, total body irradiation.

parameters examined, including preexisting hepatic damage, previous infection with *Pneumocystis carinii* or *Cryptosporidium parvum*, transplantation before 5 years of age, conventional or low-intensity conditioning regimens, use of unrelated donors or T-cell-depleted marrow, or the occurrence of GvHD.

Discussion

Supportive treatment of CD40L deficiency varies slightly between European centers but all patients receive immunoglobulin replacement, prophylactic antibiotics for *Pneumocystis carinii* pneumonia, granulocyte colony-stimulating factor for intractable neutropenia, as well as antibacterial treatment and nutritional support. Long-term prognosis remains poor despite supportive treatment, and hepatic disease is the major cause of death.⁴

For patients with established hepatic disease, planning the most appropriate treatment remains difficult, as occult cryptosporidial infection is very likely to reactivate during the posttransplantation period despite the use of prophylactic antimicrobials and can lead to further compromise of hepatic function. Hepatic biopsy yields useful information regarding hepatic damage, but should be considered only if there is biochemical or radiologic evidence of disease. Surprisingly, despite preexisting hepatic disease being a risk factor for VOD in HSCT, only 4 patients experienced this complication even though most patients received standard European conditioning protocols containing busulfan, known to be associated with an increased risk of VOD.²⁴ Fludarabine/melphalan conditioning regimens generally cause less acute toxicity than conventional regimens and may be preferable in patients with preexisting hepatic disease.¹⁹ For patients who present with end-stage hepatic disease related to CD40L deficiency, a combination of orthotopic hepatic transplantation followed by a nonmyeloablative reduced-intensity, chemotherapy-conditioned bone marrow transplantation has been successful in one case (patient 37).¹⁶ Interestingly, conventional and molecular diagnostic methods failed to show any evidence of cryptosporidial infection in this patient at any stage. However, HSCT should be done as soon as possible after orthotopic hepatic transplantation because of the high risk of severe cryptosporidial infection in the new liver and consequent rapid deterioration of hepatic function. Better detection of cryptosporidial carriage and infection using polymerase chain reaction has been developed and may allow better identification of patients at higher risk.¹⁸ However, at the moment good anticyptosporidial drugs are not available, although a combination of drugs such as paromomycin, nitazoxanide, and azithromycin may be of some use in suppressing infection.²⁵

Previous *Pneumocystis carinii* pneumonia did not increase the risk of death following HSCT, but preexisting lung damage was strongly associated with mortality. It may be that preexisting lung damage is a predictive marker for latent viral or fungal infection. Alternatively, patients with preexisting lung damage may be in generally poorer condition and tolerate transplantation less well. It is of note that although severe GvHD was not significantly different between the 2 groups, all 4 patients with GvHD greater than grade II died, and this association may

be more apparent in a larger series. Transplantation using whole marrow to achieve early T-cell recovery would be a logical approach to limit cryptosporidial or other infective disease, but, in this study, 7 of 12 cases engrafted after receiving T-cell-depleted marrow and T-cell depletion was not associated with an increased mortality. The results using T-cell-depleted and whole marrow from unrelated donors are very encouraging, with 68% of patients surviving, similar to recent European results reported for matched unrelated donor transplants for other T-cell immunodeficiencies.²⁶ However, the use of antigen-mismatched donors was associated with death or autologous reconstitution.

The most difficult question remains the timing of HSCT. In patients without preexisting hepatic disease, HSCT was successful in 13 (72%) of 18 patients, with 4 deaths and 1 autologous reconstitution. These results are similar to those achieved when young, relatively well children with other T-cell immunodeficiencies such as Wiskott-Aldrich syndrome²⁷ undergo transplantation, where early HSCT is more successful than that done at a later age. Many patients remain very well, leading near normal lives on supportive treatment, which includes the use of boiled water to reduce the risk of cryptosporidial disease. Also, there may be an understandable reluctance to risk a 20% or greater chance of death following HSCT when it is not certain which patients will ultimately develop fatal hepatic disease. One approach in CD40L deficiency may be to administer supportive therapy and monitor closely for evidence of hepatic disease and other complications, including lung damage, with HSCT performed at the earliest sign of complications, possibly using a low-intensity conditioning regimen. An alternative would be to recommend early HSCT using a full conditioning regimen. These questions will be answered only by continuing careful collection of detailed longitudinal follow-up data on the incidence of complications and the survival of patients treated by HSCT early with full conditioning, later with low-intensity conditioning or without HSCT and full supportive care only. It will be particularly important to identify adverse risk factors for each treatment strategy so that we can determine who should undergo transplantation and when HSCT should be performed. These results from across Europe show that, overall, HSCT is curative in nearly 60% of CD40L patients, with preexisting lung disease appearing to be the most important adverse risk factor.

Appendix

The following colleagues participated in this study by the European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation and the European Society for Immunodeficiencies: M. Abinun, A. Anah, D. Bensussan, H. Gaspar, A. R. Gennery, A. J. Cant, E. G. Davies, A. Fasth, T. J. Flood, W. Friedrich, S. Bianchi, P. Landais, R. Seger, N. Wulffraat, C. Steward, H. Ozsahin, P. Vays, A. Fischer, R. G. M. Bredius, L. D. Notzhangala, S. Marthe-Martin, P. Bordignon, M. Cavazzana-Calvo, S. Muller, J. Vossen, T. Gungor, J. Ortega, A. O'Meara, A. Will, F. Porta, M. Slatter, A. C. Lankester, I. Andre-Schmutz, S. Corbacioglu, Y. Camcioglu, T. Espanol, B. Gerritsen, F. Le Deist, C. I. E. Smith, A. Van Royen-Kerkhof, D. Moshous, A. Thrasher, P. de Coppi, A. Bhattacharya, M. Hoenig, K. Kalwak, N. Perez, S. Caillaud-Zucman, S. Hacein-Bey, O. Danos, P. Aubourg, N. Carrier, and J. Stary.

References

- Korthauer U, Graf D, Mages HW, et al. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature*. 1992;361:539-541.
- Cisanto JP, Sonnetby JV, Gaudat JF, Fischer A, De Saint-Basile G. CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature*. 1993;361:541-543.
- Van Kooten C, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Current Opin Immunol*. 1997;9:325-337.
- Heyward AR, Levy J, Facchetti F, et al. Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver, and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Immunol*. 1997;158:377-383.
- Cunningham CK, Benville CM, Ochs HD, et al. Enteroviral meningoencephalitis as a complication of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr*. 1999;134:554-558.
- Andrews JF, Katz F, Jones A, Smith S, Finn A. CD40 ligand deficiency presenting as unresponsive neutropenia. *Arch Dis Child*. 1995;74:456-459.

7. Toniati P, Savoldi G, Jones AM, et al. Report of the ESID collaborative study on clinical features and molecular analysis of X-linked Hyper-IgM syndrome [abstract]. *European Society for Immunodeficiencies Newsletter* 2002 (suppl); F9-40.
8. Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, et al. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr*. 1997;131:47-54.
9. Fasth A. Bone marrow transplantation for hyper-IgM syndrome. *Immunodeficiency*. 1993;4:323.
10. Thomas C, De Saint Basile G, Le Deist F, Theophile D, Fischer A. Brief report: correction of X-linked hyper-IgM syndrome by allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1995;333:428-429.
11. Scholl PR, O'Gorman MRG, Pachman LM, Haut P, Kietzel M. Correction of neutropenia and hypogammaglobulinemia in X-linked hyper-IgM syndrome by allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22:1215-1218.
12. Bordignon P, Aubertin B, Carret A, et al. Bone marrow transplantation as treatment for X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22:1111-1114.
13. Kato T, Tsuge I, Inaba J, Kato K, Matsuyama T, Kojima S. Successful bone marrow transplantation in a child with X-linked hyper-IgM syndrome. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23:1081-1083.
14. Kawai S, Sasahara Y, Minegishi M, et al. Immunological reconstitution by allogeneic bone marrow transplantation in a child with the X-linked hyper-IgM syndrome. *Eur J Pediatr*. 1999;158:394-397.
15. Duplantier JE, Seyama K, Day NK, et al. Immunological reconstitution following bone marrow transplantation for X-linked hyper IgM syndrome. *Clin Immunol* 2001;98:313-318.
16. Hadzic N, Pagliuca A, Rela M, et al. Correction of the hyper-IgM syndrome after liver and bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 2000;342:320-323.
17. Gennery AR, Clark JE, Flood TJ, Abinun M, Cant AJ. T cell depleted bone marrow transplantation from unrelated donor for X-linked hyper-immunoglobulin M syndrome [letter]. *J Pediatr*. 2000;137:290.
18. Mclachlin J, Amar CFL, Pedraza-Diaz S, Mieli-Vergani G, Hadzic N, Davies EG. The use of polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of infection with *Cryptosporidium* in patients with primary immunodeficiencies. *Ped Inf Dis J*. 2003;22:329-335.
19. Amrolia P, Gaspar HB, Hassan A, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation for congenital immunodeficiencies. *Blood*. 2000;96:1239-1246.
20. Khawaja K, Gennery AR, Abinun M, Flood TJ, Cant AJ. Single supraregional centre experience of bone marrow transplantation for CD40L deficiency. *Arch Dis Child*. 2001;84:508-511.
21. Leone V, Tommasin A, Andolina M, et al. Elective bone marrow transplantation in a child with X-linked hyper-IgM syndrome presenting with acute respiratory distress syndrome. *Bone Marrow Transplant*. 2001;30:42-52.
22. Groeneweg M, Hartwig NG, Jonge Poerink-Stockschläder AB, et al. Two children with severe recurrent infections and the X-linked hyper-IgM syndrome. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2003;147:1024-1028.
23. Katz F, Hinshelwood S, Rutland P, Jones A, Kinnon C, Morgan G. Mutation analysis in CD40 ligand deficiency leading to X-linked hypogammaglobulinemia with hyper IgM syndrome. *Hum Mutat*. 1998;8:223-228.
24. Carreras E, Bertz H, Aroese W, et al. Incidence and outcome of hepatic veno-occlusive disease after blood or marrow transplantation: a prospective cohort study of the European group for blood and marrow transplantation. *Blood*. 1998;92:3599-3604.
25. Amadi B, Mwiya M, Musuku J, et al. Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360:1375-1380.
26. Antoine C, Müller S, Cant A, et al. Long-term survival and transplantation of hematopoietic stem cells for immunodeficiencies: a report of the European experience 1988-99. *Lancet*. 2003;361:553-560.
27. Filipovich AH, Stone JV, Tomany SC, et al. Impact of donor type on outcome of bone marrow transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the International Bone Marrow Transplant Registry and the National Marrow Donor Program. *Blood*. 2003;97:1598-1603.

II- PREVENTION DE LA GVHD

II-1- Déplétion T par sélection positive CD34+ dans le WAS

En Juin 2000, nous avons réalisé une allogreffe phénoïdétique déplétée en lymphocytes T par sélection positive CD34+ Miltenyi chez un patient atteint d'un syndrome de Wiskott Aldrich. Cette allogreffe a été finalement rejetée après une prise initiale. Nous discuterons les raisons de ce rejet dans le contexte notamment d'un WAS.

II-1-1 Présentation du cas clinique

Le diagnostic de Syndrome de Wiskott Aldrich a été posé chez cet enfant à l'âge de 4 mois devant des signes cliniques infectieux et cutanés. En effet, l'enfant a présenté des infections bactériennes à répétition, notamment deux septicémies à *Pyocyanique* et à *Maltophilia* multi-résistant ainsi qu'une septicémie à *Enterobacter*, une otite purulente chronique à *Pyocyanique*, *Staphylococcus coagulase négative* et *Candida albicans* et des infections des voies centrales veineuses à *Staphylococcus coagulase négative*. Parallèlement, l'enfant présentait un eczéma très sévère surinfecté avec lymphadénite dermatopathique cervicale satellite, ainsi que des phénomènes cliniques auto-immuns apparus à l'âge de 14 mois sous la forme de polyarthrite (hanches, chevilles et genoux) et des lésions de vascularite des membres inférieurs.

Biologiquement, une thrombopénie majeure a débuté à l'âge d'un mois et demi avec des micro-plaquettes, sans syndrome hémorragique sévère. Une splénectomie a été réalisée à l'âge de 8 mois, avec une efficacité certaine (+ 100 000 plaquettes) mais une rechute (- 20 000 plaquettes) lors de chaque infection.

Sur le plan de l'immunité humorale, une hyper IgA et une hyper IgE supérieure à 2000 UI/l étaient observées alors que les IgG étaient normales et les IgM à la limite inférieure de la normale. La fonction anticorps vis-à-vis des antigènes protéiques se situait à la limite inférieure de la normale. En revanche, étant donné l'âge de l'enfant, la fonction anticorps vis-à-vis des antigènes polysaccharidiques n'a pas été testée.

Sur le plan de l'immunité cellulaire, aucune anomalie quantitative n'a pu être mise en évidence. L'exploration fonctionnelle réalisée au sein de notre laboratoire a montré une bonne réponse proliférative vis-à-vis des mitogènes classiques mais aucune réponse proliférative

contre le tétanos. De plus, la réponse proliférative vis-à-vis du periodate s'est révélée effondrée (Index de transformation, IT = 1, alors que les témoins présentent un IT > 26).

Par ailleurs, la présence d'auto-anticorps anti-plaquettes anti-gp2b3a, un test de Coombs positif et des auto-anticorps anti-lymphocytes B objectivaient un phénomène d'auto-immunité biologique.

Le diagnostic de la maladie a été affirmé par l'étude de la mutation du gène WASP qui a objectivé une mutation entraînant un décalage du cadre de lecture.

La présence de manifestations auto-immunes, la répétition de septicémies à Pyocyanique, l'extrême gravité de l'eczéma de cet enfant, sont les arguments qui ont conduit à proposer un traitement par allogreffe de Cellules souches hématopoïétiques à l'âge de 18 mois.

II-1-2 Allogreffe de CSH

Le donneur présentait avec le patient une compatibilité HLA 9/10 allélique avec une différence portant sur le gène A (A3 011 vers A 3012).

Comme l'a rapporté ensuite Filipovitch *et al* en 2001, les résultats des allogreffes phénoïdiques chez les patients de moins de 5 ans atteints de WAS sont similaires à ceux des allogreffes génoidentiques, en terme de probabilité de survie. Cependant, la même équipe a clairement montré que la cause principale de décès des allogreffes phénoïdiques chez les patients atteints de WAS est la GVHD. Or, la présence d'une incompatibilité HLA entre le donneur et notre patient était un facteur de risque de GVHD supplémentaire. C'est pourquoi la prévention de la GVHD devait être particulièrement efficace. Il a donc été décidé d'ajouter à la prophylaxie classique de la GVHD (associant Ciclosporine et Methotrexate) une déplétion du greffon en lymphocytes T par sélection positive CD34+ réalisée par la technique CliniMACS de Miltenyi. Cette technique, réalisée à l'UTCT, utilise des anticorps monoclonaux anti-CD34 (du clone Q-Bend10) couplés à des microbilles immunomagnétiques. Les cellules mononucléées médullaires obtenues par séparation sur gradient de densité sont mises en contact avec l'anticorps. Les anticorps non fixés aux cellules sont éliminés par lavage. Les cellules sont ensuite déposées sur la colonne Miltenyi. Cette colonne est placée dans un champ magnétique crée par l'appareil CliniMACS. Les cellules ayant fixé l'anticorps anti-CD34+ couplé aux microbilles immunomagnétiques sont retenues dans ce champ magnétique alors que toutes les autres cellules sont éluées. Plusieurs passages automatiques sur cette colonne de la fraction sélectionnée permettent d'accroître la pureté en

cellules CD34+ et de diminuer la contamination par d'autres types cellulaires comme les lymphocytes T CD3+.

Dans le cas présent, le greffon obtenu après sélection positive CD34+ Miltenyi contenait : $24.15 \cdot 10^6$ cellules nucléées totales par kg de poids du receveur, $23.67 \cdot 10^6$ CD34+/kg (soit une pureté de 98%) et $2.41 \cdot 10^5$ CD3+/kg (soit une contamination de 1%). Le rendement de la colonne correspondant au rapport des cellules CD34+ en bas de colonne sur les cellules CD34+ déposées sur la colonne) était particulièrement élevé : 96%. Cependant, la contamination en lymphocytes T CD3+ s'est révélée trop élevée puisque le seuil de lymphocytes T à ne pas dépasser pour éviter la survenue d'une GVHD est de $1 \cdot 10^4$ CD3+/kg.

Afin de ne pas administrer une dose trop élevée de lymphocytes T, il a été décidé de ne réinjecter qu'une fraction de ce greffon contenant : $2.5 \cdot 10^6$ CNT/ kg, $2.4 \cdot 10^6$ CD34+/kg et $4.2 \cdot 10^4$ CD3+/kg.

Avant de recevoir le greffon de CSH, le patient a reçu un conditionnement myéloablatif composé de Busulfan (16 mg/kg) suivi de Thiotépa (10 mg/kg), Cyclophosphamide (200 mg/kg). La prophylaxie de la GVHD a reposé sur du Méthotrexate court et de la ciclosporine A et bien sûr la déplétion T du greffon par sélection positive CD34+.

II-1-3 Evolution clinique post-greffe

II-1-3-1- Sur le plan hématologique

Après une prise initiale du greffon objectivée par une chimère complète à J15 (11 cellules sur 11 de type donneur), la greffe s'est soldée par un rejet entre J15 et J50 avec d'abord apparition d'une chimère mixte puis 100% receveur, à la fois sur les lignées lymphoïdes et sur les lignées myéloïdes. La séparation des sous populations pour l'étude du chimérisme post-greffe est réalisée à l'UTCT par la technique ROBOSEP de Stem cell Technology.

Parallèlement est apparue une auto-reconstitution (Globules blancs supérieurs à 1000/ μ l et polynucléaires neutrophiles supérieurs à 500/ μ l à J23, Plaquettes supérieures à 25000/ μ l à J50 et Plaquettes supérieures à 25000/ μ l à J55).

II-1-3-2- Sur le plan de la GVHD

Du fait du rejet, aucun signe de GVHD aiguë n'a été observé.

II-1-3-3- Sur le plan infectieux

A J8, l'enfant a présenté une infection des voies aériennes supérieures puis une bronchiolite à VRS de gravité moyenne, traitée par Virazole, Gammaglobulines IV à hautes doses et Synagis. L'infection s'est progressivement amendée au début du deuxième mois.

Aucune autre infection n'est à signaler.

II-1-3-4- Sur le plan général

Du fait de l'échec de la prise de greffe, un eczéma très sévère est réapparu avec prurit intense, polyadénopathies cervicales et inguinales satellites. Les épisodes infectieux se sont également multipliés avec réapparition d'une otorrhée purulente surinfectée par *Pyocyanique* et de plusieurs septicémies à *Staphylocoque méti-R* sur cathéter probablement infecté. De plus, de nombreuses manifestations d'allergie alimentaire ont été observées.

Devant la sévérité de l'évolution clinique, il a été décidé de proposer un traitement par une deuxième allogreffe de CSH phénoïdétique avec le même donneur.

II-1-4 Deuxième allogreffe de CSH

Une deuxième allogreffe de CSH a été réalisée environ 5 mois et demi après la première allogreffe.

Un conditionnement non myéloablatif composé de Fludarabine 150 mg/m² suivi de Melphalan 140/m² a été réalisé. La prévention de la GVHD a consisté en l'association Ciclosporine et Methotrexate (comme pour la première allogreffe) ainsi qu'en l'administration de SAL de J-5 à J-3.

Le greffon médullaire n'a pas été déplété en lymphocytes T, compte tenu de l'absence de prise de la première greffe. En fait, il s'agissait de la fraction positive CD34+ du greffon médullaire qui n'avait pas été greffée lors de la première allogreffe et de la fraction négative qui avaient toutes deux été congelées à l'UTCT. Ces deux fractions ont donc été décongelées et poolées, afin d'obtenir un greffon présentant les caractéristiques suivantes : 0.75 10⁸ CNT/kg, 10.6 10⁶ CD34/kg et 2.83 10⁷ CD3/kg.

L'évolution post-greffe a été très simple avec une sortie rapide d'aplasie (Globules blancs supérieurs à 1000/μl à J22, polynucléaires neutrophiles supérieurs à 500/μl à J24, Plaquettes supérieures à 25000/μl à J18 et Plaquettes supérieures à 25000/μl à J21). La chimère hématopoïétique de type donneur a été établie à partir de J30 et confirmée à J45. Il n'y a pas eu d'évènement infectieux particulier et on peut noter la disparition de toute allergie alimentaire. Le seul problème a été une GVHD aiguë digestive isolée de grade IIB (grade 1

histologique sur biopsie) apparue à J25, résolutive sous traitement par Solumedrol 2.5 mg/kg/j avec diminution rapide. L'enfant a pu sortir du secteur de greffe à J60.

L'évolution à un an de la greffe est extrêmement satisfaisante avec une reprise nette de la croissance staturo-pondérale, une diminution très significative des infections, une normalisation du taux de plaquettes et l'absence de récurrence de la GVHD. La seule ombre est la persistance d'un eczéma peu sévère et d'une légère élévation des IgE, probablement liés à l'apparition d'un chimérisme mixte partiel sur la population lymphocytaire B (30% d'origine receveur). Un chimérisme mixte est à signaler sur les autres sous populations : population myéloïde à 50 % d'origine receveur et population lymphoïde T à 10% d'origine receveur. Cependant, ce chimérisme est stable et parfaitement toléré avec absence de déficit immunitaire et taux de plaquette normal.

Le recul est aujourd'hui de 6 ans, délai suffisant pour affirmer que l'enfant est guéri de son syndrome de Wiskott Aldrich suite à la deuxième allogreffe phénoïdique de CSH avec conditionnement non myéloablatif.

II-1-5 Discussion et conclusion

Les conditions de la première allogreffe ont été définies au regard de l'expérience publiée :

- un conditionnement myéloablatif, du fait de la forte immunité résiduelle chez les receveurs atteints de WAS pouvant entraver la prise de la greffe.
- une prévention de la GVHD très importante comprenant en plus de la prévention médicamenteuse une déplétion en lymphocytes T du greffon, du fait du risque élevé de GVHD dans les allogreffes phénoïdiques pour WAS et du risque supplémentaire pour l'enfant que présentait l'absence d'histocompatibilité 10/10.

Cependant, la sélection positive CD34+ n'ayant pas permis d'atteindre un taux de lymphocytes T /kg de poids du receveur satisfaisant (du fait, en partie, du faible poids du receveur : 7.6 kg), tout le greffon n'a pas pu être réinjecté et la dose de cellules CD34+ s'est révélée insuffisante pour permettre une prise de greffe ($2.4 \cdot 10^6$ CD34+/kg). La persistance d'une immunité résiduelle malgré l'administration d'un conditionnement myéloablatif est probablement à l'origine de ce rejet.

En revanche, les conditions de la deuxième allogreffe ont été définies en réaction aux résultats de la première allogreffe. En effet, il était dangereux de proposer à nouveau un conditionnement myéloablatif chez ce jeune enfant. C'est pourquoi l'option d'un

conditionnement non myéloblatif a été retenue, bien que l'expérience de ce type de conditionnement dans le cadre de WAS était peu importante à ce moment-là. La prévention de la GVHD, toujours considérée comme risque majeur dans ce type d'allogreffe, a été renforcée par l'administration en pré-greffe de SAL. Ces dernières ont une demi-vie de plusieurs jours et sont donc toujours présentes dans la circulation du patient au moment où le greffon est administré, permettant ainsi de réaliser une déplétion T *in vivo* du greffon. Le choix de cette prévention de la GVHD a permis de ne pas manipuler le greffon *in vitro* et de pouvoir administrer ainsi une forte dose de cellules CD34+, nécessaire dans le cas d'un conditionnement non myéloblatif. L'évolution post-greffe vers un chimérisme mixte stable est fréquente après un conditionnement non myéloblatif. Le risque dans ce contexte particulier, est que le pourcentage de cellules de type donneur soit insuffisant pour permettre la restauration de l'immunité et la résolution du déficit immunitaire. Dans le cas présent, nous disposons des résultats du chimérisme sur les différentes sous populations cellulaires et pouvons observer que la population T est à 90% d'origine donneur. Une évolution similaire a été décrite en 2002 par Longhurst *et al*, qui ont réalisé une allogreffe avec un conditionnement non myéloblatif (constitué de CAMPATH 1H, de Fludarabine et de Cyclophosphamide) chez un patient atteint de WAS ayant de lourds antécédents infectieux ainsi qu'une atteinte pulmonaire. Un chimérisme mixte stable a été observé sur les lymphocytes T ainsi qu'un chimérisme majoritairement receveur sur les polynucléaires et la restauration de l'immunité ainsi que la résolution du déficit immunitaire ont été obtenues sans complication majeure post-greffe. Toutefois, les études récentes sur des cohortes importantes de patients allogreffés pour un WAS montrent qu'un chimérisme mixte est souvent associé à une mauvaise reconstitution plaquettaire et à plus long terme à l'apparition de manifestations auto-immunes (Pai *et al*, 2006 ; Oszahin *et al*, 2007). A la lumière de ces résultats, une surveillance régulière de l'évolution clinique de notre patient est réalisée.

A travers ces résultats, nous pouvons observer que la déplétion T du greffon par sélection positive CD34+, largement utilisée dans le cadre d'allogreffes en situation haploidentique doit répondre à certains critères. Outre la déplétion T, qui doit permettre de ne pas réinjecter plus de $1 \cdot 10^4$ CD3/kg (seuil parfois difficile à atteindre, principalement chez les receveurs de faible poids), la dose de CD34+ réinjectés doit être importante. A titre indicatif, en situation haploidentique, l'équipe de Perugia préconise une dose supérieure à $10 \cdot 10^6$ CD34/kg (dose parfois difficile à atteindre, principalement chez les receveurs de poids élevé).

Par ailleurs, cet exemple montre qu'il existe des alternatives à la prévention de la GVHD par sélection positive CD34+ qui doivent être préférées lorsque les conditions d'obtention d'un greffon riche en cellules CD34+ et correctement déplété en lymphocytes T ne peuvent être réunies.

II-2- Déplétion alloréactive

ARTICLE 4:

Improving immune reconstitution while preventing GVHD in allogeneic stem cell transplantation.

Cavazzana-Calvo M, André-Schmutz I, Hacein-Bey-Abina S, Bensoussan D, Le Deist F, Fisher A.

Seminars in Hematology, 2002, 39 : 32-40

Lors de mon stage d'interne chez le Pr Cavazzana-Calvo, j'ai travaillé sur la déplétion alloréactive avec immunotoxine afin de déterminer quel était le temps d'incubation avec l'immunotoxine qui donnait le meilleur degré de déplétion T alloréactive. Puis, une fois sur Nancy, nous avons accueilli à l'UTCT en 1998 une étudiante que nous avons encadrée pour réaliser une revue bibliographique sur les différentes stratégies de déplétion alloréactive. Enfin, nous avons développé au sein de l'UTCT les contrôles qualité des cellules allodéplétées dans l'objectif de participer au protocole oligocentrique d'injection de lymphocytes T allodéplétés chez des patients allogreffés pour une hémopathie maligne. Malheureusement, ce protocole n'a pas pu débiter.

Cette revue que nous présentons ici fait état des différentes stratégies de prévention de la GVHD permettant de préserver le potentiel immunitaire anti-infectieux. Ces stratégies sont classées en deux approches distinctes ayant le même objectif : favoriser les effets positifs des lymphocytes T tout en prévenant la survenue d'une GVHD.

La première approche est basée sur le fait que les lymphocytes T responsables de la GVHD sont aussi responsables de l'effet GVL : il est donc impossible de dissocier l'effet délétère de l'effet bénéfique des lymphocytes T. C'est pourquoi deux équipes ont développé une stratégie clinique visant à contrôler les lymphocytes T en les transfectant avec un gène suicide. Le gène transfecté est le gène d'une enzyme : la Thymidine kinase du virus *Herpès simplex* (HSV-Tk). Cet enzyme peut transformer le Gancyclovir en métabolite toxique pour la cellule. Seules les cellules ayant intégré le gène de l'HSV-Tk sont sensibles à l'administration du Gancyclovir. En pratique, des lymphocytes T du donneur transfectés par l'HSV-Tk sont administrés au receveur d'une allogreffe de CSH déplétée en lymphocytes T, de manière à favoriser l'effet GVL et l'immunité anti-infectieuse. Dès l'apparition de signes de GVHD, un

traitement par Gancyclovir est réalisé afin de détruire les lymphocytes T allogéniques responsables de la GVHD.

La deuxième approche est basée sur l'hypothèse que les cellules responsables de l'effet GVHD et de l'effet GVL peuvent être dissociées, au moins en partie. Deux approches *ex vivo* ont été proposées : la première consiste à induire une anergie des lymphocytes T du donneur vis-à-vis des allo-antigènes du receveur, la deuxième consiste à éliminer *ex vivo* les lymphocytes T du donneur activés par les antigènes HLA du receveur. Il s'agit de la déplétion alloréactive.

Pour induire une anergie des lymphocytes T, certains travaux se sont portés sur le blocage du « second signal » d'activation des lymphocytes T ou signal de co-stimulation. Plusieurs couples de molécules sont impliqués dans ce signal de co-stimulation dont les principaux sont : CD28/CD80-86, CD40/CD154, OX40/OX40L, ICOS/B7H2. Un essai clinique est rapporté consistant à mettre en culture *in vitro* pendant 36 heures des cellules du donneur avec des cellules irradiées du receveur et hCTLA-4Ig. CTLA4 est un ligand de CD28 qui possède une affinité plus importante pour CD28 que les molécules CD80-CD86 et exerce ainsi une régulation négative en « détachant » CD28 de ses ligands. Malheureusement les résultats de cette étude portant sur 12 patients n'ont pas été encourageants avec 4 décès liés à la toxicité du conditionnement, 1 non prise, 3 GVHD aiguës digestives et 1 GVHD chronique. D'autres équipes se sont intéressées à l'effet inhibiteur (« anergy like ») de l'IL 10 et du TGF β .

La technique de déplétion alloréactive consiste à réaliser une culture mixte lymphocytaire avec les cellules du donneur et les cellules du receveur irradiées. Les cellules du donneur s'activent et expriment des antigènes membranaires, marqueurs de cette activation : CD25 (chaîne α du récepteur de l'IL2), CD69 (marqueur précoce d'activation). Ces antigènes membranaires constituent alors des cibles pouvant être reconnues par des anticorps monoclonaux couplés soit à une immunotoxine, soit à des billes immunomagnétiques. Les tests *in vitro* ont montré que la population allodéplétée conservait un effet anti-leucémique et une capacité anti-virale.

Tous ces travaux ont permis de débiter un essai clinique sur l'hôpital Necker qui est présenté à la fin de la revue.

Improving Immune Reconstitution While Preventing Graft-Versus-Host Disease in Allogeneic Stem Cell Transplantation

Marina Cavazzana-Calvo, Isabelle André-Schmutz, Salima Hacein-Bey-Abina, Danielle Bensoussan, Françoise Le Deist, and Alain Fischer

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the treatment of choice for many hematologic malignancies or inherited disorders. Ex vivo T-cell depletion (TCD) of the graft and post-transplantation immunosuppression efficiently prevent the development of graft-versus-host disease (GVHD). However, the consequence of these nonspecific approaches is a long-lasting immunodeficiency associated with increased disease relapse, graft rejection, and reactivation of viral infections. Donor lymphocyte infusion, to treat leukemic relapse after allogeneic HSCT, can cause severe GVHD. Several strategies are being optimized to specifically inactivate anti-host T cells while preserving antileukemic or antimicrobial immunocompetence, based on ex vivo or in vivo elimination of anti-host T cells or on the modulation of their anti-host activity.

Semin Hematol 39:32-40. Copyright © 2002 by W.B. Saunders Company.

ALLOGENEIC hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the treatment of choice for a number of hematologic malignancies^{2,42,43} and inherited diseases of the lymphohematopoietic system.^{12,33} Progress in supportive care and in the management of infectious diseases has improved the long-term survival of transplanted patients given human leukocyte antigen (HLA)-genoidentical transplants, but less so for partially HLA-incompatible transplants.^{45,49} These disappointing results led to attempts to modify transplantation procedures in order to successfully use HSC from HLA-mismatched related or HLA-matched unrelated donors. Using these types of donor, stem cell dose escalation combined with reinforced conditioning regimens have enabled the HLA barrier to be bypassed, at least in the case of adults affected by malignancies and treated by multiple courses of chemotherapy before the transplantation procedure.^{1,65} Before this approach was introduced, adult leukemia patients frequently re-

jected partially incompatible T-cell-depleted (TCD) allogeneic transplants.

Non-genoidentical sources of HSC are commonly used to treat children affected by severe inherited immune disorders who lack genoidentical donors. Despite the advantages presented by this selected patient population (absence of earlier treatment, fewer previous transfusions, lower risk of graft-versus-host disease [GVHD], and no need for a graft-versus-leukemia [GVL] effect), significant improvement in the long-term event-free survival is still difficult to achieve owing to profound and long-lasting T-cell immunodeficiency post-HSCT.^{41,47} GVHD and graft rejection can be efficiently prevented both in adult and pediatric patients by combining profound TCD and effective immunosuppressive agents with a high stem cell dose. Nevertheless, disease-free survival still ranges from 20% to 70% depending on the age of the patient, the underlying disease,³ and the degree of HLA disparity,⁵⁷ the worst results being reported for leukemia patients due to a high relapse rate.^{1,13}

The sustained T-cell immunodeficiency of HSCT recipients depends on many factors such as the extent of TCD of the graft (greater or less than a threshold of 1×10^4 donor T cell/kg), the in vivo use of T-cell-depleting antibodies to prevent graft rejection, and age-dependent residual thymic function.⁵⁶ Severe infections and disease recurrence complicate the outcome in two thirds of partially incompatible transplants. The cause of death of children transplanted with HSC from a haplo-incompatible donor is often viral infection⁵⁸: respiratory viruses such as adenoviruses, respiratory syncytial virus (RSV), and paramyxovirus influenzae, as well as cytomegalovi-

From the Laboratoire de Thérapie Cellulaire et Génique, INSERM U429, Laboratoire d'Immunologie Pédiatrique, and Service d'Immunologie et d'Hématologie Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris; and the Laboratoire de Thérapie Cellulaire, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Supported in part by Assistance Publique-Hopitaux de Paris, by INSERM, by a European grant S14PCT950029. I.A. is supported by a fellowship from Association Française contre les Myopathies.

Address reprint requests to Marina Cavazzana-Calvo, MD, PhD, INSERM U429, Hôpital Necker Enfants Malades, 149 rue de Sévres, 75743 Paris Cedex 15, France.

Copyright © 2002 by W.B. Saunders Company

0037-1963/02/3901-0004\$35.00/0

doi:10.1053/shem.2002.29251

rus (CMV) and Epstein-Barr virus (EBV).^{11,46} In contrast, disseminated fungal infection is the main source of opportunistic infection in adults.⁷⁸ The kinetics of these infections is striking, most of them occurring within the first 6 months post-transplant, when patients are still highly immunosuppressed. Consequently, shortening the immune reconstitution period is a potential way to significantly decrease transplant-related mortality following TCD-HSCT.

Patients can benefit from the injection of a fixed number of mature donor T cells that are able to mediate protection against infections^{66,76} and relapse,³¹ as well as facilitate engraftment, without inducing severe GVHD. The existence of these "positive" T-cell effects has been demonstrated in a well-defined murine system where injected T cells exerted a dose-dependent facilitation of engraftment.⁵³ As these T cells are phenotypically indistinguishable, alternative approaches have been developed to modulate the alloreactive response. The alloimmune response against HLA-partially incompatible transplants, as compared with immune responses to exogenous antigens, entails an unusually large number of T-cell clones.⁶⁸ Depending on the technique used, the percentage of alloreactive T-cell precursors has been estimated to range from less than 0.001 to 10% of total T cells. Despite a high number of alloreactive T cells in vitro, only half of them are able to proliferate in vivo.⁷⁰ Major and minor histocompatibility antigens can elicit strong alloreactive responses. Antigen presentation by major histocompatibility complex (MHC) molecules, both direct and indirect, causes full T-cell activation even in the presence of an immunological deficit.^{36,77}

The development of preclinical and clinical strategies has been based on two approaches, both with the same goal of amplifying the positive effects of T lymphocytes while preventing GVHD. The first is based on the assumption that alloreactive T cells mediating GVHD are also involved in GVL activity, making it impossible to distinguish between the two. Based on this assumption, preclinical and clinical trials have attempted to control T-cell function in vivo by insertion of a suicide gene (Table 1).

The second strategy is based on the assumption that even if protective actions against infections, GVHD, and GVL are highly interconnected, T cells responsible for such activities can, at least in part, be separated. Two ex vivo approaches have been suggested. The first consists of inducing host alloantigen-specific anergy and/or immunosuppressive T cells. The second involves ex vivo killing (or negative selection) of T cells activated by recipient HLA antigens. We here summarize the pertinent background studies and discuss clinical applications.

Table 1. Approaches to Modulate or Eliminate Anti-host Reactivity in Donor T Cells

In vivo postinfusion	
• Depletion with ganciclovir of TK-transfected T cells	Bonini et al, 1997 ⁸ Tieberghien et al, 2001 ⁷¹
Ex vivo prior to infusion	
• Blockade of costimulatory pathways	Guinan et al, 1999 ⁴⁰
—CTLA-4 Ig with CsA	
—Anti-CD40L antibody	
• Immunomodulation with inhibitory cytokines	Cavazzana-Calvo et al, 2000 ¹⁵
—IL-10 and TGF- β	
• Elimination of alloreactive T cells	
—Depletion with anti-CD25 immunotoxin	
—Removal with anti-CD25 or anti-CD69 antibodies and magnetic beads	

Suicide Gene Therapy

Suicide genes encode for enzymes that render cells sensitive to otherwise nontoxic prodrugs. Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV-TK, referred to here as TK) converts nucleoside analogs such as ganciclovir (GCV) into the monophosphate form; this conversion does not occur in normal eukaryotic cells. The monophosphate is transformed into a triphosphate metabolite that is a potent inhibitor of DNA elongation, thereby causing cell death. Thus, TK gene transfer creates a genetically determined difference, conferring GCV-sensitivity to dividing transduced T cells and allowing the selective elimination of antigen-responsive proliferating TK-positive T cells by GCV administration. Its main application is the control of unwanted T cell immune responses such as GVHD.

In practice, T cells obtained before HSCT harvest are transduced ex vivo with TK-carrying retroviral vectors, selected for TK integration, and then infused into conditioned recipients receiving HSCT.^{8,71} If necessary, GCV is administered after transplant to selectively eliminate activated, dividing TK-positive T cells.

Infusion of HSCT plus peripheral T cells to lethally irradiated mice provides an experimental model of lethal acute (a)GVHD to test this principle. Using T cells from TK-transgenic mice, aGVHD can be effectively prevented by the early administration of GCV.^{19,27,44} Published studies used variable doses and timing of GCV treatment. Two doses of GCV were sufficient to eliminate GVHD in one report,⁴⁴ as compared with daily treatment for 1 week in another,¹⁹ and several days to weeks for a third.²⁷ While these

differences may be explained by variation in transgene expression variability and strain-dependent severity of aGVHD, they indicate that the therapeutic window is narrow, which could be a problem for clinical applications. In these experiments, "late" treatment with GCV at the time of established aGVHD led to severe damage of secondary lymphoid organs and liver. Despite a good survival rate, persistent immunodeficiency was observed, eventually leading to increased mortality.²⁰ Thus, GCV probably should be started as soon as possible after the TK-positive T-cell infusion.²¹ Furthermore, the kinetics of the T-cell division rate enable discrimination of alloreactive from nonalloreactive lymphocytes and spare functional TK-positive T cells, able to kill lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)-infected target cells.¹⁸

The two published clinical trials of suicide gene therapy differ by the time at which TK-positive T cells were reinfused: delayed until after HSCT⁸ and at the time of HSCT.⁷¹ In the first pilot study, TK-positive T-cell infusions were given only to patients developing EBV-lymphoproliferative disease (EBV-LPD) or relapsing after HSCT.⁸ Three of seven evaluable patients experienced GVHD; two cases of grade III aGVHD were cured by GCV administration, while one case of chronic (c)GVHD did not resolve despite *in vitro*-proven sensitivity of TK-positive T cells to GCV. The transduced cells could be detected following infusion in three patients. In total, there were three complete remissions, two partial remissions, and two patients who showed no response despite reinfusion of 3 to 5×10^6 T cells. Thus, TK-positive T cells administered repeatedly and in different numbers are able to mediate the GVL effect and aGVHD can be controlled by GCV administration. The disadvantages of delayed T-cell infusion were (1) a lack of GVL at the onset of relapse or EBV reactivation that might account for the absence or partial response in four of seven patients; and (2) a risk of immunization against TK, as was seen in one case. The results illustrate clearly the difficulties associated with early infusion of TK-positive T cells after HSCT.⁷¹ Twelve patients at high risk for aGVHD received a TCD-HSCT from an HLA-identical sibling, simultaneously with increasing doses of donor TK-positive T cells. Three patients developed aGVHD of grade $\geq$ II, and one cGVHD. All of the aGVHD patients responded quickly to GCV treatment, although one required additional immunosuppression to control this complication. In terms of *in vivo* immune competence of the injected T cells, these results raised several concerns. Three patients developed EBV-LPD despite the injection of donor T cells, possibly related to the decreased frequency of pre-cytotoxic T lymphocyte (CTL) precursors against EBV found in cultured TK-positive T cells as compared to fresh T cells. Further-

more, while some TK-transduced T cells were still detectable by polymerase chain reaction 2 years after transplantation, most injected T cells quickly disappeared from the bloodstream. Following the 12-day culture period required for TK-gene transfer, the T-cell repertoire may have become selectively skewed. This together with the prophylactic use of cyclosporin (CsA) from day -1 to days +60 to +90 post-HSCT could have contributed to poor survival and function of infused TK-positive T cells. Abolition of post-transplant immunosuppression and shortening of the transduction culture period could improve immune function. However, an additional problem is the emergence of TK-positive T cells resistant to GCV.³⁵ The molecular characterization of these resistant clones revealed a 227-bp deletion in the HSV-TK gene donor and acceptor sites within the HSV-TK gene sequence. Better retroviral vectors must be developed and the TK transfer procedure must be optimized. The impossibility of transfecting all T cells, the heterogeneity of TK gene integration, stability and level of expression which might render GCV ineffective, and T-cell dysfunction are real obstacles.¹⁰ Furthermore, transplanted patients often develop reactivation of CMV, adenovirus, and EBV, infections which can lead to massive proliferation of antiviral T cells. In this case, discrimination of GVH and antiviral immune responses, based on different rates of proliferation, would be impossible.

Ex Vivo Induction of Anergy and Immunosuppression Towards Host Alloantigens

Full activation of T cells is a complex phenomenon requiring both the recognition of MHC class I and II molecules on antigen-presenting cells (APC) (TCR-HLA peptide) and the delivery of costimulatory signals by the APC. Once activated, T cells proliferate and exert specialized functions, such as secreting cytokines or killing target cells. The 1990s saw the introduction of the concept of the two-signals model: signal 1 is the ligation of an antigen displayed by the APC to the immunoreceptor on T cells; during the intimate contact between cell clusters, a number of receptor/ligand interactions mediate signal 2 and induce full T-cell activation (signal 2 is also called the "costimulatory signal").¹⁷

The first costimulatory pair of molecules identified was the receptor protein CD28, expressed constitutively on T cells, and its two binding partners, CD80 and CD86 (also called B7.1 and B7.2), whose expression is upregulated on activated APCs.²⁴ Together with the signal mediated by the T cell's antigen receptor, the CD28/B7 pair enhances the production of interleukin-2 (IL-2), T-cell proliferation, and the development of effector functions.^{17,24} Activation of

helper T cells induces expression of CTLA-4, which displays a much higher affinity for CD80 and CD86 than does CD28. CTLA-4 is a potent regulatory molecule of the T-cell activation process, and exerts a negative effect probably by displacing CD28 from its ligands. CTLA-4 blocks IL-2 production (as well as antigen-induced cell death).^{17,24}

The second key molecular pair, also essential for costimulation and thus complete activation of T cells, is CD40, constitutively expressed on APCs, and its receptor CD154, expressed by activated CD4⁺ T cells and a small fraction of activated CD8⁺ T cells.⁶³ Blockade of the CD40/CD154 pathway, or absence of one of the partners, inhibits both humoral and cellular immune responses. The two costimulatory pathways, CD28/CD80/CD86 and CD40/CD154, are closely associated, since (1) activation of CD40/CD154 pathway creates a positive feedback loop by increasing the expression of CD80 and CD86 on APCs⁶⁴; and (2) CD40L expression is enhanced on CD40⁺ B cells by CD28/CD80/CD86 costimulation.²⁶

Many other costimulatory molecules have since been described, among which are OX40/OX40L, 4-1BB/4-1BBL, and, more recently, ICOS, a molecule expressed by activated T cells, and its counterpart, B7RP-1.⁶⁷ These costimulatory pathways, despite an apparent overlap in activity, may exert important independent roles, probably relying on their different patterns of expression on T-cell subsets and APCs and at different stages of T-cell activation.^{17,24,67}

Several lines of evidence indicate that CD28/CD80/CD86 costimulation plays a significant role in alloreactivity.⁴ In vivo interference with CD28/CD80/CD86 interactions reduces GVHD lethality in mice.^{48,59,72,80} Modulating alloreactivity of donor T cells by blocking this costimulatory pathway *ex vivo*, prior to infusion, offers several advantages over the *in vivo* approach: (1) the recipient is not exposed to reagents that may have side effects *in vivo*; (2) the *ex vivo* efficacy of alloreactivity induction can be accurately monitored; and (3) modulation of alloreactivity is more likely to be specifically directed against host alloantigens than to leukemia-associated or viral antigens, which may achieve a critical antigenic threshold *in vivo*. Mixed lymphocyte reaction culture (MLC) remains the *in vitro* assay that best mimics the allogeneic response *in vivo*. Its inhibition by monoclonal antibodies and/or pharmacological agents is generally used as a model of abolition of aGVHD *in vivo*. Nevertheless, it should be emphasized that this assay is a poor surrogate for the clinical setting and results of MLC require cautious interpretation. Murine models have partially elucidated this issue, as illustrated by hCTLA-4 immunoglobulin (Ig). hCTLA-4 Ig is a soluble fusion protein consisting of the extracellular domain of CTLA-4 linked to the

constant region of IgG1. It was designed to take advantage of the high affinity for CD80 and CD86 and the ability to block both CD28 and CTLA-4 signaling. B6 donor splenocytes from a 3- to 4-day host-stimulated culture were exposed to saturating concentrations of hCTLA-4Ig. Despite clear *in vitro* hyporesponsiveness that reached more than 90% with the addition of anti-LFA-1 monoclonal antibody, no prevention of GVHD lethality was observed when the cultured cells were infused *in vivo*.⁶ To further increase the level of hyporesponsiveness, anti-B7 monoclonal antibody was combined with cyclosporine (CsA) to synergistically block alloantigen-induced T-cell activation *in vitro*.^{74,75} The synergistic effect of low-dose CsA is intriguing, since CsA can antagonize tolerizing effects. In a MLC inhibition assay, the addition of high-dose CsA to hCTLA-4Ig inhibited the induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness.³⁷ Nevertheless, hCTLA-4Ig alone or in combination with anti-LFA-1, as well as the association of hCTLA-4Ig and CsA, induced a state of hyporesponsiveness to alloantigens that could be reversed by exogenous IL-2, indicating that inhibited T cells were not deleted.

The hyporesponsive cells obtained by *in vitro* treatment with a combination of anti-CD80 monoclonal antibody and CsA were not inert and could inhibit potentially responsive T lymphocytes.²³ These data are consistent with the concept of "spreading anergy" initially proposed by Waldmann et al, and later confirmed in experiments on the suppressor capacity of human antigen-specific hyporesponsive T-cell clones.⁵⁵ In contrast to these data, the suppressive effect mediated by hyporesponsive alloantigen-induced T lymphocytes could not be reversed by addition of exogenous IL-2 and required cell-to-cell contact between stimulators, "anergic," and responsive cells.²³ Furthermore, the alloantigen-induced anergic lymphocytes maintained their capacity to proliferate in response to viral and bacterial antigens and to develop virus- and leukemia-specific cytotoxic activity *in vitro*.²² It would be interesting to validate this well-documented *in vitro* approach in an animal model of TCD-allogeneic HSCT.

A clinical trial testing the feasibility of inducing anergy before transplantation of histoincompatible bone marrow was performed by Guinan et al.⁴⁰ To induce alloantigen-specific anergy, bone marrow cells from donors mismatched with the recipient for one HLA haplotype were cocultured with irradiated cells from the recipient for 36 hours in the continuous presence of hCTLA-4 Ig. Twelve patients were enrolled. Interpretation of the results was complicated by the use of immunoprophylaxis against GVHD consisting of short-course methotrexate and CsA, and by the decision to study mainly "poor-risk" patients. All but one patient promptly engrafted. Be-

cause of regimen-related toxicity (four patients died within the first month post-transplantation) and the occurrence of one graft failure, only seven patients were evaluable. Three developed gastrointestinal manifestations of aGVHD, and one of the five patients who survived more than 100 days developed cGVHD. Data on the immunological reconstitution are scarce: the absolute CD4⁺ T-cell counts rose to 400/ μ L or higher by 6 months in three of the four survivors (all aged < 16 years). It is difficult to draw any firm conclusion on the usefulness of this strategy since aGVHD prevention was limited and no proof was provided for the concomitant preservation of the anti-infectious effects of the injected T cells.

Blocking CD40/CD40L interaction decreases GVHD lethality from 100% to approximately 60% in MHC-mismatched murine models of transplantation.^{7,28} Consistent with the higher expression of CD40L on activated CD4⁺ T cells compared to CD8⁺ T cells, anti-CD40L monoclonal antibody has a beneficial effect only on GVHD initiated by CD4⁺ T cells.⁷ The results obtained in the latter study are in a favor of a diminished Th1-type response to alloantigens. Blazar et al have evaluated the long-term efficiency and specificity of ex vivo blockade of CD40/CD40L interaction of purified CD4⁺ T cells stimulated by MHC class II mismatched cells.⁵ Important features of this study are the 10-day duration of MLC with anti-CD40L monoclonal antibody and the limited MHC II disparity (only three amino acids in the I-A region) between B6 responders and bm12 stimulators. Donor CD4⁺ cells were rendered hyporesponsive to host alloantigens, as proven by the inhibition of both primary and secondary MLR. Moreover, they were incapable of causing aGVHD. This protection from GVHD was superior to that obtained following in vivo administration of anti-CD40L in the same strain combination and was not reversible by IL-2.⁷ Anti-host hyporesponsiveness was achieved without inhibition of specific responses against exogenous antigens as assessed by quantifying the in vitro response of ovalbumin-specific T-cell receptor (TCR) transgenic cells. Despite its limitations, this is a feasible method to spare at least the antiviral and, more hypothetically, antileukemia responses of nonalloreactive cell populations. However, to translate this technology to the clinical setting of TCD-HSCT would be premature. The mouse model used was characterized by MHC class II disparity only, while human GVHD involves both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. As discussed above, blocking CD40L would have a limited effect on allogeneic CD8⁺ T cells. In addition, injection of large doses of ex vivo "tolerized" CD4⁺ T cells without any CD8⁺ T cells is less likely to protect against viral infections, since CD8⁺ cells are the principal mediators of the antiviral protection. Combinations

of different blocking molecules would therefore be required.

Other types of costimulatory molecular targets, currently under investigation, could be used to modulate T-cell alloreactivity.⁴ The exact mechanisms by which agents blocking costimulatory signals are unknown. In addition to their well-described effect on clonal expansion and effector function, blockade of CD28 and CD40 costimulatory signals could decrease T-cell survival by modulating the expression of antiapoptotic proteins.⁴ Functional alteration and/or deletion of T cells might be responsible for the phenomenon.

Finally, stimulation of human naive T cells in the presence of IL-10 can facilitate the induction of an anergic-like state,³⁸ highlighting the immunosuppressive property of this cytokine. Originally described as a Th2 factor in mice, IL-10 inhibits cytokine synthesis by Th1 cells and acts as general inhibitor of proliferation and cytokine responses.⁴ Moreover, CD4⁺ T cells chronically activated in the presence of IL-10 give rise to regulatory clones (Tr1) producing high levels of IL-10, low levels of IL-2 and no IL-4, and able to suppress the proliferation of naive CD4⁺ T cells specific for the same antigen.³⁹ Similarly, transforming growth factor- β (TGF- β) exerts inhibitory effects in a number of animal models, leading to the idea that the combined use of these cytokines could induce a T-cell antigen-specific hyporesponsiveness applicable in the clinic. To test this hypothesis, CD4⁺ T cells, stimulated in a MLC against recipient cells alone, or in the presence of either IL-10, TGF- β , or both, were injected into sublethally irradiated class II incompatible mice and their survival measured. The infusion of 1×10^5 T cells was lethal in 85% to 100% of recipients when cells were cultured with no cytokine, IL-10, or TGF- β alone. In contrast, when CD4⁺ T cells treated with IL-10 plus TGF- β were injected, 75% of recipient mice survived, although some GVHD was found histologically.⁷⁹ Like blockade of CD28/CD80/86 and CD40/CD40L pathways, IL-10 plus TGF- β immunomodulation induces an alteration of TCR signaling, with diminished activation of the early response kinases (ERK), and of the downstream nuclear pathways that control T-cell expansion.⁹ Of importance, alloantigen-specific hyporesponsiveness was achieved without losing the capacity of the cells to respond to OVA antigen, at least in vitro. The finding that exogenous antigen responses are preserved after ex vivo treatment suggests that the immune competence of alloantigen-nonresponsive cells may be spared. Because of the important role played by CD8⁺ T cells as antiviral and antileukemia effectors, it would be interesting to test whether IL-10 plus TGF- β can similarly inhibit CD8⁺ T-cell responses to alloantigens. A second key issue to be addressed before clinical ap-

plication is the mechanism of immunosuppression, especially whether IL-2 or anti-TCR stimulation can reverse hyporesponsiveness of IL-10-treated T cells, as recently shown in an in vitro human model.⁴⁸ Similarly, whether anergy is maintained following T-cell transplantation in the context of inhibitory cytokines, as well as agents blocking costimulatory pathways, remains debatable. The type of conditioning regimen or concurrent infection could overcome alloreactive hyporesponsiveness by mechanisms including production of high levels of cytokines or antigens causing GVHD.

Depletion of Alloreactive T Cells

Clonal elimination of alloreactive T cells is a very old idea, dating from the original bromodeoxyuridine (BrdU) treatment experiments of Zoschke and Bach performed to demonstrate that lymphocytes responding to foreign histocompatibility antigens are not multispecific but committed to certain antigens.⁸⁰ Different pharmacological agents, such as tritiated thymidine, 33258-Hoechst-modified-BrdU and light, and 5-fluorouracil have been used to reduce in vitro cell-mediated cytotoxicity to alloantigens.^{59,72,73,80} Despite abolition of CTL activity, lethal GVHD was not completely prevented in a fully allogeneic murine combination, probably because a cell subset survives this nonspecific in vitro treatment.⁷³

In a canine MLC model, anti-dog leukocyte antigen (DLA) class II monoclonal antibodies blocked a mixed lymphocyte reaction,³² but the same antibodies failed to overcome transfusion-induced sensitization in DLA-identical littermates and led to graft failure.⁶⁹ The discovery in the 1980s of specific activation markers sequentially appearing on the T-cell surface led to reconsideration of this approach. Several strategies have been undertaken to achieve more complete ex vivo depletion of the anti-host specifically activated T cells. All of the methods are based on the use of monoclonal antibodies directed to the high-affinity IL-2 receptor (CD25) or to CD69, coupled either to a toxin or to magnetic beads. Confirmation of depletion of anti-host T cells is shown by the inhibition of MLC between HLA fully, haplo-incompatible or phenoidential donor/recipient pairs,^{14,25,32,34,61,62} or HLA genoidential siblings, in which minor HLA antigens are recognized.^{51,60,62} The results have been highly variable. In the HLA genoidential setting, Koh et al reported 3.5% residual proliferation using anti-CD69 antibody labeling followed by magnetic sorting.⁵¹ The main differences with other protocols were (1) the use of recipient cells prestimulated for 24 hours with a cocktail of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α); (2) the choice of the antigen, depletion of

CD69⁺ cells (v CD25⁺ cells in the other studies); and (3) the method of depletion, by magnetic beads rather than immunotoxins. In the HLA-mismatched setting, the addition of anti-CD25 ricin immunotoxin in 2-day MLC led to greater than 98% reduction in residual proliferation towards recipient cells.^{14,62} Differences in techniques used, such as the time at which the immunotoxin is added, the type of immunotoxin, the use of magnetic bead depletion instead of immunotoxin, and the type of stimulator cells used, account for the variability of residual proliferation, which ranges from 8% to 26%.^{25,32,34,51,61} Two major issues have to be considered in order to optimize allodepletion. The expression of activation markers must be carefully monitored during MLC. CD25 and CD69 present different expression kinetics on activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells, which appear to be in part dependent on the protocol of T-cell activation.^{14,32,51} The use of preactivated recipient cells and the association of monoclonal antibodies specific for CD25 and CD69 antigens could improve depletion of alloreactive cells. Magnetic cell sorting presents several advantages over immunotoxins, including higher recovery rates, greater potential for medical application as based on existing clinical grade devices, and the ready-to-use availability of cells after the procedure.^{34,51} Among the population of T cells specific for HLA antigens, there is a mix of naive and memory cells, TCRs are broadly cross-reactive, and many T cells specific for environmental antigens also cross-react with foreign HLA peptides. On the basis of this information, T-cell allodepletion should be associated with a reduction of the number of T cells specific for exogenous antigens, but significantly this was not the case for either viral or leukemia-associated antigens.^{25,60,62} In particular, it has been shown that the number of cytotoxic precursor cells, as evaluated by limiting dilution assay and specific for CMV-infected fibroblasts and EBV-transformed cell lines, was not affected by this depletion method.⁶² The use of immunotoxins directed against CD25 to deplete alloreactive cells seems to preserve the anti-leukemia activity of treated cells, at least in vitro.

One method, in which allogeneic T cells were treated with an anti-CD25-ricin α -chain immunotoxin, passed all required preclinical studies.^{14,30,62} A murine model showed that TCD was effective, at least partially, in preventing both graft rejection and GVHD in a one haplotype-mismatched combination.¹⁶ RFT5-SMPT-dgA immunotoxin, approved by the Food and Drug Administration for a clinical phase I trial in patients with refractory Hodgkin's lymphoma,²⁹ is now under evaluation in a phase I/II clinical trial aimed at testing its applicability in allogeneic HSCT from HLA-disparate donors.¹⁵ Pediatric patients with genetic disorders or hematologic malignancies, were transplanted

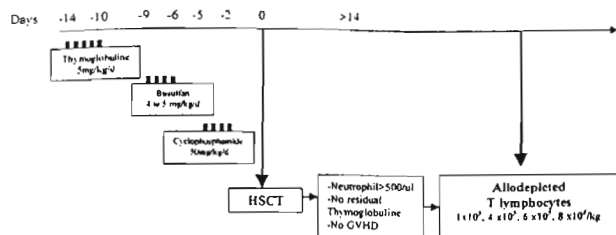


Figure 1. Treatment schedule. Patients received 5 mg/kg/d of anti-thymocyte globulin between days -14 to -10, 4 or 5 mg/kg/d of busulfan between days -9 to -6 and 50mg/kg/d of cyclophosphamide between days -5 to -2. CD34⁺ hematopoietic stem cells from matched unrelated donor or mismatched related donor were purified according to the Miltenyi Biotec procedure and transplanted at day 0. Peripheral donor lymphocytes were cultured with host cells in a mixed lymphocyte reaction and CD25⁺-activated T cells eliminated by a anti-CD25 immunotoxin after 4 days of culture. Allodepleted lymphocytes were infused to the patients provided that anti-thymocyte globulin was undetectable in the serum and engraftment confirmed.

with HSC from matched unrelated or mismatched related donors after conditioning which included early treatment with rabbit anti-human thymocyte globulin (Thymoglobuline, SangStat, Lyon, France) between days -14 and -10, followed by busulfan and cyclophosphamide (Fig 1). Allodepleted donor T cells were injected between days +15 and +30 post-transplantation, provided that Thymoglobuline, administered for prevention of rejection, was cleared from the serum and the absolute neutrophil count was greater than 500/ μ L. No immunoprophylaxis was given post-TCD-HSCT or after allodepleted T cells add-back. Preliminary data show that up to 8×10^5 treated T cells/kg per injection did not induce severe aGVHD in the haploincompatible setting. The immune recovery of CD4⁺ T cells as well as the detection of virus-specific cytotoxic T cells as early as 25 days postinfusion, in a setting of viral infection, suggests that infused T cells can survive and expand.

Conclusion

The critical problem of elimination of GVHD potential from T-cell immunotherapeutic populations is near solution. Almost all known aspects of T-cell activation have been exploited with the aim of eliminating GVHD (Table 1). For most approaches, several experiments still must be performed prior to undertaking clinical trials, including in vitro quantification of residual activity against recipients' HLA antigens, validation of the efficiency of allomodulation or depletion in animal models, and evaluation of the immune competence of treated cells. Improving immune recovery while preventing GVHD implies that treated T cells are fully competent to react

against leukemia cells or infectious organisms. The clinical trials performed or currently in progress should help in understanding which criteria and pre-clinical studies are important. The combination of some of these strategies, such as blockade of in vitro costimulatory pathway together with TK elimination in vivo, simultaneous blocking of two costimulatory pathways as already shown for solid allografts,^{50,54} or depletion of alloreactive cells followed by in vitro cloning of residual T lymphocytes specific for infection or leukemia targets, are worth future exploration.

References

1. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, et al: Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 339:1186-1193, 1998
2. Barrett AJ, Horowitz MM, Pollock BH, et al: Bone marrow transplants from HLA-identical siblings as compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission. *N Engl J Med* 331:1253-1258, 1994
3. Bertrand Y, Landais P, Friedrich W, et al: Influence of severe combined immunodeficiency phenotype on the outcome of HLA non-identical, T-cell depleted bone marrow transplantation. *J Pediatr* 134:740-748, 1999
4. Blazar BR, Korngold R, Vallera DA: Recent advances in graft-versus-host disease (GVHD) prevention. *Immunol Rev* 157:79-109, 1997
5. Blazar BR, Taylor PA, Noelle RJ, et al: CD4⁺ T cells tolerized ex vivo to host alloantigen by anti-CD40 ligand (CD40L: CD154) antibody lose their graft-versus-host disease lethality capacity but retain nominal antigen responses. *J Clin Invest* 102:473-482, 1998
6. Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltis-Mortari A, et al: Co-blockade of the LFA 1:ICAM and CD28/CTLA4:B7 pathways is a highly effective means of preventing acute lethal graft-versus-host disease induced by fully major histocompatibility complex-disparate donor grafts. *Blood* 85:2607-2618, 1995
7. Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltis-Mortari A, et al: Blockade of CD40 ligand CD40 interaction impairs CD4⁺ T cell-mediated alloreactivity by inhibiting mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation. *J Immunol* 158:29-39, 1997
8. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, et al: HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276:1719-1723, 1997
9. Boussiotis VA, Chen ZM, Zeller JC, et al: Altered T-cell receptor + CD28-mediated signaling and blocked cell cycle progression in interleukin 10 and transforming growth factor- β -treated alloreactive T cells that do not induce graft-versus-host disease. *Blood* 97:565-571, 2001
10. Boyer O, Cohen JL, Bellier B, et al: Transient control of a virus-induced immunopathology by genetic immunosuppression. *Gene Ther* 7:1536-1542, 2000
11. Broers AE, van Der Holt R, Van Esser JW, et al: Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 95:2240-2245, 2000
12. Buckley RH, Schiff SE, Schiff RL, et al: Hematopoietic stem-

- cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 340:508-516, 1999
13. Cavazzana-Calvo M, Bordignon P, Michel G, et al: A phase II trial of partially incompatible bone marrow transplantation for high-risk acute lymphoblastic leukaemia in children: prevention of graft rejection with anti-LFA-1 and anti-CD2 antibodies. *Br J Haematol* 93:131-138, 1996
 14. Cavazzana-Calvo M, Fromont C, Le Deist F, et al: Specific elimination of alloreactive T cells by an anti-interleukin-2 receptor β chain-specific immunotoxin. *Transplant* 50:1-7, 1990
 15. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Schindler J, et al: Donor T lymphocytes infusion following ex vivo depletion of donor anti-host reactivity by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin. *Blood* 96:477a, 2001 (suppl 1, abstr 2052)
 16. Cavazzana-Calvo M, Stephan JL, Sarnacki S, et al: Attenuation of graft-versus-host disease and graft rejection by ex vivo immunotoxin elimination of alloreactive T cells in an H-2 haplotype disparate mouse combination. *Blood* 83:288-298, 1994
 17. Chambers CA, Allison JP: Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol* 11:203-210, 1999
 18. Cohen JL, Boyer O, Klatzmann D: Suicide gene therapy of graft-versus-host disease: Immune reconstitution with transplanted mature T-cells. *Blood* 98:2071-2076, 2001
 19. Cohen JL, Boyer O, Salomon B, et al: Prevention of graft-versus-host disease in mice using a suicide gene expressed in T lymphocytes. *Blood* 89:4636-4645, 1997
 20. Cohen JL, Lacroix-Desmazes S, Charlotte F, et al: Immunological defects after suicide gene therapy of experimental graft-versus-host disease. *Hum Gene Ther* 10:2701-2707, 1999
 21. Cohen JL, Saron MF, Boyer O, et al: Preservation of graft-versus-infection effects after suicide gene therapy for prevention of graft-versus-host disease. *Hum Gene Ther* 11:2473-2481, 2000
 22. Comoli P, Locatelli F, Moretta A, et al: Human alloantigen-specific anergic cells induced by a combination of CTLA-1g and CsA maintain anti-leukemia and anti-viral cytotoxic responses. *Bone Marrow Transplant* 27:1263-1273, 2001
 23. Comoli P, Montagna D, Moretta A, et al: Alloantigen-induced human lymphocytes rendered nonresponsive by a combination of anti-CD80 monoclonal antibodies and cyclosporin-A mixed lymphocyte reaction in vitro. *J Immunol* 155:5506-5511, 1995
 24. Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC: The expanding B7 superfamily: Increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2:203-209, 2001
 25. Datta AR, Barrett AJ, Jiang YZ, et al: Distinct T cell populations distinguish chronic myeloid leukaemia cells from lymphocytes in the same individual: A model for separating GVHD from GVL reactions. *Bone Marrow Transplant* 14:517-524, 1994
 26. Ding L, Green JM, Thompson CB, et al: B7/CD28-dependent and -independent induction of CD40 ligand expression. *J Immunol* 155:5124-5132, 1995
 27. Drobyski WR, Morse HC III, Burns WH, et al: Protection from lethal murine graft-versus-host disease without compromise of alloengraftment using transgenic donor T cells expressing a thymidine kinase suicide gene. *Blood* 97:2506-2513, 2001
 28. Durie FH, Aruffo A, Ledbetter J, et al: Antibody to the ligand of CD40, gp39, blocks the occurrence of the acute and chronic forms of graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 94:1333-1338, 1994
 29. Engert A, Diehl V, Schnell R, et al: A phase-I study of an anti-CD25 ricin A-chain immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in patients with refractory Hodgkin's lymphoma. *Blood* 89:403-410, 1997
 30. Engert A, Martin G, Amlot P, et al: Immunotoxins constructed with anti-CD25 monoclonal antibodies and deglycosylated ricin A-chain have potent anti-tumour effects against human Hodgkin cells in vitro and solid Hodgkin tumours in mice. *Int J Cancer* 94:450-456, 1991
 31. Falkenburg JH, Smit WM, Willemze R: Cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response against acute or chronic myeloid leukemia. *Immunol Rev* 157:223-230, 1997
 32. Fehse B, Frerk O, Goldmann M, et al: Efficient depletion of alloreactive donor T lymphocytes based on expression of two activation-induced antigens (CD25 and CD69). *Br J Haematol* 109:644-651, 2000
 33. Fischer A, Landais P, Friedrich W, et al: Bone marrow transplantation (BMT) in Europe for primary immunodeficiencies other than severe combined immunodeficiency: A report from the European Group for BMT and the European Group for Immunodeficiency. *Blood* 83:1149-1154, 1994
 34. Garderet L, Snell V, Przepiorka D, et al: Effective depletion of alloreactive lymphocytes from peripheral blood mononuclear cell preparations. *Transplantation* 67:124-130, 1999
 35. Garin MI, Garrett E, Tiberghien P, et al: Molecular mechanism for ganciclovir resistance in human T lymphocytes transduced with retroviral vectors carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Blood* 97:122-129, 2001
 36. Goulmy E: Human minor histocompatibility antigens: New concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol Rev* 157:125-140, 1997
 37. Gribben JG, Guinan EC, Vassiliki A, et al: Complete blockade of B7 family-mediated costimulation is necessary to induce human alloantigen-specific anergy: A method to ameliorate graft-versus-host disease and extend the donor pool. *Blood* 87:4887-4893, 1996
 38. Groux H, Bigler M, E de Vries JE, et al: Interleukin-10 induced a long-term antigen-specific anergic state in human CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 184:19-29, 1996
 39. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al: A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742, 1997
 40. Guinan EC, Vassiliki MD, Boussiotis A, et al: Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts. *N Engl J Med* 340:1704-1714, 1999
 41. Haddad E, Landais P, Friedrich W, et al: Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: A European retrospective study of 116 patients. *Blood* 91:3646-3653, 1998
 42. Hansen JA, Gooley TA, Martin PJ, et al: Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 338:962-968, 1998
 43. Hansen JA, Petersdorf E, Martin PJ, et al: Hematopoietic stem cell transplants from unrelated donors. *Immunol Rev* 157:141-151, 1997
 44. Helene M, Lake-Bullock V, Bryson JS, et al: Inhibition of graft-versus-host disease. Use of a T cell-controlled suicide gene. *J Immunol* 158:5079-5082, 1997
 45. Henslee-Downey PJ, Abhyankar SH, Parrish RS, et al: Use of partially mismatched related donors extends access to allogeneic marrow transplant. *Blood* 89:3864-3872, 1997
 46. Howard DS, Philippe GL II, Reece DE, et al: Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 29:1494-1501, 1999
 47. Jabado N, Le Deist F, Cant A, et al: Bone marrow transplantation from genetically HLA-nonidentical donors in children

- with fatal inherited disorders excluding severe combined immunodeficiencies: Use of two monoclonal antibodies to prevent graft rejection. *Pediatrics* 98:420-428, 1996
48. Joss A, Akdis M, Faith A, et al: IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol* 30:1683-1690, 2000
 49. Kernan NA, Bartsch G, Ash RC, et al: Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program. *N Engl J Med* 328:593-602, 1993
 50. Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN, et al: CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8789-8794, 1997
 51. Koh MBC, Prentice HG, Lowdell MW: Selective removal of alloreactive cells from haematopoietic stem cell grafts: Graft engineering for GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transplant* 23:1071-1079, 1999
 52. Ladiges WC, Pesando JM, Severs E, et al: Selective inhibition of the canine mixed lymphocyte response by HLA-DR and DP-reactive monoclonal antibodies. *Transplantation* 45:484-488, 1988
 53. Lapidot T, Lubin I, Terenzi A, et al: Enhancement of bone marrow allografts from nude mice into mismatched recipients by T cells void of graft versus host activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4595-4599, 1990
 54. Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, et al: Long term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 381:434-438, 1996
 55. Lombardi G, Sidhu S, Batchelor R, et al: Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science* 264:1587-1589, 1994
 56. Mackall CL, Fleischer TA, Brown MR, et al: Age, thymopoiesis and CD4⁺ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med* 332:143-149, 1995
 57. Madrigal JA, Scott I, Arguello R, et al: Factors influencing the outcome of bone marrow transplants using unrelated donors. *Immunol Rev* 157:153-166, 1997
 58. Maltezos HC, Kafetzis DA, Abisaid D, et al: Viral infections in children undergoing hematopoietic stem cell Transplantation. *Pediatr Infect Dis J* 19:307-312, 2000
 59. Maryanski JL, Cerottini JC, Brunner KT: Susceptibility of proliferating cytolytic T lymphocytes to 33258 Hoechst-modified BUdR and light treatment: quantitation of the residual precursor cells by limiting dilution analysis. *J Immunol* 124:839-845, 1980
 60. Mavroudis DA, Dermime S, Molldrem J, et al: Specific depletion of alloreactive T cells in HLA-identical siblings: A method for separating graft-versus-host and graft-versus-leukaemia reactions. *Br J Haematol* 101:565-570, 1998
 61. Mavroudis DA, Jiang YZ, Hensel N, et al: Specific depletion of alloreactivity against haplotype mismatched related individuals by a recombinant immunotoxin: A new approach to graft-versus-host disease prophylaxis in haploidentical bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 17:793-799, 1996
 62. Montagna D, Yvon E, Calcaterra V, et al: Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin does not impair in vitro antileukemia and antiviral activity. *Blood* 93:3550-3557, 1999
 63. Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, et al: A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6550-6554, 1992
 64. Ranheim EA, Kipps TJ: Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med* 177:925-935, 1993
 65. Reisner Y, Martelli MF: Bone marrow transplantation across HLA barriers by increasing the number of transplanted cells. *Immunol Today* 16:437-440, 1995
 66. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, et al: Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 345:9-13, 1995
 67. Schwartz RH: It takes more than two to tango. *Nature* 409:31-32, 2001
 68. Sherman LA, Chattopadhyay S: The molecular basis of alloreognition. *Ann Rev Immunol* 11:385-402, 1993
 69. Storb R, Deeg HJ, Appelbaum FR, et al: Failure of anti-la monoclonal antibody to abrogate transfusion-induced sensitization and prevent marrow graft rejection in DLA-identical canine littermates. *Transplantation* 45:505-506, 1988
 70. Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, et al: Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: New answers to an old question. *J Immunol* 166:973-981, 2001
 71. Tiberghien P, Ferrand C, Lioure B, et al: Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood* 97:63-72, 2001
 72. Tokuda N, Gondo H, Mayumi H, et al: Drug-induced in vitro tolerance to allogeneic antigens. I. Establishment of a tolerance induction system in a fully allogeneic murine combination. *Transplantation* 42:281-287, 1986
 73. Tokuda N, Mayumi H, Himeno K, et al: Drug-induced in vitro tolerance to allogeneic antigens: II. Further analysis of in vitro-tolerized spleen cells in a fully allogeneic murine combination. *Transplantation* 45:464-470, 1988
 74. Van Gool SW, Ceuppens JL, Walter H, et al: Synergy between cyclosporin A and a monoclonal antibody to B7 in blocking alloantigen-induced T-cell activation. *Blood* 83:176-183, 1994
 75. Van Gool SW, de Boer M, Ceuppens JL: The combination of anti-B7 monoclonal antibody and cyclosporin A induces alloantigen-specific anergy during a primary mixed lymphocyte reaction. *J Exp Med* 179:715-720, 1994
 76. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, et al: Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 333:1038-1044, 1995
 77. Warrens AN, Lombardi G, Lechler RI: MHC and alloreactivity. *Transplant Immunol* 2:103-107, 1994
 78. Williamson EC, Millar MR, Steward CG, et al: Infections in adults undergoing unrelated donor bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 104:560-568, 1999
 79. Zeller JC, Panoskaltsis-Mortari A, Murphy WJ, et al: Induction of CD4⁺ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF- β . *J Immunol* 163:3684-3691, 1999
 80. Zoschke DC, Bach FH: Specificity of allogeneic cell recognition by human lymphocytes in vitro. *Science* 172:1350-1352, 1971

III- SIMPLIFICATION DU PROTOCOLE DE GREFFE DANS LE CAS PARTICULIER DU SYNDROME DE DIGEORGE

ARTICLE 5 :

T cell immune constitution after peripheral blood mononuclear cell transplantation in complete DiGeorge syndrome.

Bensooussan D., Le Deist F., Latger-Cannard V., Grégoire MJ., Avinens O., Feugier P., Bourdon V., André-Botté C., Schmitt C., Jonveaux P., Eliaou JF., Stoltz JF., Bordigoni P.

British Journal of Haematology, 2002, 117: 899-906

ARTICLE 6 :

PBMC transplantation in complete DiGeorge syndrome: an eight year update.

Daguindau N., Decot V., Picard C., Latger-Cannard V., Grégoire MJ., Nzietchueng R., Salmon A., Stoltz JF., Bordigoni P., Bensooussan D.

Soumis

Dans ce chapitre, nous allons rapporter l'expérience d'une greffe de cellules allogéniques sans conditionnement préalable du patient. Cette greffe a été réalisée dans le contexte particulier d'un cDGS où il a été montré par plusieurs équipes que lors de greffes de CSH réalisées sans conditionnement, seule la population lymphocytaire T était d'origine donneur, les autres populations cellulaires restant receveur. Le fait de s'affranchir du conditionnement, et des effets secondaires qu'il engendre, est possible dans le cadre de ce déficit immunitaire avec absence totale de lymphocytes T.

CAS CLINIQUE

Le diagnostic de cDGS avait été posé chez cet enfant à l'âge de 2 mois devant une hyperparathyroïdie sévère, une dysmorphie faciale, un eczéma sévère, l'absence de thymus mais en l'absence de malformations du tronc cardiaque. Le nombre de lymphocytes T circulants était très faible. L'étude fonctionnelle de ces lymphocytes T réalisée à l'UTCT a montré une très faible réponse proliférative aux mitogènes. La recherche de nouveaux émigrants thymiques n'avait pas été réalisée à ce moment là mais elle a été réalisée après allogreffe et aucun TREC n'a été retrouvé. Ce résultat confirme à posteriori le caractère complet du DGS. L'analyse cytogénétique a permis de détecter une délétion 22q11 homozygote.

De nombreuses infections, l'absence de réponse à toute vaccination, l'apparition d'une thyroïdite auto-immune et la spectaculaire cassure de la courbe de croissance ont conduit à envisager une allogreffe chez cet enfant. Nous avons proposé pour cet enfant une injection de cellules mononucléées à partir d'un donneur génoidentique. Etant donné le jeune âge du donneur (10 mois), nous avons collecté les cellules mononucléées en 4 fois et les avons cryopréservées à l'UTCT jusqu'au jour de la greffe.

Le patient n'a reçu aucun conditionnement pour cette injection. Le jour de la greffe, le greffon a été décongelé renfermant $24 \cdot 10^6$ cellules mononucléées par kg de poids du receveur, $10.2 \cdot 10^6$ CD3/kg, $8.9 \cdot 10^6$ CD19/kg, $1.7 \cdot 10^6$ CD3-CD16+CD56+/kg et très peu de CD34+ : $0.073 \cdot 10^6$ /kg. La prophylaxie de la GVHD a consisté en Ciclosporine A (12.5 mg/kg/j de J-1 à J35) et Mycophenolate mofetil (30 mg/kg/j de J0 à J28).

Le patient a reçu des Immunoglobulines IV pendant les 6 premiers mois post-greffe.

EVOLUTION POST-GREFFE

L'évolution clinique post-greffe a été extrêmement favorable avec survenue d'une GVHD de grade I spontanément résolutive, disparition des infections et de l'eczéma, récupération d'une fonction thyroïdienne normale et ascension spectaculaire des courbes de taille et de poids.

Comme décrit précédemment, un chimérisme mixte a été observé avec une prise partielle sur les lymphocytes T (45 à 55%) et un chimérisme 100% receveur sur les lymphocytes B et les polynucléaires. La séparation des sous population pour la réalisation de cette étude a été faite par nos soins à l'UTCT.

Nous avons pu étudier au laboratoire la récupération des fonctions cellulaires avec apparition de réponses prolifératives aux mitogènes et à l'anatoxine tétanique après vaccination. De même, la production d'anticorps spécifiques après vaccination a pu être montrée.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'étude des TRECs a été réalisée mais aucun TRECs n'a été détecté. L'étude du répertoire T a été effectuée par le Dr Le Deist à Necker et a montré un répertoire diversifié sur les CD4, très proche du répertoire du donneur et un répertoire plus restreint sur les CD8+.

Nous avons suggéré que les lymphocytes T contenus dans le greffon avaient subi une expansion périphérique chez le receveur et avaient permis une récupération des fonctions immunitaires contribuant à la résolution des infections, de l'eczéma et à la disparition de la

thyroïdite autoimmune. Nous avons également souligné les problèmes éventuels pouvant survenir en l'absence de thymopoïèse : un épuisement du greffon, une restriction du répertoire T, l'apparition de manifestations autoimmunes.

Devant de tels risques, le patient a été suivi régulièrement cliniquement et biologiquement. Nous avons étudié le chimérisme sur sous-populations séparées ainsi que les fonctions immunitaires tous les ans.

Nous sommes maintenant à 8 ans de l'allogreffe et rapportons dans l'article 6 l'état clinique et immunitaire du patient. Cliniquement, l'enfant se porte bien en l'absence d'infections. Le problème persistant est une hypocalcémie majeure liée à une non observance du traitement médicamenteux. Le chimérisme mixte reste stable et l'étude immunologique révèle des fonctions similaires à celles rapportées 2 ans après la greffe. Les seuls changements observés sont l'apparition d'une inversion du rapport CD4/CD8 et l'apparition d'une restriction importante du répertoire T CD8+. Le répertoire T CD4+ reste diversifié et similaire à celui de la donneuse. Aucune manifestation autoimmune, ni aucun signe d'épuisement du greffon n'ont pu être observés. L'évolution clinique de ce patient est très rassurante, compte tenu des hypothèses envisagées précédemment et semble similaire à celle de la première patiente allogreffée sans conditionnement par Goldsobel *et al* il y a 24 ans.

T-cell immune constitution after peripheral blood mononuclear cell transplantation in complete DiGeorge syndrome

DANIELE BENSOUSSAN,^{1,2} FRANÇOISE LE DEIST,³ VÉRONIQUE LATGER-CANNARD,^{2,4} MARIE JOSÉ GRÉGOIRE,⁵ ODILE AVINENS,⁶ PIERRE FEUGIER,¹ VIOLAINE BOURDON,⁵ CHRISTINE ANDRÉ-BOTTÉ,¹ CLAUDINE SCHMITT,⁷ PHILIPPE JONVEAUX,⁵ JEAN FRANÇOIS ELIAOU,⁶ JEAN FRANÇOIS STOLTZ^{1,2} AND PIERRE BORDIGONI⁷ ¹Unité de Thérapie cellulaire et Tissus, Chu de Nancy, ²UMR CNRS 7563, Faculté de Médecine, Vandœuvre-lès-Nancy, ³Laboratoire d'Immunologie Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, ⁴Laboratoire d'Hématologie Biologique, and ⁵Laboratoire de Génétique, Chu de Nancy, ⁶Laboratoire d'Immunologie, Chu de Montpellier, and ⁷Unité de Transplantation Médullaire, Hôpital d'Enfants, Chu de Nancy, France

Received 22 October 2001; accepted for publication 12 December 2001

Summary. Complete DiGeorge syndrome (cDGS) is a congenital disorder characterized by typical facies, thymic aplasia, susceptibility to infections, hypoparathyroidism and conotruncal cardiac defect. Fetal thymus or post-natal thymus tissue transplantations and human leucocyte antigen (HLA)-genoidental bone marrow transplantations were followed in a few cases by immune reconstitution. More recently, a peripheral blood mononuclear cell transplantation (PBMCT) was performed with an HLA-genoidental donor and followed by a partial T-cell engraftment and immune reconstitution. We report a boy with cDGS, without cardiac defect, who suffered recurrent severe infections. At the age of 4 years, he underwent PBMCT from his HLA-genoidental sister. He received no conditioning regimen, but graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis was with oral cyclosporin A and mycophenolate mofetil.

Toxicity was mild, with grade I acute GVHD. The patient is currently 2.5 years post-PBMCT with excellent clinical performances. Mixed chimaerism can only be observed on the T-cell population (50% donor T cells). T-lymphocyte count fluctuated (CD3 more than $400 \times 10^6/l$ at d 84 and CD4 more than $200 \times 10^6/l$ at d 46). Exclusive memory phenotype T cells and absence of new thymic emigrants suggest expansion of infused T cells. T-cell mitogen and tetanus antigen responses normalized a few months after transplantation. After immunizations, specific antibodies were produced. PBMCT from an HLA identical sibling could be an efficient treatment of immune deficiency in cDGS.

Keywords: complete DiGeorge syndrome, transplantation, immune constitution, chimaerism, peripheral expansion.

Complete DiGeorge syndrome (cDGS) is a rare congenital disorder, resulting from faulty development of the third and fourth pharyngeal pouches. DGS is characterized by typical facies, thymic aplasia, increased susceptibility to a variety of infections, hypoparathyroidism and conotruncal cardiac defects (Barrett *et al.*, 1981). Previous studies have reported that many patients with DGS are hemizygous for 22q11 or, in rare instances, hemizygous for 10p13 (Driscoll *et al.*, 1993; Daw *et al.*, 1996). Deletion in the *UFD1L* gene at 22q11 has been described, but other genes located in the same region could be implicated (Yamagishi *et al.*, 1999).

It is known that patients with cDGS have a persistent immunodeficiency with low T-cell response to mitogens and no or very few detectable T cells ($< 400 \times 10^6$ CD4⁺ cells/l) in the peripheral blood (Bastian *et al.*, 1989; Müller *et al.*, 1989). In severe cases, the highly compromised T-cell compartment is accompanied by a relative increase of B lymphocytes (Müller *et al.*, 1989).

Several therapies have been used to treat immunodeficiency associated with DGS. The first one was the transplantation of fetal thymus and, in a few cases, it was followed by immune reconstitution (Cleveland *et al.*, 1968; August *et al.*, 1970; Mayumi *et al.*, 1989). One recent study showed that the transplantation of post-natal thymus tissue to five children with DGS succeeded in two cases (Market *et al.*, 1999). These two patients developed normal proliferative responses to mitogen within 3–8 months after transplantation. The TREC analysis (episomal circular DNA

Correspondence: Dr Danièle Bensoussan, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, Chu de Nancy, Allée du Morvan, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy. E-mail: d.bensoussan@chu-nancy.fr

excision products of T cell-receptor gene rearrangement) showed evidence of new thymopoiesis. In three patients, human leucocyte antigen (HLA)-genotypical bone marrow transplantation (BMT) successfully restored T-cell function by adoptive transfer of post-thymic T cells (Goldsabel *et al.* 1987; Borzy *et al.* 1989; Matsumoto *et al.* 1998). Bowers *et al.* (1998) postulated that only post-thymic lymphocytes, and not stem cells, were responsible for immune constitution after successful BMT. They performed peripheral blood mononuclear cell transplantation (PBMT) from an HLA-identical sibling which was followed by a partial T-cell engraftment and immune reconstitution.

In the present report, we describe the case of a young boy with complete DGS without cardiac defect who suffered recurrent and severe infections associated with an autoimmune thyroiditis and received PBMC from an HLA-identical sibling. Two and a half years after the PBMT, the child is in very good health with complete resolution of autoimmune thyroiditis. He presents a stable mixed chimaerism on T cells and a good immune reconstitution. PBMT was performed without any conditioning regimen and the follow-up of the patient was uneventful.

PATIENT AND METHODS

Patient

The boy, born at 37 weeks with a birth weight of 2.28 kg, was diagnosed with complete DiGeorge syndrome (DGS) at the age of 2 months. He presented severe hypoparathyroidism, dysmorphic facies, velopharyngeal insufficiency and severe eczema with hyper IgE, but no conotruncal cardiac malformation. Chest radiography and ultrasound tomography showed no thymic shadow. He was found to have a low number of circulating T cells and near absence of PBMC proliferative responses to mitogens. Cytogenetic study detected a hemizygous 22q11 deletion [fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with a VYSIS LSI/VCPS region dual colour probe, locus TUPLE 1].

The child's first 4 years were complicated by recurrent infections including septicaemias (*Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*), pneumonias (*Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*) and sinusitis. Despite the vaccination schedule, he never immunized. At the age of 4 years, he developed a cytomegalovirus (CMV) enteritis successfully treated with gancyclovir, but CMV antibodies remained negative. Moreover, at the age of 3 years he presented an autoimmune thyroiditis. These complications were associated with severe growth failure (height: -5 SD, weight: -3.5 SD).

PBMC transplantation

Because of the young donor age (10 months), unmobilized peripheral blood was collected four times from the HLA-genotypical boy's healthy sister (after the parents' informed consent). PBMC were separated from each collection on a density gradient (Lymphoprep, Life Technology, Cergy Pontoise, France), washed twice in human serum albumin 4% (HSA, LFB, Les Ulis, France) and cryopreserved using a rate controlled freezer (Kryo 10-16 planer, Flobio,

France). The patient did not receive any conditioning regimen and was transplanted on 3 March 1999 with thawed PBMC: 24×10^6 mononucleated cells/kg containing 10.2×10^6 CD3/kg, 8.9×10^6 CD19/kg and 1.7×10^6 CD3⁺CD16⁺CD56⁺/kg, and very few CD34⁺ cells: 0.073×10^6 /kg. As graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis, the patient received cyclosporin A (12.5 mg/kg/d from d -1 to d 35) and mycophenolate mofetil (30 mg/kg/d from d 0 to d 28) (Yu *et al.* 1998). The patient received immunoglobulins (Endobulines, LFB), 600 mg/kg/month for 6 months after PBMT.

Chimaerism study

Cell subset purification. Peripheral blood circulating cells were separated on a density gradient. Monocytes and T-lymphocytes were immunomagnetically isolated by CD14 and Pan T microbeads, respectively, with a magnetic activated cell sorter (MACS) device (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, USA). Briefly, PBMC were first incubated with a microbead-conjugated monoclonal anti-CD14 antibody. The positive fraction was kept for chimaerism analysis and the negative fraction was incubated with a microbead-conjugated monoclonal antibody cocktail contained in the Pan-T isolation kit (CD11b, CD16, CD19, CD36 and CD56) (Miltenyi Biotec). The negative fraction was enriched in T cells and the positive fraction essentially contained B and natural killer (NK) cells. More than 90% purity was achieved for both CD14 and CD3 cells.

FISH analysis. Because of the sex difference between donor and recipient, purified fractions could be analysed by FISH with alpha-satellite centromeric chromosome X and Y probes (Vysis, USA). FISH was also performed with LSI/VCPS region dual-colour probe, locus TUPLE 1 (Vysis).

Polymorphism analysis. We used a semiquantitative polymerase chain reaction (PCR)-based assay with polymorphic short tandem repeat (STR) markers. The FISHER Genomic F-G 50 kit (Fisher Scientific, Elancourt, France) was used for DNA extraction. The FGA tetranucleotide STR locus (labelled with HEX) was found to be informative in distinguishing donor and recipient DNA. The ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer, Foster City, USA) provided separation and sensitive quantification of PCR products amplified with fluorescent primer set. The AB GENESCAN 672 TM software was used to calculate the peak areas from the fluorescent signals, determining a quantitative measurement of the degree of mixed chimaerism for this informative locus.

Flow cytometry

Lymphocyte phenotyping was performed on EDTA whole blood samples, with a FACSCALIBUR flow cytometer (Beckton Dickinson, San Jose, USA), by direct immunofluorescence using the following specific conjugated monoclonal antibodies: anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD45RO, -CD45RA, -CD16, -CD56, -CD19, -TCR $\alpha\beta$, -TCR $\gamma\delta$ (Becton Dickinson) and anti-CD103 (HML1, Immunotech, Marseille, France). Additional monoclonal antibodies were used to characterize the T-cell receptor V β repertoire (Immunotech). Indirect immunofluorescence was used for all the V β analysis except

for V β 2, V β 3, V β 8, V β 13–6 and V β 17 which were determined by direct immunofluorescence.

Mitogen- and antigen-induced proliferation

Proliferation assays in response to phytohaemagglutinin (PHA), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-ionomycin, pokeweed mitogen (PWM) and tetanus toxoid antigen were performed as previously described (Bordigoni *et al.* 1982).

NK-cell functional analysis

NK activity was measured in triplicates using a standard chromium release assay against K562 cells, as previously described (Le Deist *et al.* 1987).

Vaccination and antibody determination

The patient was immunized at 7, 8 and 9 months after PBMCT with a series of three tetanus and diphtheria toxoids, poliovirus and *haemophilus influenzae* type B conjugate vaccine (Hib) and a series of two (7 and 8 months after PBMCT) 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccines (Pvax). Specific antibodies were detected by enzyme-linked immunosorbent assay tests.

TRECS

On d 477, peripheral CD4 and CD8 T-lymphocytes were preliminarily isolated with Dynabeads (Dyna, Compiègne, France). DNA was extracted on CD4 and CD8 T-cell fractions according to Qiagen Protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France). DNA concentration was determined using a fluorometer. Primer sequences are located on either side of the recombination joints. Defined numbers of internal standard molecules were added to each PCR reaction (Douek *et al.* 1998). PCR products were separated by electrophoresis on polyacrylamide gels with an automated 373 DNA sequencer. Data interpretation was performed by GENESCAN analysis.

RESULTS

Clinical outcome

The patient's clinical course after transplantation was uneventful. Toxicity was mild with transient grade I acute GVHD at d 45 post PBMCT; this did not require treatment. The patient was discharged on d 58. There has been no chronic GVHD. Post transplantation, there was complete resolution of chronic pulmonary infection and eczema. Normal thyroid function was regained associated with a complete disappearance of anti-thyroglobulin antibodies. Interestingly, there was a dramatic decrease in IgE (from 15 times normal pretransplant to four times normal post procedure). There was only one infection post transplant (+15 months); central venous catheter-related coagulase negative *staphylococcus* septicaemia.

There was substantial weight and height gain with normalization of his weight, although his height remains -2 SD below the normal for age (vs -4 SD before PBMCT) (Fig 1). He continues to require calcium and 1 α -calcitriol supplementation. The patient is currently very well 2.5 years after transplantation.

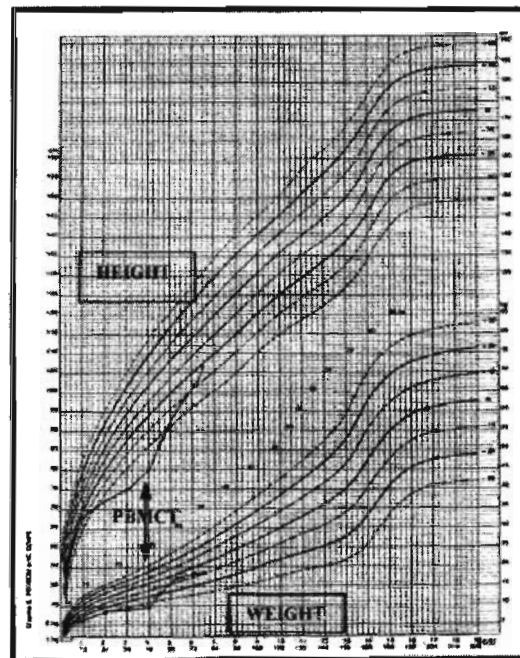


Fig 1. Weight and height gain after PBMCT. The patient's height increased radically from 80 cm (to -5 SD) before PBMCT (the patient was 4 years old) to 106 cm (-2 SD) 2 years after PBMCT. His weight also progressed from 9.5 kg (to -3.5 SD) before PBMCT to 18.5 kg (nearly the normal mean weight) 2 years after PBMCT.

Engraftment and haematological reconstitution

No conditioning regimen was administered and there was no secondary aplasia. Partial engraftment was detected on d 14 after transplantation with 10% XX donor cells (data not shown). A mixed chimaerism was observed only on T-cell subset, fluctuating around 50% XX donor T cells (from $415 \times 10^6/\text{L}$ CD3⁺ T cells including $145 \times 10^6/\text{L}$ XX donor CD3⁺ T cells on d 98, to $311 \times 10^6/\text{L}$ CD3⁺ T cells including $217 \times 10^6/\text{L}$ XX donor CD3⁺ T cells on d 890) (Fig 2). The

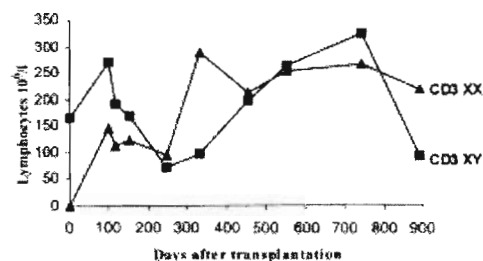


Fig 2. Chimaera study on CD3⁺ cells. Evolution of CD3⁺ T cells from recipient origin (CD3 XY) and donor origin (CD3 XX) from the day of PBMCT to d 890. Results are expressed as absolute values.

monocyte fraction and B and NK cell fraction were exclusively of recipient origin (with a mean of $99.1 \pm 3.4\%$ and $97.6 \pm 2.1\%$ XY recipient cells respectively).

Immunological reconstitution

Lymphocyte subsets. Before PBMT, the patient had few $CD3^+$ T cells ($166 \times 10^6/l$), including $120 \times 10^6/l$ TCR $\alpha\beta$ T cells and $45 \times 10^6/l$ TCR $\gamma\delta$ T cells. $CD4^+$ cells and $CD8^+$ cells were equally represented, $CD4^+$ cell phenotype was mainly $CD45 RO^+$ ($98 \times 10^6/l$) whereas $CD4^+CD45RA^+$ cells remained below $8 \times 10^6/l$.

After PBMT, T-lymphocyte count increased regularly during the first 3 months ($CD3 > 400 \times 10^6/l$ and $CD8 > 100 \times 10^6/l$ on d 84 and $CD4 > 200 \times 10^6/l$ on d 46) (Fig 3A). The T-cell count fluctuated around

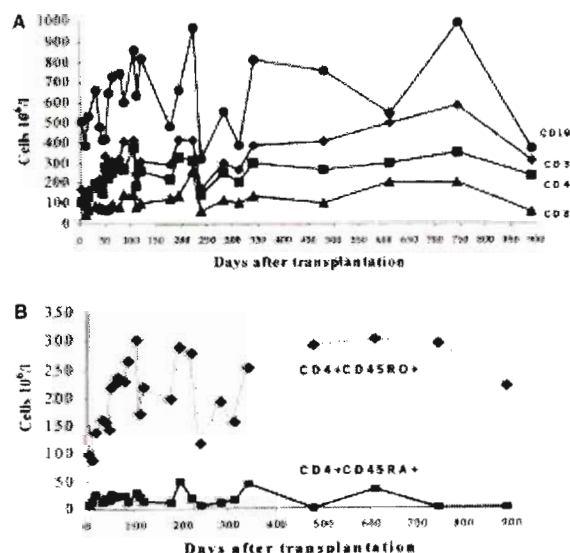


Fig 3. Immunological reconstitution after PBMT. (A) Phenotypic analysis of $CD19^+$, $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD8^+$ lymphocyte subsets of the patient after PBMT. (B) Time course of the reconstitution of $CD4^+CD45RO^+$ and $CD4^+CD45RA^+$ subsets after PBMT. Results are expressed as absolute values.

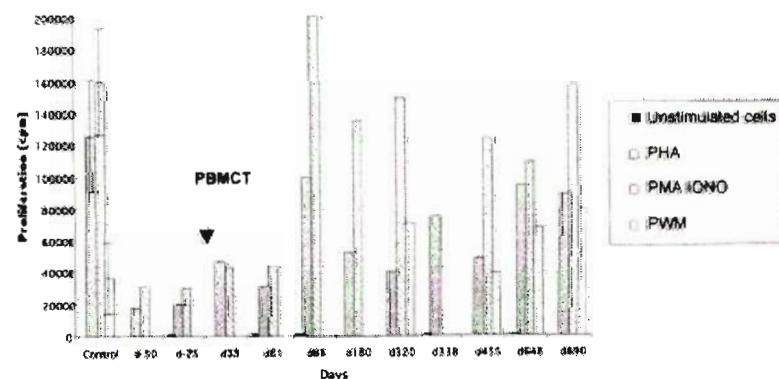


Fig 4. Proliferative responses to mitogens. Proliferative response evaluated through $H3$ -thymidine incorporation after mitogen stimulation of PBMC from the patient. Control proliferations from each test are expressed in mean $\pm$ SD.

$300 \times 10^6/l$ during the first year post PBMT ($385 \times 10^6/l$ on d 340) including $311 \times 10^6/l$ TCR $\alpha\beta^+$ T cells and $31 \times 10^6/l$ TCR $\gamma\delta^+$ T cells. $CD4^+$ cell phenotype was mainly $CD45 RO^+$ ($CD4^+CD45RO^+ > 200 \times 10^6/l$ on d 46). $CD4^+CD45RA^+$ cells still remained very low (always $< 50 \times 10^6/l$) (Fig 3B). Two and a half years after PBMT, similar T-lymphocyte proportions were still found: $311 \times 10^6/l$ $CD3^+$ cells including $286 \times 10^6/l$ TCR $\alpha\beta^+$ T cells and $33 \times 10^6/l$ TCR $\gamma\delta^+$ T cells. $CD8^+$ T cells were mainly TCR $\alpha\beta^+$ and $CD8\alpha\beta^+$ ($147 \times 10^6/l$). Moreover, CD103 antigen, which is specific to human mucosal lymphocytes, was weakly expressed on $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells (2%), on d 740. $CD8^+CD45RO^+$ and $CD8^+CD45RA^+$ populations have been analysed since d 477 and were initially equally represented ($73.5 \times 10^6/l$ and $61.2 \times 10^6/l$ respectively), but on d 890 there were mainly $CD8^+CD45RO^+$ ($16.8 \times 10^6/l$ compared with $8.4 \times 10^6/l$).

$CD19^+$ B cells fluctuated within the normal range after transplantation ($532 \times 10^6/l$ on d 15– $370 \times 10^6/l$ on d 890) (Fig 3A).

Mitogen- and antigen-induced proliferation. PHA and PMA-ionomycin-induced proliferations were increased on d 33 post transplantation compared with d -25 before transplantation (Fig 4). Those proliferative responses continued to increase and reached normal values at d 88 post transplantation (PHA: 100 000 c.p.m. and PMA-ionomycin: 219 000 c.p.m.). After tetanus vaccination, tetanus toxoid proliferation was studied *in vitro*. Proliferation was very marked on d 338 and continued to remain high on d 890 (115 000 and 96 462 c.p.m. respectively). Control proliferation was 15 000 c.p.m. A mixed chimaerism was observed with FISH on metaphases analysis after tetanus toxoid antigen stimulation: 48% XX donor-activated T cells without 22q11 deletion, and 52% XY recipient T cells with 22q11 deletion.

NK-cell activity. NK-cell activity was normal before transplantation with or without interleukin 2 (IL-2) activation, showing functional NK cells. Similar results were obtained on d 42 after transplantation (data not shown).

Antibody responses after vaccination. Before transplantation, the patient presented very low immune responses to vaccinations (Table I). After transplantation, the patient had very good and sustained antibody responses to

Table 1. Specific antibody production.

Months before and after PBMCT	-5	5	7	12	13	15	Normal values
Pneumococcus*† (µg/ml)	< 0.3	0.7	1.1	0.3	4.3	0.7	> 0.3
Hib†§ (%)	27	68	67	96	ND	99	> 30
Tetanus toxoid (IU/ml)§	0.01	0.5	0.8	> 5	> 5	0.8	> 0.1
Diphtheria toxoid (µg/ml)§	0.03	1.5	0.9	> 5	> 5	0.9	> 0.1
Poliovirus (10 ⁻¹)§¶							
1	-	-	12	> 512	> 512	384	> 40
2	-	-	-	26	16	50	> 40
3	-	16	22	> 512	> 512	355	> 40

*Antibody to *Streptococcus pneumoniae* (23 serotypes).

†Immunization at 7 and 8 months post PBMCT.

‡Anti-*Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide.

§Immunization at 7, 8 and 9 months after PBMCT.

¶Poliovirus expressed as the reciprocal of the serum dilution.

Immunoglobulin administration was performed for 6 months after PBMCT.

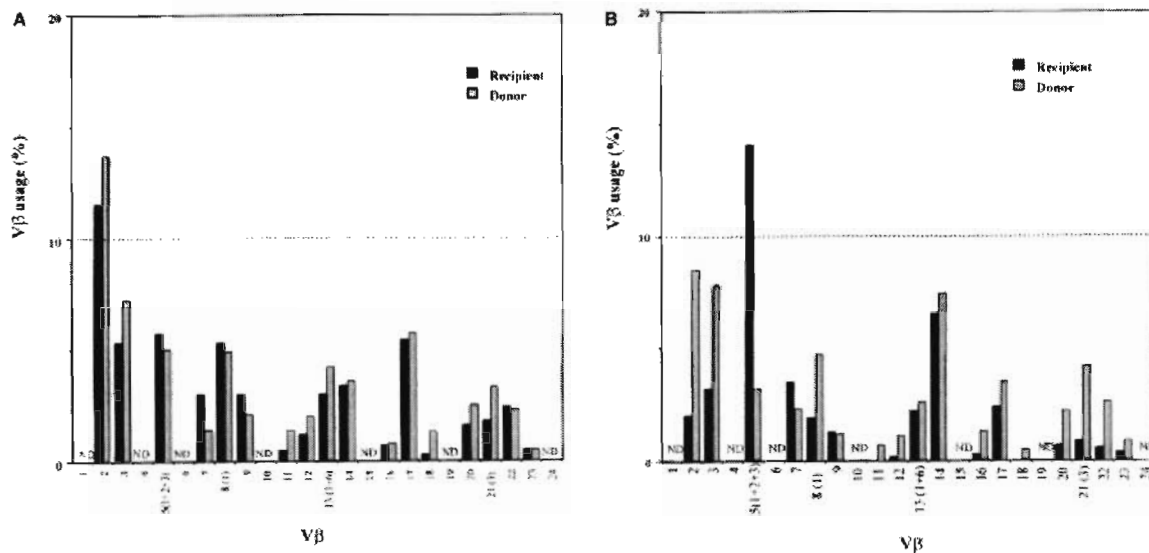


Fig. 5. TCR V β repertoire profile on recipient and donor CD4⁺ and CD8⁺ T cells 2 years after PBMCT. Comparative analysis between donor and recipient of TCR V β repertoire on CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T-cells. Results are expressed as percentage of V β expression. ND means that the V β expression was not studied.

immunization with poliovirus, tetanus toxoid, pneumococcal polysaccharides and haemophilus influenzae.

T-cell repertoire. CD4⁺ and CD8⁺ recipient T-cell repertoire studies performed 2 years after PBMCT are represented in Fig 5A and B. A normal surface expression on CD4⁺ T cells of 17 V β families studied was observed. Moreover, a similar pattern could be detected on donor CD4⁺ T cells at the same time. The CD8⁺ T-cell repertoire was characterized by minor defects with no detection of four members among the 17 V β families tested (V β 5-2, V β 11, V β 18 and V β 13-6). Moreover, V β 5-1 was excessively expressed (14%, data not

shown). All these features were not found on donor CD8⁺ T cells.

TRECS. No TRECS were detected, suggesting that no thymic function could be detected.

DISCUSSION

The present paper reports a successful allogeneic unmobilized peripheral blood mononuclear cell transplantation (PBMCT) in a child with cDGS with 22q11 deletion (Müller *et al.* 1989; Yamagishi *et al.* 1999). Such an experience has

previously been reported by Bowers *et al* (1998), but with a short follow up (95 d post PBMCT) and a limited immunological study. In our patient, the immunodeficiency was characterized by recurrent severe infections associated with auto-immune thyroiditis and eczema (Scuccimarri & Rodd, 1998; Archer *et al*, 1990). Low CD3⁺ T-cell number ($< 200 \times 10^6/l$) and markedly decreased PHA-induced proliferation had been observed for the first 4 years of life. No conditioning regimen was administered and GVHD prophylaxis consisted of oral cyclosporin A and mycophenolate mofetil (Yu *et al*, 1998). After transplantation, he developed transient grade I GVHD. Immunodeficiency, eczema and autoimmune thyroiditis, as illustrated by the complete disappearance of anti-thyroglobulin antibodies and normal thyroid function, were all resolved. The patient has improved clinically, and gained in weight and height in the 2.5 years since transplantation.

The chimera study showed a mixed chimaerism on T cells. The other subsets were from recipient origin exclusively.

T-cell immune constitution could be identified very soon after PBMCT with a significant improvement of T-cell count in peripheral blood. Most of the T cells were of memory phenotype and presented $\alpha\beta^+$ TCR. TREC analysis did not show any new thymic emigrants but there was a wide T-cell repertoire on CD4⁺ cells and, to a lesser extent, on CD8⁺ cells. T-cell proliferation to different mitogens normalized 3 months post PBMCT. After tetanus vaccination, antigen proliferation to tetanus toxoid substantially increased. Moreover, NK-cell function remained constant and normal before and after transplantation.

Three mechanisms can be proposed to explain T-cell reconstitution. First, immature lymphoid progenitors of the graft are submitted to a thymic maturation. This hypothesis needs a thymic remnant that could be activated after interaction with infused T cells as previously suggested (Bowers *et al*, 1998; Collard *et al*, 1999). For our patient, we could not visualize the thymus on the pretransplantation ultrasound tomography; nevertheless, no surgery was performed to confirm the absence of thymus (Bastian *et al*, 1989). The CD34⁺ precursor cells level in the graft was very low. CD4⁺CD45RA⁺ cells did not increase after PBMCT. Those cells did not expand nor did they disappear; they survive within an independent 'niche' in the absence of thymus output, but are continuously substituted when there is a thymus export (Tanchot & Rocha, 1998; Tanchot *et al*, 2000). Finally, there were no new thymic emigrants, as shown by TREC analysis. Second, immature lymphoid progenitors of the graft are submitted to extra-thymic maturation. Extra-thymic maturation is not compatible with the wide V β repertoire on CD4⁺ cells and CD8⁺ cells to a lesser extent (Rocha *et al*, 1992). Moreover, we detected $< 35 \times 10^6/l$ TCR $\gamma\delta$ T cells. Lymphocytes do not exhibit extrathymic phenotype such as CD103 and the CD8⁺ T cells bear both CD8 α and β chains. TREC analysis was negative, as is usual in extrathymic maturation (Douek *et al*, 2000). Third, peripheral expansion of post-thymic mature T cells is responsible for immune constitution. Mature T cells, brought in by the graft, are not thymus dependent, thus

explaining the absence of TREC. Usually, in peripheral expansion, T cells display a memory phenotype, which correlates with the high level of CD4⁺CD45RO⁺ T cells in our patient and the low level of CD4⁺CD45RA⁺ naive T cells (Mackall *et al*, 1997). However, the V β repertoire in peripheral expansion is usually skewed. The TCR diversity of such expanded populations seems to be limited by the diversity of the starting inocula (Drayson *et al*, 1989). Moreover, as we have observed with the CD4⁺ T cells from our patient, it has recently been suggested that the donor's repertoire is maintained in the host environment, in the absence of the thymus (Pignata *et al*, 2001). Nevertheless, four V β families from the donor were not detected in the CD8 recipient repertoire which could be due to the expansion of the V β 5-1 family. Alternatively, another possibility could be an elimination of strong anti-host clones by other oligoclonal T cells (such as V β 5-1). However, no increase of CD57⁺, a marker of oligoclonal cytotoxic CD8⁺ T cells, within the effector T-cell population could be detected after PBMCT (data not shown) (Autran *et al*, 1991; Sze *et al*, 2001). Mitogen proliferation may be due to CD4⁺CD45RO⁺ T cells, as previously shown in severe combined immunodeficiency very soon after allogeneic stem cell transplantation, before CD4⁺CD45RA⁺ emergence (Patel *et al*, 2000). In contrast, other authors correlated mitogen proliferation to CD4⁺CD45RA⁺ cell emergence in similar conditions (Brugnani *et al*, 1998). Peripheral expansion of mature donor T cells seems to be the only hypothesis to explain immunological constitution in our patient. Nevertheless, we have observed a mild expansion of donor T cells at the same time as the presence of recipient T cells, representing nearly half of the mature T-cell pool. Competition between donor and recipient T-cell populations may be responsible for a partial inhibition on donor T-cell expansion, as previously described (Freitas & Rocha, 2000). Mitogen non-responsive, phenotypically mature T cells have already been detected in an infant with cDGS when he was 5 months old (Collard *et al*, 1999). The authors suggested that there was an oligoclonal expansion of a small number of T cells matured extrathymically, as no functional thymus remnant could be detected. In our patient, the recipient T cells can proliferate after mitogen or tetanus toxoid antigen stimulation, suggesting that a specific memory population could be produced before or after PBMCT. As this proliferation could only be observed after PBMCT, some co-operation (as an immune bystander effect) between donor and recipient T cells may have occurred (Freitas & Rocha, 2000). We were also impressed by the very prompt and marked responses to vaccinations, particularly against the tetanus toxoid antigen. Mature antigen-specific T cells must have been transferred from the recently immunized donor (Bowers *et al*, 1998). Interestingly, even if this has already been demonstrated for tetanus toxoid and Hib antigens, it has never been observed for pneumococcal antibodies (Molrine *et al*, 1996). Roux *et al* (2000) demonstrated that there is a good correlation between the extent of the antibody response and the high diversity of the T-cell repertoire. However, it has previously been shown that the recipient's antigenic milieu influences by skewing the repertoire

towards particular antigenic specificities (Gaschet *et al.* 1995). The antibody response in our patient is probably the evidence required to show that donor T cells are able to co-operate with recipient B cells.

Because of a peripheral T-cell expansion and the absence of thymopoiesis, we cannot rule out the possibility that this boy might develop the following problems in the future. First, a progressive T-cell exhaustion of the graft could occur, as a result of apoptosis. T cells present long telomeres throughout life and express telomerase, which protects the chromosomes against progressive deletion (Robertson *et al.* 2000). Nevertheless, after high-dose chemotherapy for adult breast cancer or BMT from an unrelated donor for combined immunodeficiency in children, an increased susceptibility of CD4⁺ cells to apoptosis after mitogen stimulation was observed (Hakim *et al.* 1997; Brugnani *et al.* 1999). This apoptosis seems to have a regulatory effect in response to the increased level of activation in the CD4 population. Nevertheless, it may also contribute to the genesis of immunodeficiency that follows BMT. The loss of part of a relevant T-cell repertoire could also be observed (Brugnani *et al.* 1999). This observation raises the problem of the evolution of the TCR repertoire of our patient. Will it still remain the same or will losses occur by apoptosis? We could hope that, as reported by Tanchot & Rocha (1998), after the elimination of antigen, decay of memory T cells would lead to initial rapid contraction of large clones and to the relatively prolonged survival of small clones, determining a memory T-cell repertoire comprising all the small T-cell clones brought by the graft. Second, exclusive peripheral expansion of the T cells without thymic selection could lead to autoimmunity. The emergence of certain autoimmune diseases after thymectomy, as well as the age-related increase in self-reactive lymphocytes, suggest that continuous thymic output ensures that self-reactive T cells are maintained at very low frequencies in the periphery (Sakaguchi & Sakaguchi, 1990; Tanchot & Rocha, 1997). In our patient, there was no thymic output preventing the emergence of recipient-reactive clones from donor origin in the peripheral pool. These recipient-reactive clones could be responsible for chronic GVHD. However, no sign of chronic GVHD has been found since the patient was PBMC transplanted. Moreover, the complete recovery of his autoimmune thyroiditis was also observed after PBMC.

In conclusion, these data indicate that PBMC transplantation from an HLA-identical sibling without conditioning is an efficient treatment of immune deficiency in complete DiGeorge syndrome. It is noteworthy that peripheral expansion of mature T cells is probably the mechanism for T-cell immune constitution. However, a longer follow-up period is required to exclude the gradual exhaustion of the T-lymphocyte graft or emergence of autoimmune disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Mrs B. Serrurier, A. Schaal and D. Binot Saintot for their excellent technical assistance. We would like to thank Doctor A. Eljaafari for discussion and criticism.

REFERENCES

- Archer, E., Chuang, T.Y. & Hong, R. (1990) Severe eczema in a patient with DiGeorge's syndrome. *Cutis*, **45**, 455–459.
- August, C.S., Berkel, A.L., Levey, R.H., Rosen, F.S. & Kay, H.E. (1970) Establishment of immunological competence in a child with congenital thymic aplasia by a graft of fetal thymus. *Lancet*, **1**, 1080–1083.
- Autran, B., Leblond, V., Sada-Sowti, B., Lefranc, E., Got, P., Sutton, L., Binet, J.L. & Debre, P. (1991) A soluble factor released by CD8+CD57+ lymphocytes from bone marrow transplanted patients inhibits cell-mediated cytotoxicity. *Blood*, **77**, 2237–2241.
- Barrett, D.J., Ammann, A.J., Wara, D.W., Cowan, M.J., Fisher, T.J. & Stiehm, E.R. (1981) Clinical and immunologic spectrum of the DiGeorge syndrome. *Journal of Clinical and Laboratory Immunology*, **6**, 1–6.
- Bastian, J., Law, S., Vogler, L., Lawton, A., Herrod, H., Anderson, S., Horowitz, S. & Hong, R. (1989) Prediction of persistent immunodeficiency in the DiGeorge anomaly. *Journal of Pediatrics*, **115**, 391–396.
- Bordignon, P., Faure, G., Bene, M.C., Dardenne, M., Bach, J.F., Duheille, J. & Olive, D. (1982) Improvement of cellular immunity and IgA production in immunodeficient children after treatment with synthetic serum thymic factor (PTS). *Lancet*, **7**, 293–297.
- Borzy, M., Ridgway, D., Noya, F. & Shearer, W. (1989) Successful bone marrow transplantation with split lymphoid chimerism in DiGeorge Syndrome. *Journal of Clinical Immunology*, **9**, 386–392.
- Bowers, D., Lederman, H., Sicherer, S., Wilkstein, J. & Chen, A. (1998) Immune constitution of complete DiGeorge anomaly by transplantation of unmobilized blood mononuclear cells. *Lancet*, **352**, 1983–84.
- Brugnani, D., Airo, P., Malagoli, A., Cattaneo, R., Pennacchio, M. & Porta, F. (1998) Rapid regeneration of normally functional naive CD4⁺ T cells after bone marrow transplantation from unrelated donors for combined immunodeficiency. *Blood*, **92**, 3484–3486.
- Brugnani, D., Airo, P., Pennacchio, M., Carella, G., Malagoli, A., Ugazio, A.G., Porta, F. & Cattaneo, R. (1999) Immune reconstitution after bone marrow transplantation for combined immunodeficiencies. Down-modulation of Bcl-2 and high expression of CD95-Fas account for increased susceptibility to spontaneous and activation-induced lymphocyte cell death. *Bone Marrow Transplantation*, **23**, 451–457.
- Cleveland, W.W., Fogel, B.I., Brown, W.T. & Kay, H.E. (1968) Fetal thymic transplant in a case of DiGeorge's syndrome. *Lancet*, **2**, 1211–1214.
- Collard, H.R., Boeck, A., McLaughlin, T.M., Watson, T.J., Schiff, S.E., Hale, L.P. & Market, M.L. (1999) Possible extrathymic development of nonfunctional T cells in a patient with Complete DiGeorge Syndrome. *Clinical Immunology*, **91**, 156–162.
- Daw, S.C., Taylor, C., Kraman, M., Call, K., Mao, J., Schuffenhauer, S., Meitinger, T., Lipson, T., Goodship, J. & Scambler, P. (1996) A common region of 10p deleted in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Nature Genetics*, **13**, 458–460.
- Douek, D.C., McFarland, R.D., Keiser, P.H., Gage, E.A., Massey, J.M., Haynes, B.F., Polis, M.A., Hare, A.T., Feinberg, M.B., Sullivan, J.L., Jamieson, B.D., Zack, J.A., Picker, L.J. & Koup, R.A. (1998) Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, **396**, 690–694.
- Douek, D.C., Vescio, R.A., Betts, M.R., Brenchley, J.M., Hill, B.J., Zhang, L., Berenson, J.R., Collins, R.H. & Koup, R.A. (2000) Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet*, **355**, 1875–1881.

- Drayson, M.T., Sparshott, S.M. & Bell, E.B. (1989) Fidelity of the repertoire in T cell reconstituted athymic nude rats. Preservation of a deficit in alloresponsiveness over one year. *Journal of Experimental Medicine*, 170, 691–702.
- Driscoll, D.A., Salvin, J., Sellinger, B., Budarf, M.L., McDonald-McGinn, D.M., Zackai, E.H. & Emanuel, B.S. (1993) Prevalence of 22q11 micro deletion in DiGeorge and velocardiofacial syndromes: implications for genetic counseling in prenatal diagnosis. *Journal of Medical Genetics*, 30, 813–817.
- Freitas, A. & Rocha, B. (2000) Population Biology of lymphocytes: The fight for survival. *Annual Review of Immunology*, 18, 83–111.
- Gaschet, J., Denis, C., Milpied, N., Hallet, M., Romagne, F., Necker, A., Vivien, R., David-Ameline, J., Davodeau, F., Bonneville, M. & Vie, H. (1995) Alterations of T cell repertoire after bone marrow transplantation: characterization of over-represented subsets. *Bone Marrow Transplantation*, 16, 427–435.
- Goldsbelt, A., Haas, A. & Stiehm, R. (1987) Bone marrow transplantation in DiGeorge syndrome. *Journal of Pediatrics*, 111, 40–44.
- Hakim, F.T., Cepeda, R., Kaime, S., Mackall, C.L., AcAtee, N., Zujewski, J., Cowan, K. & Gress, R.E. (1997) Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: Thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. *Blood*, 90, 3789–3798.
- Le Deist, F., Raffoux, C., Griscelli, C. & Fischer, A. (1987) Graft vs graft reaction resulting in the elimination of the maternal cells in a SCID patient with maternal fetal GVHD after an HLA identical bone marrow transplantation. *Journal of Immunology*, 138, 423–427.
- Mackall, C.L., Hakim, F.T. & Gress, R.E. (1997) T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunology Today*, 18, 245–251.
- Market, L., Boeck, A., Hale, L., Kloster, A., McLaughlin, T., Batchvarova, M., Douek, D., Koup, R., Kostyu, D., Ward, F., Rice, H. & Mahaffey, S. (1999) Transplantation of thymus tissue in complete DiGeorge syndrome. *New England Journal of Medicine*, 341, 1180–1189.
- Matsumoto, T., Amamoto, N., Kondoh, T., Nakayama, M., Takayanagi, T. & Tsuji, Y. (1998) Complete-type DiGeorge syndrome treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 22, 927–930.
- Mayumi, M., Kimata, H., Suehiro, Y., Hosoi, S., Ito, S., Kuge, Y., Shinomi, K. & Mikawa, H. (1989) DiGeorge syndrome with hypogammaglobulinemia: a patient with excess suppressor T cell activity treated with fetal thymus transplantation. *European Journal of Pediatrics*, 148, 518–522.
- Molrine, D.C., Guinan, E.C., Antin, J.H., Parsons, S.K., Weinstein, H.J., Wheeler, C., McGarigle, C., Blanding, P., Philips, N.R., Kinsella, K., Deans, K., Gamarra, A., Goorin, A., George, S. & Ambrosino, D.M. (1996) Donor immunization with Haemophilus influenzae type b (HIB) -conjugate vaccine in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 87, 3012–3018.
- Müller, W., Peter, H.H., Kalfetz, H.C., Franz, A. & Rieger, C.H. (1989) The DiGeorge sequence: Immunologic findings in partial and complete forms of the disorder. *European Journal of Pediatrics*, 149, 96–103.
- Patel, D.D., Gooding, M.E., Parrott, R.E., Curtis, K.M., Haynes, B.F. & Buckley, R.H. (2000) Thymic function after hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *New England Journal of Medicine*, 342, 1325–1332.
- Pignata, C., Gaetanidello, L., Masci, A.M., Franck, J., Christiano, A., Matrecano, E. & Racioppi, L. (2001) Human equivalent of the mouse Nude/SCID phenotype: long term evaluation of immunologic reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood*, 97, 880–885.
- Robertson, J.D., Gale, R.E., Wynn, R.F., Dougal, M., Linch, D.C., Testa, N.G. & Chopra, R. (2000) Dynamics of telomere shortening in neutrophils and T lymphocytes during ageing and the relationship to skewed X chromosome inactivation patterns. *British Journal of Haematology*, 109, 272–279.
- Rocha, B., Vassili, P. & Guy-Grand, D. (1992) The extrathymic T-cell development pathway. *Immunology Today*, 13, 449–453.
- Roux, E., Dumont-Girard, F., Starobinski, M., Siegrist, C.A., Helg, C., Chapuis, B. & Roosnek, E. (2000) Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood*, 96, 2299–2303.
- Sakaguchi, S. & Sakaguchi, N. (1990) Thymus and autoimmunity. Capacity of the normal thymus to produce pathogenic self-reactive T cells and conditions required for their induction of autoimmune disease. *Journal of Experimental Medicine*, 172, 537–545.
- Scuccimari, R. & Rodd, C. (1998) Thyroid abnormalities as a feature of DiGeorge syndrome: a patient report and review of the literature. *Journal of Pediatric Endocrinology Metabolism*, 11, 273–276.
- Sze, D.M., Giesajtis, G., Brown, R.D., Raitakari, M., Gibson, J., Ho, J., Baxter, A.G., Pazekas de St Groth, B., Basten, A. & Joshua, D.E. (2001) Clonal cytotoxic T-cells are expanded in myeloma and reside in the CD8+CD57+CD28- compartment. *Blood*, 98, 2817–2827.
- Tanchot, C. & Rocha, B. (1997) Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output. *Journal of Experimental Medicine*, 186, 1099–1106.
- Tanchot, C. & Rocha, B. (1998) The organization of mature T-cell pools. *Immunology Today*, 19, 575–579.
- Tanchot, C., Fernandes, H.V. & Rocha, B. (2000) The organization of mature T cell pools. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 355, 323–328.
- Yamagishi, H., Garg, V., Matsuoka, R., Thomas, T. & Srivastava, D. (1999) A molecular pathway revealing a genetic basis for human cardiac and craniofacial defects. *Science*, 283, 1158–1161.
- Yu, C., Seidel, K., Nash, R.A., Deeg, J., Sandmaier, B.M., Barsoukov, A., Santos, E. & Storb, R. (1998) Synergism between mycophenolate mofetil and cyclosporine in preventing graft-versus-host-disease among lethally irradiated dogs given DLA-non identical unrelated marrow grafts. *Blood*, 91, 2581–2587.

ARTICLE 6 :

PBMC transplantation in complete DiGeorge syndrome: an eight year update.

Daguindau N., Decot V., Picard C., Latger-Cannard V., Grégoire MJ., Nzietchueng R., Salmon A., Stoltz JF., Bordigoni P., Bensoussan D.

Soumis

*PBMC TRANSPLANTATION IN COMPLETE DIGEORGE
SYNDROME:
AN EIGHT YEAR UPDATE*

Nicolas DAGUINDAU^{1,2}, Véronique DECOT¹, Capucine PICARD³, Véronique LATGER-Cannard⁴, Marie José GREGOIRE⁵, Rosine NZIETCHUENG⁶, Alexandra SALMON², Jean François STOLTZ¹, Pierre BORDIGONI², and Danièle BENSOUSSAN¹

- 1- Unité de Thérapie cellulaire et Tissus, CHU de Nancy, France
- 2- Unité de Transplantation Médullaire, Hôpital d'Enfants, CHU de Nancy, France
- 3- Laboratoire d'Immunologie Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France
- 4- Service d'Hématologie Biologique, CHU de Nancy, France
- 5- Laboratoire de Génétique, CHU de Nancy, France.
- 6- Unité INSERM U684, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Corresponding author:

Dr Danièle BENSOUSSAN
Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus
CHU de Nancy
Allée du MORVAN
54511 VANDOEUVRE-LES-NANCY
Tel: 03-83-15-37-79 / 03-83-15-48-69
Fax: 03-83-15-37-56
e-mail: d.bensoussan@chu-nancy.fr

Running short title:

An eight year follow up after transplantation for cDGS.

SUMMARY

A young boy with a confirmed cDGS underwent a peripheral blood mononuclear cell transplantation (PBMCT) from his HLA-identical sister at 4.5 years of age, without a conditioning regimen. Eight years later, he is healthy with good immunological functions in presence of a stable mixed T-cell chimerism. We observe an inverted CD4+/CD8+ ratio, related to the CD8 subset expansion, with a skewing of TCR repertoire and absence of recent thymic emigrants in the CD4+ subset. The telomere loss observed in T-cells is certainly related to donor T-cell expansion but also patient T-cell telomere shortening.

Key Words: cDGS, PBMCT, Immunological reconstitution, TCR repertoire, Telomere shortening.

INTRODUCTION

DiGeorge Syndrome (DGS) is a rare congenital disorder characterized by conotruncal heart defects, thymic hypoplasia, hypoparathyroidism and facial dysmorphism (Muller, et al.1988). 22q11.2 deletion is found in approximately 80% of the patients. Thymic hypoplasia occurs in about 80% and implies an immunodeficiency known to be extremely variable (Sullivan, et al.1999). Recently, criteria for athymia (complete DGS) were based on very low levels of naive T-cells ($<50 /\text{mm}^3$ CD3+CD45RA+CD62L+) and very low levels of T-cell receptor rearrangement excision circles (TRECs $< 100/100.000$ T-cells). These profoundly immunodeficient infants are particularly predisposed to fatal opportunistic infections. Several therapies have been used to restore their immunity: successful HLA genotypical bone marrow transplantation (BMT) without a conditioning regimen or GVHD prophylaxis (Goldsobel, et al.1987), successful HLA genotypical BMT with a conditioning regimen and GVHD prophylaxis leading to complete donor chimerism (Matsumoto, et al.1998), cord blood transplantation (Ohtsuka, et al.2004), successful postnatal thymic tissue transplantation (Markert, et al.2007) and successful PBMCT (Bowers, et al.1998).

In our first report (Bensoussan, et al.2002), we described the case of a young boy with cDGS at 2.5 years post-PBMCT. We showed very encouraging clinical and immunological improvements. This case suggested peripheral expansion of infused T-cells and raised the questions of progressive T-cell exhaustion, increased oligoclonality in T-cell repertoire and the emergence of chronic GVHD in the absence of thymic output. We now report the 8 year clinical and immunological follow-up.

STUDY DESIGN

Patient

The patient, diagnosed as a cDGS, underwent HLA-genotypical PBMCT without any conditioning regimen, but with an initial GVHD prophylaxis, when he was 4.5 years old.

After 2.5 years, clinical improvement with spectacular weight and height gains without serious infections could be observed. A quantitative and qualitative immune reconstitution with a stable mixed chimerism on T-cells was reported but without new thymic emigrants (TRECs). The T-cell repertoire was quite perturbed on CD8+ T-cells with overexpression of the V β 5-1 family and complete absence of 4 families (V β 5-2, V β 11, V β 18, and V β 13-6).

Chimerism study

T-cells and polynuclear cells were isolated from whole blood with a fully automated cell separator ROBOSEP[®] (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) using a CD3 and CD15 positive selection. The CD3+ and CD15+ cell fractions had a purity of 93 and 97%, respectively. After DNA extraction, polymorphism analysis was performed by fluorescent polymerase chain reaction (PCR) for polymorphic locus THO1 and genetic analyser ABI PRISM[®] 310 (Applied Biosystems).

Flow Cytometry

Flow cytometry was performed on a FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA) to define lymphocyte subsets including naive T-cells (CD45RA+/CD62L+) and recent thymic emigrant naive CD4+ T-cells (CD31+CD45RA+/CD4+) (Kimmig, *et al.*2002) and to characterize the T-Cell Receptor V β repertoire with a panel of 21 V β family-specific monoclonal antibodies.

Proliferation assays

Proliferation responses to various mitogens and to various antigens (tetanus toxoid, cytomegalovirus, aspergillus conidia) were performed as previously described (Bensoussan, *et al.*2002).

Measurements of the Terminal Restriction Fragments (TRF) Length

DNA extractions were performed from CD3+ cells using the Puregene DNA purification kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN).

TRF lengths were measured as previously described (Benetos, *et al.*2005).

Results and Discussion

Eight years post-PBMCT, the clinical picture is marked by a very good general state (height +0.5 SD and weight -0.5 SD), the absence of infectious complications, no sign of GVHD and marked hypocalcemia related to a therapeutic non-compliance.

We still observe the persistence of a stable mixed chimerism profile (41% of recipient cells over the past 6 years) on the T-cell subset, exclusively.

Proliferation responses to mitogens and antigens also remain stable within normal values (PHA: 175 000 cpm, PMA-ionomycine: 260 000 cpm, tetanus toxoid: 312 000 cpm).

Post-vaccination specific antibody titers for poliovirus, pneumococcal polysaccharides, *haemophilus influenzae*, tetanus and diphtheria remain high.

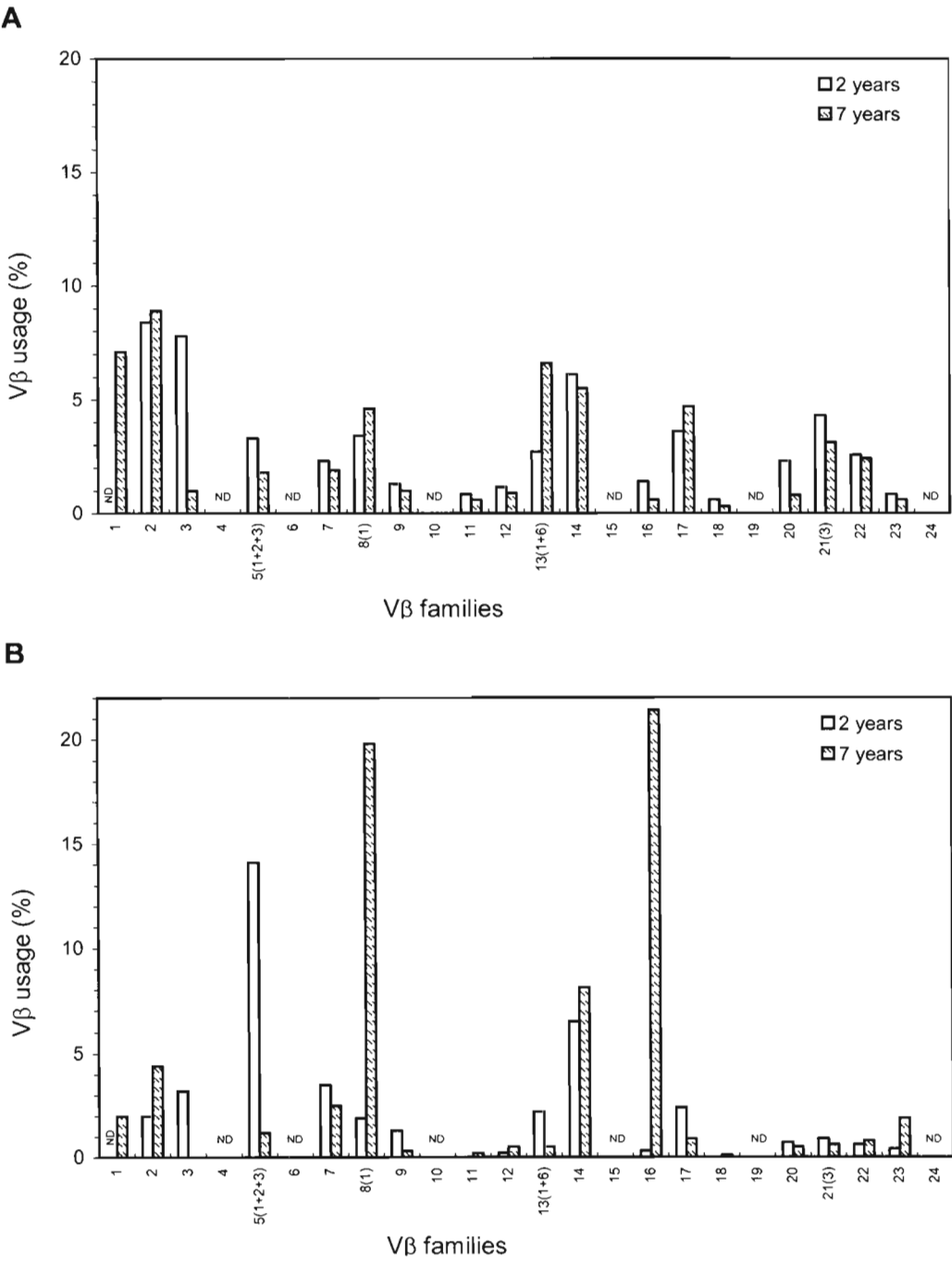
A slow rise in T-cell count is observed ($644.10^6/l$ vs $311.10^6/l$ 2.5 years post-transplantation), due to a significant increase in the CD8+ T-cells which reach the 10th percentile for age, but a stable, low number of CD4+ T-cells ($225.10^6/l$), responsible for an inverted CD4+/CD8+ ratio (0.58 vs 1.4 at 2.5 years), as previously described after BMT in athymic recipients (Pignata, *et al.*2001). In the CD4+ subset, only 1% expressed a CD62L+/CD45RA+ naive phenotype and always in the absence of recent thymic emigrants CD31+CD45RA+/CD4+ (1%). Lack of new thymic emigrants may explain the absence of CD4+ cell expansion. The TCR repertoire study performed on CD4+ cells by flow cytometry shows a similar profile between donor and recipient. Thus, TCR repertoire diversity in the CD4+ population is not affected by athymia and recipient environment.

In the CD8+ subset, the CD45RA+ regeneration is predominant (RA: RO ratio = 2.4 vs 0.5 2.5 years after PBMCT). Most CD8+ cells are CD28- (91%) but the CD8+CD57+ population (27%) is normally represented. The predominance of CD8+CD28- cells is the result of an extrathymic lymphopoiesis. These data support the hypothesis of a double regeneration pathway: thymus-independent for some of the CD8+ T-cell subset and limited expansion of mature peripheral cells of the CD4+ subset, in the absence of the thymus (Mackall, *et al.*1997). Fig 1A-B shows TCR repertoire evolution of 21 V β families in the CD8+ donor and recipient T-cells. In the donor cells, there is a marked decrease of only the V β 3 family, still within normal range and an increase of the V β 13-1 family. In the recipient CD8+ T-cells, there is a skewed distribution of the V β families characterized by a marked overexpression of V β 8-1 and V β 16 families and a marked decrease of V β 3 and V β 5 families. Other authors have reported important perturbations of the CD8+ T-cell repertoire in patients with pDGS (Cancrini, *et al.*2005) and in human nude/SCID after BMT (Pignata, *et al.*2001). This oligoclonal expansion of CD8+ T-cells has also been reported in Common Variable Immunodeficiency (CVID) patients where it was related to an increased CD8+CD28- subset, as with our patient (Serrano, *et al.*2000). The skew of TCR repertoire is probably not due to infectious antigenic stimulations, as our patient has not suffered infections since he was transplanted. In the view of Cancrini *et al*, a skewed TCRBV repertoire of CD8+ cells reflects a developmental defect.

Terminal restriction fragment length in purified CD3+ cells was 10 kb for patient and 10.3 kb for donor. In the light of studies of telomere dynamics in T-cell subsets after allogeneic-BMT, this difference (0.3 – 0.5 kb) could be related to telomere shortening in donor lymphocytes, reflecting peripheral expansion as observed immediately after BMT (Robertson, *et al.*2001). But taking into account the T-cell chimerism, we measured in our recipient the mean counts from both sources. Thus, telomere loss could also be due to accelerated T-cell telomere shortening as reported in pDGS (Piliero, *et al.*2004). We lack pre-transplantation and intermediary data to construct a kinetic of telomere shortening.

Our case report supports PBMCT as a therapeutic option in cDGS, with no infections after eight years, no chronic GVHD, persistence of specific cellular and humoral immunity and no need for another donor PBMC infusion. However, the skew of TCR repertoire and telomere shortening suggest a “replicative stress” and raise the question of graft exhaustion, as reported in a Nude/SCID patient 6 years after BMT (Pignata, *et al.*2001). Therefore TCRBV repertoire and TRF length seem to be useful indicators to follow graft expansion. Nevertheless, the first patient to be transplanted with BM without a conditioning regimen for a cDGS by Goldsobel *et al.* over twenty years ago is relatively healthy although the TCR repertoire is skewed. These data support the long-lasting efficiency of such a therapy and are very encouraging for our patient.

Fig 1. TCR Vβ repertoire profile on donor (A) and recipient (B) CD8+ T-cells 2 and 7 years after PBMCT. Results expressed as a percentage of Vβ expression. ND means that the Vβ expression was not studied.



REFERENCES

- Benetos, A., Gardner, J.P., Kimura, M., Labat, C., Nzietchueng, R., Dousset, B., Zannad, F., Lacolley, P. & Aviv, A. (2005) Aldosterone and telomere length in white blood cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **60**, 1593-1596.
- Bensoussan, D., Le Deist, F., Latger-Cannard, V., Gregoire, M.J., Avinens, O., Feugier, P., Bourdon, V., Andre-Botte, C., Schmitt, C., Jonveaux, P., Eliaou, J.F., Stoltz, J.F. & Bordigoni, P. (2002) T-cell immune constitution after peripheral blood mononuclear cell transplantation in complete DiGeorge syndrome. *Br J Haematol*, **117**, 899-906.
- Bowers, D.C., Lederman, H.M., Sicherer, S.H., Winkelstein, J.A. & Chen, A.R. (1998) Immune constitution of complete DiGeorge anomaly by transplantation of unmobilised blood mononuclear cells. *Lancet*, **352**, 1983-1984.
- Cancrini, C., Romiti, M.L., Finocchi, A., Di Cesare, S., Ciaffi, P., Capponi, C., Pahwa, S. & Rossi, P. (2005) Post-natal ontogenesis of the T-cell receptor CD4 and CD8 Vbeta repertoire and immune function in children with DiGeorge syndrome. *J Clin Immunol*, **25**, 265-274.
- Goldsobel, A.B., Haas, A. & Stiehm, E.R. (1987) Bone marrow transplantation in DiGeorge syndrome. *J Pediatr*, **111**, 40-44.
- Kimmig, S., Przybylski, G.K., Schmidt, C.A., Laurisch, K., Mowes, B., Radbruch, A. & Thiel, A. (2002) Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med*, **195**, 789-794.
- Mackall, C.L., Fleisher, T.A., Brown, M.R., Andrich, M.P., Chen, C.C., Feuerstein, I.M., Magrath, I.T., Wexler, L.H., Dimitrov, D.S. & Gress, R.E. (1997) Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood*, **89**, 3700-3707.
- Markert, M.L., Devlin, B.H., Alexieff, M.J., Li, J., McCarthy, E.A., Gupton, S.E., Chinn, I.K., Hale, L.P., Kepler, T.B., He, M., Sarzotti, M., Skinner, M.A., Rice, H.E. & Hoehner, J.C. (2007) Review of 54 patients with complete DiGeorge anomaly enrolled in protocols for thymus transplantation: outcome of 44 consecutive transplants. *Blood*, **109**, 4539-4547.
- Matsumoto, T., Amamoto, N., Kondoh, T., Nakayama, M., Takayanagi, T. & Tsuji, Y. (1998) Complete-type DiGeorge syndrome treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **22**, 927-930.
- Muller, W., Peter, H.H., Wilken, M., Juppner, H., Kallfelz, H.C., Krohn, H.P., Miller, K. & Rieger, C.H. (1988) The DiGeorge syndrome. I. Clinical evaluation and course of partial and complete forms of the syndrome. *Eur J Pediatr*, **147**, 496-502.
- Ohtsuka, Y., Shimizu, T., Nishizawa, K., Ohtaki, R., Someya, T., Noguchi, A., Shimura, N., Kim, H., Sugimoto, H., Fujita, H., Morio, T. & Yamashiro, Y. (2004) Successful engraftment and decrease of cytomegalovirus load after cord blood stem cell transplantation in a patient with DiGeorge syndrome. *Eur J Pediatr*, **163**, 747-748.
- Pignata, C., Gaetaniello, L., Masci, A.M., Frank, J., Christiano, A., Matrecano, E. & Racioppi, L. (2001) Human equivalent of the mouse Nude/SCID phenotype: long-term evaluation of immunologic reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood*, **97**, 880-885.
- Piliero, L.M., Sanford, A.N., McDonald-McGinn, D.M., Zackai, E.H. & Sullivan, K.E. (2004) T-cell homeostasis in humans with thymic hypoplasia due to chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Blood*, **103**, 1020-1025.

- Robertson, J.D., Testa, N.G., Russell, N.H., Jackson, G., Parker, A.N., Milligan, D.W., Stainer, C., Chakrabarti, S., Dougal, M. & Chopra, R. (2001) Accelerated telomere shortening following allogeneic transplantation is independent of the cell source and occurs within the first year post transplant. *Bone Marrow Transplant*, **27**, 1283-1286.
- Serrano, D., Becker, K., Cunningham-Rundles, C. & Mayer, L. (2000) Characterization of the T cell receptor repertoire in patients with common variable immunodeficiency: oligoclonal expansion of CD8(+) T cells. *Clin Immunol*, **97**, 248-258.
- Sullivan, K.E., McDonald-McGinn, D., Driscoll, D.A., Emanuel, B.S., Zackai, E.H. & Jawad, A.F. (1999) Longitudinal analysis of lymphocyte function and numbers in the first year of life in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin Diagn Lab Immunol*, **6**, 906-911.

Troisième partie:
DISCUSSION

L'efficacité de l'allogreffe de CSH dans le traitement des déficits immunitaires héréditaires n'est plus à démontrer. Cette thérapeutique a apporté une réponse curative à des maladies graves n'offrant qu'une perspective de survie parfois très courte.

Nous avons pu montrer au cours de ce travail que le succès du traitement des DI par allogreffe de Cellules Hématopoïétiques est dépendant de deux paramètres principaux :

- ***une bonne connaissance du déficit immunitaire à traiter et des complications qui le caractérisent afin d'optimiser les conditions de greffe.***
- ***une prévention efficace des effets secondaires des allogreffes notamment la GVHD et les infections.***

Nous allons reprendre successivement ces deux notions à la lumière des articles que nous avons présentés.

I- Une bonne connaissance du déficit immunitaire à traiter et des complications qui le caractérisent

Nous avons pu voir, à travers l'exemple du Syndrome Hyper IgM lié à l'X (ou déficit en CD40 Ligand) que l'indication de greffe doit être posée en fonction de l'évolution clinique du patient et du type de donneur disponible.

Nous avons tout d'abord rapporté le cas de deux frères allogreffés avec des donneurs génoidentiques à l'âge de 6 et 8 ans, respectivement, et dont l'évolution clinique a été très satisfaisante. Toutefois, ces enfants présentaient tous les deux une infection à *Cryptosporidium parvum* avec cholangite sclérosante et une atteinte hépatique débutante. L'absence d'atteinte grave du foie ou d'autres organes a permis de proposer un conditionnement myéloablatif à ces enfants. L'équipe de Kawaja a décrit le cas de deux patients atteints d'HIGM1, présentant une atteinte hépatique sévère et recevant une allogreffe de CSH avec conditionnement myéloablatif. (Kawaja *et al*, 2001). En revanche, d'autres équipes proposent lors d'une maladie hépatique avancée de réaliser un conditionnement non myéloablatif (Amrolia *et al*, 2000). Deux patients ont pu bénéficier avec succès de ce traitement.

Les auteurs de l'étude européenne à laquelle nous avons contribué, qui sont également les auteurs de Recommandations précédemment exposées, soulignent que le problème principal est de déterminer le moment propice pour réaliser l'allogreffe. Au regard de ce que nous avons exposé ci-dessus, il paraît raisonnable de proposer l'allogreffe de CSH avant toute atteinte hépatique. Il a été montré dans cette étude que l'allogreffe est un succès dans environ 60% des cas et dans 72% des cas en l'absence d'atteinte hépatique. Or, beaucoup de patients

atteints d'HIGM1 mènent une vie pratiquement normale. Il n'est de ce fait pas aisé de leur proposer un traitement présentant un risque vital de 28%. C'est pourquoi, il est recommandé de réaliser un traitement substitutif associé à une surveillance étroite et régulière des paramètres hépatiques. La recherche de *Cryptosporidium parvum* fait partie de cette exploration hépatique. Une détection précoce par des techniques sensibles telles que la PCR doit permettre de proposer le traitement par allogreffe de CSH au moment où il s'avère nécessaire, sans prendre de risque supplémentaire lié à l'état clinique du patient. L'utilisation de Nitazoxamide peut permettre de diminuer la charge parasitaire avant l'allogreffe. Cependant, les traitements anti-parasitaires utilisés seuls ou en association contre le *Cryptosporidium parvum* n'ont parfois qu'une efficacité relative.

Parallèlement, nous avons pu montrer à travers l'exemple du syndrome de DiGeorge complet qu'une bonne connaissance de ce déficit avait permis de proposer une allogreffe de cellules hématopoïétiques très simplifiée, avec un greffon ne contenant que les cellules d'intérêt (pas de CSH) et l'absence de conditionnement de greffe, permettant ainsi de s'affranchir de ses effets secondaires. En effet, l'absence de thymus qui caractérise ce déficit et qui a été confirmée pour notre patient de façon directe par l'imagerie et de façon indirecte par l'absence de nouveaux émigrants thymiques (TRECs) ne permet pas d'espérer une maturation thymique des progéniteurs lymphoïdes présents dans le greffon. Nous avons de plus montré qu'il n'y avait pas non plus de maturation extra-thymique, incompatible avec le répertoire T étendu de l'enfant après greffe et en l'absence d'expression d'un phénotype extra-thymique de lymphocytes (absence d'expression de CD103). La seule explication de la reconstitution immunitaire spectaculaire observée chez cet enfant après greffe est une expansion périphérique des lymphocytes T matures post-thymiques présents dans le greffon. Dans ce contexte, il apparaît clairement qu'il n'est pas utile de proposer en première intention un protocole d'allogreffe classique avec un greffon riche en cellules souches hématopoïétiques et un conditionnement myéloablatif. En présence d'un donneur génoidentique, une allogreffe de cellules mononucléées du sang périphérique sans conditionnement est suffisante pour corriger le déficit immunitaire présent dans le cDGS. Ce geste est simple pour le donneur comme pour le receveur et peut éventuellement être répété en cas d'épuisement du greffon ou de restriction du répertoire des lymphocytes T. Toutefois, dans le cas de notre patient nous avons maintenant un recul de 8 ans après allogreffe avec une évolution clinique tout à fait favorable. De plus, des expériences similaires ont été rapportées

récemment, avec des évolutions cliniques et immunitaires favorables (Hoenig *et al*, 2004 ; Janda *et al*, 2007).

Cependant, fin 2006, nous avons été amenés à traiter un jeune bébé atteint de cDGS atypique avec une présentation clinique de type Ommen. L'absence de nouveaux émigrants thymiques et la présence d'un répertoire T oligoclonal peu diversifié ont pu être observées. Un traitement par corticoïdes a permis d'obtenir la résolution d'une éruption cutanée et la disparition progressive des lymphocytes T circulants. Une allogreffe de cellules mononucléées périphériques de sa soeur génoidentique a été proposée et un conditionnement par SAL a été réalisé en 3 injections (J-7, J-5 et J-2) afin de prévenir tout risque de rejet lié aux lymphocytes T du receveur. Malheureusement, aucune prise des lymphocytes du donneur n'a pu être mise en évidence chez le receveur, ce qui a conduit à lui proposer une allogreffe de MO avec sa sœur, suite à un conditionnement non myéloablatif composé de l'association Fludarabine et Melphalan. Cette deuxième allogreffe a été un succès avec un chimérisme initial 100% donneur sur toutes les populations cellulaires puis apparition progressive d'un chimérisme partiel sur la population myéloïde. Une récupération des fonctions immunitaires cellulaires a pu être observée avec présence d'un répertoire T polyclonal. L'absence d'efficacité de la première allogreffe de cellules mononucléées initialement attribuée aux lymphocytes T du receveur (malgré l'absence de lymphocytes T circulants au moment de la greffe) semble plutôt secondaire à l'administration de SAL qui est probablement responsable d'une déplétion T du greffon *in vivo*, comme cela a été démontré dans les allogreffes de CSH. En effet, l'expansion chez le receveur des lymphocytes T du greffon qui permet une récupération des fonctions immunitaires, dans le contexte particulier du cDGS, a probablement été bloquée par l'effet de déplétion T du SAL.

II- Prévenir les effets secondaires des allogreffes de CSH :

Nous avons pu montrer dans ce travail que les deux effets secondaires majeurs entravant à ce jour le succès de l'allogreffe de CSH dans les DI sont *la survenue de la GVHD et les infections post-greffe*.

Nous avons pu rapporter deux techniques de déplétion T totales permettant de prévenir la survenue de la GVHD.

La première n'est plus utilisée à ce jour car elle requiert des composés d'origine animal : la déplétion des lymphocytes T dépendante du complément de Lapin. Cette technique a été beaucoup utilisée dans les années 1990 afin d'éliminer spécifiquement les lymphocytes T des greffons. Nous avons pu voir dans la population témoin de notre travail, que cette seule

déplétion T avait pour conséquence la survenue d'infections graves parmi lesquelles les syndromes lymphoprolifératifs induits par le virus d'Epstein Barr (EBV). En effet, la contrepartie de ce traitement du greffon est la perte des lymphocytes T ayant un potentiel anti-infectieux qui a pour conséquence une incidence accrue des infections bactériennes, virales et fongiques après allogreffe. C'est pourquoi, nous avons proposé d'ajouter un traitement concomitant des cellules par des anticorps dirigés contre les lymphocytes B. Nous avons mis en évidence qu'une telle stratégie permettait de prévenir la survenue d'infections par le virus d'Epstein Barr (EBV) : 0 lymphomes induits par l'EBV dans le groupe d'étude avec déplétion B versus 37% dans le groupe témoin. Cependant, la survenue des autres infections virales ou fongiques n'est pas diminuée.

La seconde technique de déplétion T est toujours utilisée à ce jour : la sélection positive CD34+ par méthode immunomagnétique. Cette méthode utilise des anticorps de grade clinique sans aucun apport de produit d'origine animal. De plus, elle permet de réaliser des déplétions T assez profondes. Les autres populations cellulaires sont également déplétées : les lymphocytes B et les cellules NK notamment. Cependant, il peut arriver que la déplétion T obtenue soit insuffisante. C'est le cas que nous avons rapporté lors de l'allogreffe d'un enfant atteint du syndrome de Wiskott Aldrich (WAS). Nous n'avons pas observé chez cet enfant la survenue d'infections après allogreffe du fait d'une reconstitution autologue rapide. Cependant, ce type de manipulation du greffon engendre une immunodépression profonde et longue, propice à la survenue d'infections.

A travers ces exemples, il apparaît que toute la problématique réside dans la séparation des lymphocytes T responsables de la GVHD de ceux responsables de la défense anti-infectieuse. A titre de comparaison, le même enjeu existe avec les allogreffes de CSH dans le traitement des hémopathies malignes, avec la nécessité de dissocier l'effet GVHD de l'effet GVL. Nous avons rapporté dans ce travail une méthode de prévention de la GVHD préservant le capital des lymphocytes T anti-infectieux : la déplétion alloréactive, soit par élimination physique des lymphocytes T alloréactifs du greffon soit par neutralisation de leur effet alloréactif par induction d'anergie. Deux essais cliniques français successifs ont été réalisés par l'équipe de Necker chez des patients atteints de DI héréditaire pour la majorité d'entre eux afin de tester l'impact sur la reconstitution immunitaire de l'injection de doses de lymphocytes T allodéplétés. Le premier essai a inclus 15 patients qui ont reçu une allogreffe (deux allogreffes pour l'un d'entre eux) en situation haploidentique dans 13 cas et avec un donneur non apparenté dans 3 cas (André-Schmutz *et al*, 2002). Les patients ont tous reçu un greffon déplété en lymphocytes T par la méthode de sélection positive CD34+ contenant en médiane

13.1 10^6 CD34+ /kg (de 4.1 à 51.8) et une médiane de 1 10^4 CD3+/kg (de 0.21 à 1.88 x 10^4), après un conditionnement associant Busulfan, Endoxan et SAL. Aucune prophylaxie de la GVHD n'a été administrée. Les cellules allodéplétées ont été préparées en mettant en contact en culture mixte lymphocytaire les cellules du donneur et les cellules du receveur irradiées. Après 3 jours de culture, l'anticorps anti-chaîne α du récepteur à l'IL2 couplé à une immunotoxine a été ajouté pendant toute une nuit. L'efficacité de la déplétion a été contrôlée par cytométrie en flux mais également par un ensemble de tests fonctionnels *in vitro* montrant la perte du potentiel alloréactif vis-à-vis du receveur mais pas vis-à-vis d'un tiers et la conservation du potentiel anti-infectieux. L'injection de cellules allodéplétées a été réalisée une fois la prise du greffon confirmée et lorsque le taux de SAL chez le patient était < 0.4 $\mu\text{g/ml}$, c'est-à-dire en médiane à 24 jours post greffe (de 15 à 47 jours). Quatre doses de lymphocytes T allodéplétés ont été administrées : 1, 4, 6 et 8 10^5 CD3/kg. L'efficacité clinique de la déplétion a été montrée par l'absence de GVHD de grade $\geq$ II après l'injection de lymphocytes T jusqu'à une dose de 8 10^5 /kg. Au total, deux patients ont développé une GVHD aiguë de grade II et deux autres de grade I. Cependant, les auteurs signalent que ces 4 patients avaient reçu des lymphocytes T allodéplétés présentant une alloréactivité résiduelle élevée, supérieure à celle observée pour les autres patients ($\geq 1\%$). La reconstitution immunitaire des patients a été très rapide. Les données de cet essai suggèrent que les lymphocytes T allodéplétés permettent de prévenir la survenue d'infections. Chez deux patients qui présentaient une infection CMV active et/ou une infection EBV au moment de l'injection des lymphocytes T, une résolution de ces deux infections a pu être observée. Un deuxième essai est actuellement mené par la même équipe en utilisant une méthode de déplétion T immunomagnétique. Les résultats de cette étude ne sont pas encore publiés.

Une étude similaire a été menée par l'équipe de Malcom Brenner chez des patients atteints dans la majorité des cas d'hémopathies malignes et allogreffés en situation haploidentique (Amrolia *et al*, 2006). La technique d'allodéplétion était la même. Seize patients âgés en médiane de 9 ans (de 2 à 58 ans) ont reçu un greffon déplété en lymphocytes T contenant en médiane : 11.5 10^6 CD34/kg (de 5.9 à 20 10^6 CD34/kg) et 2.6 10^4 CD3/kg (de 0.73 à 18 10^4 CD3/kg). Les patients ont reçu des injections de lymphocytes T allodéplétés à J30, J60 et J90 à la dose de 10^4 cellules/kg et par dose pour 8 d'entre eux et de 10^5 cellules/kg et par dose pour les 8 autres. Un patient a présenté une GVHD de grade IV évoluant vers une GVHD chronique hépatique létale et un autre patient a présenté une GVHD de grade II, évoluant également en GVHD chronique résolutive sous immunosuppression. De plus, la reconstitution immunitaire T et l'immunité anti-virale ont été considérablement améliorées (2

décès sont liés à une cause infectieuse). Cependant, le taux de rechute est élevé (7/16 patients).

L'équipe de John Barrett a réalisé un essai clinique de déplétion alloréactive avec la même technique (anticorps anti-CD25 couplé à une immunotoxine) chez 16 patients d'âge médian 65 ans (51 à 73 ans) atteints d'hémopathie maligne à un stade avancé et recevant une allogreffe de CSP à partir d'un donneur génoidentique après un conditionnement non myéloablatif (Solomon *et al*, 2005). Ces patients ont reçu un greffon déplété en lymphocytes T renfermant en médiane 4.5×10^6 CD34/kg (de 3.4 à 7.3×10^6 CD34/kg), complété avec des lymphocytes T allodépétés en médiane 1×10^8 /kg (de 0.2 à 1.5×10^8 /kg). Quinze patients ont eu une prise du greffon. Le taux de GVHD de grade II à IV observé a été de 46% +/- 13% et de GVHD de grade III à IV de 12% +/- 8 %. Les auteurs soulignent que dans cette population de patients, l'incidence de la GVHD de grade II à IV est classiquement de 58% et l'incidence de la GVHD de grade III à IV est classiquement 34%, avec une prophylaxie standard de la GVHD. Les auteurs concluent à un bénéfice de la déplétion alloréactive dans la prévention de la GVHD pour cette population de patients et montrent que la prise de greffe, l'effet GVL et la reconstitution immunitaire des patients n'ont pas été affectés, contrairement à l'étude précédente.

D'autres stratégies de thérapie cellulaire sont actuellement développées pour essayer de prévenir ou limiter la GVHD tout en conservant le potentiel anti-infectieux. Nous allons en évoquer deux qui semblent très prometteuses : les Cellules Souches Mésenchymateuses (MSC) et les lymphocytes T régulateurs (Tregs).

I- Les Cellules Souches Mésenchymateuses

Les MSC sont des progéniteurs non hématopoïétiques multipotents qui peuvent se différencier en cellules stromales médullaires (contrôlant le « homing » et la prolifération des CSH), en ostéoblastes et adipocytes ainsi qu'en chondrocytes, ténocytes, myocytes et cardiomyocytes (Deans *et al*, 2000). Toutes ces cellules ont la même origine embryonnaire mésodermique. La multipotentialité des MSC s'étend à d'autres cellules n'ayant pas une origine mésodermique : cellules neuronales et cellules hépatocytaires. Les MSC s'obtiennent simplement en culture par adhérence d'un prélèvement de cellules médullaires sur plastique. Après un temps de culture de 2 à 3 semaines elles constituent une couche adhérente de

cellules fusiformes d'aspect fibroblastiques. Les MSC obtenues après culture expriment les antigènes de classe I du CMH, mais n'expriment pas les antigènes de classe II, ni les molécules de co-stimulation CD80, CD86, CD40 et CD40 ligand. Les MSC n'activent pas les lymphocytes T alloréactifs en culture mixte lymphocytaire (CML) et inhibent une CML lorsqu'elles sont ajoutées en troisième partenaire. Cette inhibition semble liée à la production de facteurs solubles inhibiteurs en particulier le Transforming Growth Factor beta (TGFβ) et la prostaglandine E2 (PGE2). Il a été montré récemment que les MSC ont une influence sur le profil cytokinique des cellules dendritiques (DC), des T naïfs, des T helper TH1 et TH2 et des cellules NK en faveur d'un effet anti-inflammatoire (augmentation de la production d'IL4 et IL10 et diminution de la production d'IFNγ (Aggarwal *et al*, 2005).

Cet effet immunomodulateur des MSC peut se révéler extrêmement intéressant dans le contexte de la prévention de la GVHD. Cependant, il existe à ce jour peu de données dans la littérature donnant des résultats de greffe de CSM allogéniques associées à une greffe de CSH en vue de la prévention de la GVHD. L'équipe de Lazarus a rapporté une étude portant sur 46 patients ayant reçu une allogreffe de CSH et des MSC obtenues en culture à partir de donneurs génoidentiques (Lazarus *et al*, 2005). Ce premier essai a montré la faisabilité d'une telle stratégie et l'absence de toxicité des MSC. Une GVHD aiguë modérée à sévère a été observée chez 28% des patients et une GVHD chronique chez 61% des patients. La survie sans progression de la maladie deux ans après greffe est de 53%.

Dans le traitement de la GVHD aiguë grave résistante aux immunosuppresseurs majeurs Katarina Le Blanc a rapporté une expérience très intéressante (LeBlanc *et al*, 2004). Un enfant atteint d'une leucémie aiguë lymphoblastique a reçu une allogreffe non apparentée et a développé une GVHD de grade IV (foie et tube digestif). Les MSC allogéniques haploidentiques ont été isolées à partir de la mère de l'enfant. Deux doses successives de 2×10^6 /kg puis de 1×10^6 /kg administrées par voie intra veineuse ont permis de faire disparaître la GVHD comme le montrait la normalisation de la bilirubine et la régression des diarrhées. Cependant, 18 mois après l'injection de MSC, la GVHD a récidivé et le patient est décédé. La même équipe a publié une étude pilote avec 8 patients présentant des GVHD aiguës de grade II-IV résistantes aux corticoïdes traités avec une dose médiane de MSC de 1×10^6 MSC/kg (Ringden *et al*, 2006). Plusieurs conclusions peuvent être tirées de cette étude : l'absence d'effets secondaires après injection des MSC, l'absence de formation de tissus ectopiques, l'impact spectaculaire des MSC sur l'immunomodulation et la réparation du tissu intestinal chez 6 patients et du tissu hépatique chez 1 patient. Les auteurs concluent que les MSC ont une place dans le traitement de la GVHD aiguë cortico-résistante (Le Blanc *et al*, 2006).

Un protocole national français sous l'égide de la SFGM-TC débute courant 2007 dans le traitement préventif de la GVHD aiguë. Il s'agit d'une étude prospective randomisée en double aveugle comparant l'administration de MSC allogéniques en prophylaxie de la GVHD au décours d'une allogreffe de CSH pour une hémopathie maligne en situation génoidentique ou phénoïdentique (dans ce cas le donneur de MSC est un membre de la famille du receveur) versus placebo. L'objectif de cette étude est de comparer le taux de GVHD aiguë de grade supérieur ou égal à II après allogreffe de CSH avec MSC ou sans MSC (bras de référence). Il est attendu une réduction du taux de GVH aiguë de grade supérieur ou égal à II de 25% entre le bras avec MSC et le bras sans MSC.

II- Les Lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) sont une sous population spécialisée de lymphocytes T qui a pour rôle de supprimer l'activation des autres cellules du système immunitaire et de maintenir ainsi l'homéostasie du système immunitaire. Ils ont été décrits pour la première fois en 1983 (Nakamura *et al*, 1983). Parmi les Tregs, on distingue plusieurs sous populations : les Tregs naturels et les Tregs inducibles.

Les Tregs naturels apparaissent lors du développement thymique et sont CD4⁺ CD25⁺. Il semble que l'activation des Tregs naturels soit dépendante des spécificités antigéniques. Les résultats obtenus *in vitro* suggèrent que l'effet des Tregs naturels sur les lymphocytes T effecteurs s'exerce par le biais d'un contact cellule – cellule (interaction CTLA4-CD80/CD86 par exemple) mais également par le biais de sécrétion de cytokines comme le TGF β 1 (Pausi *et al*, 2004 et Nakamura *et al*, 2001). Le facteur de transcription, qui joue un rôle fondamental dans le développement et la fonction de Tregs naturels, est FoxP3.

Les Tregs inducibles sont produits en périphérie probablement pour arrêter la réponse immunitaire lorsque l'élément pathogène a été éliminé et pour éviter la survenue d'une auto-immunité. Leur génération est dépendante de facteurs périphériques comme la nature et le degré de maturation de l'APC, la présence de cytokines comme le TGF β et la présence de faibles doses d'antigène. Il existe au moins deux populations de Tregs inducibles : les Th3 qui exercent leur effet suppresseur par sécrétion de TGF β et les Tr1 qui sécrètent de l'IL10 en grande quantité. Les Tregs inducibles fonctionnent de façon indépendante des interactions cellulaires et exercent leur action suppressive par le biais de la sécrétion de cytokines (IL10 et TGF β).

L'effet immunosuppresseur des Tregs en fait un outil extrêmement intéressant pour la régulation de la GVHD. En effet, il a pu être montré sur des modèles animaux que l'administration de Tregs permettait de contrôler la GVHD sans inhiber l'effet GVL. Une étude a été réalisée chez des patients atteints de GVHD aiguë montrant une corrélation inverse entre l'expression de FoxP3 et la gravité de la GVHD : l'expression du mRNA de Fox P3 était non détectable chez les patients atteints de GVHD de grade III-IV, significativement réduite (2 fois moins) chez les patients atteints de GVHD de grade I-II que chez les patients ne présentant pas de GVHD (Hess *et al*, 2006). L'analyse séquentielle des lymphocytes du sang périphérique de patients atteints de GVHD aiguë évoluant vers une GVHD chronique révélait une diminution nette de l'expression de FoxP3 lorsque la GVHD était active et un retour à une expression normale après résolution de la GVHD. De plus, la normalisation de l'expression de FoxP3 coïncidait avec le développement de cellules T *de novo*, comme le montre l'analyse des TRECs. En conclusion, ces Tregs seraient des nouveaux émigrants thymiques et joueraient un rôle crucial dans la prévention de la GVHD aiguë. En revanche, des résultats très contradictoires ont été publiés sur le rôle des Tregs dans la GVHD chronique.

Des techniques d'expansion *in vitro* des Tregs se développent et plusieurs groupes initient des essais cliniques (Bluestone, 2005). Par exemple, l'équipe de Blazar propose un essai clinique utilisant des Tregs naturels après expansion *ex vivo* avec des anticorps monoclonaux anti-CD3 et anti-CD28 en présence d'IL2. Ces Tregs sont co-injectés au moment de l'allogreffe de CSH. Le succès de cette approche résiderait dans la fréquence élevée de précurseurs de Tregs naturels spécifiques d'alloantigènes dans la population polyclonale de Tregs, qui représente 10% de la population totale. Cet essai est actuellement en cours. Une autre approche consiste à utiliser les Tregs inductibles Tr1. En effet, il a pu être montré chez des patients allogreffés en situation partiellement compatible pour SCID et ne présentant pas de GVHD en l'absence de tout traitement immunosuppresseur, que des taux élevés d'IL10 étaient retrouvés dans le sang périphérique. De plus, une proportion importante des lymphocytes T dérivés du donneur qui étaient spécifiques des antigènes HLA du receveur produisait des taux élevés d'IL10 (Bachetta *et al*, 1994 ; Baker *et al*, 1999). L'équipe de Roncarolo s'intéresse plus particulièrement à induire *in vitro* la production de Tr1 capables de produire de l'IL10 et du TGF β , de faibles taux d'IFN γ , pas d'IL2 ni d'IL4 et exerçant une action suppressive sur les réponses T par l'intermédiaire de l'IL10 et du TGF β . La production de ces cellules Tr1 peut être obtenue par l'utilisation de stimulations répétées de cellules T CD4⁺ naïves isolées du sang périphérique par des cellules dendritiques immatures. Ces cellules dendritiques, dites

tolérogènes ont un phénotype immature particulier, caractérisé par une haute expression de CD45RB, induit par l'IL10 et sécrètent elles-mêmes des taux élevés d'IL10. Elles sont capables d'induire la génération de cellules Tr1 spécifiques d'antigène, à la fois *in vivo* et *in vitro* (Wakkach *et al*, 2003).

Il semble que les Tregs aient un rôle important à jouer dans la prévention et/ou le traitement de la GVHD aiguë, comme le montrent les résultats obtenus dans les études pré-cliniques. Cependant, il reste encore plusieurs points à éclaircir ou à confirmer, notamment, la population la plus appropriée de lymphocytes Tregs à utiliser, l'impact de l'utilisation des Tregs sur la reconstitution immunitaire et sur l'effet GVL et le nombre de cellules à utiliser afin d'obtenir un effet clinique durable.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de montrer dans le contexte de 3 déficits de l'immunité cellulaire, ce que les développements récents de la thérapie cellulaire ont permis d'apporter en terme de bénéfice dans le traitement de ces pathologies. Ces progrès thérapeutiques sont également liés à une meilleure maîtrise des caractéristiques des déficits immunitaires et de leurs complications.

Nous avons illustré dans ce travail que les complications majeures des greffes de cellules allogéniques étaient la GVHD et les infections post-greffes liées à l'immunodépression des patients et que les efforts se concentraient actuellement sur le développement de stratégies de prévention de la GVHD préservant le capital anti-infectieux du greffon. Cependant, un grand nombre de patients ne développent pas de GVHD ni d'infection après allogreffe de CSH. De plus, parmi les patients qui présentent une augmentation d'une charge virale, tous ne nécessitent pas un traitement curatif ; en effet, certains seront suffisamment immunocompétents pour maîtriser l'infection. Il est de ce fait indispensable de connaître parfaitement l'état immunitaire des patients après allogreffes de CSH afin de ne leur administrer le traitement médicamenteux ou de Thérapie cellulaire (lymphocytes T cytotoxiques anti-infectieux par exemple) que si nécessaire.

Ainsi, un monitoring régulier des principales charges virales et fongiques avec des techniques performantes de Biologie moléculaire, lorsqu'elles existent, doit être réalisé chez tous les patients après allogreffe de CSH. Parallèlement, un suivi de la reconstitution immunitaire cellulaire quantitatif et fonctionnel doit être réalisé. Des études complémentaires de la réponse immunitaire fonctionnelle spécifique d'agents pathogènes viraux (EBV, CMV, ou ADV par exemple) ou fongiques (*aspergillus*) par technique ELISPOT par exemple, peuvent être proposées lorsqu'une augmentation de la charge virale est constatée sur deux prélèvements successifs.

Il apparaît ici clairement qu'une structure forte d'Immunologie cellulaire se donnant les moyens de développer des tests spécifiques pour le diagnostic des déficits immunitaires et disposant d'outils permettant de contribuer en temps réel à l'étude de la reconstitution immunitaire spécifique est une des clés de voûte d'une structure impliquée dans la prise en charge et le traitement des déficits immunitaires héréditaires. Cette structure émerge au CHU de Nancy, notamment dans le cadre de l'UTCT.

De plus, l'intégration de cette structure dans un réseau national de laboratoires impliqués dans les mêmes thématiques permet d'optimiser le travail de chacun. Ce réseau national voit actuellement le jour dans le cadre du CEREDIH (Centre de Référence des

Déficits Immunitaires Héréditaires) sous la responsabilité du Pr Alain Fischer et permettra de parvenir plus rapidement au diagnostic de déficit immunitaire.

La création d'un réseau similaire de laboratoires travaillant à l'étude de la reconstitution immunitaire après allogreffe de CSH serait également bénéfique. Ce dernier pourrait d'ailleurs être intégré au CEREDIH puisque dans la majorité des cas, ce sont les mêmes laboratoires qui sont impliqués dans ces deux thématiques.

BIBLIOGRAPHIE

Aggarwal S. and Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell response. *Blood*, 2005, 105, 1815-11822.

Al Tamemi S., Mazer B., Mitchell D., Albuquerque P., Duncan A., McCusker C., Jabado N. Complete DiGeorge anomaly in the absence of neonatal hypocalcemia and velofacial and cardiac defects. *Pediatrics*. 2006; 116.

Aldrich RA., Steinberg AG., Campbell DC. Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics*. 1954;13:133-138.

Amrolia P., Gaspar H., Hassan A., Webb D., Jones A., Sturt N., Mieli-Vergani G., Pagliuca A., Mufti G., Hadzic N., Davies G., Veys P. Nonmyeloablative stem cell transplantation for congenital immunodeficiencies. *Blood*. 2000;96:1239-1246.

Amrolia P., Muccioli-Casader G., Huls H., Adams S., Duret A., Gee A., Yvon E., Weiss H., Cobbold M., Gaspar B., Rooney C., Kuehnle I., Ghetie V., Schindler J., Krance R., Heslop H., Veyx P., Vitetta E., Brenner M. Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *Blood*. 2006;108:1797-1808.

Ancliff PJ, Blundell MP, Cory GO, Calle Y, Worth A, Kempinski H, Burns S, Jones GE, Sinclair J, Kinnon C, Hann IM, Gale RE, Linch DC, Thrasher AJ. Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood*. 2006 ;108:2182-2189.

André-Schmutz I., Le Deist F., Hacein-Bey S., Vitetta E., Schindler J., Pellier I., Quartier P., Chedeville G., Luby JM., Martinache C., Hamel Y., Vilmer E., Casanova JL., Blanche S., Audat F., Ghetie V., Caillat-Zucman S., Radford-Weiss I., Buffet R., Fischer A and Cavazzana-Calvo M. Preventing GVHD while improving immune reconstitution in hematopoietic stem cell transplantation by infusion of donor T lymphocytes after ex vivo depletion of CD25+ alloreactive cells with an immunotoxin. *Lancet*. 2002;360:130-7.

Andreu N, Matamoros N, Escudero A, Fillat C. Two novel mutations identified in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene cause Wiskott-Aldrich syndrome and thrombocytopenia. *Int J Mol Med*. 2007;19:777-782.

Badour K., Zhang J., Shi F., Leng Y., Collins M., Siminovitch KA. Fyn and PTP-PEST mediated regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) tyrosine phosphorylation is required for coupling T cell antigen receptor engagement to WASp effector function and T cell activation. *J Exp Med*. 2004;199:99-112.

Bacchetta R., Bigler M., Touraine JL. *et al.* High levels of IL10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med*. 1994;179:493-502.

Baker KS., Roncarolo MG., Gianfrani C, *et al.* High spontaneous IL10 production in unrelated bone marrow transplant recipients is associated with fewer transplant-related complications and early deaths. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23:1123-1129.

Bastian J., Law S., Vogler L. et al. Prediction of persistent immunodeficiency in the DiGeorge anomaly. *J Pediatr.* 1989; 115:391-396.

Bhushan A., Covey LR. CD40 : CD40L interactions in X-linked and non X-linked hyper IgM syndromes. *Immunol Research* 2001;24/3 : 311-324.

Binder V, Albert MH, Kabus M, Bertone M, Meindl A, Belohradsky BH. The genotype of the original Wiskott phenotype. *N Engl J Med.* 2006;355:1790-3.

Bluestone J. Regular T-cell therapy: is it ready for the clinic? *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5:343-349.

Bordigoni P., Auburtin B., Carret A., Schuhmacher A., Humbert J., LeDeist F., Sommelet D. Bone Marrow transplantation as treatment for X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Bone Marrow transplantation. 1998;22:1111-1114.

Borzy M., Hong R., Horowitz S, et al. Fatal lymphoma after transplantation of cultured thymus in children with combined immunodeficiency disease. *N Eng J Med.* 1979;301:565-568.

Borzy M., Ridgway D., Noya F., Shearer W. Successful Bone Marrow Transplantation with split lymphoid chimerism in DiGeorge syndrome. *J Clin Immunol*;1989;9:386-392.

Bowers D., Lederman H., Sicherer S., Winkelstein J., Chen A. Immune constitution of complete DiGeorge anomaly by transplantation of unmobilised blood mononuclear cells. *The Lancet.* 1998;352:1983-1984.

Brochstein J., Gillio A., Ruggiero M., Kernan N., Emanuel D., Laver J., Small T., O'Reilly R. Marrow transplantation from human leucocyte antigen-identical or haploidentical donors for correction of Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Pediatr.* 1991;119:907-912.

Buckley R. Bone Marrow reconstitution in primary immunodeficiency. In: Rich RR (ed). *Clinical Immunology. Principles and practice.* Mosby: New York. 1994, pp 1823-1826.

Buckley R. Transplantation. In: Stiehm ER (ed). *Immunologic disorders in infants and children*, 4th edn. WB Saunders: Philadelphia, 1996, pp1014-1058.

Bums S., Cory GO., Vainchenker W., Thrasher AJ. Mechanisms of WASp-mediated hematologic and immunologic disease. *Blood* 2004, 104:3454-3462.

Cancrini C., Romiti M., Finocchi A., Di Cesare S., Ciaffi P., Capponi C., Pahwa S., Rossi P. Post-natal ontogenesis of the T-cell receptor CD4 and CD8 V β repertoire and immune function in children with DiGeorge syndrome. *J Clin Immunol.* 2005;25:265-274.

Chinen J., Rosenblatt H., O'Brian Smith E., Shearer W., Noroski L. Long term assessment of T-cell populations in DiGeorge syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:573-579.

Collard H., Boeck A., Laughlin T., Watson T., Schiff S., Hale L., Market L. Possible extrathymic development of Nonfunctionnal T cells in a patient with Complete DiGeorge Syndrome. *Clinical Immunology*. 1999;91(2):156-162.

Conley M., Saragoussi D., Notarangelo L., Etzioni A., Casnaova JL. An international study examining therapeutic options used in treatment of Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Immunol*. 2003;109:272-277.

Cooper MD., Chae HP., Lowman JT., Krivit W., Good RA. Wiskott Aldrich syndrome : an immunologic deficiency disease involving the afferent limb of immunity. *Am J Med*. 1968;44:499-513.

Cotelingam JD., Witebsky FG., Hsu SM., et al. Malignant lymphoma in patients with the Wiskott Aldrich syndrome. *Cancer invest*. 1985;3:515-522.

De Saint Basile G, Tabone MD, Durandy A. CD40 ligand expression deficiency in a female carrier of the X-linked hyper-IgM syndrome as a result of X chromosome lyonization. *Eur J Immunol*. 1999;29:367-373.

Deans R.J., Moseley A.M. Mesenchymal stem cells :biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000 ; 28 : 875-884.

Derry JM., Ochs HD., Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 1994, 78:635-644.

Devriendt K., Kim AS., Mathijs G., et al. Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet*. 2001;27:313-317.

Di George AM, Lischner HW, Dacou C., Arey JB. Absence of the thymus. *Lancet*, 1967;1(7504): 1887.

Dictor M., Fasth A., Olling S. Abnormal B-cell proliferation associated with combined immunodeficiency, cytomegalovirus, and culture thymus graft. *Am J Clin Pathol*. 1984;82:487-490.

Doffinger R., Smahi A., Bessia C., Geissmann F., Feinberg J., Durandy A., Bodemer C., Kenwrick S., Dupuis-Girod S., Blanche S., et al. X-linked anhydrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF- κ B signaling. *Nat Genet*. 2001; 27 : 277-285.

Duplantier J., Seyama K., Day N., Hitchcock R., Nelson R., Ochs H., Haraguchi S., Klemperer M., Good R. Immunologic reconstitution following bone marrow transplantation for X-linked hyper IgM syndrome. *Clin Immunol*. 2001;98:313-318.

Dupré L., Marangoni F., Scramuzza S., Trifari S., Hernandez R., Aiuti A., Naldini L., Roncarolo M. Efficacy of Gene Therapy for Wiskott Aldrich Syndrome using WAS promoter/cDBA-containing lentiviral vector and Non lethal irradiation. *Human Gene Therapy*. 2006;17:303-313.

Dupuis-Girod S., Medioni J., Haddad E., et al. Auto-immunity in Wiskott-Aldrich syndrome: risk factors, clinical features, and outcome in a single center cohort of 55 patients. *Pediatrics*. 2003;111:e622-e627.

Dupuis-Girod S., Cancrini C., LeDeist F., Palma P., Bodemer C., Puel A., Livadiotti S., Picard C., Bossuyt X., Rossi P., Fischer A. Casanova JL. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a child who had anhydrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Pediatrics* 2006;118:e205-e211.

Durandy A., Honjo T. Human genetic defects in class-switch recombination (hyper-IgM syndromes). *Curr Opin Immunol* 2001, 13:543-548.

Durandy A., Revy P., Fischer A. Hyper-immunoglobulin –M syndromes caused by an intrinsic B cell defect. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003;3:421-425.

Edelmann L., Pandita RK., Spiteri E., Funke B., Goldberg R., Palanisamy N., Chaganti RS. Magenis E., Shprintzen R., Morrow B.E. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Human molecular genetics*. 1999;8:1157-1167.

Fagarasan S. Honjo T. T-independent immune response: new aspects of B-cell biology. *Science* 2000, 290: 89-92.

Fasth A. Bone marrow transplantation for hyper IgM syndrome. *Immunodeficiency*. 1993;4:323.

Ferrari S, Giliani S, Insalaco A, Al-Ghonaum A, Soresina AR, Loubser M, Avanzini MA, Marconi M, Badolato R, Ugazio AG, Levy Y, Catalan N, Durandy A, Tbakhi A, Notarangelo LD, Plebani A. Mutations of CD40 gene cause a novel autosomal recessive form of hyper IgM (HIGM3). *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12614-12619.

Filipovitch A., Stone J., Tomany S., Ireland M., Kollman C., Peltz J., Casper J., Cowan M., Edwards J., Fasth A., Gale R., Junker A., Kamani N., Loechelt B., Pietryga D., Ringden O., Vowels M., Hegland J., Williams A., Klein J., Sobocinski K., Rowlings P., Horowitz M. Impact of donor type on outcome of bone marrow transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome : collaborative study of the International bone marrow transplant registry and the National Marrow donor program. *Blood*. 2001;97:1598-1603.

Gennery A., Khawaja K., Veys P., Bredius R., Notarangelo L., Mazzolari E., Fischer A., Landais P., Cavazzana-Calvo M., Friedrich W., Fasth A., Wulfraat N., Matthes Martin S., Bensoussan D., Bordigoni P., Lange A., Pagliuca A., Andolina M., Cant A., Davies G. Treatment of CD40 Ligand deficiency by hematopoietic stem cell transplantation: a survey of the European experience, 1993-2002. *Blood*. 2004;103:1152-1157.

Gennery AR., Barge D., O'Sullivan JJ. et al. Antibody deficiency and autoimmunity in 22q11.2 deletion syndrome. *Arch Dis Child*. 2002;86:422-425.

Goldsobel A., Haas A., Stiehm R. Bone Marrow transplantation in DiGeorge syndrome. *J Pediatr*; 1987; 111:40-44.

Golsteyn RM., Arpin M., Friederich E., Louvard D. Le protéines du cytosquelette d'actine : bien placées pour la mobilité. Médecine Sciences, 2000 ;16 :722-731.

Greer WL., Higgins E., Sutherland DR., Novogrodsky A., Brochausen I., Peacocke M., Rubin LA., Baker M., Dennis JW., Siminovitch KA. Altered expression of leucocyte sialoglycoprotein in Wiskott Aldrich syndrome is associated with a specific defect in O-glycosylation. Biochem Cell Biol. 1989;67:503-509.

Haddad E., Zugara J., Louache F., Debili N., Crouin C., Schwartz K., Fischer A., Vainchenker W., Bertoglio J. The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF1-induced T-lymphocyte. Blood, 2001;97:33-38.

Hadzic N., Pagliuca A., Rela M., Portmann B., Jones A., Veys P., Heaton N., Mufi G., Mieli-Vergani G. Correction of the hyper IgM syndrome after Liver and Bone Marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;342:320-324.

Hess AD. Modulation of graft versus Host disease: role of regulatory T lymphocytes. Biol Blood Marrow Transplant. 2006; 12:13-21.

Hoenig M., Schultz A., Schuetz C., Debatin K., Friedrich W. Treatment of Complete DiGeorge Syndrome by repeat transfusions of Blood lymphocytes from an HLA identical sibling donor. ASH annual meeting Abstracts 2004; 104:1332.

Hollenbaugh D., Grosmaire LS., Kullas CD., Chalupny NJ., Braesch AS., Noelle RJ., Stamenkovic I., Ledbetter JA., Aruffo A. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor : expression of a soluble form of gp39 with B-cell co-stimulatory activity. EMBO J 1992;11 : 4313-

Hongeng S., Pakakasama S., Hathirat P., Chaisiripoomkere W., Ungkanont A. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in a Wiskott Aldrich syndrome patient. Bone Marrow transplantation. 1999;24:445-446.

Honjo T., Kinoshita K., Muramatsu M. Molecular mechanism of class switch recombination : linkage with somatic hypermutation. Ann. Rev. Immunol. 2002; 20:165-196

Imai K., Slupphaug G, Lee WI, Revy P, Nonoyama S, Catalan N, Yel L, Forveille M, Kavli B, Krokan HE, Ochs HD, Fischer A, Durandy A. Human Uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. Nature Immunol. 2003;4:1023-1028.(a)

Imai K., Catalan N., Plebani A., Marodi L., Sanal O., Kumaki S., Nagendran V., Wood P., Glastre C., Sarrot-Reynaud F., Hermine O., Forveille M., Revy P., Fischer A., Durandy A. Hyper-IgM syndrome type 4 with B-lymphocyte intrinsic selective deficiency in immunoglobulin class-switch recombination. J Clin Invest 2003;112:136-142. (b)

Imai K., Morio T., Zhu Y., Jin Y., Itoh S., Kajiwarra M., Yata J., Mizutani S., Ochs HD., Nonoyama S. Clinical course of patients with *WASP* gene mutations. Blood. 2004;103:456-464.

Imai K., Zhu Y., Revy P., Morio T., Mitzutani S., Fischer A., Nonoyama S., Durandy A. Analysis of class switch recombination and somatic hypermutation in patients affected with autosomal dominant hyper-IgM syndrome type 2. *Clin Immunol.* 2005;115:277-285.

Imai K., Shimadzu M., Kubota T., Morio T., Matsunaga T., Park Y., Yoshioka A., Nonoyama S. Female hyper IgM syndrome type 1 with a chromosomal translocation disrupting CD40LG. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762:335-340.

Jacobsohn D., Emerick K., Scholl P., Melin-Aldana H., O’Gorman M., Duerst R., Kletzel M. Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplant for X-linked Hyper IgM syndrome with cholangiopathy. *Pediatrics.* 2004;113:122-127.

Jain A., Ma CA, Liu S., Brown M., Cohen J., Strober W. Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohydrotic ectodermal dysplasia. *Nat Immunol* 2001;2 : 223-228.

Jain A., Ma CA., Lopez-Granados E., Means G., Brady W., Orange J., Liu S., Holland S., Derry J. Specific NEMO mutations impair CD40-mediated c-Rel activation and B-cell terminal differentiation. . *J Clin Invest* 2004;114:1593-1602.

Janda A., Sedlacek P., Mejstrikova E., Zdrahalova K., Hrusak O., Kalina T., Sieglöva A., Zizkova H., Formankova R., Keslova P., Hubacek P., Sediva A., Bartunkova J., Dlask K., Stary J. Unrelated partially matched lymphocyte infusions in a patient with complete DiGeorge/CHARGE syndrome. *J Pediatr Transplant.* 2007, 11:441-447.

Jawad AF., McDonald-McGinn DM., Zackai E., Sullivan KE. Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *J Pediatr.* 2001;139:715-723.

Jin Y., Mazza C., Christie J., Giliani S., Fiorini M., Malla P., Gandellini F., Stewart D., Zhu Q., Nelson D., Notarangelo L., Ochs H. Mutations of the Wiskott Aldrich Syndrom protein (WASp): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood.* 2004;104 : 4010-4019.

Junker AK., Driscoll DA. Humoral immunity in DiGeorge syndrome. *J Pediatr.* 1995;127:231-237.

Kato T., Tsuge I., Inaba J., Kato K., Matsuyama T., Kojima S. Successful bone marrow transplantation in a child with X-linked hyper-IgM syndrome. *Bone Marrow transplantation.* 1999;23:1081-1083.

Kawai S., Sasahara Y., Minegishi M., Tsuchiya S., Fujie H., Ohashio Y., Kumaki S., Konno T. Immunological reconstitution by allogeneic bone marrow transplantation in a child with the X-linked hyper IgM syndrome. *Eur J Pediatr.* 1999; 158:394-397.

Khawaja K., Gennery A., Flood T., Abinum M., Cant A. Bone Marrow transplantation for CD40Lignad deficiency : a single centre experience. *Arch Dis Child.* 2001;84:508-511.

Kim HJ, Yoo EH, Ki CS, Yoo GH, Koo HH, Kim JW, Kim SH. A novel mutation W252X in the WAS gene in a Korean patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Int J Hematol.*

2006;83:426-428.

Knutsen A., Steffen M., Wassmer K., Wall D. Umbilical cord blood transplantation in Wiskott Aldrich syndrome. *J Pediatr.* 2003;142:519-523.

Kobayashi R, Ariga T, Nonoyama S, Kanegane H, Tsuchiya S, Morio T, Yabe H, Nagatoshi Y, Kawa K, Tabuchi K, Tsuchida M, Miyawaki T, Kato S. Outcome in patients with Wiskott-Aldrich syndrome following stem cell transplantation: an analysis of 57 patients in Japan. *Br J Haematol.* 2006;135:362-366.

Ku CL, Yang K., Bustamante J., Puel A., Von Bernuth H., Santos O., Lawrence T., Chang H., Al-Mousa H., Picard C., Casanova JL. Inherited disorders of human Toll-like receptor signalling: immunological implications. *Immunological reviews* 2005;203:10-20.

Kutukculer N., Moratto D., Aydinok Y., Lougaris V., Aksoylar S., Plebani A. et al. Disseminated *Cryptosporidium* infection in an infant with hyper IgM syndrome caused by CD40 deficiency. *J Pediatr* 2003;142:194-196.

Latger-Cannard V, Salignac S, Salmon A, Mansuy L, de Maistre E, Botte C, Bordigoni P, Schlegel N, Lecompte T. [Thrombocytopenia: clinicobiologic validation and classification] *Ann Biol Clin (Paris).* 2005;63:599-610.

Lazarus HM., Koc ON., Devine SM., Curtin P., Maziarz RT., Holland HK., Shpall EJ., McCarthy P., Atkinson K., Cooper BW. Et al. Co-transplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in haematological malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11:389-398.

Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B., Götherström C., Hassan M., Uzunel M., Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004;363:1439-1441.

Le Blanc K., Ringden O. Mesenchymal Stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18:586-591.

Lemathieu V., Gastier JM., Francke U. Novel mutations in Wiskott-Aldrich syndrome protein gene and their effects on transcriptional, translational, and clinical phenotypes. *Hum Mutat.* 1997;14:54-66.

Leone V., Tommasini A., Andolina M., Runti G., De Vonderweid U., Campello C., Notarangelo L., Ventura A. Elective bone marrow transplantation in a child with X-linked Hyper IgM syndrome presenting with acute respiratory distress syndrome. *Bone Marrow Transplantation.* 2002;30:49-52.

Levy J., Espanol-Boren T., Thomas C., Fischer A., Tovo P, Bordigoni P., Resnick I, Fasth A., Baer M., Gomez L., Sanders EAM., Tabone MD., Pantaz D., Etzioni A., Monifo V., Abinun M., Hammerström L., Abrabamsen T., Jones A., Finn A., Klemola T., De-Vries E., Sanal O., Peitsch MC., Notarangelo LD. Clinical spectrum of X-linked Hyper-IgM syndrome. *J. Pediatr* 1997;131:44-

Lindsay EA. Chromosomal microdeletions : dissecting del22q11 syndrome. *Nat Rev Genet*. 2001; 2(11):858-868.

Longhurst H., Taussig D., Haque T., Syndercombe-Court D., Cavenagh J., Edgar D., Hlebert M., Non-myeloablative bone marrow transplantation in an adult with Wiskott-Aldrich syndrome. *British J. Haematol*. 2002;116:497-499

Maillard MH, Cotta-de-Almeida V, Takeshima F, Nguyen DD, Michetti P, Nagler C, Bhan AK, Snapper SB. The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *J Exp Med*. 2007;204:381-391.

Marangoni F, Trifari S, Scaramuzza S, Panaroni C, Martino S, Notarangelo LD, Baz Z, Metin A, Cattaneo F, Villa A, Aiuti A, Battaglia M, Roncarolo MG, Dupre L. WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. *J Exp Med*. 2007;204:369-380.

Markert L., Boeck A., Hale L., Kloster A., McLaughlin T., Batchrova M., Doueck D., Koup R., Kostyu D., Ward F., Rice H., Mahaffey S. Transplantation of thymus tissue in complete DiGeorge syndrome. *N Eng J Med*. 1999;341:1180-1189.

Markert L., Kostyu D., Ward F., McLaughlin T., Watson T., Buckley R., Schiff S., Ungerleider R., Gaynor J., Oldham K., Mahaffey S., Ballow M; Driscoll A., Hale L., Haynes B. Successful formation of e chimeric human thymus allograft following transplantation of cultured postnatal human thymus. *J. Immunol*. 1997;158:998-1005.

Markert L., Sarzotti M., Ozaki D., Sempowski G., Rhein M., Hale L., Le Deist F., Alexieff M., Li J., Hauser E., Haynes B., Rice H., Skinner M., Mahaffey S., Jagers J., Stein L., Mill M. Thymus transplantation in complete DiGeorge syndrome: immunologic and safety evaluations in 12 patients. *Blood*. 2003;102:1121-1130.

Markert L., Alexieff M., Sarzotti M., Ozaki D., Devlin B., Sedlak D., Sempowski G., Hale L., Rice H., Mahaffey S., Skinner M. Postnatal thymus transplantation with immunosuppression as treatment for DiGeorge syndrome. *Blood*. 2004;104:2574-2581.

Markert L., Alexieff M., Sarzotti M., Ozaki D., Devlin B., Sempowski G., Rhein M., Szabolcs P., Hale L., Buckley R., Coyne K., Rice H., Mahaffey S., Skinner M. Complete DiGeorge syndrome : Development of rash, lymphadenopathy, and oligoclonal T cells in 5 cases. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:734-741.

Markert L., Devlin B., Alexieff M., Li J., McCarthy E., Gupton S., Chinn I., Hale L., Kepler T., He M., Sarzotti M., Skinner M., Rice H., Hoehner J. Review of 54 patients with complete DiGeorge anomaly enrolled in protocols for thymus transplantation: outcome of 44 consecutive transplants. *Blood*. 2007;109:4539-4547.

Martin F., Kearney JF. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B-cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev*. 2000, 175:70-79.

Martinic MM., Rulicke T., Althage A et al. Efficient T cell repertoire selection in tetraparental chimeric mice independent of thymic epithelial MHC. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(4):1851-1866.

Maysumoto T., Amamoto N., Kondoh T., Nakayama M., Takayanagi T., Tsuji Y. Complete-type DiGeorge syndrome treated by bone marrow transplantation. Bone Marrow transplantation. 1998; 22:927-930.

Molina JJ., Sancho J., Terhorst C., Rosen FS., Remold-O'Donnell E. T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses. J. Immunol. 1993;151:4383-4390.

Mullen C., Anderson K., Blaese R. Splenectomy and/or Bone Marrow Transplantation in the management of the Wiskott-Aldrich Syndrome: Long-Term Follow-up of 62 cases. Blood. 1993;82:2961-2968.

Muller W., Peter H., Kallfelz H., Franz A., Rieger C. The DiGeorge sequence. II. Immunologic findings in partial and complete forms of the disorder. Eur J Pediatr. 1989;149: 96-103.

Muller W., Peter H., Wilken M., Jüppner H., Kallfelz H., Krohn H., Miller K., Rieger C. The DiGeorge sequence. I. Clinical evaluation and course of partial and complete forms of the syndrome. Eur J Pediatr. 1988;147: 496-502.

Nakamura K., Akahoshi T., Yoshii A., Kashiwasaki S. Generation of anti-NZB red blood cell antibody-forming plasma cells from bone marrow cultures of syngeneic and allogeneic mice: functional modulation of helper T-cell subsets in autosensitization. Immunology. 1983;48:579-586.

Nakamura K., Kitani A., Strober W. Cell contact-dependant immunosuppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . J Exp Med 2001;194:629-644.

Noronha S., Hardy S., Sinclair J., Blundell M., Strid J., Schultz O., Zwirner J., Jones G., Katz D., Kinnon C., Thrasher A. Impaired dendritic-cell homing in vivo in the absence of Wiskott-Aldrich syndrome protein. Blood 2005;105:1590-1597.

Notarangelo LD., Lanzi G., Peron S., Durandy A. Defects of class-switch recombination. J. Allergy Clin Immunol. 2006;117:855-864.

Notarangelo LD., Peitsch MC. CD40L base: a database of CD40L gene mutations causing X linked hyper IgM syndrome. Immunol Today 1996;17:511-516

Ochs H. The Wiskott Aldrich syndrome. Seminars in Hematology. 1998;35:332-345.

Ochs H., Thrasher A. The Wiskott Aldrich syndrome. J allergy and clin immunol. 2006;117:725-738.

Ohtsuka Y., Shimizu T., Nishizawa K., Ohtaki R., Someya T., Noguchi A., Shimura N., Kim H., Sugimoto H., Fujita H., Morio T., Yamashiro Y. Successful engraftment and decrease of cytomegalovirus load after cord blood stem cell transplantation in a patient with DiGeorge syndrome. Eur J Pediatr. 2004; 163:747-748.

Orange JS, Jain A., Ballas ZK, Schneider L., Geha R, Bonila F. The presentation and natural history of immunodeficiency caused by nuclear factor κ B essential modulator mutation. *J allergy and clin immunol.* 2004;113:725-733.

Orstavik K., Kristiansen M., Knudsen G., Storhaug K., Vege A., Eiklid K., Abrahamsen T., Smahi A., Steen-Johnsen J. Novel splicing mutation in the NEMO (IKK-gamma) gene with severe immunodeficiency and heterogeneity of X-chromosome inactivation. *Am J Med Genet A.* 2006;140:31-39.

Ozsahin H., LeDeist F., Benkerrou M., Cavazzana Calvo M., Gomez L., Griscelli C., Blanche S., Fischer A. Bone marrow transplantation in 26 patients with Wiskott-Aldrich syndrome from a single center. *J. Pediatr.* 1996;129: 239-244.

Ozsahin H., Cavazzana-Calvo M., Notarangelo L., Schulz A., Thrasher A., Mazzolari E., Slatter M., Le Deist F., Blanche S., Veys P., Fasth A., Bredius R., Sedlacek P., Wulffraat N., Ortega J., Heilmann C., O'Meara A., Wachowiak J., Kalwak K., Matthes-Martin S., Gungor T., Ikinogullari A., Landais P., Cant A., Friedrich W., Fischer A. Long term outcome following stem-cell transplantation in Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the European Society for Immunodeficiencies and European group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* (soumis, en revision positive).

Pai SY, DeMartis D, Forino C, Cavagnini S, Lanfranchi A, Giliani S, Moratto D, Mazza C, Porta F, Imberti L, Notarangelo LD, Mazzolari E. Stem cell transplantation for the Wiskott-Aldrich syndrome: a single-center experience confirms efficacy of matched unrelated donor transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006;38:671-679.

Pausi S., Lu L., McCarthy N., Cantor H., Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:10398-10403.

Pierdominici M., Mazzetta F., Caprini E., Marziali M., Digilio M., Marino B., Aiuti A., Amati F., Russo G., Novelli G., Pandolfi F., Luzi G., Giovannetti A. Biased T-cell receptor repertoires in patients with chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin Exp Immunol.* 2003;132:323-331.

Piliero L., Sanford A., McDonald-McGinn D., Zackai E., Sullivan K. T-cell homeostasis in humans with thymic hypoplasia due to chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Blood.* 2004;103:1020-1025.

Pirovano S., Mazzolari E., Pasic S., Albertini A., Notarangelo L., Imberti L. Impaired thymic output and restricted T-cell repertoire in two infants with immunodeficiency and early-onset generalized dermatitis. *Immunology Letters.* 2003;86:93-97.

Proust A, Guillet B, Picard C, de Saint Basile G, Pondarre C, Tamary H, Dreyfus M, Tchernia G, Fischer A, Delaunay J. Detection of 28 novel mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia based on multiplex PCR. *Blood Cells Mol Dis.* 2007;39:102-106.

Quartier P., Bustamante J., Sanal O., Plebani A., Debré M., Deville A., Litzman J., Levy J., Feraud JP., Lane P., Horneff G., Aksu G., Yalçin I., Davies G., Tezcan I., Ersoy F., Catalan N., Imai K., Fischer A., Durandy A. Clinical, immunologic and genetic analysis of 29 patients

with autosomal recessive hyperIgM syndrome due to Activation-induced Cytidine deaminase deficiency. Clin Immunol. 2004; 110:22-29.

Rada et al. Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutations perturbed in UNG-deficient mice. Curr. Biol. 2002;12:1748-1755

Ramesh N., Anton IM., Hartwig JH., Geha RS. WIP, a protein associated with Wiskott Aldrich syndrome protein, induced actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:14671-14676.

Reece E., Gartner J., Seemayer T., Joncas J., Pagano J. Epstein Barr virus in malignant lymphoproliferative disorder of B-cells occurring after thymic epithelial transplantation for combined immunodeficiency. Cancer Res. 1981;41:4243-4247.

Remond O'Donnell E., Kenny DM, Parkman R., Cairns L., Savage B., Rosen FS. Characterization of a human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. J Exp Med. 1984;159:1705-1723.

Remond O'Donnell E., Rosen FS., Kenny D. Defects in Wiskott-aldrich syndrome blood cells. Blood. 1996;87:2621-2631.

Revy P., Muto T., Levy Y., Geissmann F., Plebani A., Sanal O., Catalan N., Forveille M., Dufourcq-Lagelouse R., Gennery A., Tezcan I., Ersoy F., Kayserili H., Ugazio A., Brousse N., Muramatsu M., Notarangelo L., Kinoshita K., Honjo T., Fischer A., Durandy A. Activation induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). Cell, 2000, 102: 565-575.

Rice H., Skinner M., Mahaffey S., Oldham K., Ing R., Hale L., Market L. Thymic transplantation for complete DiGeorge syndrome : Medical and surgical considerations. J Ped Surg. 2004;39:1607-1615.

Ringden O., Uzunel M., Rasmusson I., Remberger M., Sundberg B., et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. Transplantation. 2006;91:1390-1397.

Sabri S, Foudi A, Boukour S, Franc B, Charrier S, Jandrot-Perrus M, Farndale RW, Jalil A, Blundell MP, Cramer EM, Louache F, Debili N, Thrasher AJ, Vainchenker W. Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. Blood. 2006;108:134-140.

Schindelhauer D., Weiss M., Hellebrand H, et al. Wiskott Aldrich syndrome: no strict genotype-phenotype correlations but clustering of missense mutations in the amino-terminal part of the WASP gene product. Hum. Genet. 1996;98:68-76.

Scholl P., Gorman M., Pachman L., Haut P., Kletzel M. Correction of neutropenia and hypogammaglobulinemia in X-linked Hyper IgM syndrome by allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplantation. 1998;22:1215-1218.

Schwinger W., Urban C., Lackner H., Kerbl R., Benesch M., Dornbusch H., Sovinz P., Schumm M., Handgretinger R. Unrelated partially matched peripheral blood stem cell

transplantation with highly purified CD34+ cells in a child with Wiskott Aldrich syndrome. Bone Marrow Transplantation. 2000;26:235-237.

Sediva A., Bartunkova J., Zachova R., Polouckova A., Hrusak O., Janda A., Kocarek E., Novotna D., Novotna K., Klein T. Early development of immunity in DiGeorge syndrome. Med Sci Monit. 2005;11(4):CR182-187.

Seyama K, Kira S., Ishidoh K, Souma S., Miyakawa T., Kominami E. Genomic structure and PCR-SSCP analysis of the human CD40 ligand gene: its application to prenatal screening for X-linked hyper IgM syndrome. Hum Genet 1996; 97 : 180-

Seyama K, Nonoyama S., Gangsaas I et al : Mutations of the CD40 ligand gene and its effect on CD40 ligand expression in patients with X-linked hyper IgM syndrome. Blood 1998;92 : 2421-2434.

Shah SS., Lai SY., Ruchelli E et al. Retropharyngeal aberrant thymus. Pediatrics, 2001 ;108(5) : E94.

Siminovitch KA., Greer WL, Novogrodsky A., Axelsson B., Somani AK., Peacocke M. A diagnostic assay for the Wiskott-Aldrich syndrome and its variant forms. J Invest Med. 1995;43:159-169.

Smith CA. Driscoll DA., Emmanuel BS. Et al. Increased prevalence of immunoglobulin A deficiency in patients with the chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). Clin Diagn Lab Immunol. 1998;5:415-417

Snapper SB, Rosen FS., Mizoguchi E., et al. Wiskott Aldrich syndrome protein –deficient mice reveal a role for WASp in T but not B cell activation. Immunity, 1998;9:81-91.

Solomon S., Mielke S., Savani B., Montero A., Wisch L., Childs R., Hensel N., Schindler J., Ghetie V., Leitman S., Mai T., Carter C., Kurlander R., Read E., Vitetta E., Barrett J. Selective depletion of alloreactive donor lymphocytes : a novel method to reduce the severity of graft-versus-host disease in older patients undergoing matched sibling donor stem cell transplantation. Blood, 2005,106:1123-1129.

Spits H. Development of alpha-beta T-cells in the human thymus. Nat Rev Immunol. 2002;2(10):760-772.

Strom T., Gabbard W., Kelly P., Cunningham J., Nienhuis A., Functional correction of T-cells derived from patients with the Wiskott Aldrich syndrome (WAS) by transduction with an oncoretroviral vector encoding the WAS protein. Gene Ther. 2003;10:803-809.

Sullivan E., Mullen CA., Blaese RM., Wilkenstein JA. A multiinstitutional survey of the Wiskott Aldrich syndrome. J Pediatr. 1994; 125:876-885.

Sullivan K. The clinical, immunological, and molecular spectrum of chromosome 22q11.2 deletion syndrome and DiGeorge syndrome. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2004;4:505-512.

Sullivan K., Mc Donald-McGinn D., Driscoll D., Emmanuel B., Zachai E., Jawad A. Longitudinal analysis of lymphocyte function and numbers in the first year of life in chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6:906-911.

Ta VT., Nagaoka H., Catalan N., Durandy A., Fischer A., Imai K., Nonoyama S., Tashiro J., Ikegawa M., Ito S., Kinoshita K., Muramatsu M., Honjo T. .AID mutant analysis indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat. immunol.* 2003;4:843-848.

Thomas C., De Saint Basile G., LeDeist F., Theophile D., Fischer A. Brief report correction of X-linked hyper IgM syndrome by allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1995;333:426-429.

Tsuji Y., Imai K., Kajiwara M., Aoki Y., Isoda T., Tomizawa D., Imai M., Ito S., Maeda H., Minegishi Y., Ohkawa H., Yata J., Sasaki N., Kogawa M., Nagasawa M., Morio T., Nonoyama S., Mizutani S. Hematopoietic stem cell transplantation for 30 patients with primary immunodeficiency disease: 20 years experience of a single team. *Bone Marrow transplantation.* 2006; 37: 469-477.

Uzel G. The range of defects associated with nuclear factor κ B essential modulator. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005;5:513-518.

Villa A., Notarangelo L., Macchi P., et al. X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome are allelic diseases with mutations in the WASP gene. *Nat. Genet.* 1995;9:414-417.
Villa A., Notarangelo LD, DiSanto JP, Macchi PP, Strina D., Frattini A., Lucchini F., Patrosso CM., Giliani S., Mantuano E., Agosti S., Nocera G., Kroczeck RA., Fischer A., Ugazio AG., De Saint Basile G., Vezzoni P. Organization of the human CD40L gene: implications for molecular defects in X chromosome-linked hyper IgM syndrome and prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91 : 2110-

Wakkach A., Fournier N., Brun V., *et al.* Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity.* 2003;18:605-617.

Weller S., Faili A., Garcia C., Braun MC., LeDeist F., De Saint Basile G., Hermine O., Fischer A., Reynaud CA., Weill JC. CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B-cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:1166-1170.

Wengler GS., Notarangelo LD., Berardelli S. et al. High prevalence of nonsense, frameshift, and splice-site mutations in 16 patients with full-blown Wiskott Aldrich syndrome. *Blood.* 1995;86:3648-3654.

Wilkenstein J., Marino M., Ochs H., Fuleihan R., Scholl P., Geha R., et al. The X-linked hyper-IgM syndrome. Clinical and Immunological features of 79 patients. *Medicine.* 2003;18:837-848.

Wiskott A. Familiärer, angeborener Morbus werhoffs? *Monatsschrift Kinderheilkunde.* 1937;68:212-216.

Yamada M., Ohtsu M., Kobayashi I., Kawamura N., Kobayashi K., Ariga T. et al. Flow cytometric analysis of Wiskott Aldrich syndrome (WAS) protein on lymphocytes from WAS patients and their familial carriers. *Blood*. 1999;93:756-757.

Zhang J., Shehabeldin A., Da Cruz LA., et al. Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes. *J Exp Med*. 1999; 190:1329-1342.

Zonana J, Elder ME, Schneider LC, Orlow SJ, Moss C, Golabi M, Shapira SK, Farndon PA, Wara DW, Emmal SA, Ferguson BM. A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO). *Am J Hum Genet*. 2000, 67: 1

ANNEXES

ARTICLE 7:

Frequency of thrombocytopenia and large platelets correlate neither with conotruncal cardiac anomalies nor immunologic features in chromosome 22q11.2 deletion syndrome

Latger Cannard V. Bensoussan D, Gregoire MJ., Marcon F., Cloez JL., Leheup B., Jonveaux P., Lecompte T., Bordigoni P.

European Journal of Pediatrics, 2004, 163:327-328.

Dans le cadre d'une étude prospective réalisée à l'initiative du Dr Latger Cannard du Service d'Hématologie Biologique du CHU de Nancy et à laquelle nous avons collaboré, nous avons analysé sur une période de 4 ans les paramètres plaquettaires, les anomalies cardiaques et les réponses immunitaires de 34 patients avec une délétion 22q11.2. L'exploration de l'immunité cellulaire a été réalisée au sein de l'UTCT.

Nous avons pu observer la présence d'une thrombopénie chez 35 % des patients et la présence de macroplaquettes chez 82% des patients comme cela avait précédemment été rapporté. Cependant, aucune corrélation n'a pu être montrée entre la thrombopénie ou les macroplaquettes et les anomalies cardiaques ou les anomalies immunitaires.

Nous concluons que l'exploration d'une macrothrombopénie devrait inclure une étude moléculaire à la recherche d'une délétion 22q11.2.

***FREQUENCY OF THROMBOCYTOPENIA AND LARGE PLATELETS CORRELATE
NEITHER WITH CONOTRUNCAL CARDIAC ANOMALIES NOR IMMUNOLOGIC
FEATURES IN CHROMOSOME 22Q11.2 DELETION SYNDROME.***

Véronique Latger-Cannard¹, Danièle Bensoussan², Marie-Josée Grégoire³, François Marcon⁴,
Jean-Louis Cloez⁵, Bruno Leheup⁶, Philippe Jonveaux³, Thomas Lecompte¹ and Pierre
Bordigoni⁷

¹ Service d'Hématologie Biologique, CHU Nancy,

² Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, CHU Nancy

³ Laboratoire de Génétique, CHU Nancy,

⁴ Service de Cardiologie Pédiatrique, CHU Nancy,

⁵ Clinique Claude Bernard, CHR Metz,

⁶ Service de Génétique Pédiatrique, CHU Nancy

⁷ Service d'Hématologie Pédiatrique, CHU Nancy,

For correspondance :

Dr Véronique Latger-Cannard

Service d'Hématologie Biologique

CHU Nancy

Avenue du Morvan

54 500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Phone. (33) 03.83.15.37.64

Fax. (33) 03.83.15.37.89

E mail : v.cannard@chu-nancy.fr

We report thrombocytopenia and large platelets in 34 patients with 22q11.2 deletion syndrome. Our report demonstrates the absence of correlation between platelet abnormalities and other phenotypic features such as conotruncal cardiac anomalies or immunodeficiency.

The 22q11.2 deletion syndrome includes a wide spectrum of clinical anomalies, among which are dysmorphic facies, velopharyngeal insufficiency with or without an overt cleft, speech delay, hypoparathyroidism, conotruncal cardiac anomalies and immunodeficiency.

In this prospective study, we analyzed, over a period of 4 years, platelet parameters, cardiac anomalies and immunologic features in 34 patients with a 22q11.2 deletion (median age : 5 years, age range : one month-24 years, 25F/9M).

Platelet counts (H2 Technicon[®], Bayer) indicated thrombocytopenia (platelet count < $150 \times 10^9/L$) in 35% (13/34) of the patients and large platelets (mean platelet volume, MPV > 10 fL and median MPV to 10.6 fL) were found in 82% (28/34). A strong negative correlation between the MPV and the platelet count was noted (correlation coefficient -0.78). These platelet findings were not associated with bleeding tendencies, even during heart surgery. Macrothrombocytopenia in patients with 22q11 deletion constitutes now a well defined feature of the wide spectrum of this syndrome. This link has been first suggested in 1995 by Budarf et al. with a case of Bernard-Soulier syndrome due to a mutation on one chromosome and the typical chromosome 22q11.2 deletion on the other chromosome (4), and was then reported in 1997 by Ryan et al. (5). The gene had been mapped in the critical deletion region of del 22q11 by Carlson et al in 1997(1). Our results are according to Van Geet study (7) which found in 38 patients with velocardiofacial syndrome, an increased platelet size (median MPV to 10.5 fL) with a strong negative correlation (-0.58) between the MPV and platelet

count. Then, Lawrence et al. suggested that the haploinsufficiency of GPIb β , related to hemizygous deletion, may lead to macrothrombocytopenia (4). Finally, Kato et al. recently confirmed hemizygosity for GPIb β by FISH analysis (3). The authors demonstrated that phenotype of patients with 22q11 deletion syndrome, such as large platelets, thrombocytopenia and slightly impaired platelet agglutination to ristocetin, is associated with the decreased membrane expression of GPIb β protein due to hemizygosity.

Associations between the frequency of platelet abnormalities and conotruncal cardiac anomalies or immunodeficiency findings were sought in this patient population.

Ninety one % (31/34) of the population had an identifiable cardiac anomaly. Table Ia shows the absence of correlation between thrombocytopenia or large platelets and any specific cardiac anomaly. Platelet abnormalities were also found in case of normal heart. These results suggest that conotruncal heart anomalies do not contribute to thrombocytopenia according to Kato *et al* (3).

Immunological evaluation was realized according to the scoring system described by Sullivan et al. (6). Among the patients, 91% (31/34) demonstrated immunocompromise of some type (impaired cellular or humoral immunity or both). As illustrated in table Ib, the frequency or severity of each category of immunocompromise were according to Sullivan results (6) and were not correlate with platelet abnormalities.

This study leads to consider chromosome 22q11 deletion syndrome as a new etiology of hereditary giant platelet disorder. In our opinion, exploration of unexplained hereditary macrothrombocytopenia should include a molecular study. This study also demonstrates the lack of correlation between platelet abnormalities and conotruncal cardiac anomalies or immune dysfunction. Consequently, each patient with a deletion of chromosome 22q11.2 should be completely evaluated for both platelet and immunodeficiency.

Acknowledgements: We specially thank Jacqueline Zevnick for reviewing the article

REFERENCES

1. Carlson C., Sirotkin H, Pandita R, Goldberg R, McKie J, Wadey R, Patanjali SR, Weissman SM, Anyane-Yeboa K, Warburton D, Scambler P, Shprintzen R, Kucherlapati R, Morrow BE (1997) Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients. *Am J Human Genet* 61 : 620-629.
2. Jawad A, McDonald-McGinn D, Zackai E, Sullivan K (2001) Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *J Pediatr* 139 : 715-723.
3. Kato T, Kosaka K, Kimura M, Imamura S, Yamada O, Iwai K, Ando M, Joh-o K, Kuroe K, Ohtake A, Takao A, Momma K, Matsuoka R (2003) Thrombocytopenia in patients with 22q11.2 deletion syndrome and its association with glycoprotein Ib β . *Genet Med* 5: 113-119.
4. Lawrence S, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Sullivan K (2003) Thrombocytopenia in patients with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr* 143:277-278.
5. Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M, Aurias A, Raymond FL, Clayton-Smith J, Hatchwell E, McKeown C, Beemer FA, Dallapiccola B, Novelli G, Hurst JA, Ignatius J, Green AJ, Winter RM, Brueton L, Brondum-Nielsen K, Scambler PJ (1997) Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions : a European collaborative study. *J Med Genet* 34:798-804.
6. Sullivan K, Jawad AF, Randall P, Driscoll DA, Emanuel B, McDonald-McGinn D, Zackai E (1998) Lack of correlation between impaired T cell production, immunodeficiency and other phenotypic features in chromosome 22q11.2 deletion syndromes (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin Immunol Immunopath* 86 : 141-146.

7. Van Geet C, Devriendt K, Eyskens B, Vermynen J, Hoylaerts MF (1998) Velocardiofacial syndrome patients with a heterozygous chromosome 22q11 deletion have giant platelets. *Pediatr Res* 44:607-611.

LEGENDES

Table I : Correlation between platelet abnormalities (thrombocytopenia, large platelets) and cardiac anomalies (a) or immunologic findings (b).

Patients with 22q11 deletion (n = 34)	Truncus Arteriosus (n = 2; 6%)	Tetralogy of Fallot (n = 5; 15%)	Atrial septal Defect (n = 3; 9%)	Ventricular septal defect (n = 12; 35%)	Interrupted aortic arch (n = 9; 26%)	Other* (n = 10; 29%)	Normal heart (n = 4; 12%)
Thrombocytopenia (n=13)	1 (50%)	2 (40%)	1 (33%)	4 (33%)	3 (33%)	4 (40%)	1 (25%)
Large platelets (n=28)	1 (50%)	4 (80%)	3 (100%)	11 (92%)	7 (78%)	9 (90%)	4 (100%)

* Includes pulmonary atresia, aortic bicuspidia.

Table Ia

Patients with 22q11 deletion (n = 34)	Impaired T cell production (n = 28; 82%)	Impaired T cell function (n = 10; 29%)	Impaired humoral function (n = 6; 18%)	Severity score ≥ 2 (n = 11; 32%)	Normal (n = 3; 9%)
Thrombocytopenia (n=13)	11 (39%)	4 (40%)	1 (17%)	3 (27%)	1 (33%)
Large platelets (n=28)	25 (89%)	7 (70%)	5 (83%)	8 (73%)	3 (100%)

Table Ib

DEUX ARTICLES COLLABORATIFS SUR UN AUTRE DEFICIT IMMUNITAIRE: LE WHIM Syndrome

ARTICLE 8:

The WHIM syndrome shows a peculiar dysgranulopoiesis myelokathexis

V. Latger Cannard, D. Bensoussan, P. Bordigoni

British Journal of Haematology, 2006, 132 (5), 669

ARTICLE 9:

WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12

K. Balabanian, B. Lagane, JL. Pablos, L. Laurent, T. Planchenault, O. Verola, C. Lebbe, D. Kerob, A. Dupuy, O. Hermine, JF. Nicolas, V. Latger-Cannard, D. Bensoussan, P. Bordigoni, F. Baleux, F. Le Deist, JL. Virelizier, F. Aranzana-Seisdedos and F. Bachelerie .

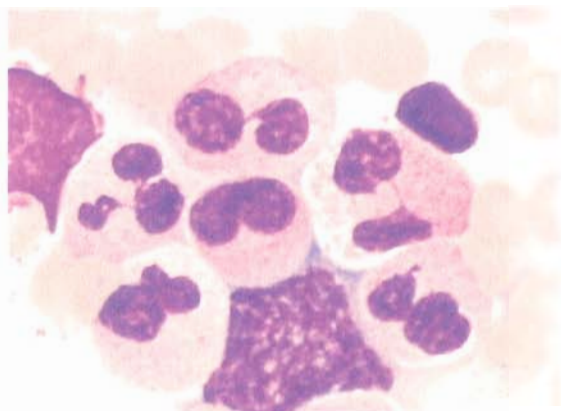
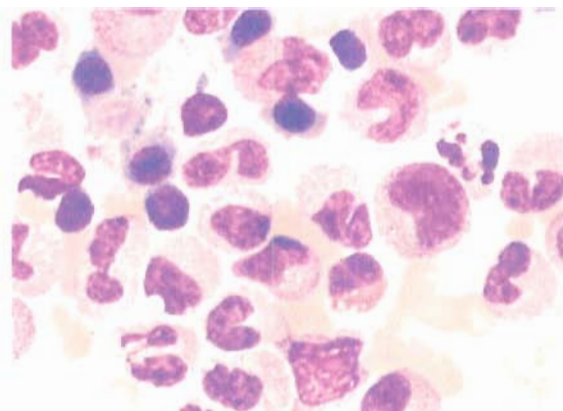
Blood, 2005, 105, 2449-2457

Le WHIM syndrome est un déficit immunitaire rare caractérisé par la présence de verrues (Warts), d'une hypogammaglobulinémie (H), d'infections (I) et d'une myélokathexie (M). Nous avons diagnostiqué tardivement ce syndrome chez un patient de 17 ans présentant depuis l'enfance des infections du tractus respiratoire, des infections herpétiques, des verrues depuis l'âge de 6 ans, d'abord sur les mains puis s'étendant sur les bras, les jambes et les pieds. Le patient a présenté très précocement une pancytopenie. L'observation du myélogramme a permis de mettre en évidence la myélokathexie caractérisée par une grande quantité de polynucléaires neutrophiles de morphologie particulière. L'exploration immunologique a montré un déficit immunitaire T et B avec d'une part une réponse cellulaire faible vis-à-vis des antigènes vaccinaux et d'autre part une hypogammaglobulinémie. Un traitement par gammaglobulines et Neupogen a permis de diminuer le taux d'infections et d'augmenter le taux de polynucléaires neutrophiles.

Chez ce patient, le diagnostic a pu être posé par l'observation attentive du myélogramme. La myélokathexie et surtout la morphologie caractéristique des polynucléaires ont conduit les cytologistes à proposer ce diagnostic. L'article 8 rapporte le cas clinique ainsi que les perturbations biologiques associées et se focalise sur les caractéristiques de l'observation du myélogramme.

Du matériel biologique de ce patient a été envoyé à l'équipe de F. Bachelier à l'Institut Pasteur, à la demande de F. Arenzana, afin que soit recherchée la cause moléculaire de ce WHIM syndrome. Peu de temps auparavant, il avait été montré que le WHIM syndrome était associé à une mutation autosomique dominante sur le gène de CXCR4 (récepteur de la chémokine CXCL12 ou SDF1). Cependant, aucune mutation sur le gène de CXCR4 n'a été retrouvée chez ce patient. De plus, aucun autre membre de la famille (fratrie ou parents) n'est atteint d'un WHIM syndrome. L'ensemble des études fonctionnelles rapportées dans l'article 9 ont conduit les auteurs à montrer que le récepteur CXCR4 ne s'internalise que très peu en réponse à CXCL12. L'altération de l'internalisation suggère l'existence d'une protéine mutée ou « down régulée » restreinte à l'axe CXCL12/CXCR4. L'activation soutenue de CXCR4 observée dans les polynucléaires de patients WHIM bloque la sortie des neutrophiles matures de la MO. Ce mécanisme peut certainement expliquer la myélokathexie. Les auteurs suggèrent qu'un traitement par un antagoniste de CXCR4 (médicament prochainement commercialisé pour la mobilisation des CSH) devrait permettre de remonter le taux de polynucléaires neutrophiles circulants et de diminuer ainsi les infections bactériennes.

The WHIM syndrome shows a peculiar dysgranulopoiesis: myelokathexis



A 17-year-old boy had been born at term after an uneventful pregnancy to non-consanguineous parents. His siblings and parents were well. He had experienced numerous upper respiratory tract infections since birth, which had caused pulmonary atelectasia requiring surgical removal of the affected lobe. He had suffered recurrent herpetic peribuccal infection. Warts had appeared on his hands at 6 years of age and extended gradually to the elbows, arms, legs, knees and feet.

Pancytopenia was first documented at the age of 1 month. White blood cell counts varied from 1.9 to $3.9 \times 10^9/L$ with neutrophil counts of 0.9 – $2.8 \times 10^9/L$. There was no cyclic pattern of neutropenia. His haemoglobin concentration ranged between 10 and 12 g/dl and the platelet count was 47 – $127 \times 10^9/L$. Blood smears showed abnormal neutrophils with condensed nuclei connected by long, stringy filaments. The bone marrow was hypercellular with an increased proportion of mature myeloid cells (left). Many neutrophils had bisegmented nuclei with dense pyknotic lobes connected by long filaments leading to bizarre forms, such as 'eyeglasses' or 'clover leaf' (right). Occasionally, these filaments were twisted around each other. Some eosinophils showed cytoplasmic vacuolation. No significant morphological abnormalities were observed in the other cell lineages. Folic acid and vitamin B₁₂ levels were normal.

Immunological investigation showed severe combined immunodeficiency. Both B- and T-cell subpopulations were reduced, particularly CD4⁺ T cells. T-cell responses to vaccine antigens were moderately affected. Global hypogammaglobu-

linaemia was observed (IgG < 6 g/l; normal levels of IgG2 and IgG3). No antibodies to leucocytes or platelets were detected and karyotype analysis was normal.

Monthly treatment with gammaglobulins and filgrastim was initiated when the child was 7 years of age, producing a subsequent decrease in the rate of infections and an increased neutrophil count ($>1 \times 10^9/L$). The patient presented the full spectrum of findings described in the WHIM syndrome, a rare immunodeficiency disorder characterised by warts, hypogammaglobulinaemia, infections and myelokathexis. Myelokathexis is characterised by a prolonged retention of neutrophils in the bone marrow compartment leading to neutropenia, despite hyperplasia of bone marrow myeloid cells, and degenerative changes in mature neutrophils. The observation of these morphologic features was strongly suggestive of myelokathexis and is helpful in the diagnosis of WHIM syndrome. This syndrome is caused by the mutation of a chemokine receptor gene, leading to production of the mutant CXCR4 protein that causes abnormal apoptosis and migratory function, thought to be related to the cause of chronic leucopenia.

Véronique Latger-Cannard,¹

Danièle Bensoussan,²

Pierre Bordignon³

¹Department of Biological Haematology, ²Cell Therapy Unit, and

³Department of Paediatrics, CHU Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, France
E-mail: v.cannard@chu-nancy.fr

ARTICLE 9 :

WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12 Balabanian K., Lagane B., Pablos JL., Laurent L., Planchenault T., Verola O., Lebbe C., Kerob D., Dupuy A., Hermine O., Nicolas JF., Latger-Cannard V., Bensoussan D., Bordigoni P., Baleux F., Le Deist F., Virelizier JL., Aranzana-Seisdedos F., Bachelier F.

Blood, 2005, 105, 2449-2457

WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12

Karl Balabanian, Bernard Lagane, José Luis Pablos, Lysiane Laurent, Thierry Planchenault, Olivier Verola, Celeste Lebbe, Delphine Kerob, Alain Dupuy, Olivier Hermine, Jean-François Nicolas, Véronique Latger-Cannard, Danièle Bensoussan, Pierre Bordignon, Françoise Baleux, Françoise Le Deist, Jean-Louis Virelizier, Fernando Arenzana-Seisdedos, and Françoise Bachelier

The WHIM syndrome is a rare immunodeficiency disorder characterized by warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis. Dominant heterozygous mutations of the gene encoding CXCR4, a G-protein-coupled receptor with a unique ligand, CXCL12, have been associated with this pathology. We studied patients belonging to 3 different pedigrees. Two siblings inherited a *CXCR4* mutation encoding a novel C-terminally truncated receptor. Two unrelated patients were found to bear a wild-type *CXCR4* open reading frame. Circulating lymphocytes and neu-

trophils from all patients displayed similar functional alterations of CXCR4-mediated responses featured by a marked enhancement of G-protein-dependent responses. This phenomenon relies on the refractoriness of CXCR4 to be both desensitized and internalized in response to CXCL12. Therefore, the aberrant dysfunction of the CXCR4-mediated signaling constitutes a common biologic trait of WHIM syndromes with different causative genetic anomalies. Responses to other chemokines, namely CCL4, CCL5, and CCL21, were preserved, suggesting that, in clinical

forms associated with a wild-type *CXCR4* open reading frame, the genetic anomaly might target an effector with some degree of selectivity for the CXCL12/CXCR4 axis. We propose that the sustained CXCR4 activity in patient cells accounts for the immune-hematologic clinical manifestations and the profusion of warts characteristic of the WHIM syndrome. (Blood. 2005;105:2449-2457)

© 2005 by The American Society of Hematology

Introduction

The CXC chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12)^{1,2} is the sole natural ligand for CXCR4,^{3,4} a broadly expressed G-protein-coupled receptor (GPCR).⁵ The unique, non-promiscuous interaction between CXCL12 and CXCR4 is critically involved in the organogenesis of a number of phylogenetically distant animal species.⁶⁻¹¹ In addition, B-cell lymphopoiesis and bone marrow (BM) myelopoiesis are regulated by the CXCL12/CXCR4 axis during embryogenesis.¹²⁻¹⁴ In postnatal life, the CXCL12/CXCR4 couple controls the BM homing of CD34⁺ cells and lymphocyte trafficking.¹⁵⁻¹⁸ Besides the regulation of homeostatic processes, CXCR4 has been implicated in the development of infectious^{3,19} and inflammatory diseases as well as tumor metastasis.²⁰⁻²³ Recently, inherited heterozygous autosomal dominant mutations of the *CXCR4* gene, which result in the truncation of the carboxyl-terminus (C-tail) of the receptor, were found to be associated with the WHIM syndrome.²⁴ This rare immunodeficiency disease is characterized by disseminated human papillomavirus (HPV)-induced warts, hypogammaglobulinemia, recurrent bacterial infections, and myelokathexis, a form of neutropenia

associated with abnormal retention of mature neutrophils in the BM.²⁵⁻²⁷ Patients with WHIM also exhibit a marked T-cell lymphopenia. The disorder is clinically and genetically heterogeneous,²⁸ since hypogammaglobulinemia and verrucosis were absent in some cases,²⁹ and individuals with isolated myelokathexis were found to be wild type for the *CXCR4* gene.²⁴ However, the altered mechanism accounting for the pathogenesis of the WHIM syndrome not associated to *CXCR4* mutations remains unknown. Here, we provide original evidence that individuals with incomplete or full clinical forms of the WHIM syndrome, and carrying either a mutated or a wild-type *CXCR4* open reading frame (ORF), share biologic anomalies targeting CXCR4-dependent signaling.

Patients, materials, and methods

Patients and sample processing

Patients P1 and P2 (pedigree I, 41 and 38 years old, respectively), P3 (pedigree II, 43 years old), and patient P4 (pedigree III, 17 years old)

From the Unité d'Immunologie Virale, Institut Pasteur, Paris, France; the Unité de Chimie Organique, Institut Pasteur, Paris, France; the Servicio de Reumatología, Unidad de Investigación, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; the Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; the Service de Dermatologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; the Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 8147, Hôpital Necker, Paris, France; the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U503, Université Claude Bernard et Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; the Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalo-Universitaire de Nancy, Vandœuvre-Les-Nancy, France; the Service de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, Centre Hospitalo-Universitaire de Nancy, Vandœuvre-Les-Nancy, France; the Unité de Transplantation Médullaire, Centre Hospitalo-Universitaire de Nancy, Vandœuvre-Les-Nancy, France; and the Laboratoire d'Immunologie Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France.

Submitted June 17, 2004; accepted November 7, 2004. Prepublished online as

Blood First Edition Paper, November 9, 2004; DOI 10.1182/blood-2004-06-2289.

Supported by fellowships and grants from Agence Nationale de Recherches Sur le SIDA (ANRS, France) and Ensemble contre le SIDA (SIDACTION, France) (K.B. and B.L.).

K.B. and B.L. contributed equally to this study.

Reprints: Françoise Bachelier, Unité d'Immunologie Virale, Institut Pasteur, 75724 Paris, France; e-mail: fbachele@pasteur.fr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2005 by The American Society of Hematology

(Figure 1A) displayed clinical features of the WHIM syndrome. Disseminated, cutaneous warts caused by common serotypes of HPV were observed in the 4 patients, with anal and genital condylomata in patients P1, P2, and P3. Sporadic, genital infections by herpes viruses were observed in patients P1 and P3. Bacterial infections of the respiratory tract were frequent in all patients and caused pulmonary atelectasia in patient P4, requiring surgical removal of the affected lobe. Patients P1 and P2 showed the typical pattern of isolated myelokathexis in BM biopsies. A similar pattern was found in patients P3 and P4. Indeed, histologic analysis of BM proved in both patients the presence of dysgranulopoiesis with increased amount of mature neutrophils exhibiting hypersegmented nucleus characteristic of myelokathexis. Like in patients P1 and P2, no dyslymphopoiesis or dyserythropoiesis were observed in patients P3 and P4. All the patients showed a marked leukopenia ($< 2 \times 10^9/L$) affecting both B- and T-cell subpopulations, in particular the $CD4^+$ T-cell subset. In patient P3, lymphocyte counting maintained below $0.4 \times 10^9/L$, while in patient P4 it was regularly below $0.2 \times 10^9/L$. In patient P3, $CD14^+$ monocytes were not detected.

Profound neutropenia ($< 0.4 \times 10^9/L$) was observed in patients P1 and P2 and was less pronounced in patients P3 and P4: $1 \times 10^9/L$ or slightly below for patient P4, while in patient P3 it oscillated between 1.1×10^9 and $1.6 \times 10^9/L$. Global hypogammaglobulinemia was observed in patients P1 ($< 3 g/L$), P2 ($< 6 g/L$; normal levels of immunoglobulin G1 [$IgG1$]), and P4 ($< 6 g/L$; normal levels of $IgG2$ and $IgG3$). For patient P3, γ -globulin values were in the low limits of the normal range. Patient P1 displayed a marked anemia (hemoglobin, $< 80 g/L$) and thrombocytopenia ($< 50 \times 10^9/L$). Mild normocytic, normochromic, nonregenerative anemia, and thrombocytopenia were observed in patients P2, P3, and P4. T-cell responses to vaccine antigens were preserved in patients P1, P2, and P3 and moderately affected in patient P4. Healthy blood donor volunteers were matched for age and sex and used as control subjects. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and polymorphonuclear neutrophils (PMNs) were isolated from heparin-treated blood samples using Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) density gradient centrifugation as previously described.³⁰ The local ethics committee approved this study, and all subjects gave informed consent for this investigation.

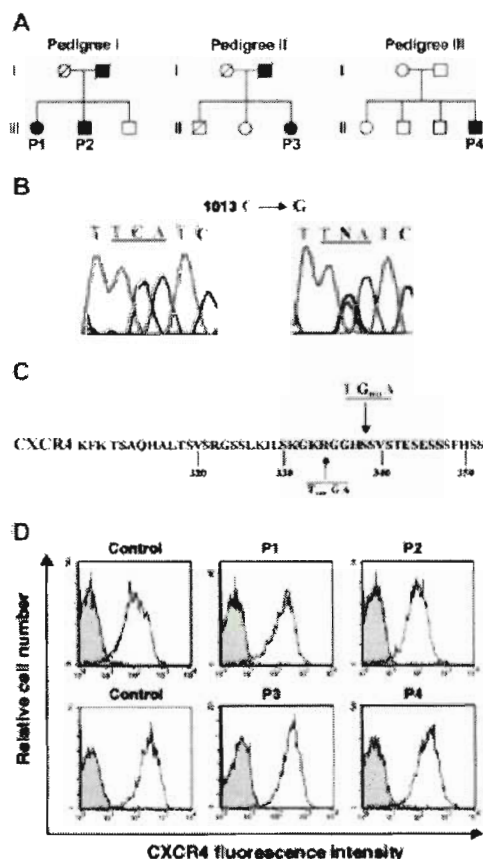


Figure 1. Analysis of the *CXCR4* ORF in patients with WHIM. (A) Patients P1 and P2 (pedigree I) inherited the disease-associated haplotype from their father. Patient P3 (pedigree II) inherited the disease-associated haplotype from her father. Patient P4 (pedigree III) is the fourth child of healthy, nonconsanguineous parents and might constitute a sporadic case. (B) Electropherogram of the *CXCR4* cDNA sequence from patient P1 (right panel) encompassing a C1013 → G substitution. The same mutation was detected in patient P2. Left panel shows for patient P3 the equivalent *CXCR4* cDNA wild-type sequence. (C) In the amino acid sequence of the *CXCR4* C-tail, the mutation recovered in patients P1 and P2 introduces a nonsense codon (underlined) in place of Ser-838. The previously reported WHIM-associated *CXCR4*¹⁰⁰⁰ is shown.²⁴ (D) Cell surface expression of *CXCR4* in $CD3^+$ -gated PBMCs from the 4 patients and 2 independent healthy donors was determined by flow cytometry using the PE-conjugated 12G5 (empty histograms) or isotype control (gray histograms) monoclonal antibody (mAb).

CXCR4 mutation identification

Total messenger RNAs extracted (RNeasy kit; QIAGEN Sciences, Courtabouff, France) from freshly patient-isolated PBMCs were reverse transcribed (Superscript; BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) by extension of oligo(dT) priming using a "template-switch" (TS) primer 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)20VN-3'.³¹ Subsequent amplification of oligo-dT primed cDNA was performed by polymerase chain reaction (PCR; Advantage II pol; BD Biosciences Clontech) (40 cycles at 95°C for 30 seconds and 68°C for 3 minutes) using specific *CXCR4* forward 5'-AGTAGCCACCGCATCTGGAGAAC-3' and reverse 5'-ACAAAAATCCAAACAGCAATAAACTG-3' primers. Additionally, a 3'-step-out rapid amplification of *CXCR4* cDNA ends³¹ was performed using specific *CXCR4* forward primer and TS-PCR reverse primers. Double-strand sequencing of amplification products was performed to, at least, a 4-fold redundancy by primer walking.

CXCR4 constructs and expression

The nonsense mutations $TG_{1000}A$ and $TG_{1013}A$ (Figure 1C) were introduced in the *CXCR4* coding region by PCR and confirmed by sequence analysis. The *CXCR4*^{wt}, *CXCR4*¹⁰⁰⁰, and *CXCR4*¹⁰¹³ cDNAs were cloned into the pTRIP vector and were expressed following a lentiviral-based strategy³² in PBMCs from healthy individuals activated ($> 90\%$ $CD25^+$ blasted T cells) with phytohemagglutinin (PHA; 1 $\mu g/mL$) and 20 ng/mL interleukin-2 (IL-2; PeproTech, Rocky Hill, NJ) or in the *CXCR4*-negative A0.01 T-cell (from Dr HT He, Centre d'Immunologie de Luminy, Marseille, France) and Chinese hamster ovary (CHO) cell lines (ATCC, Rockville, MD). For some experiments, the *T7-GFP-CXCR4*^{wt} cDNA (kindly provided by Dr G. Gaibelet, IPBS/CNRS, Toulouse, France), cloned into the pcDNA3 plasmid, was used. We controlled that the functioning of the resulting *CXCR4*^{wt} chimera was wild-type-like. These *CXCR4*^{wt} chimeras were expressed following the calcium phosphate-DNA coprecipitation method in *CXCR4*^{wt}- or *CXCR4*¹⁰¹³-expressing CHO cells or simultaneously with *CXCR4*^{wt} or *CXCR4*¹⁰¹³ using the amaxa Nucleofector technology (Cologne, Germany) in PBMCs from healthy individuals. Experiments were performed 36 hours after transfection and 15 hours after nucleoporation.

Functional evaluation of chemokine receptors

Flow cytometry analysis were carried out on a FACSCalibur (Becton Dickinson, Rungis, France) using the following anti-human monoclonal antibodies (mAbs) (from Becton Dickinson unless specified): CD3 (clone SK7), CD8 (clone B9.11 and clone 53-6.7; Immunotech, Beckman-Coulter, Marseille, France), CD25 (clone M-A251), CD4 (clone RPA-T4), *CXCR4* (clone 12G5), CCR5 (clone 2D7), and the rat anti-human CCR7 (clone 3D12). The binding of the mouse anti-T7-Tag mAb (Novagen; EMD Biosciences, Darmstadt, Germany) was revealed using the secondary phycoerythrin (PE)-conjugated goat anti-mouse F(ab')₂ Ab (Dako, Glostrup, Denmark).

Chemokine receptor internalization was studied as previously described.³³ Briefly, cells were incubated at 37°C unless specified for 45 minutes with 200 nM CXCL12 (from Dr F. Boleux, Unité de Chimie Organique, Institut Pasteur, Paris, France) or 6Ckine/CCL21 (R&D Systems, Minneapolis, MN), or for 75 minutes with 200 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma Chemical, St Louis, MO). After 1 wash in acidic glycine buffer (pH = 2.7), levels of receptor cell surface expression were determined using the corresponding PE-conjugated mAbs alone in A0.01 T-cell and CHO cell lines, or in combination with fluorescent mAbs specific for T-cell antigens (CD3, CD8, and CD4) in PBMCs. Background fluorescence was evaluated using the corresponding PE-conjugated, immunoglobulin-isotype control mAb. No receptor internalization was found when cells were incubated at 4°C in the presence of ligand. Receptor expression in stimulated cells was calculated as follows: (receptor geometric mean fluorescence intensity [MFI] of treated cells/receptor geometric MFI of unstimulated cells) × 100. 100% correspond to receptor expression at the surface of cells incubated in medium alone.

Chemotaxis was performed using a Transwell assay³³ upon induction with chemokines. Briefly, 3×10^5 cells in 150 μ L RPMI medium supplemented with 20 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) and 1% human AB serum were added to the upper chamber of a 6.5-mm diameter, 5- μ m pore polycarbonate Transwell culture insert. The same media (600 μ L) with or without chemokine were placed in the lower chamber. Chemotaxis proceeded for 2 hours at 37°C in humidified air with 5% CO₂. CXCL12, macrophage inflammatory protein 1 β (MIP-1 β)/CCL4 (from Dr F. Boleux) and regulated on activation normal T expressed and secreted (RANTES)/CCL5 (Sigma) were used at 30 nM and CCL21 at 60 nM. AMD3100 (AnorMED, Langley, Canada) was used at 1 μ M to inhibit CXCR4-dependent signaling. The fraction of cells migrating across the polycarbonate membrane was calculated as follows: [(number of cells migrating to the lower chamber in response to chemokine) – (number of cells migrating spontaneously)] / number of cells added to the upper chamber at the start of the assay × 100.

Actin polymerization assays were performed as described²³ using CXCL12 at 30 nM and CCL21 at 60 nM. Intracellular F-actin content was measured in fixed cells using the fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled phalloidin and was expressed as follows: (MFI after addition of chemokine / MFI before addition of chemokine) × 100. MFI values assessed before addition of ligand were arbitrarily set at 100%.

HEK-293T cells (ATCC) were transiently transfected using a phosphate calcium method with CXCR4-derived cDNAs. Crude membranes from these cells were assessed for ³⁵S-GTPγS (GTP analog guanosine-5'-[γ-thio]-triphosphate) binding as described.³⁴ EC₅₀ (half maximal effective concentration) was determined with the GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA) using nonlinear regression applied to a sigmoidal dose-response model.

Histopathologic studies

Wart and condyloma biopsies from patients P1 and P2 (4 independent samples) and 4 patients without WHIM were obtained. Biopsies from healthy skin, a non-HPV-related proliferative lesion (seborrheic keratosis), 2 epidermoid carcinomas, and inflammatory skin lesions (cutaneous lupus and dermatomyositis) were studied in parallel. Immunohistochemistry was performed in paraffin-embedded sections as previously described,³⁵ using the anti-CXCL12 (clone K15C, IgG2a isotype Ig) and anti-CXCR4 (clone 6H8, IgG1 isotype Ig) mAbs. Binding of mAbs was detected by immunoperoxidase staining using diaminobenzidine (DAB) substrate, and sections were subsequently counterstained in Gill hematoxylin. Control sections were similarly processed with isotype-matched mouse IgG instead of primary mAbs. Images were obtained on a Zeiss Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with standard optic objectives at the indicated magnifications (10–60×, apertures 0.25–1.4) and were directly digitalized using a SpotRT CCD camera and Spot 4.0.4 software (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI).

Statistical analysis

Statistical analyses consisted in unpaired 2-tailed Student *t* tests and were carried out with the Prism software (GraphPad Software).

Results

Patients with WHIM syndrome present a genetic heterogeneity in the CXCR4 locus

We identified that the siblings P1 and P2, who inherited the autosomal dominant haplotype from their father (Figure 1A), carry a mutation in the CXCR4 ORF. According to recent reports,^{34,36} this punctual heterozygous mutation (Figure 1B, right panel) leads to a partial deletion of the CXCR4 C-tail (WHIM¹⁰¹³; Figure 1C). Patient P3 inherited the autosomal dominant haplotype from her father, while patient P4 is the fourth child of healthy, nonconsanguineous parents and might constitute a sporadic case of the syndrome (Figure 1A). In both patients P3 and P4, 1 single CXCR4 cDNA product was amplified using the 3'-step-out rapid amplification technology, and its sequence was found to be wild type as illustrated for patient P3 in Figure 1B (left panel). These 2 pedigrees were called "WHIM^{wt}" in reference to the absence of mutation in the CXCR4 ORF. We found that the levels of CXCR4 cell surface expression on WHIM^{wt} lymphocytes were similar to those detected either on WHIM¹⁰¹³ or control ones (Figure 1D). This result is suggestive of a normal production and stability of CXCR4 mRNA in WHIM^{wt} lymphocytes. Functional studies were next set up to investigate CXCL12-induced signaling in WHIM^{wt} and WHIM¹⁰¹³ lymphocytes.

Impaired CXCL12-induced internalization of CXCR4 in lymphocytes from patients with WHIM

On the basis of the requirement of the C-tail integrity for CXCR4 internalization,^{33,37,40} we speculated that WHIM-associated C-tail truncated receptors (CXCR4^{tr}) might be impaired in their ability to be internalized in response to CXCL12. Therefore, internalization of CXCR4 in response to CXCL12 was investigated in circulating T lymphocytes from healthy subjects and patients P1 and P2. To assess CXCR4 cell surface expression following CXCL12 stimulation, cells were washed in acidic buffer. This permitted us to remove CXCL12 bound to CXCR4 that would compete for the binding of the mAb 12G5 to the second extracellular loop of CXCR4^{33,38,39} and, therefore, would mask detection of CXCR4 (Figure 2A). We found that, in sharp contrast to cells from healthy subjects (Figure 2A, left panel), the internalization of CXCR4 induced either by CXCL12 or PMA in T lymphocytes from patients P1 (Figure 2A, right panel) and P2 was markedly impaired (Figure 2B). Time-course analysis of CXCL12-promoted CXCR4 downmodulation indicated that the residual internalization in CD4⁺-gated T lymphocytes from patients was delayed relative to control cells (Figure 2C). Similar results were obtained in CD8⁺-gated T cells (data not shown).

To authenticate the causative role played by the CXCR4 mutations in the impaired endocytosis of the receptors, we expressed either CXCR4^{tr} or the CXCR4^{wt} receptors (CXCR4¹⁰⁰⁰ or CXCR4¹⁰¹³) in the A0.01 T-cell lines that do not express CXCR4 or in lymphocytes from healthy donors (Figure 2D). In A0.01 T cells, our results indicate that the CXCR4^{tr} receptors were disabled to undergo endocytosis in response to CXCL12 or PMA, while CXCR4^{wt} was, as expected, extensively internalized (Figure 2D, left panel). Expression of CXCR4^{tr} in lymphocytes from healthy

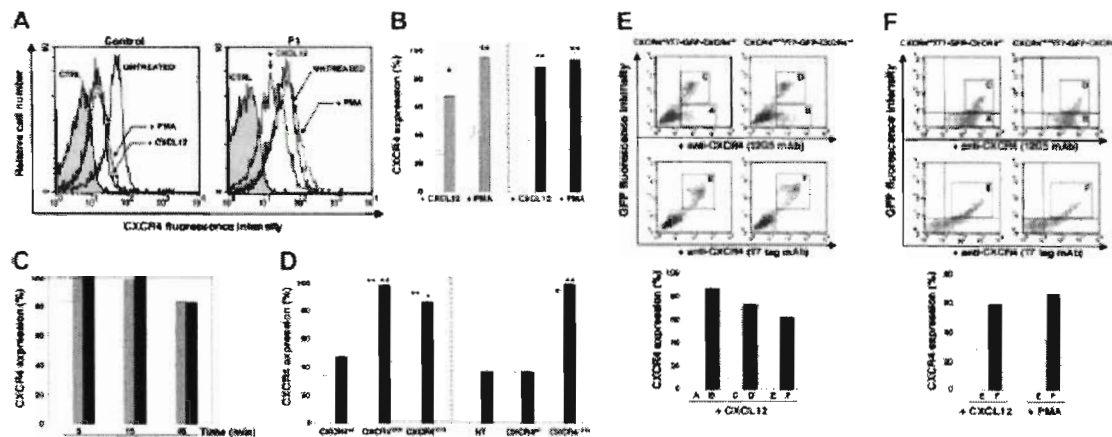


Figure 2. Altered CXCR4 internalization in WHIM¹⁰¹³ lymphocytes. (A) Cell surface expression levels of CXCR4 in CD4⁺-gated T cells from PBMCs of a healthy subject (control, left panel) or WHIM¹⁰¹³ patient P1 (right panel). CXCR4 levels were assessed using the 12G5 (empty histograms) or isotype control (CTRL, gray histograms) mAb. (B) CXCR4 cell surface expression in CD4⁺-gated T cells from PBMCs of WHIM¹⁰¹³ patients P1 (□) and P2 (■) or healthy subjects (□). **P* < .05 and ***P* < .005 compared with healthy subjects. (C) Time course of CXCL12-promoted CXCR4 endocytosis in CD4⁺-gated T cells from patients P1 (□) and P2 (■) versus healthy subject (□). (D) CXCR4 cell surface expression in A0.01 T cells (left panel) or PBMCs from healthy individuals (right panel) nontransduced (NT) or transduced with the indicated CXCR4 variant receptors. □ indicates +CXCL12; ■, +PMA. In untreated A0.01 T cells, the geometric MFI of CXCR4^{wt}, CXCR4¹⁰⁰⁰, and CXCR4¹⁰¹³ receptors were 30, 35, and 28, respectively. Analysis in PBMCs was assessed in CD4⁺-gated T cells. **P* < .05 and ***P* < .005 compared with CXCR4^{wt}-expressing A0.01 T cells or with NT T lymphocytes. Results, expressed as percentage of untreated cells, are from 8 independent experiments (mean ± SEM) (B,D) or from 1 representative experiment of 2 (C). (E) Cell surface expression of T7-GFP-CXCR4^{wt} in CXCR4^{wt} or CXCR4¹⁰¹³ CHO cells either untreated (dot plot, top) or treated with CXCL12 or PMA (lower panel). □ indicates CXCR4^{wt}; ■, CXCR4¹⁰¹³. In untreated CHO cells, the geometric MFI of CXCR4^{wt} GFP⁺ (gate A), CXCR4¹⁰¹³ GFP⁺ (gate B), CXCR4^{wt} GFP⁻ (gate C), and CXCR4¹⁰¹³ GFP⁻ (gate D) were 47, 57, 63, and 61, respectively. Expression of T7-GFP-CXCR4^{wt} is roughly comparable when coexpressed with CXCR4^{wt} (geometric MFI = 150, gate E) or CXCR4¹⁰¹³ (geometric MFI = 130, gate F). Analysis of CXCL12-promoted receptor endocytosis was performed in the cell gates defined earlier in the legend. Results (mean ± SEM) are representative of 2 determinations and are expressed as percentage of untreated cells. (F) Cell surface expression of T7-GFP-CXCR4^{wt} in CD4⁺-gated T cells from PBMCs of a healthy individual transfected with CXCR4^{wt} or CXCR4¹⁰¹³ variant either untreated (dot plot, upper panel) or treated with CXCL12 or PMA (lower panel). □ indicates CXCR4^{wt}; ■, CXCR4¹⁰¹³. In untreated CD4⁺-gated T cells, the geometric MFI of CXCR4 in gates A, B, C, and D were 195, 210, 620, and 580, respectively. Expression of T7-GFP-CXCR4^{wt} is roughly comparable when coexpressed with CXCR4^{wt} (geometric MFI = 360, gate E) or CXCR4¹⁰¹³ (geometric MFI = 220, gate F). Analysis of CXCL12- or PMA-promoted receptor endocytosis was performed in cell gates defined above. Results are from 1 representative experiment of 2 and are expressed as percentage of untreated cells.

subjects is shown in Figure 2D, right panel. CXCL12- and PMA-induced endocytosis of receptors were found to be impaired in cells transduced with CXCR4¹⁰¹³ (Figure 2D, right panel) and CXCR4¹⁰⁰⁰ (data not shown), while they remained preserved in nontransduced or CXCR4^{wt}-transduced lymphocytes. These findings show that expression of CXCR4¹⁰¹³ in T cells reproduces the CXCR4 dysfunctions observed in WHIM¹⁰¹³ leukocytes. This suggests the functional prevalence of the mutant CXCR4 receptor over its wild-type counterpart in WHIM¹⁰¹³ leukocytes.

We then investigated whether this phenomenon might be attributed to the predominant expression of the mutant CXCR4 receptor at the cell surface of WHIM¹⁰¹³ leukocytes. We stably expressed in CHO cells, which lack endogenous CXCR4 expression, either CXCR4^{wt} or CXCR4¹⁰¹³ receptors following a lentiviral-based strategy. These cells were then transiently transfected with a plasmid encoding T7-GFP-CXCR4^{wt}. T7 and green fluorescent protein (GFP) tags fused at the receptor N-terminus of this chimera receptor permitted us to distinguish selectively CXCR4^{wt} expression when it coexists with CXCR4¹⁰¹³ (Figure 2E).

Staining of the T7-Tag revealed that the cell surface expression of the CXCR4^{wt} chimera was not altered when coexpressed with the mutated CXCR4¹⁰¹³ receptor (GFP⁺-gated cells in Figure 2E, gates E and F). Conversely, we controlled that untagged CXCR4^{wt} and CXCR4¹⁰¹³ displayed similar cell-surface expression in the presence of the chimera (GFP⁺-gated cells in Figure 2E, gates C and D). However, we found that the CXCR4^{wt} chimera receptor became refractory to CXCL12-induced internalization when coexpressed with CXCR4¹⁰¹³ (Figure 2E, lower panel). Similar experiments performed using PBMCs from healthy subjects, coexpressing after nucleoporation the CXCR4^{wt} chimera with either

CXCR4¹⁰¹³ or CXCR4^{wt} (in a 1:1 ratio), are shown in Figure 2F. Expression levels of the CXCR4^{wt} chimera in CD4⁺-gated T cells were roughly comparable when coexpressed with CXCR4^{wt} (upper panel, gate E) or CXCR4¹⁰¹³ (upper panel, gate F). Again, we found that CXCR4¹⁰¹³ expression impaired CXCR4^{wt} chimera endocytosis in response to both CXCL12 and PMA (Figure 2F, lower panel). Overall, these findings highly suggest that the functional prevalence of CXCR4¹⁰¹³ we speculated in WHIM¹⁰¹³ leukocytes cannot be attributed to its accumulation at the cell surface. Rather, our results make it likely that CXCR4¹⁰¹³ alters the functioning of the wild-type receptor by means of a transdominant-negative effect.

We next investigated whether the aberrant pattern of CXCR4 endocytosis relates specifically to the presence of a truncated CXCR4 receptor or extends to leukocytes from a WHIM¹⁰¹³ patient. Figure 3A-B illustrates the defective CXCL12-promoted CXCR4 internalization in CD4⁺-gated T cells from patients P3 and P4. In contrast, CXCR4 was readily internalized after PMA treatment, as observed in lymphocytes from healthy individuals, including the parents of patient P4 (Figure 3B). We also noticed that CCL21 (Figure 3B) and CCL4 (data not shown) efficiently promoted internalization of the chemokine receptors CCR7 and CCR5, respectively, in both patient P4 and control cells. Additionally, in skin fibroblasts from patient P3 with WHIM¹⁰¹³, we found that CXCR4 was refractory to CXCL12-promoted internalization but remained fully sensitive to PMA stimulation (data not shown).

Impaired CXCR4 desensitization in WHIM patient lymphocytes

Defective CXCL12-dependent CXCR4 endocytosis suggested an impairment of homologous desensitization, an adaptive process

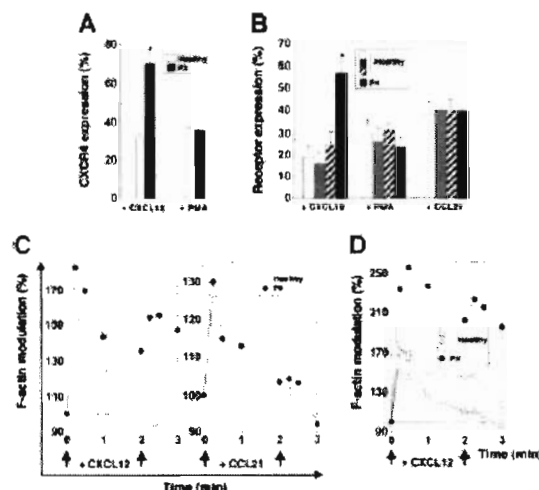


Figure 3. Defective CXCR4 internalization and desensitization in WHIM¹⁰¹³ lymphocytes. (A-B) CXCL12- and PMA-promoted CXCR4 internalization in CD4⁺-gated T cells from WHIM¹⁰¹³ patients P3 (A) and P4 (B) and healthy subjects (□, and patient P4's mother □ and father □). (C-D) CXCL12-promoted CXCR4 internalization in CD4⁺-gated T cells from the patient P4 and healthy subjects is shown. Values, expressed as percentage of unstimulated cells, are from 3 independent experiments (mean ± SEM). **P* < .05 compared with healthy subjects. (C-D) CXCL12-triggered actin polymerization in CD4⁺-gated T lymphocytes from WHIM patients P3 (C, left panel) and P4 (D) and healthy individuals (□ and patient P4's mother □ and father □). Panel C (right) shows kinetics of actin polymerization following CXCL12 stimulation. Arrows indicate chemokine stimulation. The results displayed are from 1 representative experiment of 2.

that precludes a protracted coupling of the stimulated receptor to heterotrimeric G $\alpha\beta\gamma$ proteins. To address this issue, we measured polymerization of actin monomers into F-actin filaments, a response indicative of receptor-dependent G-protein activation.^{41,42} In control CD4⁺-gated T lymphocytes, a rapid and transient rise of F-actin was observed after the first stimulation with CXCL12 but no response after the second stimulation, indicating that desensitization had occurred (Figure 3C-D, open symbols). By contrast, in CD4⁺-gated T lymphocytes from WHIM¹⁰¹³ patients P3 (Figure 3C, left panel, ●) and P4 (Figure 3D, ●), actin polymerization was

protracted after the first stimulation with CXCL12, and a rise was also observed after the second stimulation. However, the response to CCL21 was similar in control and patient cells (Figure 3C). Similar results were obtained in CD8⁺-gated T cells (data not shown). Regarding the WHIM¹⁰¹³ pedigree, we also demonstrated that CXCR4 desensitization was impaired in both CD4⁺- and CD8⁺-gated T lymphocytes from patients P1 and P2 (Figure 4A, ●). Additionally, this functional anomaly was also evidenced in CXCR4-negative T-cell lines or control T lymphocytes expressing the mutant CXCR4¹⁰¹³ receptors (Figure 4B, left and right panels, respectively).

The increased magnitude of CXCL12-promoted F-actin peak observed in all patient lymphocytes (Figures 3C-D and 4A) was reproduced both in A0.01 T-cell lines and in normal T lymphocytes expressing CXCR4¹⁰¹³ (Figure 4B). This finding might reflect an increased ability of WHIM-associated CXCR4 to activate G-proteins. We thus developed HEK-293T cell lines expressing similar amounts of CXCR4^{WT} or CXCR4¹⁰¹³ (Figure 4) to investigate CXCL12-induced activation of G-proteins using a GTP γ S binding assay.⁴³ As shown in Figure 4C (left panel), the half-maximal effective concentrations for CXCL12 were about half for CXCR4¹⁰¹³ than for CXCR4^{WT}-expressing membranes, indicating that the ligand is a more potent agonist toward the truncated than the wild-type receptor. Additionally, a more efficient activation of G-proteins by CXCR4¹⁰¹³ was observed either in the absence or in the presence of CXCL12 (Figure 4C, right and left panels, respectively). Thus, the enhanced responsiveness of WHIM-associated CXCR4 to CXCL12 is likely to be the consequence of an improved activation of receptor-associated G-proteins.

Enhanced CXCL12-promoted chemotaxis of WHIM patient leukocytes

Sustained agonist-induced G-protein-dependent signaling and impaired CXCR4 desensitization predicted magnified responsiveness of WHIM leukocytes to CXCL12. This possibility was investigated using a chemotaxis assay. Leukocytes from WHIM¹⁰¹³ (Figure 5A) and WHIM¹⁰¹³ (Figure 5B) patients displayed a stronger chemotactic response toward CXCL12 relative to control cells. This enhanced cell migration in response to CXCL12 was totally inhibited by the specific CXCR4 antagonist AMD3100 (Figure

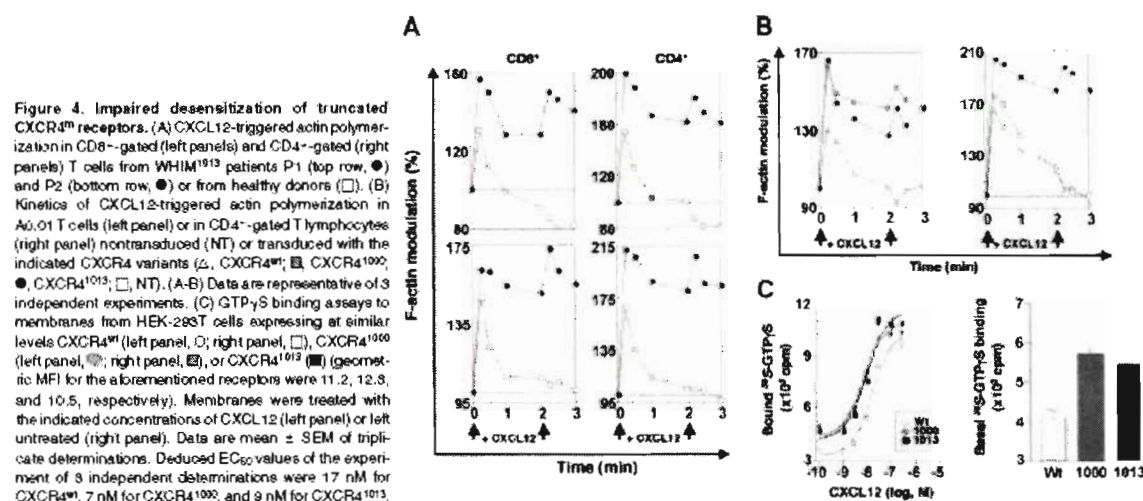


Figure 4. Impaired desensitization of truncated CXCR4¹⁰¹³ receptors. (A) CXCL12-triggered actin polymerization in CD8⁺-gated (left panels) and CD4⁺-gated (right panels) T cells from WHIM¹⁰¹³ patients P1 (top row, ●) and P2 (bottom row, ●) or from healthy donors (□). (B) Kinetics of CXCL12-triggered actin polymerization in A0.01 T cells (left panel) or in CD4⁺-gated T lymphocytes (right panel) nontransduced (NT) or transduced with the indicated CXCR4 variants (Δ, CXCR4^{WT}; □, CXCR4¹⁰¹³; ●, CXCR4¹⁰¹³; □, NT). (A-B) Data are representative of 3 independent experiments. (C) GTP γ S binding assays to membranes from HEK-293T cells expressing at similar levels CXCR4^{WT} (left panel, □; right panel, □), CXCR4¹⁰¹³ (left panel, ●; right panel, ●), or CXCR4¹⁰¹³ (left panel, □; right panel, □) (geometric MFI for the aforementioned receptors were 11.2, 12.3, and 10.5, respectively). Membranes were treated with the indicated concentrations of CXCL12 (left panel) or left untreated (right panel). Data are mean ± SEM of triplicate determinations. Deduced EC₅₀ values of the experiment of 3 independent determinations were 17 nM for CXCR4^{WT}, 7 nM for CXCR4¹⁰¹³, and 9 nM for CXCR4¹⁰¹³.

5B, left panel). CCR5- and CCR7-dependent migrations were observed to be in the same range for WHIM and control leukocytes. We reproduced the exacerbated CXCL12-induced chemotaxis of WHIM leukocytes with A0.01 T cells expressing CXCR4^m (Figure 5C). As compared with controls, CXCR4^m-expressing A0.01 T cells displayed stronger migratory responses at low concentrations of ligand, indicating a higher efficiency of CXCL12 toward these cells.

As myelokathexis constitutes a prominent clinical manifestation of the syndrome, we also examined the sensitivity of PMNs from WHIM^m and WHIM¹⁰¹³ patients to CXCL12. Similarly to patient lymphocytes, PMNs displayed impaired CXCR4 desensitization (Figure 6A,C), and a markedly increased chemotaxis in response to CXCL12 (Figure 6B,D).

Expression and distribution of CXCL12 in warts and condylomata from patients with WHIM

To gain knowledge on the relationship between the lack of CXCR4-signaling attenuation and the profusion and persistence of HPV lesions observed in patients with WHIM, we investigated the expression of CXCL12 in wart and condyloma biopsies from these patients. CXCL12 was not detected in the epidermis of healthy skin, benign proliferative lesions (seborrheic keratosis), inflammatory skin lesions, or epidermoid carcinomas (Figure 7A-D). In addition, no CXCL12 staining was observed in skin lesions induced by herpes virus (Kaposi) or poxvirus (*Molluscum contagiosum*; data not shown). In striking contrast, 3 of 4 samples from patients P1 and P2, found to be positive for HPV (immunostaining of the capsid L1 HPV protein; data not shown), displayed strong CXCL12 immunostaining in keratinocytes (Figure 7E-F). Simi-

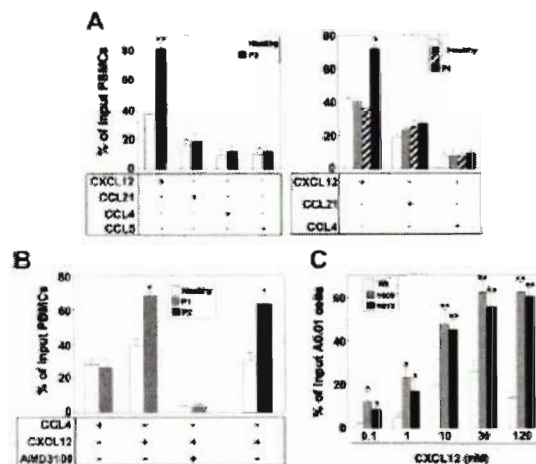


Figure 5. Exacerbated CXCL12-induced chemotaxis of WHIM leukocytes. (A) CXCL12-, CCL21-, CCL4-, or CCL5-induced migration of PMNs from patients P3 (left panel, ■) and P4 (right panel, ■) and healthy donors (□) and patient P4's mother (■) and father (■). Transmigrated cells recovered in the lower chamber were counted by flow cytometry with gating on forward and side scatter to exclude debris and monocytes. (B) CXCL12-promoted chemotaxis of PMNs from WHIM¹⁰¹³ patients P1 (left panel, ■) and P2 (right panel, ■) or healthy individuals (□). Inhibition of cell migration by AMD3100 added in both chambers and chemotaxis in response to CCL4 are shown. (C) Dose-dependent CXCL12-induced chemotaxis of A0.01 T cells transduced with the indicated CXCR4 variants (□, CXCR4^m; ■, CXCR4¹⁰¹³; ■, CXCR4^{wt}). Parental A0.01 T-cell line was consistently unresponsive to CXCL12. (A-C) Results (mean $\pm$ SEM) are from 3 independent experiments and are expressed as percentage of input cells that migrated to the lower chamber. * $P < .05$ and ** $P < .005$ compared with leukocytes from healthy subjects or with CXCR4^m-expressing A0.01 T cells.

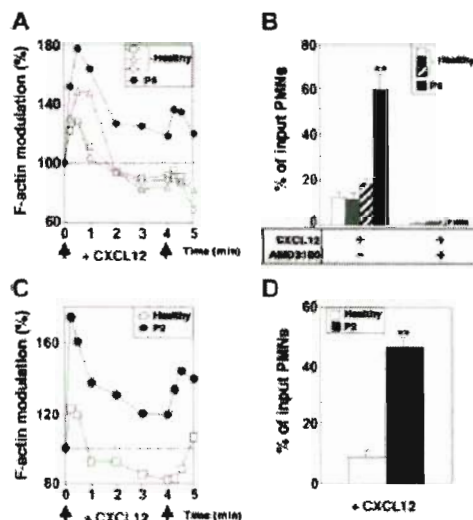


Figure 6. Impaired CXCR4 signaling in WHIM PMNs. (A,C) CXCL12-triggered actin polymerization in overnight-cultured PMNs from WHIM^m patient P4 (A, ●) or WHIM¹⁰¹³ patient P2 (C, ●) compared with those from healthy donors (□) and patient P4's mother (■) and father (■). Results are from 1 representative experiment of 8. (B,D) CXCL12-induced chemotaxis of PMNs from patients P4 (B, ■) and P2 (D, ■) were compared with those of cells from healthy donors (□) and patient P4's mother (■) and father (■). Inhibition of CXCL12-induced chemotaxis by addition of AMD3100 in both chambers is shown in panel B. Results (mean $\pm$ SEM) are from 3 independent experiments and are expressed as percentage of input PMNs that migrated to the lower chamber. ** $P < .005$ compared with PMNs from healthy subjects.

larly to WHIM HPV lesions, keratinocytes from warts of patients without WHIM (4 samples from 4 patients), free of concomitant infections by other pathogens, also displayed, mainly in the granular layer, abundant CXCL12 expression (Figure 7G-H). The expression pattern of CXCL12 in the dermis was similar to that previously observed in healthy and inflammatory skin and included blood vessel endothelia, sweat glands, scattered fibroblasts, and large mononuclear leukocytes.^{35,44,45} In both WHIM and non-WHIM HPV lesions, fibroblasts and a fraction of mononuclear leukocytes with dendritic cell-like morphology expressed abundant CXCL12 (Figure 7I-K). As previously reported for healthy and inflammatory skin,³⁵ CXCR4 was uniformly detected in epidermal keratinocytes, endothelium, and infiltrating cells in all WHIM and non-WHIM warts and condylomata (Figure 7L). Absence of labeling using IgG2a and IgG1 nonrelevant isotype controls supports the specificity of staining for CXCL12 and CXCR4, respectively (Figure 7I,M).

Discussion

Our study shows that primary lymphocytes and neutrophils from individuals with clinical features of the WHIM syndrome share functional alterations of CXCR4-mediated responses. We provide original evidence that such anomalies do not necessarily depend on the occurrence of a C-terminally truncated form of CXCR4, as they are also observed in WHIM leukocytes expressing only wild-type CXCR4 receptors. Refractoriness of CXCR4 to be desensitized and internalized together with increased G-protein-dependent signaling in response to CXCL12 are characteristic biologic manifestations we found in all patient leukocytes. We propose that the

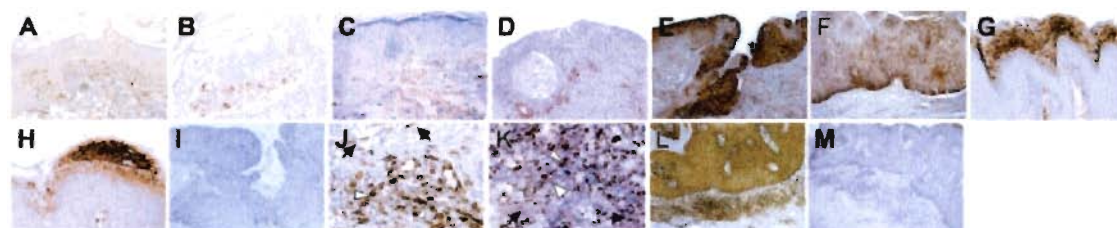


Figure 7. Expression of CXCL12 in HPV lesions from patient with and without WHIM. CXCL12 immunostaining of control skin samples: healthy skin (A), seborrheic keratosis (B), inflammatory skin (C), and epidermoid carcinoma (D). CXCL12 expression in WHIM wart epidermis (E), WHIM dysplastic condyloma epidermis (F), non-WHIM wart (G), non-WHIM condyloma (H). WHIM wart epidermis (same specimen as in panel E) immunostained with IgG2a isotype-matched control antibody (Ab) (I). CXCL12 expression in non-WHIM (J) and WHIM (K) dermal mononuclear infiltrates. Cells with fibroblast (arrows) or dendritic cell morphology (arrowheads) are shown (J-K). CXCR4 immunostaining of WHIM wart dermis and epidermis (L). The same specimen was similarly processed with IgG1 isotype-matched control Ab (M). Original magnification, $\times 400$ (A-C,G,H), $\times 200$ (D-F,I), $\times 600$ (J-K), $\times 100$ (L-M).

resulting, abnormally sustained CXCR4 activity in WHIM lymphocytes and neutrophils might account for the peculiar association of lymphopenia and myelokathexis with this genetic disorder.

Agonist-induced GPCR internalization generally relies on phosphorylation of the C-tail that in turn promotes binding of β -arrestins to phosphorylated receptors.⁴⁶ Accordingly, CXCR4 internalization depends on C-tail Ser/Thr residues that are phosphorylated in response to PMA and CXCL12 via protein kinase C (PKC) or G-protein-coupled receptor kinases (GRKs).⁴⁰ Thus, removal of Ser³³⁸/Ser³³⁹ and Ser³⁴¹/Thr³⁴² couples and Ser³⁴⁴ in C-tail-truncated CXCR4^{tr} is likely to be responsible for the impaired endocytosis of these receptors in WHIM lymphocytes. Yet, the residual marginal endocytosis of CXCR4^{tr} upon ligand stimulation could be accounted for by the preserved Ser³²⁴ and Ser³²⁵ residues.⁴⁰

Ectopic expression of CXCR4^{tr} in T cells reproduces qualitatively and quantitatively the CXCR4 dysfunctions observed in WHIM^{tr} leukocytes. This finding provides direct evidence for the etiologic role of the C-tail-truncated CXCR4 and strongly suggests a prevalence of the mutant CXCR4 functioning over that of the wild-type receptor. CXCR4 is known to spontaneously internalize at high rates, with a marginal part being recycled at the cell surface.⁴⁷⁻⁴⁹ Thus, as a first assumption, we speculated that the default of CXCR4^{tr} to be internalized cause its predominance at the plasma membrane. However, our results with the T7-GFP-CXCR4^{tr} chimera receptor (Figure 2E-F) challenge this possibility as expression of CXCR4^{tr} does not affect cell surface expression of CXCR4^{tr} and vice versa. Of importance, we clearly demonstrate that CXCR4^{tr} alters the functioning of its wild-type counterpart in a transdominant-negative manner. These findings provide clues on the molecular mechanisms that account for the functional defect we report in WHIM^{tr} leukocytes that carry heterozygous mutation of CXCR4. It is known that CXCR4 forms constitutive oligomers.^{50,51} Similarly, it is likely that CXCR4^{tr}/CXCR4^{tr} hetero-oligomers exist in WHIM^{tr} leukocytes, thereby permitting CXCR4^{tr} to hijack CXCR4^{tr} functioning by a transdominant mechanism. Resonance energy transfer experiments with distinctly tagged mutant and wild-type CXCR4 receptors will help to elucidate the intimate mechanisms of this phenomenon.

We propose that the functional anomalies of CXCR4 we identified in WHIM^{tr} leukocytes likely rely on an aberrant downstream partner with some degree of selective interaction with CXCR4. This assumption is reinforced by our observations that first, CXCR4^{tr}, when ectopically expressed in primary fibroblasts from WHIM^{tr} patients, became defective in CXCL12-promoted endocytosis (data not shown). Second, CCR7 and CCR5 internalization and desensitization were unaffected in WHIM^{tr} lymphocytes. Finally, the fact that CXCR4 in WHIM^{tr} lymphocytes

internalizes poorly in response to CXCL12 but remains fully susceptible to PMA strongly suggests that the endocytic pathway downstream of the β -arrestin recruitment is preserved. Thus, the impaired internalization of CXCR4^{tr} in response to CXCL12 points to the existence of a mutated or down-regulated protein restricted to the CXCL12/CXCR4 axis, which might affect the agonist-dependent phosphorylation and/or the coupling of the C-tail to the endocytic pathway. Potential protein candidates include GRKs, as it appears from recent works that distinct GRKs do not interact with CXCR4 with equal efficiency.^{42,52,53} In addition to GRKs, evidence accumulates that proteins can associate with the C-ter domain of GPCRs,⁵⁴ thereby regulating their activity. Accordingly, an unknown scaffolding protein might selectively participate in the attenuation of CXCR4 signaling.

The refractoriness of CXCR4 to desensitization is a prominent characteristic in both WHIM^{tr} and WHIM^{tr} leukocytes, from which results the enhanced efficiency of CXCR4 receptors to stimulate G-proteins. Because chemotaxis relies on the activation of G-protein $\beta\gamma$ subunits,⁵⁵ both the enhanced and sustained CXCR4-associated G-protein-dependent signaling in WHIM leukocytes could account for their more pronounced migration toward CXCL12 gradients. Our data are in keeping with the previously reported increased cell motility triggered by other chemokine receptors (ie, CCR2b, CCR5, CXCR2) that are refractory to desensitization.⁵⁶⁻⁵⁹ A recent study also reports an increased CXCL12 chemotactic response of leukocytes from WHIM patients carrying CXCR4 mutations.³⁶ However, it is unclear why these receptors were not defective in desensitization and internalization, as they lack the Ser residues critical for agonist-induced endocytosis.⁴⁰ These divergent observations are even more puzzling since the ectopic expression of CXCR4^{tr}, either in the CXCR4-negative A0.01 T-cell line or in normal lymphocytes, recreates in our hands the same set of CXCR4-related anomalies we observed in primary cells from patients with WHIM. However, while we used freshly isolated WHIM^{tr} leukocytes, Gulino et al³⁶ performed experiments with long-term IL-2-expanded leukocytes. These different methodologic approaches may account for the discrepancies between the 2 groups regarding CXCR4 endocytosis and desensitization.

The correlation between altered CXCR4 signaling and the profusion of HPV lesions in patients with WHIM, however, remains intriguing. In light of reported observations and our current findings, several hypotheses can be considered. As previously proposed,²⁴ the profusion of HPV-induced lesions could be accounted by a selective defect of anti-HPV effector-T lymphocytes due to the presence of a C-tail-truncated CXCR4. Although normal T-lymphocyte functions are observed in the patients described here, and in other reports,^{24,25,60} the paucity of anti-HPV responses and

the marked T lymphopenia could contribute to the attenuation of the specific antiviral activity. Moreover, the aberrant CXCR4 signaling in WHIM patient cells could enhance some immune escape mechanisms proposed for HPV infection.⁶¹ An alternative hypothesis to the immune-specific deficiency is the possibility that infiltrating leukocytes, at the sites of HPV infection, would be instrumental for the development of extensive verrucosis. Indeed, in mouse models keratinocyte hyperproliferation, transformation, and metastasis elicited by HPV-16 oncogenes largely depend on the presence of infiltrating leukocytes with the capacity to secrete matrix metalloproteinase-9.⁶² The production of this enzyme is induced by CXCL12.^{63,64} Thus, in patients with WHIM, CXCL12 secreted in the dermis could favor the development of HPV-induced lesions through the sustained activation of CXCR4 in leukocytes. This mechanism could be amplified by the intriguing and previously unreported production of CXCL12 from keratinocytes in HPV-induced lesions. Further work is required to determine the relevance of immune specific and inflammatory mechanisms in the genesis of the profuse HPV clinical infections in the WHIM syndrome.

CXCL12/CXCR4 is not only critical for homing and retention of hematopoietic progenitor CD34⁺ cells (HPCs) in the BM,^{15,65,66} but it is also essential for the regulation of neutrophil mobilization from the BM.^{67,68} Manifold convergent observations support this notion. First, neutrophils activated by in vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) release elastase,⁶⁹ a protease that selectively degrades both CXCL12 and CXCR4 amino-terminus and prevents CXCL12/CXCR4 signaling.⁷⁰ Injection of G-CSF induces egress of granulocytes from BM, whereas blocking of CXCL12 prevents BM relocation of senescent, circulating neutrophils.⁶⁷ Finally, the administration to human healthy volunteers of nonpeptide CXCR4 antagonists mobilizes CD34⁺ HPCs and leukocytes, among which band-form neutrophils witness recent egress from the BM.⁷¹ We anticipate that the

sustained CXCR4 activation observed in WHIM PMNs might strongly impair egress of mature neutrophils from the BM and force relocalization of circulating aged neutrophils to the BM. This mechanism might account for myelokathexis in patients with WHIM. While BM lymphopoiesis is preserved in the WHIM syndrome, the patients show a marked lymphopenia. The sustained CXCR4-dependent signaling could also affect the egress of mature lymphocytes from the BM. In this regard, the administration of CXCR4 antagonists mobilizes lymphocytes, including B cells, from the BM.⁷¹

Our findings provide a rationale for the incorporation of CXCR4 antagonist to the therapeutic arsenal used in the treatment of patients suffering with WHIM syndrome. By competing and limiting CXCR4 activation, antagonists would attenuate the aberrant signaling mediated by this receptor, raise the levels of circulating neutrophils, and thus reduce the number and severity of recurrent, bacterial infections in patients with WHIM.

Acknowledgments

We thank Dr M. Thelen (Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona, Switzerland) for critical reading of the manuscript and Pr J. L. Casanova (Laboratoire de Genetique Humaine des Maladies Infectieuses, Université de Paris René Descartes-INERM UMR550, Faculté de Médecine Necker-Enfants Malades) and Dr E. Solary (INSERM U517, Faculty of Medicine, Dijon, France) for helpful discussions. We thank Dr J. Donadieu and the French Register of Neutropenia for permanent support. We are grateful to Dr G. Gaibillet (IPBS/CNRS, Toulouse, France) and Dr P. Chârneau (Unité de Virologie Moléculaire et de Vectorologie, Institut Pasteur, Paris, France) for providing us with the T7-GFP-CXCR4^{wt} encoding plasmid and the pTRIP vector, respectively.

References

- Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:2305-2309.
- Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12:121-127.
- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, et al. The CXCL chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*. 1996;382:685-688.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*. 1996;382:685-688.
- Loetscher M, Geisler T, O'Reilly T, Zwaen R, Baggiolini M, Moser B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem*. 1994;269:232-237.
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in hematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998;393:595-599.
- Ma Q, Jones D, Borghesani PR, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and deranged cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9448-9453.
- Zhu Y, Yu T, Zhang XC, Nagasawa T, Wu JY, Rao Y. Role of the chemokine SDF-1 as the mesodermal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nat Neurosci*. 2002;5:719-720.
- David NB, Sapède D, Saint-Etienne L, et al. Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:16297-16302.
- Molyneux KA, Zinszner H, Kunwar PS, et al. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development*. 2003;130:4279-4286.
- Knauf JA, Weiz G, Geisler R, Nusslein-Volhard C. A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature*. 2003;421:279-282.
- Coulomb-L'Hermine A, Amara A, Schiff C, et al. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and antennal human B cell lymphopoiesis: expression of SDF-1 by mesothelial cells and biliary ductal plate epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8585-8590.
- Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity*. 1999;10:463-471.
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXCL chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382:635-638.
- Peled A, Petit I, Kollet O, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*. 1999;283:845-848.
- Balabanian K, Foussat A, Bouchet-Delbos L, et al. Interleukin-10 modulates the sensitivity of peritoneal B lymphocytes to chemokines with opposite effects on stromal cell-derived factor-1 and B-lymphocyte chemoattractant. *Blood*. 2002;99:427-436.
- Okada T, Ngo VN, Eklund EH, et al. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med*. 2002;196:65-75.
- Scimone ML, Feltinger TW, Mazo IB, Stein JV, Von Andrian UH, Wieringer W. CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes. *J Exp Med*. 2004;199:1113-1120.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996;272:872-877.
- Buckley CD, Arnitt N, Bradfield PF, et al. Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium. *J Immunol*. 2000;165:3429-3439.
- Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410:50-56.
- Lukacs NW, Berlin A, Scholz D, Skerit RT, Bridger GJ. AMD3100, a CXCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity. *Am J Pathol*. 2002;160:1353-1360.
- Balabanian K, Couderec J, Bouchet-Delbos L, et al. Role of the chemokine stromal cell-derived factor 1 in autoantibody production and nephritis in murine lupus. *J Immunol*. 2003;170:3382-3400.

24. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet*. 2003;34:70-74.
25. Wetzler M, Talpez M, Kleinerman ES, et al. A new familial immunodeficiency disorder characterized by severe neutropenia, a defective marrow release mechanism, and hypogammaglobulinemia. *Am J Med*. 1990;89:663-672.
26. Aprikian AA, Liles WC, Park JR, Jones M, Chi EY, Dale DC. Myelokathexis, a congenital disorder of severe neutropenia characterized by accelerated apoptosis and defective expression of bcl-x in neutrophil precursors. *Blood*. 2000;96:320-327.
27. Gorlin RJ, Gelb B, Diaz GA, Lofenese KG, Pittelkow MR, Ferryk JR Jr. WHIM syndrome, an autosomal dominant disorder: clinical, hematological, and molecular studies. *Am J Med Genet*. 2000;91:369-376.
28. Guino AV. WHIM syndrome: a genetic disorder of leukocyte trafficking. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003;3:443-450.
29. O'Regan S, Newman AJ, Graham RC. "Myelokathexis." Neutropenia with marrow hyperplasia. *Am J Dis Child*. 1977;131:655-658.
30. Le-Baillec K, Pidarot J, Belloy V, Chignard M. Human neutrophil cathepsin G down-regulates LPS-mediated monocyte activation through CD14 proteolysis. *J Leukoc Biol*. 2000;68:209-215.
31. Matz M, Shagin D, Bogdanova E, et al. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:1558-1560.
32. Amara A, Vidy A, Boulla G, et al. G protein-dependent CCR5 signaling is not required for efficient infection of primary T lymphocytes and macrophages by R5 human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol*. 2003;77:2550-2558.
33. Amara A, Gall SL, Schwartz O, et al. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1 α -dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med*. 1997;186:139-146.
34. Blanpain C, Vanderwinden JM, Cihak J, et al. Multiple active states and oligomerization of CCR5 revealed by functional properties of monoclonal antibodies. *Mol Biol Cell*. 2002;13:723-737.
35. Pablos JL, Amara A, Boulla G, et al. Stromal cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am J Pathol*. 1999;155:1577-1586.
36. Guino AV, Moratto D, Sozzani S, et al. Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood*. 2004;104:444-452.
37. Haribabu B, Richardson RM, Fisher I, et al. Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J Biol Chem*. 1997;272:28726-28731.
38. Signoret N, Oldridge J, Palchen-Matthews A, et al. Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol*. 1997;139:651-664.
39. Signoret N, Rosenkild MM, Klasse PJ, et al. Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. *J Cell Sci*. 1998;111:2819-2830.
40. Orsini MJ, Parent JL, Mundell SJ, Benovic JL, Marchese A. Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *J Biol Chem*. 1999;274:31076-31086.
41. Sanchez-Madrid F, del Pozo MA. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J*. 1998;18:501-511.
42. Vroom A, Heijnen CJ, Lombardi MS, et al. Reduced GRIK2 level in T cells potentiates chemotaxis and signaling in response to CCL4. *J Leukoc Biol*. 2004;75:901-909.
43. Wieland C, Jakobs KH, Wieland T. Altered guanine nucleotide triphosphate binding to transducin by cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *Cell Signal*. 1994;6:487-492.
44. Salucci O, Yao L, Villalba S, Sajewicz A, Pittaluga S, Tosato G. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stroma-derived factor-1. *Blood*. 2002;99:2703-2711.
45. Vanbervliet B, Bendris-Vermare N, Massacrier C, et al. The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J Exp Med*. 2003;195:823-830.
46. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*. 2002;115:455-465.
47. Tarasova NI, Stauber RH, Michajda GJ. Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXCR4 chemokine receptor 4. *J Biol Chem*. 1998;273:15888-15896.
48. Marchese A, Benovic JL. Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem*. 2001;276:45509-45512.
49. Lapham CK, Romantsev T, Petricoin E, et al. CXCR4 heterogeneity in primary cells: possible role of ubiquitination. *J Leukoc Biol*. 2002;72:1206-1214.
50. Issafras H, Angers S, Bulenger S, et al. Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J Biol Chem*. 2002;277:34666-34673.
51. Babcock GJ, Farzan M, Sodroski J. Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor. *J Biol Chem*. 2003;278:3378-3385.
52. Fong AM, Premont RT, Richardson RM, Yu YR, Lefkowitz RJ, Patel DD. Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin-2- and GRIK6-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:7478-7483.
53. Vroom A, Heijnen CJ, Raatgever R, et al. GRIK6 deficiency is associated with enhanced CXCR4-mediated neutrophil chemotaxis in vitro and impaired responsiveness to G-CSF in vivo. *J Leukoc Biol*. 2004;75:698-704.
54. Hu LA, Tang Y, Miller WE, et al. beta 1-adrenergic receptor association with PSD-95. Inhibition of receptor internalization and facilitation of beta 1-adrenergic receptor interaction with N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem*. 2000;275:3859-3866.
55. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol*. 2001;2:129-134.
56. Arai H, Monteclaro FS, Tsou CL, Franci C, Charo IF. Dissociation of chemotaxis from agonist-induced receptor internalization in a lymphocyte cell line transfected with CCR2B. Evidence that directed migration does not require rapid modulation of signaling at the receptor level. *J Biol Chem*. 1997;272:25037-25042.
57. Hau MH, Chiang SC, Ye RD, Prossnitz ER. Phosphorylation of the N-formyl peptide receptor is required for receptor internalization but not chemotaxis. *J Biol Chem*. 1997;272:29426-29429.
58. Kraft K, Olbrich H, Majouli I, Mack M, Proudfoot A, Oppermann M. Characterization of sequence determinants within the carboxyl-terminal domain of chemokine receptor CCR5 that regulate signaling and receptor internalization. *J Biol Chem*. 2001;276:34406-34418.
59. Mueller SG, White JR, Schraw WP, Lam V, Richmond A. Ligand-induced desensitization of the human CXCR4 chemokine receptor-2 is modulated by multiple serine residues in the carboxyl-terminal domain of the receptor. *J Biol Chem*. 1997;272:8307-8314.
60. Hord JD, Whitlock JA, Gay JC, Lukens JN. Clinical features of myelokathexis and treatment with hematopoietic cytokines: a case report of two patients and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1997;19:443-448.
61. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:59-65.
62. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*. 2000;103:481-490.
63. Heisig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109:625-637.
64. Kollet O, Shvritiel S, Chen YQ, et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*. 2003;112:160-169.
65. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*. 2002;3:687-694.
66. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest*. 2003;111:187-196.
67. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*. 2003;19:583-593.
68. Suratt BT, Petty JM, Young SK, et al. The role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood*. 2004;104:565-571.
69. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, et al. Neutrophil activation and hemostatic changes in healthy donors receiving granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 1999;93:2506-2514.
70. Valenzuela-Fernandez A, Planchenault T, Baleux F, et al. Leukocyte elastase negatively regulates stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4. *J Biol Chem*. 2002;277:15677-15689.
71. Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood*. 2003;102:2729-2730.

Nom : **Madame BENSOUSSAN LEJZEROWICZ**
Prénom : **Danièle**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

Spécialité : BIOINGÉNIERIE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N° 1391

Nancy, le 10 juillet 2007

Le Président de l'Université



Jean-Pierre FINANCE

DEFICITS CONGENITAUX DE L'IMMUNITE CELLULAIRE ET THERAPIE CELLULAIRE :

L'apport de la Thérapie cellulaire dans la prévention des complications survenant au décours des allogreffes de Cellules souches hématopoïétiques.

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est, à ce jour, le seul traitement curatif des déficits immunitaires (DI) héréditaires sévères. Cependant, les complications des allogreffes parmi lesquelles les infections et la réaction du greffon contre l'hôte sont parfois létales. Ce travail s'attache, à travers trois modèles de déficit immunitaire héréditaire - les syndromes hyper IgM (HIGM), le syndrome de Wiskott Aldrich (WAS) et le Syndrome de DiGeorge (cDGS) - à montrer qu'une bonne connaissance du DI et de ses complications d'une part ainsi que l'adaptation du protocole d'allogreffe accroissent les chances de succès de cette thérapeutique.

Dans le cadre des infections survenant au décours des allogreffes de CSH, nous rapportons comment la déplétion en lymphocytes B du greffon permet de prévenir efficacement la survenue d'un lymphome EBV-induit après allogreffes. Puis, nous décrivons l'effet bénéfique de l'allogreffe de CSH sur une infection à *Cryptosporidium parvum* chez deux enfants atteints d'un HIGM lié à l'X. Il semble que cet effet ne soit obtenu que lorsque les atteintes hépatiques engendrées par ce parasite ne sont pas trop avancées.

Nous étudions ensuite la prévention de la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) par manipulation du greffon de CSH. Nous rapportons les limites de la sélection positive CD34+ chez un patient atteint de WAS puis nous exposons les techniques de déplétion alloréactive permettant de conserver le capital anti-infectieux du greffon.

Enfin, dans le contexte particulier du cDGS, nous montrons comment simplifier la procédure d'allogreffe en ne réinjectant que les cellules d'intérêt et en s'affranchissant du conditionnement et de ses effets secondaires.

MOTS CLE

Déficit immunitaire héréditaire. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Prévention des infections. GVHD

PRIMARY IMMUNE DEFICIENCIES AND CELL THERAPY:

Improving results of hematopoietic stem cell transplantation

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the only way to cure severe Primary Immune Deficiencies (PID). However, HSCT is, sometimes complicated by infections or Graft versus Host disease (GVHD) which can lead to patient death. In this work we illustrate how, for three PIDs, Hyper IgM syndrome (HIGM), Wiskott Aldrich Syndrome (WAS) and DiGeorge syndrome (cDGS), expert knowledge of the disease and its complications together with optimal management of the allogeneic HSCT procedure both increase the chances for a successful outcome.

Analysing post-HSCT infections, we explain how B-cell depletion is very effective in preventing EBV-related lymphoproliferative syndromes. We also report the successful treatment of a pre-transplant *Cryptosporidium parvum* infection in two children with X-linked HIGM by an allogeneic HSCT that led to cure of the CD40L deficiency. Nevertheless, such an effective result seems to be favored by the absence of severe hepatic impairment at the time of transplant.

We then study how to prevent GVHD by graft manipulations. We report CD34-positive selection limits in a patient with WAS and we also present different alloréactive depletion methods to prevent GVHD while preserving graft anti-infectious capacity.

Finally, in the specific case of cDGS, we report on the effectiveness of unmanipulated peripheral blood mononuclear cell infusion to avoid a conditioning regimen and to simplify allogeneic transplantation procedure.

KEY WORDS

Primary Immune Deficiency. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Infections. GVHD.