



HAL
open science

Reconstitution immunitaire et immunothérapie adoptive anti-virales après allogreffe de cellules souches hématopoiétiques

Lamia Aïssi Rothé

► **To cite this version:**

Lamia Aïssi Rothé. Reconstitution immunitaire et immunothérapie adoptive anti-virales après allogreffe de cellules souches hématopoiétiques. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10073 . tel-01748654

HAL Id: tel-01748654

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748654>

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>

UFR DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE-SANTE-ENVIRONNEMENT"

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention : Sciences de la vie et de la santé

par **Lamia AÏSSI-ROTHÉ**

**RECONSTITUTION IMMUNITAIRE ET IMMUNOTHERAPIE
ADOPTIVE ANTI-VIRALES APRES ALLOGREFFE DE CELLULES
SOUCHES HEMATOPOIETIQUES**

Soutenue le 23 Juillet 2010

Membres du Jury :

Rapporteurs :	Professeur Jean-Jacques LATAILLADE Professeur Pierre ROHRLICH	PU-PH, Percy PU-PH, Université de Besançon
Examineurs :	Docteur Hélène ROUARD Professeur Jean François STOLTZ	MCU-PH, Université Paris XII PU-PH, UHP Nancy-1
Directeur de thèse :	Docteur Danièle BENSOUSSAN	PhD-HDR, UHP Nancy-1

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur **Jean-François STOLTZ** de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

J'exprime également ma profonde reconnaissance à Madame le Docteur **Danièle BENSOUSSAN** d'avoir encadré mon travail et de m'avoir accompagnée sans relâche jusqu'à la rédaction de ce mémoire. Je la remercie vivement pour la formation scientifique qu'elle a su me transmettre avec beaucoup de pédagogie et avec une grande rigueur. Elle a toujours su me soutenir et me motiver dans les moments difficiles afin que je puisse mener à bien mon projet. Ces trois années de travail resteront pour moi une agréable aventure grâce à sa gentillesse et à ses grandes qualités humaines.

Je tiens à remercier également Madame le Docteur **Véronique DECOT** pour ses précieux conseils et de m'avoir permis de participer à ses travaux de recherche sur les cellules NK.

Grand merci à ma chère amie **Olivia CAUNDAY** pour tous les bons moments que nous avons partagés durant ces trois ans. Son amitié et son soutien m'ont été précieux.

Merci à tout le personnel de l'**UTCT**, de m'avoir accueillie au sein de l'unité, de m'avoir transmis leur savoir-faire et de m'avoir accompagnée dans mon travail. Je pense en particulier à Brigitte S., qui a activement participé au projet CTL anti-ADV. Je pense également à Virginie, Kevin, Vanessa et Catherine. Merci aussi à Dominique pour ses précieux conseils en Immunologie et pour les bons moments que nous avons passés.

Grand merci à Monsieur le Professeur **Pierre BORDIGONI** de nous avoir permis de mettre en œuvre notre projet de production de grade clinique des CTL anti-ADV. Sans sa confiance et sans les encouragements qu'il nous a formulés, ce projet n'aurait pu aboutir.

Merci à Madame le Docteur **Alexandra SALMON** et Madame le Docteur **Laurence CLEMENT** du service de transplantation médullaire du CHU de Nancy pour leurs précieux conseils et leur confiance.

Merci également à Monsieur le Professeur **Jean Hugues DALLE** de l'hôpital Robert Debré de Paris de nous avoir permis de mettre en œuvre notre protocole de production de CTL anti-ADV pour traiter un patient de son service. Je tiens également à le remercier pour son enthousiasme et sa confiance.

J'exprime ma reconnaissance à Madame le Docteur **Véronique VENARD** et à **Hélène JEULIN**, ainsi qu'à l'ensemble du service de Virologie, pour l'excellente collaboration que nous avons eue. Je les remercie d'avoir cru en ce projet et de s'y être investie avec enthousiasme et enfin de m'avoir aidée sans hésiter à chaque fois que j'avais besoin de leurs compétences.

Merci également à Madame le Docteur **Anne KENNEL** et à **Christine MATHIEU** pour leurs conseils et pour nos nombreuses discussions concernant les expériences de cytométrie en flux.

Merci au personnel du laboratoire d'Immunologie de nous avoir permis d'utiliser le cytomètre en flux et pour les échanges avec Monsieur le Docteur **De CARVALHO**.

Grand merci à Monsieur le Docteur **Christophe FERRAND** de l'EFS de Besançon /Franche Comté pour sa précieuse collaboration et pour nos nombreuses discussions.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Monsieur le Professeur **Pierre ROHRLICH** et Monsieur le Professeur **Jean-Jacques LATAILLADE**, d'accepter d'être rapporteurs de ce mémoire. Je remercie aussi vivement Madame le Docteur **Hélène ROUARD**, qui a accepté de juger cette thèse.

Merci beaucoup à Marie-Jeanne et Evelyne de l'EFS de Nancy pour les nombreuses poches de sang qu'elles m'ont fournies afin de mener à bien mes expériences.

Un grand merci à ma tendre Idrissia pour son amitié et pour avoir su me faire part, ces trois années durant, de son expérience et de ses précieux conseils.

Merci à mes très chères Ilham et Ilhème pour leur amitié et pour leur présence. Leur gentillesse et leur gaieté contagieuse ont été pour moi une grande bouffée d'air.

J'ai une pensée particulière pour Laure avec qui j'ai partagé de très bons moments durant son passage à l'UTCT et avec qui j'entretiens une sincère amitié.

Grand merci à tous mes amis pour leur soutien. Je pense en particulier à Zoubeïda, Arris, Aïcha, Naïma, Nadia, Sonia, Nader, Maud, William, Laetitia, Régis, Marie-Laure et Chantal. Un grand merci également à Grégory pour le vif intérêt scientifique qu'il a porté à mes recherches.

Je tiens à exprimer mon immense gratitude à ma belle-famille pour m'avoir accueillie, soutenue et chérie comme leur propre fille. Merci pour leur tolérance et pour leur grande ouverture d'esprit qui nous ont permis de découvrir et de partager nos deux cultures. Leur présence m'a été très précieuse depuis le début de mes études en France. Grand merci à Paule, Patrick, Mamie Liliane, Pépère Marcel, Antonin, Tiphaine, Christopher et bien sûr Tonton Pierre.

Sans eux, je n'aurais jamais pu réaliser cet objectif. Grand merci à mes oncles des USA Tonton A. Madjid, Tonton Youcef et Tonton Cherif pour avoir financé ma venue en France et mes deux années de master. Merci pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon parcours et à ma réussite. Leur expérience de la recherche et du domaine universitaire m'a été d'une grande aide.

Je tiens à remercier profondément ma tante Dalila et son mari Jean-Luc de m'avoir accueillie dans leur foyer au début de mes études. Merci pour leur soutien et pour leur présence.

Un immense merci à toute la famille AÏSSI qui, depuis l'autre rive de la méditerranée, n'a cessé de m'encourager, de me motiver et de me soutenir. Sans leur amour jamais je n'aurais eu la force de mener à bien cette aventure si loin de mon pays. Merci en particulier à Djedou Mahmoud, Mamie Fatma, Tata Kheïra et mes frères et sœurs Ali, Nabila, Kheïreddine, Meriem et Noureddine. En cette occasion, j'ai une pensée toute particulière pour mes chers parents, Driss et Fatiha, qui sont pour beaucoup dans ma réussite et que je ne saurai jamais assez remercier.

Enfin, je voudrais terminer en remerciant affectueusement mon mari Ben. Il a su mettre à profit toute sa pédagogie et surtout toute sa patience pour m'aider à obtenir mon master. Son soutien, sa gentillesse et tout simplement sa présence à mes côtés ont toujours été des éléments indispensables à ma réussite.

A la mémoire de mon cousin Nabil.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	11
LISTE DES ABREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES	16
LISTE DES TABLEAUX	22

INTRODUCTION	24
---------------------	-----------

Première partie :	
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	27

CONTEXTE DE L'ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES	28
--	-----------

I- EFFET BENEFIQUE DE L'ALLOGREFFE DANS LE TRAITEMENT DES HEMOPATHIES MALIGNES :	29
---	-----------

<u>LA RÉACTION DU GREFFON CONTRE LA LEUCÉMIE (Effet GvL) :</u>	29
--	-----------

<i>I-1- Les différents antigènes intervenant dans l'effet GvL</i>	30
---	-----------

<i>I-2- Mécanismes effecteurs</i>	30
-----------------------------------	-----------

II- LES EFFETS DELETERES DE L'ALLOGREFFE DANS	
--	--

LE TRAITEMENT DES HEMOPATHIES MALIGNES :	31
<u>LA RÉACTION DU GREFFON CONTRE L'HÔTE (GvH) :</u>	31
<i>II-1- La GvH aiguë</i>	32
<u>II-1-1- Description clinique et facteurs de risques :</u>	32
<u>II-1-2- Physiopathologie :</u>	32
<i>II-2- La GvH chronique</i>	33
<u>II-2-1- Description clinique et facteurs de risque :</u>	33
<u>II-2-2- Physiopathologie :</u>	34
<u>II-2-3- Traitements immunosuppresseurs :</u>	34
III- LA NON-PRISE ou REJET DE GREFFE	36
IV- LA LENTEUR DE LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE	37
V- INFECTIONS VIRALES POST-GREFFE	40
Le Virus Epstein-Barr (EBV)	42
<u>1- Généralité/Classification :</u>	42
<u>2- Structure (Nicolas et Meyohas, 2003):</u>	42
<u>3- Cycle viral :</u>	43
3-1- <i>Présentation générale</i>	43
3-2- <i>Latence virale</i>	44
3-3- <i>Le cycle réplicatif (Nicolas et Meyohas, 2003)</i>	46
<u>4- Physiopathologie :</u>	47
<u>5- Épidémiologie (Seigneurin, 2001):</u>	49
5-1- <i>L'EBV dans le monde</i>	49
5-2- <i>Excrétion et transmission de l'EBV</i>	49
<u>6- Réponse immunitaire (Hislop et al., 2007):</u>	49
6-1- <i>Réponse immunitaire humorale</i>	50
6-2- <i>Réponse immunitaire cellulaire</i>	50
6-2-1- Les cellules NK :	50
6-2-2- Les lymphocytes T cytotoxiques :	51

6-2-3- Echappement du virus au système immunitaire	
et sa persistance dans l'organisme :	52
<u>7- Manifestations cliniques :</u>	53
7-1- <i>La primo-infection de l'EBV et la MNI</i>	53
7-2- <i>L'infection chronique active</i>	54
7-3- <i>L'EBV et le lymphome hodgkinien</i>	54
7-4- <i>Lymphoproliférations et lymphomes non hodgkiniens (LNH)</i>	
<i>associés à l'EBV</i>	55
7-4-1- Le lymphome de Burkitt :	55
7-4-2- Les lymphomes des T et des NK :	55
7-5- <i>Syndrome Lymphoprolifératif associé à l'X</i>	56
<u>8- Techniques de diagnostic :</u>	56
8-1- <i>Diagnostic indirect (sérologique)</i>	57
8-1-1- Immunofluorescence (IF) :	57
8-1-2- Immunoenzymologie (IE) :	57
8-2- <i>Diagnostic direct</i>	57
8-2-1- Culture cellulaire :	57
8-2-2- Biologie moléculaire :	58
<u>9- Traitements médicamenteux :</u>	58
9-1- <i>Traitement préventif</i>	58
9-2- <i>Traitement curatif</i>	59
II- Le Cytomégalo­virus humain (CMV)	60
<u>1- Classification :</u>	60
<u>2- Structure :</u>	60
<u>3- Cycle viral:</u>	62
<u>4- Latence et réactivation :</u>	63
<u>5- Physiopathologie :</u>	64
<u>6- Epidémiologie :</u>	65
<u>7- Réponse immunitaire :</u>	65
7-1- <i>Réponse humorale spécifique</i>	65
7-2- <i>Réponse cellulaire spécifique</i>	65
7-3- <i>Échappement au système immunitaire</i>	67

<u>8- Manifestations cliniques :</u>	68
8-1- <i>Chez les individus immunocompétents</i>	68
8-2- <i>Chez les individus immunodéprimés</i>	68
<u>9- Techniques du diagnostic :</u>	70
<u>10- Traitement des infections à CMV:</u>	71
10-1- <i>Antiviraux actifs sur le CMV</i>	72
10-2- <i>traitement prophylactique</i>	72
10-3- <i>Traitement préemptif</i>	73
10-4- <i>Traitement curatif</i>	73
III- L'Adénovirus humain (ADV)	74
<u>1- Classification :</u>	74
<u>2- Structure :</u>	75
<u>3- Cycle viral:</u>	76
<u>4- Latence et réactivation :</u>	79
<u>5- Épidémiologie :</u>	79
<u>6- Réponse immunitaire :</u>	80
6-1- <i>L'immunité humorale</i>	80
6-2- <i>L'immunité cellulaire</i>	80
<u>7- Manifestations cliniques:</u>	81
7-1- <i>Atteintes respiratoires</i>	82
7-2- <i>Atteintes oculaires</i>	82
7-3- <i>Atteintes intestinales</i>	82
7-4- <i>Infections chez les sujets immunodéprimés</i>	83
<u>8- Techniques de diagnostic :</u>	86
8-1- <i>Diagnostic direct</i>	86
8-1-1- La culture cellulaire :	86
8-1-2- Détection d'antigène :	86
8-1-3- Détection du génome viral :	87
8-2- <i>Diagnostic indirect</i>	87
<u>9- Traitement des infections à ADV:</u>	87
RECONSTITUTION IMMUNITAIRE POST-GREFFE	89

<u>1- Reconstitution immunitaire Générale :</u>	89
1-1- <i>Cinétique de la reconstitution immunitaire</i>	89
1-2- <i>La reconstitution immunitaire T</i>	90
1-2-1- Expansion des lymphocytes T du donneur :	91
1-2-2- Reconstitution des lymphocytes T naïfs :	92
1-2-3- Facteurs influençant la reconstitution des lymphocytes T :	93
1-3- <i>La reconstitution immunitaire B</i>	93
<u>2- Reconstitution immunitaire spécifique anti-infectieuse :</u>	95
2-1- <i>Reconstitution immunitaire spécifique anti-EBV</i>	95
2-2- <i>Reconstitution immunitaire spécifique anti-CMV</i>	97
2-3- <i>Reconstitution immunitaire spécifique anti-ADV</i>	100
IMMUNOTHERAPIE ADOPTIVE ANTI-INFECTIEUSE	102
<u>1- Immunothérapie non spécifique :</u>	103
<u>2- La Déplétion alloréactive :</u>	105
<u>3- Immunothérapie spécifique anti-infectieuse :</u>	107
2-1- <i>Production des CTL anti-virus par culture cellulaire</i>	108
2-1-1- Les CTL anti-EBV :	108
2-1-2- Les CTL anti-CMV (Walker <i>et al.</i>, 1995 ; Peggs <i>et al.</i>, 2003) :	112
2-1-3- Les CTL multivirus (Leen <i>et al.</i>, 2006):	115
2-1-4- Les Effets secondaires survenant après l'injection de CTL anti-infectieuses (Cruz <i>et al.</i>, 2010):	118
2-1-5- Les Limites de la production de CTL anti-infectieuses par culture cellulaire (Leen <i>et al.</i>, 2010):	118
2-2- <i>Production des CTL par sélection des tétramères</i>	119
2-3- <i>Production des CTL par techniques immunomagnétiques</i>	120
2-4- <i>Production des CTL à partir de donneurs n'ayant aucune immunité vis-à-vis des virus concernés</i>	121

Deuxième partie :
MATERIEL ET METHODES

123

<u>1- Les pools de peptides et les différents antigènes utilisés :</u>	124
1-1- Pools de peptides	124
1-2- Protéine hexon de l'ADV2	124
1-3- Préparation des lysats ADV	124
1-4- Lysat CMV	124
1-5- Lignées EBV des donneurs de CSH	124
<u>2- Elispot IFNγ:</u>	125
<u>3- Le Cytokine Capture System (Miltenyi Biotec) (cf. schéma) :</u>	126
3-1- Phase de stimulation	126
3-2- Marquage avec le Catchmatrix reagent	126
3-3- Phase de sécrétion de l'IFN γ	127
3-4- Marquage avec le réactif d'enrichissement	127
3-5- Enrichissement sur le CliniMACS	128
3-6- Récupération des Fractions positive et négative	128
<u>4- IFNγ Detection Assay (Cytokine Detection Assay, CDA):</u>	128
<u>5- Analyse phénotypique par cytométrie en flux :</u>	130
<u>6-Amplification des Lymphocytes T IFNγ+ spécifiques:</u>	132
<u>7-Contrôles qualité fonctionnels réalisés sur cellules amplifiées:</u>	132
7-1- Dosage des cytokines intracellulaires	132
7-2- Test de prolifération ou transformation lymphoblastique (TTL)	133
7-3- Test de cytotoxicité	134
7-3-1- Production des cellules cibles autologues :	134
7-3-2- Test de cytotoxicité :	135
7-4- Culture mixte lymphocytaire (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR)	135
<u>8- Analyses statistiques :</u>	136

Troisième partie :

RESULTATS

137

Etude de la Reconstitution immunitaire après allogreffe de CSH

Exemple du monitoring de la reconstitution immunitaire anti-EBV **138**

Article 1:

*Lamia AÏSSI-ROTHÉ**, Maud DAVENI*, Véronique VENARD, Alexandra SALMON, Aude FALENGA, Véronique DECOT, Laurence CLEMENT, Jean Marc VIRION, Véronique LATGER-CANNARD, Cécile TOMOWIAK, Jean François STOLTZ, Pierre BORDIGONI, Danièle BENSOUSSAN.

* Co-auteurs.

Soumis

**Production de grade clinique de lymphocytes T cytotoxiques anti-
adénovirus à des fins d'immunothérapie adoptives après
allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.** **169**

Article 2:

Lamia AÏSSI-ROTHÉ, Véronique DECOT, Véronique VENARD, Hélène JEULIN, Alexandra SALMON, Laurence CLEMENT, Anne KENNEL, Christine MATHIEU, Jean Hugues DALLE, Georg RAUSER, Christophe CAMBOURIS, Marcelo DE CARVALHO, Jean François STOLTZ, Pierre BORDIGONI, Danièle BENSOUSSAN.

J. Immunother. 2010 May; 33(4):414-424.

**Résultats obtenus après injection de CTL anti-ADV chez des
patients immunodéprimés atteints d'une infection à ADV :**
Présentation de trois cas cliniques compassionnels. **183**

I- Cas clinique n°1 : patient CP	183
<u>1- Production des CTL anti-ADV :</u>	184
1-1- Amplification des CTL anti-ADV	185
1-2- Dosage des cytokines intracellulaires	185
1-3- Cytotoxicité des CTL anti-ADV	186
1-4- Prolifération spécifique des CTL anti-ADV	186
1-5- Alloréactivité des CTL anti-ADV	187
<u>2- Evolution clinique du patient après injection des CTL anti-ADV :</u>	189
II- Deuxième cas clinique : patient NC	191
<u>1- Production des CTL anti-ADV :</u>	192
1-1- Amplification des CTL anti-ADV	193
1-2- Cytotoxicité des CTL anti-ADV	193
<u>2- Evolution clinique du patient après injection des CTL anti-ADV :</u>	195
III- Troisième cas clinique : patient AM	196
<u>1- Production des CTL anti-ADV :</u>	196
1-1- Première injection de CTL anti-ADV à partir de la leukaphérèse du donneur	197
1-1-1- Amplification des CTL anti-ADV :	198
1-1-2- Cytotoxicité des CTL anti-ADV :	198
1-2- Evolution clinique du patient après la première injection des CTL anti-ADV	200
1-3- Deuxième injection de CTL anti-ADV à partir de cellules décongelées du donneur à J ₁₂₅	200
1-3-1- Amplification in vitro des CTL anti-ADV:	201
1-3-2- Cytotoxicité des CTL anti-ADV :	202
1-3-3- Alloréactivité des CTL anti-ADV :	202
1-4- Evolution clinique du patient après la deuxième injection des CTL anti-ADV	204
<u>2- Les CTL anti-ADV injectées sont-elles à l'origine de la reconstitution immunitaire spécifique anti-ADV observée chez le receveur ?</u>	206

<u>Conclusion</u>	210
--------------------------	------------

<u>Résultats préliminaires de la production des CTL bispécifiques anti-ADV/CMV</u>	211
---	------------

<u>1- Réponse immunitaire vis-à-vis de l'ADV et le CMV :</u>	211
---	------------

<u>2- Production des CTL anti-ADV/CMV :</u>	211
--	------------

<u>3- Tests fonctionnels des CTL anti-ADV/CMV :</u>	212
--	------------

<i>3-1- Amplification in vitro des CTL anti-ADV/CMV</i>	<i>212</i>
---	------------

<i>3-2- Dosage de cytokines intracellulaires des CTL anti-ADV/CMV</i>	<i>213</i>
---	------------

<i>3-3- Cytotoxicité des CTL anti-ADV/CMV</i>	<i>214</i>
---	------------

<i>3-4- Alloréactivité des CTL anti-ADV/CMV</i>	<i>215</i>
---	------------

<u>Conclusion</u>	217
--------------------------	------------

Quatrième partie :	
DISCUSSION	218

I- Etude de la reconstitution immunitaire anti-virale	219
---	-----

II- Développement d'une technique d'Immunothérapie adoptive de grade clinique	221
---	-----

III- Expérience clinique compassionnelle d'une Immunothérapie adoptive anti-ADV	223
---	-----

IV- Présentation du protocole clinique multicentrique	226
---	-----

V- Banques de CTL allogéniques	228
--------------------------------	-----

VI- CTL tri-virus	230
-------------------	-----

VII- Relation GvH-infections virales	232
--------------------------------------	-----

CONCLUSIONS	234
--------------------	------------

BIBLIOGRAPHIE**236****ANNEXES****266****ARTICLE 3:**

Natural Killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: comparison of 3 cytokines IL-2, IL-15 or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1 and KIR2DL2 expression.

Decot V, Voillard L, Latger-Cannard V, Aïssi-Rothé L, Perrier P, Stoltz JF, Bensoussan D.

Exp Hematol. 2010 May; 38:351-62.

267

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

LISTE DES PUBLICATIONS RELATIVES AU MEMOIRE

Article 1:

Etude de la Reconstitution immunitaire après allogreffe de CSH. Exemple du monitoring de la reconstitution immunitaire anti-EBV

*Lamia AÏSSI-ROTHÉ**, Maud DAVENI*, Véronique VENARD, Alexandra SALMON, Aude FALENGA, Véronique DECOT, Laurence CLEMENT, Jean Marc VIRION, Véronique LATGER-CANNARD, Cécile TOMOWIAK, Jean François STOLTZ, Pierre BORDIGONI, Danièle BENSOUSSAN.

* Co-auteurs.

Soumis Transplantation Infectious Disease

Article 2:

Production de grade clinique de lymphocytes T cytotoxiques anti-adénovirus à des fins d'immunothérapie adoptives après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

Lamia AÏSSI-ROTHÉ, Véronique DECOT, Véronique VENARD, Hélène JEULIN, Alexandra SALMON, Laurence CLEMENT, Anne KENNEL, Christine MATHIEU, Jean Hugues DALLE, Georg RAUSER, Christophe CAMBOURIS, Marcelo DE CARVALHO, Jean François STOLTZ, Pierre BORDIGONI, Danièle BENSOUSSAN.

J. Immunother. 2010 May; 33(4):414-424.

AUTRES PUBLICATIONS

Article 3:

Natural Killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: comparison of 3 cytokines IL-2, IL-15 or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1 and KIR2DL2 expression.

DECOT V, VOILLARD L, LATGER-CANNARD V, AÏSSI-ROTHÉ L, PERRIER P, STOLTZ JF, BENSOUSSAN D.

Exp Hematol. 2010 May; 38:351-62.

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

- Journées de l'Ecole Doctorale BioSE de Nancy – 2008 – Poster.
- Congrès de l'Association Française de Cytométrie (AFC) – 2008 – Poster et Communication orale.
- Journées de la Recherche Clinique du CHU de Nancy – 2008 – Poster.
- Regenerative Medicine – Advancing next generation Therapies Hilton Head Island – SC 13th meeting – 2009 – Poster.
- Scientific Committee of the EBMT – 2009 – Poster.
- Colloque ONCOTRANS – 2009 – Communication orale.
- Congrès de la Société Française de la Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) – 2009 – Poster.
- 5ème Congrès de la Société Française de Bioingénierie Cellulaire et Tissulaire (SFBCT) – 2009 – Communication orale.

LISTE DES ABREVIATIONS

A:	Adulte
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADV :	Adénovirus
Allo:	Allogénétique
ARN:	Acide ribonucléique
Auto:	Autologue
BSA :	Bovine serum albumin
CAEBV :	L'infection EBV chronique active
CAR :	<i>Coxsackerivirus adenovirus receptor</i>
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CML :	Culture Mixte Lymphocytaire.
CMN :	Cellules Mononucléées
CMV :	Cytomégalovirus
CNT :	Cellules nucléées totales
CPA :	Cellules Présentatrices d'Antigène
CSH :	Cellules souches hématopoïétiques
CSM :	Cellules souches mésenchymateuses
CSP :	Cellules souches périphériques
CTL:	Lymphocytes T Cytotoxiques
DI :	Déficit Immunitaire Héritaire
DLI :	Donor Lymphocyte Infusion (Injection des lymphocytes du donneur)
DVMO :	Donneurs volontaires de moelle osseuse
E:	Early (phase précoce)
EBER:	EBV Encoded small RNA ()
EBNA:	Epstein Barr Nuclear Antigen
EBV:	Virus d'Epstein Barr
G-CSF:	Granulocyte Growth factor
GMP:	Good Manufacturing Practice
gp:	glycoprotéine
GvH :	Graft versus Host Disease (Réaction du greffon contre l'hôte)
GvHa :	Réaction du greffon contre l'hôte aiguë

GvHc :	Réaction du greffon contre l'hôte chronique
GvL :	Graft versus Leukemia (Réaction du greffon contre la leucémie)
GvT :	Graft versus Tumor (Réaction du greffon contre la tumeur)
ICAM:	Molécule d'adhésion intracellulaire
IE:	Immediate Early (phase très précoce)
IL :	Interleukine
IFN γ :	Interféron gamma
IFI:	Immunofluorescence indirecte
Ig:	Immunoglobuline
IR:	séquences Internes Répétées
HIGM :	Syndrome Hyper-IgM
HHV:	<i>Human herpesvirus</i>
HLA:	Human Leukocyte Antigen
HSV:	<i>Virus Herpes simplex</i>
HvG:	<i>host versus graft effect</i>
L:	Late (phase tardive)
LB:	Lymphome de Burkitt
LH:	Lymphome Hodgkinien
LLC:	Lignée cellulaire lymphoblastoïde
LMC :	Leucémie Myéloïde Chronique
LMP :	Latent Membrane Protein
LNH :	Lymphomes non hodgkiniens
LP :	Leader Protein
LPS :	Lipopolysaccharide
Ly :	Lymphocytes
MA :	Conditionnement myéloablatif
MNI :	Mononucléose infectieuse
MO :	Moelle Osseuse
MSC :	Mesenchymal Stem Cells (Cellules souches Mésenchymateuses)
NK :	Cellules Natural Killer
NMA :	Conditionnement non myéloablatif
ORF:	<i>Open reading frame</i>
Orilyt :	Origine de réplication lytique
Orip :	Origine de réplication latente

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR: Polymerase chain reaction
PHA : Phytohémagglutinine
pp: phosphoprotéine
PTLD : *Post-transplant Lymphoproliferative Disease* (syndrome lymphoprolifératif)
RI: Reconstitution immunitaire
RT-PCR: *Real time-poly chaine reaction*
SAL: Sérum anti-lymphocytaire
SCID: *Sever combined immunodeficiency disorders*
SP: Sang placentaire
TcR : Récepteur des lymphocytes T
Th: Lymphocytes T helper (auxillilaire)
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
TR : Séquences terminales répétées
TREC : T-cell receptor rearrangement excision circles
Treg : Lymphocytes T régulateurs
U : Séquences internes uniques
VZV : Virus de la varicelle et du zona.
ZEBRA : BamH1 *Z Epstein-Barr Replication Activator*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte (GvH) aiguë, d'après Dhédin et Vernant, 2010. CPA : cellules présentatrices d'antigènes ; CTL : lymphocytes T cytotoxiques ; NK : cellules Natural killer ; Ly : lymphocyte ; Th : lymphocytes T helper (auxiliaire) ; LPS : lipopolysaccharide ; TNF : tumor necrosis factor ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; IL : interleukine ; IFN γ : interféron gamma.

Figure 2 : Chronologie théorique des principales complications infectieuses observées après allogreffe, en fonction du délai par rapport à l'injection du greffon. CMV : cytomégalovirus ; GvH : réaction du greffon contre l'hôte ; HSV : virus *Herpes simplex* ; VZV : virus de la varicelle et du zona. D'après Mohty, revue du praticien, 2008.

Figure 3 : Représentation du virus Epstein-Barr.

Figure 4 : Cycle réplcatif de l'EBV. 1-Pénétration du virus dans les cellules de l'épithélium oropharyngé. 2-Multiplication du virus. 3-Infection des LB: multiplication et prolifération. 4-Réponse cytotoxique aspécifique puis spécifique. 5-Constitution de réservoir de latence dans des LB mémoire. 6-Parfois, le virus échappe au contrôle immunitaire d'où réinfection des cellules épithéliales et transmission du virus.

Figure 5 : Le cycle biologique de l'EBV *in vivo*, se caractérise par cinq étapes (Nicolas et Meyohas, 2003. Fields Virology, edited by BNF).

Figure 6 : Représentation du cytomégalovirus humain. (*adapté de Marko Reschke, <http://www.biographix.de/>*).

Figure 7: Structure du génome du cytomégalovirus (d'après Segondy, 2009). U_L : séquence unique longue ; U_S : séquence unique courte ; TR_L : *terminal repeat long* ; TR_S : *terminal repeat short* ; IR_L : *internal repeat long* ; IR_S : *internal repeat short* ; a : courte séquence sous forme répétée à chaque extrémité du génome et sous forme inversée (a') entre les séquences IR_L et IR_S.

Figure 8: Représentation schématique de l'Adénovirus (d'après Freymuth, 2003).

Figure 9 : Organisation du génome de l'adénovirus (d'après Russell, 2000).

Figure 10 : Cycle viral de l'adénovirus (d'après Freymuth, 2003).

Figure 11 : Différenciation périphérique des cellules B transitionnelles en cellules B mature naïves après allogreffe de CSH. Les histogrammes montrent les taux d'expression des CD24 et des CD38 parmi la population cellulaire B CD19+ à 1,7, 4, 7 et 9 mois après allogreffe de CSH chez un seul patient. Les cellules B transitionnelles CD24^{high} et CD38^{high} apparaissent en premier et se différencient progressivement en cellules B matures naïves.

Figure 12 : Les principales voies de thérapie cellulaire adoptive T contre les infections virales après allogreffe de CSH (d'après Feuchtinger *et al.*, 2007).

Figure 13: Diagramme montrant le nombre total des patients (248) traités par des CTL anti-EBV, générés par restimulations répétées avec des LCL-EBV autologues dans de multiples indications, d'après Merlo *et al.*, 2010.

Figure 14 : Génération des CTL multivirus (d'après la revue de Fujita *et al.*, 2008).

Figure 15: Analyse phénotypique par Cytométrie en flux des CTL anti-ADV après immunosélection. (a) Le nombre total des lymphocytes, (b) Les cellules colorées en noir correspondent aux cellules mortes 7AAD+ qui seront éliminées, (c) les cellules colorées en bleu correspondent aux monocytes CD14+ qui seront également éliminées lors de l'analyse, (d) Le cadre P correspond aux cellules T CD8 et le cadre O aux cellules T CD4, (e) La population CD8+IFN γ + colorée en vert est sélectionnée à partir du cadre P, (f) La population CD4+IFN γ + colorée en vert est sélectionnée à partir du cadre O.

Figure 16: Analyse cytométrique des CTL anti-ADV après amplification *in vitro* par dosage de cytokines intracellulaires. (a) Correspond au nombre total des lymphocytes, (b) Le cadre P correspond aux cellules T CD8 et le cadre O aux cellules T CD4, (c) La population

CD4+IFN γ + est sélectionnée à partir du cadre O, (d) La population CD8+IFN γ + est sélectionnée à partir du cadre P.

Figure 17: Tests fonctionnels des CTL anti-ADV injectés au premier patient.

A: Détection des cellules T anti-ADV chez le donneur et chez le receveur par Elispot IFN γ juste avant la production des CTL anti-ADV.

B: Analyse cytométrique avant et après sélection. Le pourcentage des CD4+IFN γ + et CD8+IFN γ + sont définis sur les cellules T CD4+ et CD8+, respectivement, en excluant initialement les cellules CD14+ et les cellules mortes 7AAD+.

C: Amplification *in vitro* des CTL anti-ADV après sélection. Une expansion de 1,4 log est observée après 12 jours en présence d'IL2 et de cellules nourricières autologues.

D : Marquage des cytokines intracellulaires des CTL CD4+ et CD8+ anti-ADV après amplification *in vitro*. Le dosage de l'IFN γ intracellulaire a été réalisé après stimulation des CTL anti-ADV avec la protéine hexon de l'ADV2 pendant 16h.

E : Cytotoxicité des CTL anti-ADV après amplification *in vitro*. Une lyse spécifique a été observée en utilisant des DC ou blastes PHA comme cellules cibles présentatrices d'antigènes (ADV2, ADV5 ou PepTivator-ADV5 Hexon, respectivement) ou non (NI) avec des rapports de 5 :1 à 40 :1.

F : Prolifération spécifique des CTL anti-ADV après amplification *in vitro*. Une prolifération spécifique des CTL anti-ADV a été détectée à J4 et J6 d'amplification *in vitro* par test de prolifération lymphoblastique.

G : Détection de l'alloréactivité avant et après sélection et amplification *in vitro*. Une réduction de 1,82 log de l'alloréactivité est détectée par culture mixte lymphocytaire contre les CMN de 3 donneurs HLA différents.

Figure 18: Quantification des cellules T sécrétrices d'IFN γ par Elispot et mesure de la charge adénovirale par PCR après injection de CTL anti-ADV.

Figure 19: Tests fonctionnels des CTL anti-ADV injectés au deuxième patient.

A : Détection des cellules T anti-ADV chez le donneur et chez le receveur par Elispot IFN γ juste avant la production des CTL anti-ADV.

B : Analyse cytométrique après sélection. Le pourcentage des CD4+IFN γ + et CD8+IFN γ + sont définis à sur les cellules T CD4+ et CD8+, respectivement, en excluant initialement les cellules CD14+ et les cellules mortes 7AAD+.

C : Amplification *in vitro* des CTL anti-ADV après sélection.

D : Cytotoxicité des CTL anti-ADV après amplification *in vitro*. Une lyse spécifique a été testée en utilisant des DC comme cellules cibles présentatrices d'antigènes (ADV2, ADV5 et PepTivator-ADV5 Hexon) ou non (NI) avec un rapport de 10 :1.

Figure 20 : Quantification des cellules T sécrétrices d'IFN γ par Elispot et mesure de la charge adévirale par PCR avant et après injection des CTL anti-ADV.

Figure 21 : Tests fonctionnels des CTL anti-ADV produits à partir de cellules fraîches et injectés au troisième patient.

A : Détection des cellules T anti-ADV chez le donneur par Elispot IFN γ juste avant la production des CTL anti-ADV.

B : Analyse cytométrique avant et après sélection. Le pourcentage des CD4+IFN γ + et CD8+IFN γ + sont définis sur les cellules T CD4+ et CD8+, respectivement, en excluant initialement les cellules CD14+ et les cellules mortes 7AAD+.

C : Amplification *in vitro* des CTL anti-ADV après sélection.

D : Cytotoxicité des CTL anti-ADV après amplification *in vitro*. Une lyse spécifique a été testée en utilisant des DC comme cellules cibles présentatrices d'antigènes (ADV2 ou ADV5) ou non (NI) avec des rapports de 5 :1 à 20 :1.

Figure 22 : Tests fonctionnels des CTL anti-ADV produits à partir de cellules décongelées et injectés au troisième patient.

A : Analyse cytométrique avant et après sélection. Le pourcentage des CD4+IFN γ + et CD8+IFN γ + sont définis sur les cellules T CD4+ et CD8+, respectivement, en excluant initialement les cellules CD14+ et les cellules mortes 7AAD+.

B : Amplification *in vitro* des CTL anti-ADV après sélection.

C : Cytotoxicité des CTL anti-ADV après amplification *in vitro*. Une lyse spécifique a été observée en utilisant des DC ou blastes PHA comme cellules cibles présentatrices d'antigènes (ADV2, ADV5 et PepTivator-ADV5 Hexon) ou non (NI) à un rapport de 10 :1.

D : Détection de la prolifération alloréactive avant et après sélection et amplification *in vitro*. Une réduction de 1,5 log de l'alloréactivité est détectée par culture mixte lymphocytaire contre les CMN d'un donneur HLA différent.

Figure 23 : Cinétiques de prolifération *in vivo*.

Figure 24 : Cinétique de production d'IFN γ *in vivo*.

Figure 25 : Profil de sécrétion des cytokines.

Figure 26A : Amplification de la chaîne du TCR β Clonalité T – Biomed 2 – PCR β B

Figure 26B: Amplification de la chaîne du TCR γ Clonalité T – Biomed 2 – PCR γ B

Figure 27 : Identification du CDR3 chez le patient.

Figure 28 : Tests fonctionnels des CTL anti-ADV/CMV (bi-virus).

A : Détection des cellules T anti-ADV et anti-CMV chez deux donneurs par Elispot IFN γ juste avant la production des CTL.

B : Analyse cytométrique avant et après sélection. (1) CTL anti-ADV, (2) CTL anti-CMV et (3) CTL anti-ADV/CMV. Le pourcentage des CD4+IFN γ + et CD8+IFN γ + sont définis sur les cellules T CD4+ et CD8+, respectivement, en excluant initialement les cellules CD14+ et les cellules mortes 7AAD+.

C : Amplification *in vitro* des CTL anti-ADV, -CMV et –ADV/CMV après sélection.

D : Fréquences des CTL (1) CD4+IFN γ + et (2) CD8+IFN γ + anti-ADV, -CMV et –ADV/CMV avant et après amplification *in vitro*. Le dosage de l'IFN γ intracellulaire a été réalisé après stimulation des 3 CTL avec le PepTivator-ADV5 Hexon, PepTivator-CMVpp65 ou avec les deux antigènes.

E : Cytotoxicité des CTL anti-ADV, -CMV et –ADV/CMV après amplification *in vitro*. Une lyse spécifique des blastes PHA présentant le PepTivator-ADV5 Hexon, PepTivator-CMVpp65 ou avec les deux antigènes, a été observée, en présence de CTL anti-ADV, -CMV et –ADV/CMV, respectivement, à un rapport de 10 :1.

F : Détection de la prolifération alloréactive des CTL anti-ADV, -CMV et –ADV/CMV avant et après sélection et amplification *in vitro*. Une réduction de 0.6 log de l'alloréactivité avec les CTL anti-ADV, de 0.92 log avec les CTL anti-CMV et de 1 log avec les CTL anti-ADV/CMV a été observée en comparaison avec les CMN avant sélection, détectée par culture mixte lymphocytaire contre les CMN de 3 donneurs HLA différents.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Autres virus impliqués dans les complications après allogreffes de CSH.

Tableau 2: Propriété des adénovirus humains.

Tableau 3 : Fréquence de l'infection à ADV, les maladies et la mortalité chez les receveurs de greffe de MO et/ou CSH, méthodes de diagnostique et les sérotypes impliqués (d'après Echavarria, 2008).

Tableau 4 : Résultats d'essais cliniques utilisant l'immunothérapie non spécifique à visée anti-infectieuse (DLI).

Tableau 5 : Essais cliniques utilisant des CTL spécifiques anti-EBV après allogreffe de CSH.

Tableau 6 : Essais cliniques utilisant des CTL spécifiques anti-CMV après allogreffe de CSH.

Tableau 7 : Essais cliniques utilisant des CTL spécifiques anti-ADV, **Multivirus** et **Bi-virus** après allogreffe de CSH.

Tableau 8 : Génération des CTL anti-ADV injectés au premier patient.

Tableau 9 : Cytotoxicité des CTL anti-ADV après amplification *in vitro*.

Tableau 10 : Génération des CTL anti-ADV injectés au deuxième patient.

Tableau 11 : Génération des CTL anti-ADV à partir de cellules fraîches injectés au troisième patient.

Tableau 12 : Génération des CTL anti-ADV à partir de cellules décongelées injectés au troisième patient.

Tableau 13 : Production de CTL anti-ADV, -CMV et -ADV/CMV à partir de 2 donneurs après stimulation avec le PepTivator-ADV5 Hexon, le PepTivator-CMVpp65 ou les deux antigènes en même temps : résultats obtenue avant et après sélection.

Tableau 14 : Dosage intracellulaire de l'IFN γ des CTL anti-ADV après stimulation avec les antigènes d'ADV, CMV ou les deux antigènes en même temps.

Tableau 15 : Dosage intracellulaire de l'IFN γ des CTL anti-CMV après stimulation avec les antigènes d'ADV, CMV ou les deux antigènes en même temps.

Tableau 16 : Dosage intracellulaire de l'IFN γ des CTL anti-ADV/CMV après stimulation avec les antigènes d'ADV, CMV ou les deux antigènes en même temps.

Tableau 17 : Cytotoxicité des CTL anti-ADV, -CMV et -ADV/CMV après amplification *in vitro*. Les blastes PHA présentant ou pas les antigènes PepTivator-ADV5 Hexon, PepTivator-CMVpp65 ou les deux en même temps, sont utilisés comme cellules cibles.

Tableau 18 : Proportion de CD3+IFN γ + parmi les CD3 injectés.

INTRODUCTION

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est le traitement de référence pour de nombreux patients atteints d'hémopathies malignes, non malignes ou de déficits immunitaires primitifs. Sa complexité et son succès résultent de l'immunosuppression des cellules du système immunitaire du receveur par le conditionnement et de la reconstitution immunitaire à partir des cellules souches dérivées du greffon. Ce contexte conflictuel est à l'origine de 3 complications majeures dont deux reposent sur le mécanisme d'alloréactivité : le rejet, la réaction du greffon contre l'hôte (GvH) et la lenteur de la reconstitution immunitaire. Si les deux premières complications sont maintenant bien connues, de nombreuses molécules pharmacologiques étant actuellement disponibles pour leur prévention et leur traitement (pour la GvH), la lenteur de la reconstitution immunitaire demeure un problème d'actualité brûlante. En effet, le retard de reconstitution immunitaire chez les receveurs d'allogreffes de CSH est la cause principale du développement de certaines complications post-allogreffes parmi lesquelles les infections virales qui sont associées à une morbidité et une mortalité importantes. Afin d'anticiper sur le développement d'infections virales causées par les agents les plus fréquents, un suivi régulier des charges virales est préconisé. Les laboratoires de Virologie sont sollicités afin de développer des techniques moléculaires quantitatives toujours plus sensibles. Parmi les bénéfices apportés par ce suivi virologique rigoureux on peut citer la mise en œuvre d'un traitement préemptif c'est-à-dire un traitement à dose curative avant toute apparition de signes cliniques en lien avec l'agent infectieux détecté. Cependant, cette seule information conduit parfois à la mise en œuvre abusive de traitements anti-viraux qui ne sont pas dénués de toxicité. L'idée d'associer au suivi viral un suivi régulier de la reconstitution immunitaire spécifique (*immunomonitoring*) se développe depuis une dizaine d'années, du fait de l'avènement de techniques rapides et sensibles de quantification de l'immunité cellulaire spécifique. Cette double approche devrait permettre de définir avec précision les patients nécessitant la mise en œuvre d'une thérapie anti-virale préemptive et ceux qui disposent de défenses immunitaires suffisantes pour maîtriser l'infection. Cependant, ce perfectionnement diagnostique, même s'il est nécessaire, ne semble pas suffire à garantir l'efficacité thérapeutique. En effet, il a été rapporté que le traitement médicamenteux de certains virus s'avérait inefficace en l'absence de reconstitution immunitaire concomitante. Une alternative thérapeutique aux antiviraux qui restore la réponse immunitaire spécifique doit pouvoir être proposée. L'immunothérapie adoptive consiste à transférer une immunité spécifique issue du donneur par l'administration de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dirigés contre un ou plusieurs virus, isolés au préalable *in vitro* et éventuellement amplifiés. Les progrès réalisés, durant cette décennie, ont montré que cette

approche est un atout essentiel dans la lutte contre les infections virales chez les receveurs d'allogreffe de CSH. Les techniques de production évoluent afin de permettre une meilleure réactivité et une disponibilité rapide des CTL au moment où le patient en a besoin.

L'objectif de ce travail est de développer et de valider l'apport d'outils diagnostiques et thérapeutiques se fondant sur l'immunité cellulaire spécifique anti-virale, en nous focalisant sur les 3 virus les plus fréquents et les plus délétères après allogreffes de CSH -le virus d'Epstein Barr (EBV), le cytomégalovirus (CMV) et l'adénovirus (ADV).

Dans la revue bibliographique nous nous sommes attachés à faire le point sur l'état des connaissances sur ces trois virus, à décrire la reconstitution immunitaire spécifique de ces virus après allogreffe de CSH et enfin à recenser et analyser les essais cliniques d'immunothérapie adoptive entrepris jusqu'à ce jour.

Nous rapportons dans un premier temps les résultats d'une étude de 2 ans réalisée sur une cohorte de 40 patients après allogreffe de CSH, associant au suivi de la charge virale EBV un suivi régulier de la reconstitution immunitaire spécifique de l'EBV par Elispot IFN γ . La finalité de ce travail est de proposer l'introduction de ces données de reconstitution immunitaire dans l'algorithme décisionnel thérapeutique des infections EBV. Une étude similaire est actuellement en cours pour l'ADV.

Dans un second temps, nous présentons la mise au point d'une technique de grade clinique de production de lymphocytes T cytotoxiques anti-ADV (CTL anti-ADV) en condition GMP (Good Manufacturing Practice), grâce au système CliniMACS et au Cytokine Capture System de Miltenyi Biotec, afin de proposer une immunothérapie adoptive. Nous décrivons par la suite trois expériences cliniques de traitement compassionnel d'une infection ADV post-allogreffe de CSH. Enfin, nous présentons les résultats préliminaires de la production de CTL bi-spécifiques anti-ADV et anti-CMV.

Première partie :

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

CONTEXTE DE L'ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une immunothérapie efficace pour le traitement des pathologies hématologiques malignes telles que les leucémies aiguës ou les lymphomes. Elle permet également de remplacer un tissu hématopoïétique déficient (dans le cas des déficits immunitaires primitifs). Contrairement à la greffe d'organes, où les organes transplantés contiennent peu de cellules immunologiquement actives, la transplantation de cellules souches aboutit à la reconstitution d'un système immunitaire dérivé du donneur chez le receveur. La mise en place de ce système immunitaire étranger chez le receveur est à l'origine de l'effet bénéfique de l'allogreffe, l'effet du Greffon contre la Leucémie (Graft *versus* Leukemia ; GvL) (Hercend *et al.*, 1986) mais est également responsable de son principal effet secondaire, la réaction du greffon contre l'hôte (Graft *versus* Host ; GvH) aiguë et/ou chronique (Morris et Hill, 2007).

De nombreux progrès ont été réalisés ces dernières décennies, en particulier en ce qui concerne la diversité des sources de CSH accessibles (moelle osseuse, cellules souches périphériques, sang placentaire), le développement des techniques de typage moléculaire des antigènes majeurs d'histocompatibilité HLA, le recours à des donneurs intrafamiliaux génoïdétiques mais également non apparentés HLA identiques (10/10^e) ou des donneurs intrafamiliaux HLA partiellement incompatibles (allogreffe haplo-identiques). De plus, l'apparition de conditionnements non myéloablatifs ou d'intensité réduite ayant pour objectif d'une part de diminuer la toxicité du conditionnement et d'autre part d'instaurer une tolérance du receveur vis-à-vis du greffon a permis de proposer l'allogreffe à des sujets plus âgés (au-delà de 50 ans). Ces conditionnements ont de plus permis de favoriser l'effet GvL. La disponibilité de nouveaux traitements immunosuppresseurs et anti-infectieux ont également contribué à améliorer les résultats des allogreffes de CSH.

I- EFFET BENEFIQUE DE L'ALLOGREFFE DANS LE TRAITEMENT DES HEMOPATHIES MALIGNES :

LA RÉACTION DU GREFFON CONTRE LA LEUCÉMIE (Effet GvL) :

La notion selon laquelle l'alloréactivité puisse générer un effet anti-leucémique a été suggérée dans un modèle murin de leucémie pour lequel le taux de rechute après autogreffe était supérieur à celui observé suite à une allogreffe (Barnes et Loutit, 1957). Chez l'homme, l'effet GvL est étroitement corrélé à la GvH, en effet le taux de rechutes de la leucémie est moindre chez les patients présentant une GvH (Weiden *et al.*, 1981). D'autres preuves de l'effet GvL en transplantation ont ensuite été accumulées au fil des années. Il a notamment été observé que :

- l'arrêt du traitement immunosuppresseur après l'allogreffe était susceptible d'induire une rémission de la maladie,
- le taux de rechute après allogreffe était plus faible qu'après une autogreffe
- la déplétion des lymphocytes T du greffon diminue certes le risque de GvH, mais est associée à un risque plus important de rechute (Maraninchi *et al.*, 1987).
- Dans environ 80% des cas aujourd'hui, le donneur compatible est un frère ou une soeur du receveur: il s'agit alors d'une greffe dite « génoidentique ». Un cas particulier de greffe génoidentique est la greffe « syngénique » réalisée entre jumeaux monozygotes, contexte dans lequel l'effet allogénique est très faible, qui est associée à un risque plus important de rechute (Gale *et al.*, 1994).

Enfin, l'induction d'une rémission chez les patients en rechute par l'injection de lymphocytes du donneur est la preuve la plus évidente du rôle de l'alloréactivité (Fefer *et al.*, 2004).

L'efficacité clinique de l'effet GvL dépend du type d'hémopathie maligne. En effet, celui-ci est très important dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) : environ 15% des patients greffés en phase chronique avec une moelle non manipulée présentent une rechute contre plus de 70% lorsque la moelle est déplétée en cellules T (Dhédin et Vernant, 2010). Dans cette pathologie, l'effet GvL peut être potentialisé par l'injection de lymphocytes du donneur (DLI) dans la prévention de la rechute. L'effet GvL est également notable dans les leucémies aiguës myéloïdes qui bénéficient également de l'apport des DLI en présence de signes précurseurs ou

avérés de rechute. En revanche, l'effet GvL semble moins efficace dans les leucémies aiguës lymphoïdes (Dhédin et Vernant, 2010).

I-1- Les différents antigènes intervenant dans l'effet GvL

Bien que la séquence des antigènes soit encore peu connue, ils peuvent néanmoins être classés en trois grandes catégories :

- Les antigènes ubiquitaires sont largement distribués chez le receveur ce qui les rend responsables du déclenchement d'un effet GvH ou GvL non spécifique (de Bueger *et al.* 1992). Il s'agit principalement des antigènes mineurs d'histocompatibilité (peptides dérivés de protéines polymorphiques du soi codées par des gènes non liés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)).
- Les antigènes considérés comme tissus spécifiques ont été retrouvés sur des cellules d'origine lymphoïde ou myéloïde (den Haan *et al.*, 1995).
- Les antigènes spécifiques de certaines leucémies sont des protéines issues de translocation chromosomique (cas de la LMC), de mutations ou de délétions présentes dans le génome des cellules leucémiques (Dermime *et al.*, 1997). C'est le modèle le plus favorable à l'effet GvL, les cibles de l'effet étant spécifiques des cellules leucémiques.

I-2- Mécanismes effecteurs

L'effet GvL qui conduit à la destruction des cellules tumorales fait appel à trois mécanismes effecteurs :

- *via* la libération de perforine ou de granzyme par les lymphocytes T cytotoxiques,
- par apoptose de la cellule déclenchée par l'engagement de la voie Fas/ Fas ligand,
- ou par la libération de cytokines permettant également de contrôler la prolifération.

II- LES EFFETS DELETERES DE L'ALLOGREFFE DANS LE TRAITEMENT DES HEMOPATHIES MALIGNES :

LA RÉACTION DU GREFFON CONTRE L'HÔTE (GvH) :

La morbidité et la mortalité liées à la GvH restent parmi les principaux obstacles au développement de l'allogreffe. Considérée souvent comme la face sombre de l'effet GvL, la GvH correspond à une attaque des tissus du receveur par les cellules immunitaires du donneur présentes dans le greffon après une transplantation de CSH.

Il existe deux formes cliniques de la GvH : celle se produisant dans les 100 jours qui suivent la greffe, appelée GvH aiguë (GvHa), et celle se produisant au-delà des 100 premiers jours post-greffe, appelée GvH chronique (GvHc) (Goker *et al.*, 2001).

La GvHa a pour cible le plus souvent les cellules épithéliales de la peau, du tube digestif, du foie, du poumon et peut également avoir pour cible les cellules hématopoïétiques. La GvHc est multisystémique.

La GvH est une complication fréquente de l'allogreffe de CSH. Une allogreffe ne peut être envisagée que s'il existe une compatibilité tissulaire entre le receveur et son donneur, cette compatibilité étant établie par la détermination des antigènes du système HLA. La plupart du temps, les allogreffes font appel à un donneur familial HLA compatible, mais elles ont aussi lieu avec un donneur HLA compatible non apparenté.

La GvH survient lors de greffes allogéniques, quand il n'est pas mis en place une immunosuppression préventive. Cependant, malgré l'instauration d'un traitement préventif, elle peut survenir dans le cadre des greffes HLA partiellement compatibles, mais aussi quasi constamment dans le cadre des greffes ayant lieu avec un donneur non apparenté HLA compatible, et de façon beaucoup plus rare lors d'une greffe avec donneur apparenté génoidentique (Goulmy *et al.*, 1996).

Ainsi, les cibles de la GvH sont donc soit les antigènes du système HLA de classe I ou II, en cas d'incompatibilité HLA partielle, soit les antigènes mineurs d'histocompatibilité en cas de greffe HLA compatible (Bleakley et Riddell, 2004).

II-1- La GvH aiguë

II-1-1- Description clinique et facteurs de risques :

La GvHa se caractérise par trois atteintes préférentielles : des lésions cutanées (érythèmes), des lésions hépatiques (cholestase), des lésions du tube digestif (diarrhées), ainsi que par une atteinte diffuse du système immunitaire et du thymus en particulier (Ferrara et Deeg, 1991). Elle se produit chez 25 à 75% des patients qui reçoivent un greffon HLA identique.

Les principaux facteurs associés à la survenue de GvHa sont : une incompatibilité HLA sur un ou plusieurs loci, l'âge élevé du receveur ou du donneur, un donneur de sexe féminin, une hémopathie en phase évolutive, l'origine des cellules de greffon (un greffon issu d'un sang placentaire contient des cellules tolérogènes qui contribuent à moins de GvH), un conditionnement renforcé et la survenue d'une infection (en particulier le CMV) (Weisdorf *et al.*, 1991).

En fonction du nombre et de la sévérité des lésions, on classe la GvHa en plusieurs grades : 0, le stade le moins grave à IV, le stade le plus grave (selon la classification de Glucksberg) (Glucksberg *et al.*, 1974).

II-1-2- Physiopathologie :

La physiopathologie de la GvHa correspond à la réponse des cellules du donneur vis-à-vis des alloantigènes du receveur (Reddy, 2003) (Figure 1, d'après Dhédin, 2010):

- la fréquence de la GvHa augmente avec l'intensité du conditionnement. Ce dernier, génère chez le receveur des lésions endothéliales et épithéliales avec libération de cytokines pro-inflammatoires (IL1, TNF α et GM-CSF), ce qui induit une surexpression de molécules d'adhésion et des molécules HLA sur les cellules du receveur. Cela facilite la reconnaissance des antigènes mineurs ou majeurs de l'hôte par les cellules immunitaires du greffon.

- la GvHa correspond à la mise en place de la réponse immune et dépend principalement des interactions entre les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) de l'hôte, et les lymphocytes T du donneur.

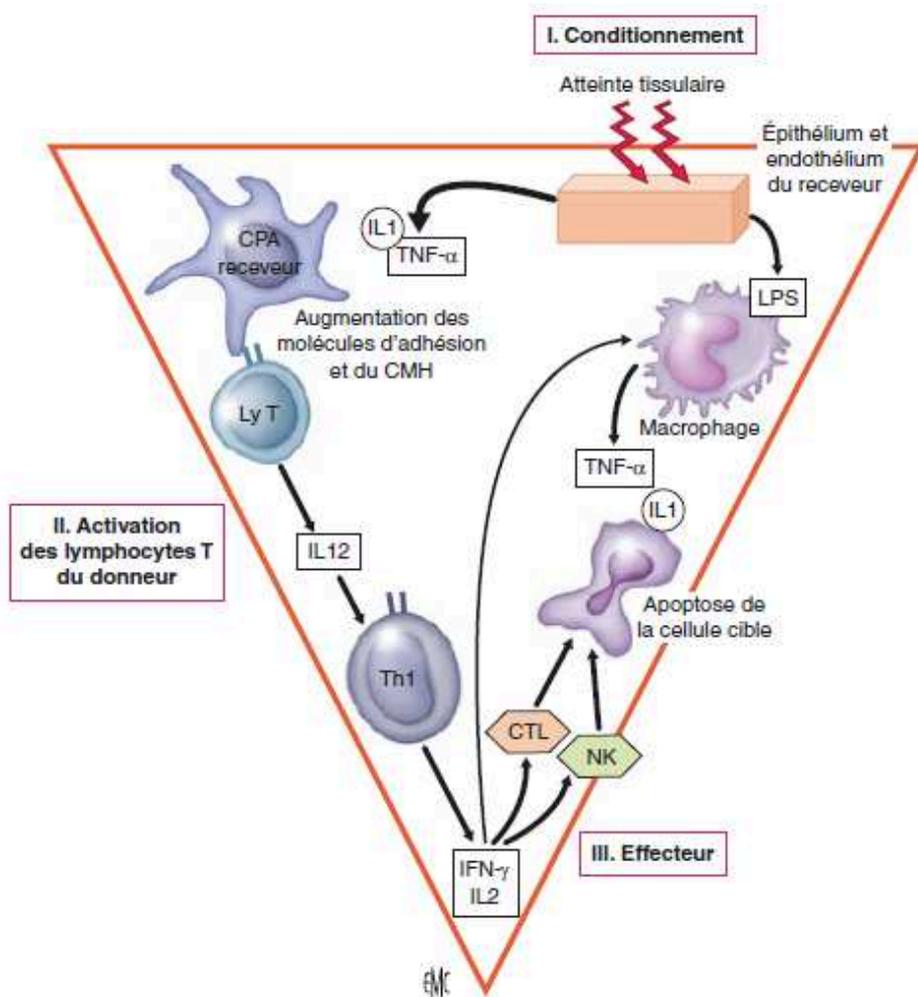


Figure 1 : Physiopathologie de la maladie du greffon contre l’hôte (GvH) aiguë, d’après Dhédin et Vernant, 2010. CPA : cellules présentatrices d’antigènes ; CTL : lymphocytes T cytotoxiques ; NK : cellules Natural killer ; Ly : lymphocyte ; Th : lymphocytes T herlper (auxiliaire) ; LPS : lipopolysaccharide ; TNF : tumor necrosis factor ; CMH : complexe majeur d’histocompatibilité ; IL : interleukine ; IFN γ : interféron gamma.

II-2- La GvH chronique

II-2-1- Description clinique et facteurs de risque :

La GvHc peut cliniquement s’apparenter à un syndrome auto-immun. Elle se définit par des atteintes identiques à celles de la GvHa, mais elle peut aussi s’étendre à d’autres territoires tels que les poumons ou les reins (Martin *et al.*, 2004). La GvHc se produit chez environ 33%

des receveurs ayant reçu un greffon génoidentique, et chez 49% des receveurs ayant reçu un greffon non apparenté (Michallet *et al.*, 2001).

Les facteurs de risque sont l'âge élevé du patient ou du donneur, le degré de compatibilité tissulaire, l'utilisation d'un greffon issu d'un donneur non apparenté, l'utilisation des cellules du sang périphérique (CSP) par rapport à la moelle osseuse (MO), la survenue de la GvHa préalable et des injections de lymphocytes du donneur (Dean et Bishop, 2003 ; Cutler *et al.*, 2001). La déplétion des lymphocytes T du greffon est associée à une baisse significative de la survenue de la GvHa ou GvHc (Ho et Soiffer, 2001). Environ 10 à 15% des patients atteints d'une GvHc meurent de complications liées à des infections, ou à l'immunosuppression (Michallet *et al.*, 2001).

II-2-2- Physiopathologie :

La physiopathologie de la GvHc est moins bien connue, mais il est évoqué un rôle central des lymphocytes T auto-immuns. En effet, le conditionnement et les lésions liées à l'âge ou à la GvHa peuvent altérer les fonctions thymiques, comme l'élimination de clones T auto-immuns (Basara *et al.*, 2001 ; Vinzio *et al.*, 2004). Les clones T auto-immuns entraînent des lésions tissulaires par infiltration directe et dys-régulation des cytokines (Bushan *et al.*, 2003). Ils produisent une réponse cytokinique TH2, notamment de l'IL4, qui favorise la production d'autoanticorps, et de l'IL10 qui inhibe la production d'anticorps contre les antigènes de l'environnement (Vinzio *et al.*, 2004).

II-3- Traitements immunosuppresseurs

De par la mortalité et la morbidité liées à la GvH, les cliniciens ont instauré un traitement prophylactique, qui a pour but d'inactiver ou d'éliminer les cellules T du donneur. La prophylaxie de la GvH fait appel à deux méthodes de référence :

❖ *L'immunosuppression post-greffe*

L'association de cyclosporine A et de méthotrexate est, depuis plus de 15 ans, considérée comme la prophylaxie de référence (Storb *et al.*, 1986). Une corticothérapie peut y être

associée ou le méthotrexate peut être remplacé (Chao *et al.*, 1993 ; Ruutu *et al.*, 2000). Plus récemment, l'intérêt du Tacrolimus (FK 506) a été évalué à la place de la ciclosporine (Nash *et al.*, 1995). Par ailleurs, le sérum anti-lymphocytaire (SAL), utilisé au moment du conditionnement de greffe pour prévenir le rejet, joue également un rôle dans la prévention de la GvH en raison de sa longue demi-vie responsable d'une déplétion T du greffon *in vivo*. Il existe également de nouveaux immunosuppresseurs, parmi eux le mycophénolate mofétil (CellCept). C'est un inhibiteur sélectif, non compétitif et réversible de la prolifération des lymphocytes B et T.

❖ *La manipulation du greffon*

La déplétion du greffon en lymphocytes T est réalisée pour les greffes à haut risque de GvH telles que les allogreffes haplo-identiques (en situation partiellement incompatible). Elle se fait le plus souvent par sélection positive des cellules CD34+ (Ho et Soiffer, 2001). En revanche, elle présente des inconvénients majeurs, tels un risque de non prise ou de rejet plus élevé, une incidence de rechutes plus élevée, et une aggravation du déficit immunitaire post-greffe (Dean et Bishop, 2003). Pour éviter ces complications, la réinjection de lymphocytes T du donneur déplétés en lymphocytes T alloréactifs a été proposée (André-Schmutz *et al.*, 2002) ou encore la réinjection de lymphocytes T du donneur transfectés avec le gène de la thymidine kinase afin de disposer du Gancyclovir pour traiter les GvH éventuellement déclenchées par cette immunothérapie.

Différentes stratégies de thérapie cellulaire sont actuellement à l'étude et ont été ou sont l'objet de protocoles cliniques pour la prévention ou le traitement de la GvHa, parmi lesquelles on peut citer l'administration de lymphocytes T CD4+CD25+, appelés lymphocytes T régulateurs (Treg), ou encore l'utilisation de Cellules souches Mésoenchymateuses (CSM) (LeBlanc *et al.*, 2008).

III- LA NON-PRISE ou REJET DE GREFFE

La non prise peut être liée à un rejet ou à une inhibition de l'hématopoïèse d'origine toxique ou virale. Le rejet (*host versus graft effect* : HvG) est dû à la persistance, après le conditionnement, de lymphocytes T de l'hôte capables de s'activer et de rejeter le greffon. Il a été montré par l'étude du polymorphisme de l'ADN, qu'il existe alors temporairement, un chimérisme mixte, c'est-à-dire la cohabitation de cellules hématopoïétiques de l'hôte et du donneur (Bretagne *et al.*, 1987 ; Donohue *et al.*, 1993). L'HvG est une complication rare (moins de 2%) après greffe de moelle génoidentique utilisant un conditionnement myéloablatif, en l'absence de manipulation *ex vivo* du greffon. Elle est favorisée par :

- la disparité HLA entre donneur et receveur (Mehta *et al.*, 1994),
- l'utilisation d'un conditionnement non myéloablatif,
- l'utilisation d'un greffon pauvre en cellules CD34+,
- la déplétion en cellules T du greffon (Green *et al.*, 1999).

Dans les situations à haut risque d'HvG, différentes techniques de prévention sont utilisées (Aversa *et al.*, 1994) :

- modification du conditionnement le rendant plus immunosuppresseur afin de détruire les lymphocytes T résiduels de l'hôte (utilisation de SAL, d'anticorps monoclonaux anti-T...),
 - augmentation du nombre de cellules souches périphériques CD34 contenues dans le greffon par l'utilisation d'un greffon de CSP plus riche en cellules CD34 qu'un greffon médullaire.
- En cas de rejet, dans quelques cas, une seconde greffe a été réalisée avec succès. Il paraît alors préférable de choisir un greffon de CSP (GvL) (Molina *et al.*, 1995).

IV- LA LENTEUR DE LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE

De multiples facteurs contribuent au statut sévère d'immunodépression chez les receveurs d'allogreffe de CSH. Le conditionnement (chimiothérapie et/ou radiothérapie) altère les tissus lymphoïdes du receveur et perturbe les barrières muqueuses. La présence de GvH aiguë ou chronique ainsi que leurs traitements induisent de nouvelles complications immunologiques. Enfin, le faible contingent de lymphocytes T greffés, comparé à la taille du compartiment cellulaire T chez une personne immunocompétente, ainsi que le nombre extrêmement limité de précurseurs immunitaires du donneur présents dans le greffon contribuent également à la lenteur de la reconstitution immunitaire chez le receveur. Tous ces facteurs rendent le receveur susceptible à un grand nombre d'infections opportunistes.

Les complications infectieuses survenant pendant la période de neutropénie ne mettent plus en jeu le pronostic vital des patients grâce à l'utilisation de facteurs de croissance (G-CSF). Les infections qui peuvent survenir dans ce délai post-greffe sont principalement des infections fongiques opportunistes.

En revanche, les complications infectieuses dues à l'EBV, au CMV, à l'ADV et aux agents fongiques (principalement *Aspergillus fumigatus* et *Candida species*) survenant après la période de neutropénie, soit entre J₅₀ et J₁₀₀ voire plus après allogreffe de CSH, contribuent largement à la morbidité et la mortalité associée à l'allogreffe. En effet, les infections post-greffe sont responsables de 17% des décès après allogreffe génoidentique et de 21% des décès après allogreffe non apparentée (Loberiza, 2003). Ces infections sont liées à un déficit quantitatif et qualitatif prolongé de l'immunité cellulaire spécifique.

La récupération de la réponse immunitaire cellulaire dépend d'une part de l'expansion périphérique des lymphocytes T matures présents dans le greffon (Douek *et al.*, 2000) et, pour un répertoire durable et diversifié, de l'éducation dans le thymus du receveur des précurseurs lymphoïdes présents dans le greffon et la production *de novo* de lymphocytes T naïfs. Ce deuxième processus prend du temps (plusieurs mois après l'allogreffe) et est perturbé car le thymus involue avec l'âge principalement après la puberté (Hakim *et al.*, 2005). De plus, il est altéré par le conditionnement à base d'irradiation qui abîme les cellules épithéliales thymiques et diminue la capacité de l'épithélium thymique à produire l'IL7, cytokine nécessaire à la survie et au développement des thymocytes, et par l'effet GvH. Chronologiquement, la première reconstitution des cellules T à survenir, provient de l'expansion homéostatique des lymphocytes T matures thymiques provenant du donneur et présents déjà dans le greffon.

Le degré d'immunodéficience chez le receveur est variable et reflète l'interaction complexe des facteurs contrôlables aussi bien qu'incontrôlables tels que l'âge du receveur, l'immunité antérieure du donneur (principalement pour le CMV), l'origine du greffon (MO, CSP ou SP), la manipulation éventuelle du greffon (la déplétion des cellules T *ex vivo*), l'utilisation d'anticorps anti-lymphocytes T (la déplétion des cellules T *in vivo*) et l'intensité du conditionnement.

De plus, comme mentionné précédemment, la GvH est associée à un risque élevé de survenue d'infections opportunistes en interférant avec la récupération des lymphocytes T par deux mécanismes distincts : l'altération de l'épithélium thymique et la réduction du nombre de lymphocytes T circulants originaires du greffon. Différentes études ont montré que la GvH constitue un facteur de risque indépendant pour la survenue d'une infection à CMV (Boeckh *et al.*, 2003), d'une infection au virus de la Varicelle et du Zona (VZV), (Steer *et al.*, 2000), d'une infection à EBV (Ocheni *et al.*, 2008) ou à ADV (Flomenberg *et al.*, 1994). L'administration de fortes doses de stéroïdes participe à l'augmentation de la charge virale du CMV en dépit de la mise en œuvre des traitements prophylactiques appropriés (Nichols *et al.*, 2002). Enfin, lors de la survenue d'une GvH chronique, le risque de survenue des infections pneumococciques est significativement augmenté (Engelhard *et al.*, 2002).

La figure 2 représente la chronologie théorique des principales complications infectieuses en fonction du délai par rapport à l'allogreffe (Mohty, 2008).

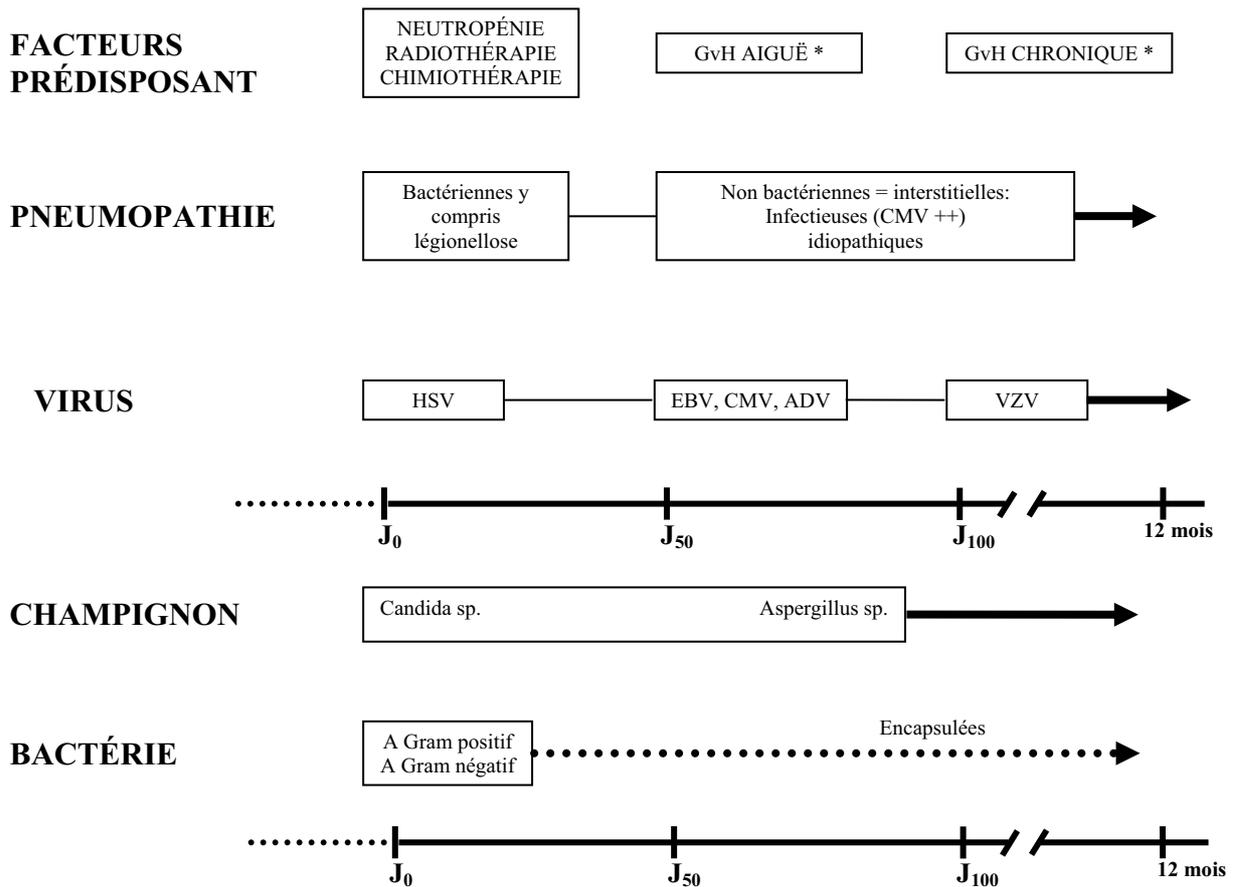


Figure 2 : Chronologie théorique des principales complications infectieuses observées après allogreffe, en fonction du délai par rapport à l’injection du greffon. CMV : cytomégalovirus ; GvH : réaction du greffon contre l’hôte ; HSV : virus *Herpes simplex* ; VZV : virus de la varicelle et du zona. D’après Mohty, revue du praticien, 2008.

Dans ce travail, nous focaliserons notre exposé sur les infections virales post-greffe et plus particulièrement celles liées à l’EBV, au CMV et à l’ADV.

V- INFECTIONS VIRALES POST-GREFFE

Les infections virales et leur réactivation sont des complications fréquentes et souvent mortelles.

Les Herpès virus à l'origine d'infections latentes requièrent une surveillance immunitaire constante des lymphocytes T. Ce sont les éléments pathogènes viraux les plus fréquemment retrouvés après allogreffe de CSH. Ils comprennent l'EBV, le CMV, le VZV et l'HSV. Ils sont capables d'entraîner l'inhibition de l'expression des molécules HLA de classe I par les cellules infectées afin d'échapper à l'immunité spécifique. Ces cellules deviennent alors la cible des cellules NK. Parmi les herpès virus, nous centrerons notre travail sur l'EBV et le CMV.

En effet, l'EBV, quiescent dans les lymphocytes B, peut se réactiver et entraîner le développement d'un syndrome lymphoprolifératif post-greffe (*Post transplant lymphoproliferative disease*, PTLD). La fréquence des PTLD induits par l'EBV peut être beaucoup plus élevée dans un contexte de greffe déplétée en lymphocytes T (Cohen *et al.*, 2007 ; Ocheni *et al.*, 2008). Il n'existe pas à ce jour d'agent antiviral efficace contre l'EBV. Cependant, le suivi régulier de la charge virale EBV dans le sang circulant permet d'anticiper la survenue d'un PTLD et de mettre en place un traitement par anticorps anti-CD20 (Rituximab). Toutefois, ce traitement ne présente pas une efficacité constante et n'est pas dénué d'effets secondaires.

Les infections à CMV après allogreffe de CSH sont associées à une forte morbidité et mortalité. L'évolution en terme thérapeutique ne s'est pas faite sur la découverte récente de nouvelles molécules mais sur la stratégie thérapeutique vis-à-vis du CMV qui est actuellement prophylactique, guidée par le suivi par PCR, ce qui a permis de diminuer l'incidence de la maladie CMV précoce en prévenant la toxicité inutile des traitements antiviraux préventifs. Cependant, les infections CMV tardives, au delà du 100^{ème} jour après la greffe, dont les facteurs de risques ne sont pas complètement identifiés, persistent et concernent 27% à 56% des patients selon les séries.

Par ailleurs, les infections à ADV après allogreffe de CSH apparaissent comme une cause importante de morbidité et de mortalité (Chakrabarti *et al.*, 2002), principalement chez

l'enfant. En effet, les infections à ADV sont plus fréquentes et se développent plutôt chez les enfants (20-30%) ayant reçu une allogreffe de CSH que chez les adultes (3-13%) (Flomenberg *et al.*, 1994; Howard *et al.*, 1999). Peu de traitements anti-viraux efficaces sont disponibles actuellement ce qui explique le taux de mortalité associé à ces infections.

Pour ces 3 virus, il semble clairement admis que le suivi de la reconstitution immunitaire spécifique en complément de la charge virale dans le sang permet de définir parmi les patients qui réactivent leur charge virale, ceux qui sont en mesure de se défendre seuls et ceux qui nécessitent la mise en œuvre d'un traitement rapide. Ceci permet de ne pas traiter abusivement les patients. De plus, ces deux paramètres permettent de suivre l'efficacité du traitement et de proposer comme alternative, en cas d'échec, une immunothérapie adoptive.

Tableau 1 : Autres virus impliqués dans les complications après allogreffes de CSH.

Virus	Familles	Incidence post-allogreffe de CSH (%)	Maladies	Traitements	Références
HSV1/2	Herpesviridae	70-80	Lésions muco-cutanée hémorragiques	Aciclovir, Valaciclovir	Darville <i>et al.</i> , 1998 Sandherr <i>et al.</i> , 2005
VZV (HHV3)	Herpesviridae	34,7	Eruption vésiculeuse douloureuse	Aciclovir, Valaciclovir, Fanciclovir	Asano-Mori <i>et al.</i> , 2008
HHV6	Herpesviridae	48-72	Retard de sortie d'aplasie, insuffisance médullaire transitoire	Ganciclovir, Acyclovir, Cidofovir,	de Pagter <i>et al.</i> , 2008
BK virus	Polyomaviridae	3,6-20	Cytites hémorragiques	Cidofovir	Harkensee <i>et al.</i> , 2008
Metapneumovirus	Paramyxoviridae	2,1	Infection respiratoire aiguë	/	Debur <i>et al.</i> , 2010
Virus respiratoire syncytial (RSV)	Paramyxoviridae	11,6	Infection respiratoire	Ribavirin	Avetisyan <i>et al.</i> , 2009
Parainfluenza	Paramyxoviridae	7,1	Infection respiratoire	/	Nichols <i>et al.</i> , 2001

Après avoir présenté les virus EBV, CMV et ADV, nous nous intéresserons à la reconstitution immunitaire spécifique vis-à-vis de ces 3 virus après allogreffe de CSH puis aux possibilités d'immunothérapie.

Le Virus Epstein-Barr (EBV)

Famille : *Herpesviridae*
Genre : *Lymphocryptovirus*
Taille du virus : 200 nm
Génome :
 ADN bicaténaire linéaire
 186 kpb
 Réplication dans le noyau
Capside :
 Icosaédrique
 125 nm de diamètre
 162 capsomères
Enveloppe :
 Dérivée de la membrane nucléaire et du Golgi
Pouvoir pathogène :
 Primo-infection : mononucléose infectieuse
 Persistance du virus dans les lymphocytes B

1- Généralité/Classification :

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un virus ubiquitaire de la famille des *herpesviridae* également appelé HHV-4 (*human herpesvirus 4*).

C'est un puissant inducteur *in vitro* de l'immortalisation et de la transformation des lymphocytes B, permettant l'établissement de lignées cellulaires lymphoblastoïdes. L'EBV, agent de la mononucléose infectieuse (MNI), est associé à des pathologies tumorales épithéliales comme le cancer indifférencié du nasopharynx, les PTLD des déficits immunitaires et certains lymphomes, dont le lymphome de Burkitt (LB), le lymphome Hodgkinien (LH) et le lymphome T de types nasal (Middelorp *et al.*, 2003).

2- Structure (Nicolas et Meyohas, 2003):

C'est un virus enveloppé, à capsidre icosaédrique (Figure 3). Son génome est constitué d'un ADN bicaténaire de 186 kpb. Linéaire dans la particule virale complète, il est circulaire ou sous forme épisomique dans la cellule infectée. Comme pour les autres herpès virus, la molécule d'ADN est divisée en séquences internes uniques (U1 à U5), internes répétées (IR1

à IR4) et terminales répétées (TR), situées à chaque extrémité et permettant la circularisation. Le virus possède une origine de réplication latente (OriP) et deux origines de réplication lytique (OriLyt). Le génome code environ pour 80 protéines impliquées dans la réplication et la latence du virus.

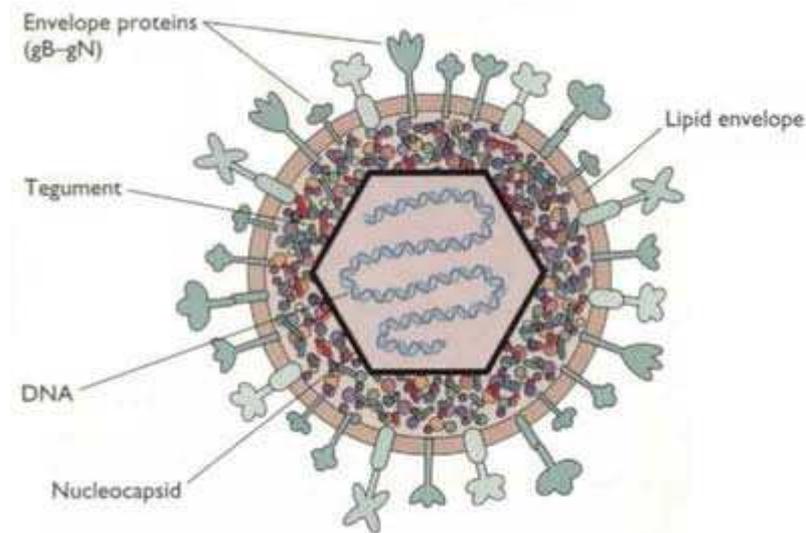


Figure 3 : Représentation du virus d'Epstein-Barr.

3- Cycle viral :

3-1- Présentation générale

L'EBV infecte les cellules épithéliales et préférentiellement les lymphocytes B, d'une part *via* la glycoprotéine d'enveloppe gp350 qui se lie à la molécule CD21, récepteur du C3d du complément exprimé à la surface des lymphocytes B, d'autre part par la liaison entre la glycoprotéine gp42 et les molécules HLA de classe II comme co-récepteur (Borza et Hutt-Fletcher, 2002). Chaque cellule infectée par l'EBV comporte de multiples copies extra-chromosomiques du virus sous sa forme épisomique ou circulaire (Nicolas et Meyohas, 2003). La fixation de l'EBV sur son récepteur induit l'activation du lymphocyte B qui devient transcriptionnellement compétent. L'EBV est donc un puissant «mitogène B» (Rickinson *et al.*, 2000). Après infection, la phase de latence est associée à l'expression de dix protéines de latence et de deux ARN non codants (Leblond *et al.*, 2002). *In vitro*, le passage à la phase de

production virale peut survenir spontanément dans certaines cellules, ou bien après activation par des agents inducteurs.

3-2- Latence virale

L'immortalisation des cellules B résulte d'un processus complexe faisant intervenir les produits de plusieurs gènes viraux qui permettent le maintien du virus dans la cellule, la transactivation d'autres gènes viraux, celle de certains gènes cellulaires et l'interaction avec des protéines cellulaires. Les gènes cellulaires cibles sont impliqués dans la croissance des cellules B et dans la protection contre l'apoptose.

Pendant la phase de latence, dix gènes sont exprimés, aboutissant à la production de :

- six protéines nucléaires, dites protéines de latence : *Epstein Barr Nuclear Antigen* (EBNA) 1, 2, 3A, 3B, 3C et *leader protein* (LP),
- trois protéines de membranes : *Latent Membrane Protein* (LMP) 1, 2A, 2B,
- et le produit du gène BARFO (*BamHI A Right Frame O*).

De plus, deux gènes sont transcrits en deux ARN non polyadénylés et non traduits : *EBV Encoded small RNA* (EBER) 1 et 2. Tous ces gènes sont exprimés dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes *in vitro* (Nicolas et Meyohas, 2003).

On distingue quatre types de latence dont trois (I, II et III) sont définies par le profil d'expression des gènes viraux latents *in vitro* en lignée cellulaire, ou *ex vivo* sur coupes tissulaires (Young et Rickinson, 2004) :

- La latence de type 0, définie *in vivo* chez le sujet séropositif et correspond à l'expression de la seule protéine LMP2A.
- La latence de type I exprimée par les lignées dérivées de LB. Elle est celle de la tumeur initiale où seuls sont exprimés EBNA1 et les deux EBER.
- La latence de type II, caractérisée par l'expression des deux EBER, des LMP et d'EBNA1, a été décrit *in vivo* dans le LH et le carcinome indifférencié du nasopharynx, et *in vitro* dans les lignées de LB après stimulation par une anti-immunoglobuline.
- La latence de type III, appelée programme de prolifération cellulaire, observée dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes dérivées de cellules B infectées *in*

in vitro, est caractérisée par l'expression des six antigènes nucléaires EBNA, des trois LMP et des deux EBER.

Les deux ARN EBER (EBER1 et EBER2) sont fortement représentés dans les cellules lymphoïdes infectées de façon latente (10^7 copies pour EBER1), et jouent un rôle important dans le maintien de la latence et dans la persistance virale en inhibant les effets antiviraux de l'interféron (Nanbo *et al.*, 2002).

La protéine EBNA1 se lie à la séquence nucléotidique OriP, impliquée dans la réplication virale épisomique, et maintient le génome viral dans le noyau. EBNA1 possède des séquences répétées Gly-Ala, dont la fonction principale est de stabiliser la protéine mature, entravant ainsi la présentation antigénique (Levitskaya *et al.*, 1995).

Le rôle crucial d'EBNA2 dans la transformation cellulaire a été montré par l'absence de transformation cellulaire *via* la souche EBV P3HR-1 qui n'exprime pas EBNA2 (Rickinson et Kieff, 2001). EBNA2 transactive l'expression de LMP1 et LMP2, ainsi que les gènes cellulaires. Les protéines EBNA2 et EBNA3 sont aussi des protéines essentielles pour l'immortalisation et la transformation *in vitro* par des interactions avec des facteurs de régulation du cycle cellulaire.

LMP1 se comporte dans la cellule comme un membre de la superfamille des récepteurs du *tumor necrosis factor* (TNF), en interagissant avec les mêmes facteurs de signalisation, et induit dans le lymphocyte B un signal identique à celui de la voie CD40/CD40 ligand (Uchida *et al.*, 1999).

Les lignées cellulaires lymphoblastoïdes, transformées par l'EBV, expriment un taux élevé de marqueurs d'activation des cellules B (CD23, CD30, CD39 et CD70), des molécules d'adhésion cellulaires LFA1 (*lymphocyte-function-associated antigen 1*, CD11a/18), LFA3 (CD58) et la molécule d'adhésion intracellulaire 1 (ICAM1, CD54) (Nicolas et Meyohas, 2003). Ces marqueurs sont absents ou très peu exprimés par les cellules B au repos, mais sont fortement exprimés lorsque celles-ci sont activées par stimulation antigénique ou mitotique, indiquant que l'immortalisation induite par l'EBV relève de l'activation constitutive des mêmes voies cellulaires conduisant à une prolifération physiologique des cellules B.

3-3- Le cycle répliatif (Nicolas et Meyohas, 2003)

Le cycle répliatif est une cascade d'activation aboutissant à la production de virions. Il comprend trois phases : très précoce, précoce et tardive, correspondant à l'expression de trois catégories de gènes distincts. Les protéines virales très précoces sont présentes au début du cycle lytique mais elles peuvent être retrouvées tout au long du cycle viral. Parmi elles, la protéine ZEBRA (*BamH1 Z Epstein-Barr Replication Activator*) et la protéine R sont des activateurs essentiels de transcription pour la majorité des gènes du cycle lytique. La protéine ZEBRA joue également un rôle dans la répliation de l'ADN viral et l'expression des gènes tardifs VCA (*Viral Capsid Antigens*) et MA (*Membrane Antigens* : gp350, gp140, gp110 et gp85) (Rickinson et Kieff, 2001).

La régulation de l'expression de cette protéine semble être la clé du passage de la latence à la production virale.

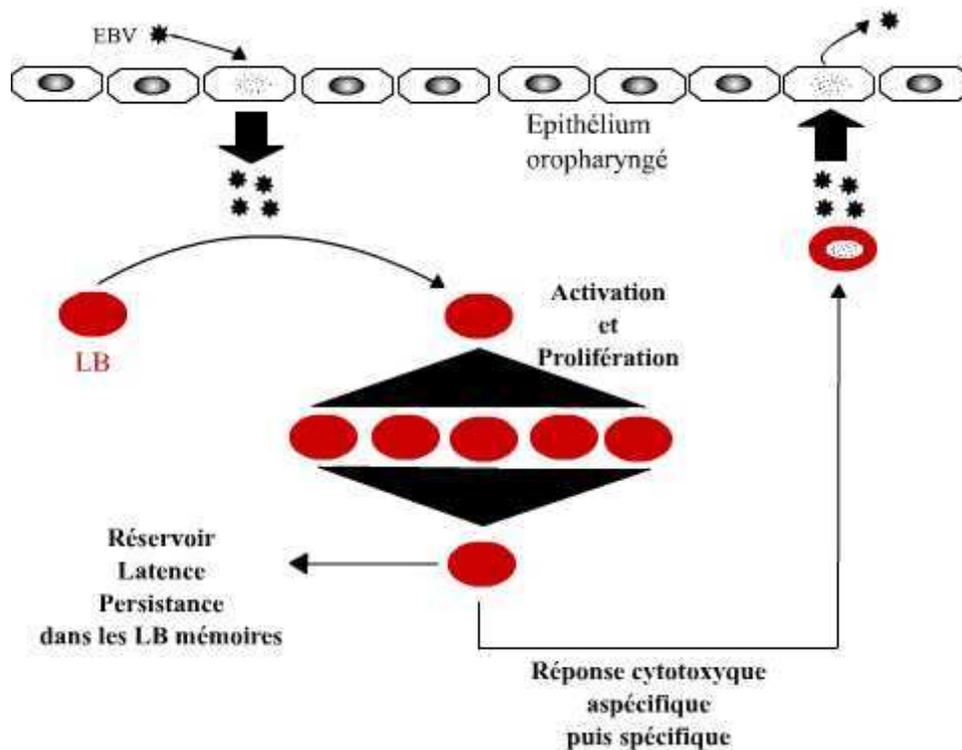


Figure 4 : Cycle répliatif de l'EBV. 1-Pénétration du virus dans les cellules de l'épithélium oropharyngé. 2-Multiplication du virus. 3-Infection des LB: multiplication et prolifération. 4- Réponse cytotoxique aspécifique puis spécifique. 5-Constitution de réservoir de latence dans des LB mémoire. 6-Parfois, le virus échappe au contrôle immunitaire d'où réinfection des cellules épithéliales et transmission du virus.

4- Physiopathologie :

L'EBV est très répandu dans la population adulte. L'infection primaire s'effectue le plus souvent par contact salivaire. Ces infections surviennent majoritairement pendant la petite enfance et sont généralement asymptomatiques. Elles peuvent parfois survenir après l'âge de 20 ans et se présentent alors cliniquement sous forme d'une MNI (Crawford *et al.*, 2006).

La période d'incubation (30-50 jours) se caractérise par la pénétration du virus au niveau de l'oropharynx et par sa multiplication. Il semble utiliser les voies normales de différenciation des lymphocytes B pour se maintenir de manière latente dans l'organisme. Ce processus est contrôlé de manière efficace par le système immunitaire par le biais de lymphocytes T spécifiques, ce qui explique l'absence de pathogénicité du virus dans la majorité des cas.

Après la transmission orale, l'EBV se réplique dans des cellules permissives, probablement dans des cellules épithéliales qui fixent directement le virus ou l'acquièrent par transfert à partir des cellules B adjacentes (Shannon-Lowe *et al.*, 2006). Cette infection lytique conduit à un taux très élevé de virions au niveau de la gorge pendant plusieurs semaines (Fafi-Kremer *et al.*, 2005 ; Balfour *et al.*, 2005) (Figure 5).

Le virus infecte également les cellules B de la muqueuse et initie la transformation infectieuse, conduisant à une expansion des lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) dans les régions extra-folliculaires des tissus lymphoïdes amygdaliens et à l'apparition d'un grand nombre de cellules infectées dans le sang (de 1% à 10% des cellules B totales lors d'une MNI aiguë). Bien que la plupart de ces cellules prolifératives soient éliminées par la réponse immunitaire, certaines d'entre elles survivent en inhibant l'expression des antigènes de latence. Ainsi, cette population de cellules B va rentrer dans un état de repos et persister sous forme circulante dans le sang et dans les tissus lymphoïdes du pharynx (Hislop *et al.*, 2007). Des événements physiologiques, comme la stimulation d'antigène et la réception d'un signal de différenciation cellulaire du plasma, pourraient conduire à des réactivations occasionnelles dans le cycle lytique. Ces événements sont récapitulés sur la Figure 5.

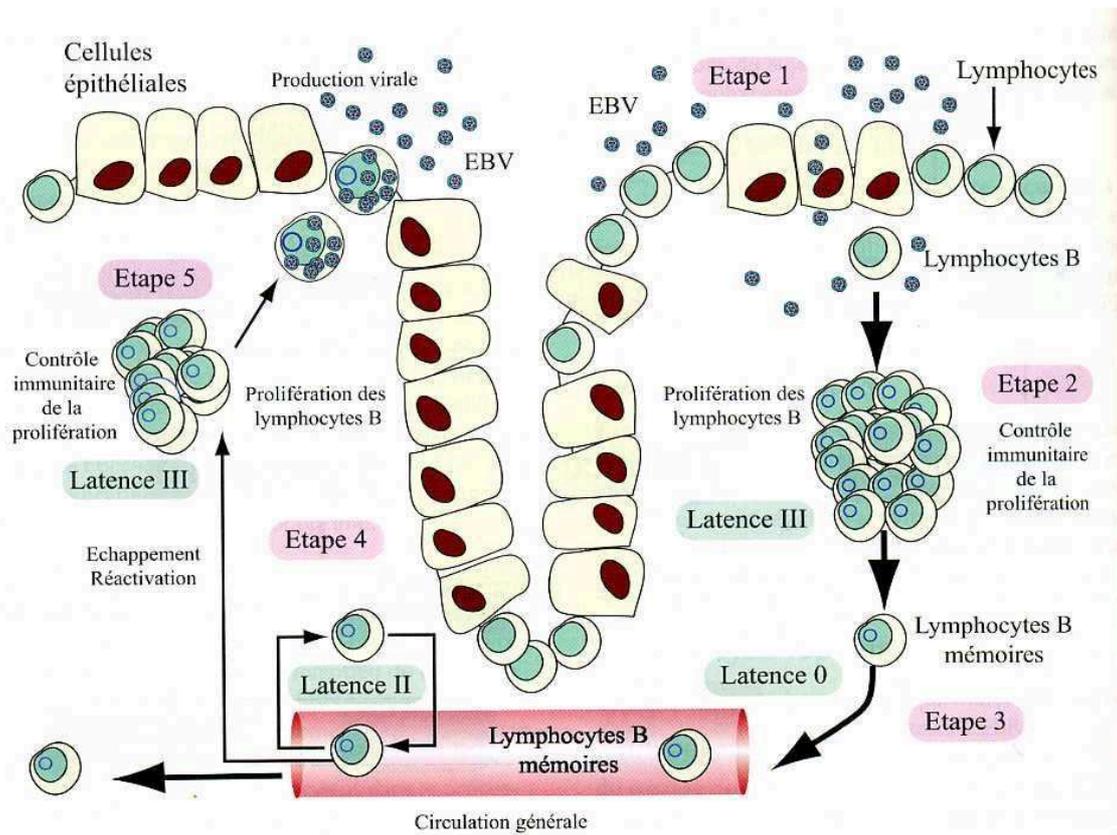


Figure 5 : Le cycle biologique de l'EBV *in vivo*, se caractérise par cinq étapes (Nicolas et Meyohas, 2003. Fields Virology, edited by BNF): Etape 1, le virus peut atteindre les lymphocytes B soit directement, soit après avoir traversé le tissu épithélial amygdalien par transcytose. Etape 2, les lymphocytes B infectés prolifèrent et produisent des virus qui infectent de nouveaux lymphocytes B. Etape 3, la réponse immunitaire se met en place et aboutit progressivement au contrôle de la prolifération cellulaire par élimination des cellules en latence de type III. Des lymphocytes B mémoires contenant l'épisode viral se différencient (latence de type 0) et atteignent la circulation générale. Etape 4, les lymphocytes B mémoires pourront développer le programme de la latence de type II nécessaire à leur survie à long terme (Babcock *et al.*, 2000). Etape 5, la prolifération de quelques lymphocytes B exprimant la latence de type III est associée à une réplication virale qui ne se manifeste que chez le sujet immunocompétent par une excrétion virale.

5- Épidémiologie (Seigneurin, 2001):

5-1- L'EBV dans le monde

Les études de séroprévalence (détection des anticorps anti-VCA) montrent que le virus infecte plus de 95% de la population mondiale. Si aucune région ou aucun pays ne sont épargnés, l'âge auquel survient la primo-infection varie selon les conditions socio-économiques. En effet dans les pays en voie de développement, tous les enfants rencontrent le virus très précocement, en général entre 1 et 4 ans. Au contraire, dans les classes privilégiées à bon niveau d'hygiène des pays industrialisés, seule la moitié des enfants de 5 à 10 ans ont des anticorps ; l'infection primaire est alors souvent retardée au moment de l'adolescence ou chez le jeune adulte. L'infection au cours de la petite enfance est le plus souvent asymptomatique. Mais plus l'enfant croise tardivement le virus, plus il risque de développer un ensemble de signes cliniques provoqué par l'intensité de la réponse immunitaire. Environ la moitié de ces primo-infections tardives se présentent sous la forme clinique complète de MNI.

5-2- Excrétion et transmission de l'EBV

Au cours de la primo-infection, aussi bien silencieuse que symptomatique, de nombreux virions sont produits dans la cavité oropharyngée et excrétés dans la salive. Cette excrétion se produit épisodiquement toute la vie chez les individus sains, chez le petit enfant à partir de la mère ou d'autres enfants, par les gouttelettes ou par les objets recouverts de salive et contaminés, plus tard par l'échange direct de salive lors du baiser. Le virus peut être transmis par les transfusions sanguines, en particulier par les culots cellulaires, mais aussi lors de greffes de moelle osseuse ou d'organe. Il ne paraît pas exister de transmission préférentielle chez le personnel de santé ; la transmission materno-fœtale est rare et la transmission sexuelle est exceptionnelle.

6- Réponse immunitaire (Hislop *et al.*, 2007):

La réponse immunitaire joue un rôle capital pour limiter l'infection primaire et pour contrôler l'état de latence.

6-1- Réponse immunitaire humorale

Lors de la primo-infection, l'infection des cellules épithéliales et des lymphocytes B entraîne une réponse immunitaire humorale, dirigée d'abord contre le cycle lytique. Dans un second temps, le virus entre dans une phase de latence associée à l'expression des protéines EBNA et LMP ; cela entraîne une réponse immunitaire humorale dirigée contre les protéines de latence. Apparaissent donc successivement des anticorps contre les protéines d'enveloppe (anti-MA, -gp85, -gp350/220), contre les protéines de capsidie (anti-VCA), contre les protéines précoces ou très précoces (anti-ZEBRA, -EA), puis contre les protéines de latence (anti-EBNA). Les anticorps anti-EA et anti-ZEBRA vont diminuer, voire disparaître, alors que les anticorps anti-VCA et anti-EBNA persistent.

La réponse immunitaire humorale participe également aux mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) dirigés contre les cellules en phase tardive du cycle répliatif. Cette réponse humorale s'oppose à la survenue des réinfections, mais ne semble jouer qu'un rôle secondaire dans le contrôle de l'infection latente et de la prolifération cellulaire.

6-2- Réponse immunitaire cellulaire

Le rôle de l'immunité cellulaire dans le contrôle de l'infection par l'EBV est primordial, faisant intervenir deux types de cellules : les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques. L'importance de l'immunité cellulaire dans le contrôle des cellules infectées a justifié une approche cellulaire de traitement des PTLD induits par l'EBV, en particulier après transplantation de moelle osseuse en injectant des CTL du donneur (Rooney *et al.*, 1998).

6-2-1- Les cellules NK :

Les cellules NK jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée contre plusieurs virus. L'expansion de ces cellules est observée dans le sang des patients ayant une MNI aiguë. Les études *in vitro* ont démontré que les cellules NK peuvent inhiber la transformation des cellules B quiescentes induite par l'EBV, si elles sont ajoutées quelques jours après l'infection, au moins en partie après la sécrétion de l'IFN γ (Hislop *et al.*, 2007).

Cependant, cliniquement leur rôle semble mineur. En effet, les PTLD après greffe de CSH déplétée en lymphocytes T surviennent majoritairement entre 3 et 6 mois, période à laquelle

les cellules NK sont numériquement et fonctionnellement normalisées mais où le déficit en lymphocytes T est profond (O'Reilly *et al.*, 1997). Les cellules NK peuvent jouer un rôle dans le contrôle des infections lytiques, particulièrement, lorsque le mécanisme d'échappement viral consiste à diminuer l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules infectées (Pappworth *et al.*, 2007).

6-2-2- Les lymphocytes T cytotoxiques :

Dans le cas d'une primo-infection à EBV, on assiste à une expansion rapide du compartiment T CD8+ majoritairement dirigé contre les antigènes lytiques (jusqu'à 40% des CD8 totaux) mais également contre les antigènes latents (jusqu'à 5% des CD8 totaux). Une réponse CD4 est également observée mais en moindre proportion, à la fois vis-à-vis des antigènes lytiques et des antigènes latents. Le compartiment CD8 se contracte rapidement par diminution de l'expression du bcl2 dans les lymphocytes T. Dans le cas d'une réactivation EBV conduisant à un PTLD, il semble clairement établi qu'il existe une défaillance des lymphocytes T CD8+ dirigés contre les antigènes latents (Hislop *et al.*, 2007).

Les CTL CD8+ jouent un rôle très important dans le contrôle de l'infection virale par leur capacité à reconnaître les peptides viraux présentés par les molécules de CMH de classe I. Les principaux antigènes viraux reconnus par les lymphocytes T CD8+ sont des peptides issus de protéines de latence (EBNA3A, 3B, 3C, EBNA2, LMP1 et LMP2) et de protéines du cycle lytique (ZEBRA et R) (Rickinson *et al.*, 1996). Les CTL CD8+ sont perforine⁺, cytotoxiques (Callan *et al.*, 2000) et sécrètent des cytokines (Woodberry *et al.*, 2005 ; Hislop *et al.*, 2005).

Les CTL CD4+ sont aussi impliqués en reconnaissant plus particulièrement la protéine de latence EBNA1 et des protéines du cycle lytique (Amyes *et al.*, 2003 ; Nikiforow *et al.*, 2003).

Contrairement aux CTL CD8+, la réponse anti-infectieuse des CTL CD4+ anti-EBV est très peu connue. Par dosage des cytokines intracellulaires, Amyes *et al.*, ont démontré que la majorité des CTL CD4+ anti-EBV produit de l'IFN γ , du TNF α et très peu d'IL2 (Amyes *et al.*, 2003). Une autre équipe a étudié le profil fonctionnel des CTL CD4+ mémoires vis-à-vis des antigènes latents, après expansion suite à un bref contact avec l'antigène, *in vitro*. Les lignées ou les clones des CTL CD4+ anti-EBNA1 sont prédominants mais n'ont pas

exclusivement un profil Th1 (Mautner *et al.*, 2004), alors que les lignées anti-EBNA3C ont toutes un profil Th1 (Sun *et al.*, 2002). Mais certains résultats doivent être interprétés avec prudence parce qu'il existe des différences subtiles dans les conditions de culture cellulaire qui peuvent influencer le profil Th1/Th2 et donc stimuler la sécrétion des cytokines IFN γ (Th1) ou IL4 (Th2) (Sun *et al.*, 2002).

6-2-3- Echappement du virus au système immunitaire et sa persistance dans l'organisme :

Le virus développe après la primo-infection, des stratégies d'échappement au système immunitaire. Il échappe ainsi à de nombreux CTL anti-EBV en détournant à son profit certaines voies cellulaires nécessaires à la prolifération et en modulant l'expression de certains gènes cellulaires à son profit. L'une des stratégies du virus consiste à posséder un gène homologue de l'IL10 cellulaire qui inhibe l'IFN γ . Il existe également un autre phénotype de latence de type I, dans lequel la protéine EBNA1 seule est exprimée, en l'absence des autres protéines de latence. Il a été montré que les cellules B infectées par l'EBV de façon latente sont capables d'échapper au système immunitaire grâce à une séquence peptidique de la protéine EBNA1 (séquence répétée Glycine-Alanine) qui limite la présentation des épitopes EBNA1 *via* le CMH de classe I (Levitskaya *et al.*, 1997). La protéine EBNA1 n'est pas reconnue par les défenses immunitaires, les lymphocytes B contenant le génome EBV ne peuvent pas être détruits par les CTL (Ressing *et al.*, 2008).

Après la primo-infection, il s'établit un équilibre remarquable entre le virus persistant dans les cellules infectées de façon latente et l'élimination des cellules infectées de façon aiguë par les défenses immunitaires. Malgré la présence constante des CTL dirigées contre plusieurs protéines de latence virales, toutes les cellules B infectées ne sont pas détruites. La protéine LMP1, par exemple, inhibe l'apoptose. Certains lymphocytes B contenant le génome EBV restreignent considérablement l'expression des gènes viraux. D'autres lymphocytes B quiescents dans le sang périphérique et les cellules B mémoires sont probablement le principal site de persistance de l'EBV.

Chez le sujet immunocompétent, on observe une délicate balance entre la prolifération des lymphocytes B infectés de façon latente et la réponse immunitaire. L'équilibre se rompt en cas d'altération de cette réponse immunitaire cellulaire. Au cours de l'immunodépression,

l'expansion des cellules infectées n'est plus contrôlée par les lymphocytes T cytotoxiques. Ces lymphocytes B immortalisés, constituent une cible importante pour des altérations génétiques secondaires : la cellule ainsi transformée, à croissance non contrôlée, peut se développer et engendrer un PTLD et un lymphome.

7- Manifestations cliniques :

La population générale est majoritairement infectée par l'EBV pendant l'enfance. Dans les pays de haut niveau socio-économique, la primo-infection peut être retardée à l'adolescence. La transmission se fait par la salive et la période d'incubation dure de 4 à 6 semaines.

7-1- La primo-infection de l'EBV et la MNI

La primo-infection par l'EBV est le plus souvent asymptomatique chez l'enfant. En revanche environ un tiers des adolescents développent une MNI lors de leur premier contact avec l'EBV. La relation entre la MNI et l'infection par l'EBV, découverte fortuitement en 1967 (Henle *et al.*, 1969), a été confirmée en 1974 (Epstein et Achong, 1977).

La MNI évolue en deux phases, la première liée à l'infection des lymphocytes B et à leur expansion, la seconde à l'augmentation du compartiment des CTL en grande partie responsable des signes cliniques (Cohen, 2000). La symptomatologie classique est définie par une triade comprenant de la fièvre, une pharyngite avec angine et des adénopathies avec splénomégalie. Il s'y associe une hyperlymphocytose constituée de lymphocytes basophiles de grande taille correspondant aux CTL.

Dans les ganglions et les amygdales, les cellules exprimant les EBER sont présentes principalement dans les aires extra-folliculaires paracorticales et plus rarement dans les centres germinatifs B. La plupart de ces cellules sont des lymphocytes B. Cette population est morphologiquement hétérogène et exprime des antigènes viraux différents correspondant à différents programmes de latence (Niedobitek *et al.*, 1997).

L'expansion clonale de cellules infectées par l'EBV semble être favorisée dans les cellules mémoires (Kurth *et al.*, 2000). Ces cellules expriment les protéines EBER et LMP2A et échappent au contrôle par les CTL.

7-2- *L'infection chronique active*

L'infection EBV chronique active (CAEBV) caractérisée par des symptômes MNI-like, récurrents ou chroniques associés à des manifestations infectieuses pouvant être fatales, est décrite chez des patients considérés comme immunocompétents. Cette maladie rare a une prévalence plus élevée dans les pays d'Asie de l'Est et est associée à un faible pronostic vital. Les cellules T et/ou NK sont infectées, avec une expansion clonale et on observe la présence d'anomalies chromosomiques non spécifiques dans deux tiers des cas (Kimura *et al.*, 2001).

7-3- *L'EBV et le lymphome hodgkinien*

Le LH est caractérisé par la présence de cellules de Reed Sternberg, dans un environnement cellulaire réactionnel hétérogène inflammatoire (Gandhi *et al.*, 2004). Les études épidémiologiques ont apporté très tôt des arguments en faveur d'une association entre l'EBV et la survenue d'un LH : le pic de fréquence entre 15 et 35 ans, la notion d'une augmentation du risque de développer un LH après une MNI et les données sérologiques avec une augmentation des anticorps anti-VCA, anti-EA et anti-EBNA. Ces données ont été confirmées par la mise en évidence d'une corrélation positive entre la MNI et le LH (Hjalgrim *et al.*, 2003). L'EBV est détecté dans les cellules tumorales dans environ 50% des cas, proportion qui varie en fonction du type histologique et de l'origine géographique. La latence virale de l'EBV dans les cellules infectées est de type II (EBNA1+, LMP1+ et LMP2+) (Portis *et al.*, 2003). Le rôle pathogénique de l'EBV reposerait d'une part sur l'activation de la voie CD40-CD40L par LMP1, remplaçant ainsi le signal normalement donné par les lymphocytes T activés, et d'autre part par l'intervention de LMP2A qui mimerait la signalisation normalement induite par l'Ig de surface (BCR) lorsqu'elle se lie avec une haute affinité à l'antigène. Ces signaux de survie maintiendraient les précurseurs des cellules de Reed Sternberg qui, dans les centres germinatifs, devraient entrer en apoptose en raison de mutations anormales des gènes des Ig (*crippled mutations*) (Schwering *et al.*, 2003).

7-4- Lymphoproliférations et lymphomes non hodgkiniens (LNH) associés à l'EBV

Les LNH associés à l'EBV surviennent le plus souvent dans un contexte clinique de déficit immunitaire primitif ou acquis, en particulier lié à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ou induit par les traitements immunosuppresseurs après greffe d'organe ou de moelle. En effet, la fréquence de LNH associés à l'EBV développée dans la population immunocompétente est inférieure à 5% (Raphaël *et al.*, 2005).

7-4-1- Le lymphome de Burkitt :

Le lymphome de Burkitt (LB) est une entité clinicopathologique. Cette dernière est caractérisée par des aspects cliniques, morphologiques, un profil immunophénotypique proche de celui des centroblastes (CD10+, CD77+, BCL6+) et des anomalies cytogénétiques. Une des trois translocations chromosomiques plaçant l'oncogène *MYC* sous le contrôle du locus de la chaîne lourde ou d'une des chaînes légères des Ig est systématiquement retrouvée ; on considère qu'il s'agit de l'évènement transformant initial (Blum *et al.*, 2004). D'autres mutations peuvent également être identifiées, notamment dans la voie p53-ARF.

L'incidence de ces tumeurs est élevée dans les régions d'Afrique d'endémie palustre ; elles sont alors uniformément associées à l'EBV. Dans d'autres parties du monde, l'incidence et la proportion d'association à l'EBV sont variables (Blum *et al.*, 2004). Le développement d'un LB est fréquent chez les patients VIH+. Lors de la présentation clinique initiale, l'expression de la latence virale est classiquement de type I (EBER+, EBNA1+) (Rickinson et Kieff, 2001). Kelly *et al.*, ont décrit un type de latence avec expression des EBNA3A, 3B, 3C sans EBNA2 ni LMP, dans des LB africains (Kelly *et al.*, 2002). De même, dans les LB associés au VIH, EBNA3 est exprimée en l'absence d'EBNA2 (Touitou *et al.*, 2003).

7-4-2- Les lymphomes T et NK :

Bien que l'infection des lymphocytes T soit rare et que le récepteur de l'EBV sur les cellules T ne soit pas clairement identifié, des pathologies lymphoïdes de nature T et des lymphomes T sont identifiés avec une plus grande fréquence dans le Sud-est asiatique. Les proliférations

lymphocytaires sont développées aux dépens des cellules T CD4, ou plus souvent T CD8, ou de la population NK. Des liens ont été établis avec l'infection chronique active et un syndrome hémophagocytaire. L'avantage prolifératif des cellules T infectées par l'EBV favorise une expansion monoclonale, une dérégulation et une production de cytokines favorisant l'apparition d'un syndrome d'activation macrophagique (Kanegane *et al.*, 2002). Le lymphome T nasal, lui aussi plus fréquent en Asie du Sud-est, se développe aux dépens de cellules T ou plus fréquemment à partir de NK. Cette prolifération de cellules cytotoxiques aboutit à une destruction tissulaire et à des érosions de la cloison nasale. La latence de l'EBV dans ces proliférations est de type I/II, au cours desquelles seul un contingent de cellules tumorales exprime LMP (Kanegane *et al.*, 2002).

7-5- Syndrome Lymphoprolifératif associé à l'X

Il peut être très grave chez les petits garçons atteints d'un déficit immunitaire congénital : le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (XLP ou syndrome de Purtilo ou syndrome de Duncan). Une prolifération lymphocytaire massive avec infiltration de tous les organes lymphoïdes et défaillance généralisée conduit à la mort (MNI fulminante) ou aboutit à un lymphome malin ou à une aplasie médullaire. Chez les patients atteints de ce déficit immunitaire, les cellules NK-T sont absentes. Or, ces cellules considérées comme le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative sont impliquées dans la protection contre les lymphomes et les agents infectieux (Kronenberg, 2002).

8- Techniques de diagnostic :

Le diagnostic virologique repose sur l'isolement du virus en culture cellulaire, la mise en évidence des antigènes ou du génome et/ou sur la détection d'anticorps spécifiques circulants. Dans cette partie, seules les techniques de diagnostic les plus utilisées pour détecter la réactivation de l'EBV après allogreffe de CSH, seront détaillées.

8-1- Diagnostic indirect (sérologique)

8-1-1- Immunofluorescence (IF) :

La sérologie EBV doit comporter la recherche de trois marqueurs : IgM anti-VCA, IgG anti-VCA, IgG anti-EBNA1. L'interprétation du profil sérologique fourni par ces trois marqueurs suffit dans la plupart des cas à affirmer la primo-infection récente (présence d'IgM anti-VCA avec ou sans IgG anti-VCA mais toujours sans IgG anti-EBNA1), l'infection ancienne ou l'absence d'immunité vis-à-vis de l'EBV. La technique de référence reste le dépistage de ces trois types d'anticorps par l'immunofluorescence indirecte (IFI) pour les anticorps VCA ou anti-complémentaire pour les anticorps EBNA.

Pour rechercher les anticorps dirigés contre les protéines EBNA, les lignées non productrices sont idéales (Raji) ; elles n'expriment que les antigènes de latence. Les anticorps seront révélés par IF anti-complémentaire, l'IF indirecte n'étant pas assez sensible.

Les anticorps VCA seront recherchés sur les lignées productrices (P3HR1). Elles contiennent 5 à 10% de cellules en réactivation, exprimant les antigènes du cycle lytique. Les anticorps sont détectés par IF indirecte classique.

8-1-2- Immunoenzymologie (IE) :

Les méthodes de préparation d'antigènes sont diverses : extraits cellulaires, protéines recombinantes, peptides synthétiques. Elles permettent en général de rechercher des anticorps dirigés contre une (des) protéine (s) de latence et du cycle lytique.

8-2- Diagnostic direct

8-2-1- Culture cellulaire :

L'immortalisation des lymphocytes B par l'EBV est relativement facile. Elle nécessite toutefois de disposer de lymphocytes B vierges de toute infection par l'EBV. Les cellules B généralement utilisées sont celles provenant de sang de cordon ombilical ou provenant de sujet EBV-séronégatifs. L'obtention de lignées nécessite quelques semaines à quelques mois, ce qui exclut cette approche des techniques de diagnostic virologique direct.

8-2-2- Biologie moléculaire :

- Hybridation *in situ*. Pendant la phase de latence du virus, deux ARN viraux non codants EBER1 et EBER2 sont transcrits. Ces deux transcrits sont abondamment exprimés (entre 10^7 et 10^8 copies par cellule) et leur localisation est nucléolaire. En raison de cette étonnante abondance, une technique d'hybridation *in situ* non radioactive sensible est suffisante pour les détecter.

- *Polymérase chain reaction* (PCR). Les techniques de PCR sont une alternative à l'isolement viral sur culture cellulaire. Il faut distinguer les techniques de détection qualitative des techniques de détection quantitative. Chaque fois qu'un prélèvement se situe dans un compartiment dans lequel le virus est en phase de latence, il faut obligatoirement faire appel à des techniques de PCR quantitative pour diagnostiquer et/ou prévoir une pathologie associée à l'EBV, particulièrement chez les sujets immunodéprimés. La détermination de la charge virale se fait principalement au niveau des lymphocytes circulants, du sang et de la salive. Les méthodes de PCR qualitatives sont utilisables dans des compartiments biologiques dans lesquels le virus n'est pas habituellement retrouvé, tel le liquide céphalorachidien (LCR).

9- Traitements médicamenteux :

Dans cette partie, nous n'envisagerons pas les traitements relevant de la thérapie cellulaire. Ils seront traités en détail dans la deuxième partie bibliographique de ce mémoire.

9-1- Traitement préventif

La prévention des PTLD induits par l'EBV dans le cadre d'allogreffes de CSH, déplétées en lymphocytes T, en situation haplo-identique ou phéno-identique, peut être assurée efficacement par la déplétion en lymphocytes B du greffon (Bensoussan *et al.*, 1998). Cette déplétion B est réalisée lorsqu'une sélection positive CD34 est effectuée. Plus récemment, la société Miltenyi propose 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. 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 d'un PTLD lié à l'EBV.

9-2- Traitement curatif

La thérapie antivirale (acyclovir et gancyclovir, inhibiteurs de la réplication de l'ADN viral) est inefficace dans le développement de la maladie associée à une phase de latence, même si quelques rares cas de rémission ont été rapportés (Cohen *et al.*, 1991).

Plus récemment, un anticorps chimérique anti-CD20 dirigé contre les cellules B, le Rituximab (Mabthera®), utilisé initialement dans le traitement des lymphomes folliculaires en rechute, a montré son efficacité dans le traitement des infections EBV et des PTLD EBV induits après allogreffe de CSH (van Esser *et al.*, 2002). Cependant, ce traitement coûteux entraîne une déplétion lymphocytaire B majeure et longue retardant la récupération de l'immunité anti-EBV en l'absence de lymphocytes B infectés par l'EBV (Masjorthusmann *et al.*, 2009). Il semble important de disposer de paramètres biologiques permettant de cibler avec justesse les patients nécessitant la mise en œuvre de ce traitement.

II- Le Cytomégalovirus humain (CMV)

Sous-Famille : *Betaherpesviridae*
Genre : *Cytomegalovirus*
Taille du virus : 150-200 nm
Génome :
 ADN à double brin, linéaire
 230-250 kpb
 Réplication dans le noyau
Capside :
 Icosaédrique
 125 nm de diamètre
 162 capsomères
Enveloppe :
 Issue des membranes internes cytoplasmiques
Tégument entre capside et enveloppe
Pouvoir pathogène :
 Infection latente dans les organes cibles, les
 monocytes du sang périphérique et les CSH

1- Classification :

Le cytomégalovirus humain (CMV) appartient à la famille des *Herpesviridae* et à la sous-famille des *Betaherpesvirinae* qui se caractérise entre autre par un cycle répliatif long et une répliation *in vitro* limitée à un nombre très restreint de cellules permissives. Le CMV appartient au genre *Cytomegalovirus* et il est le cinquième (*Human herpesvirus 5*) des huit herpesvirus humains identifiés à ce jour.

2- Structure :

Le CMV est une particule virale enveloppée de 180 à 200 nm de diamètre, constituée d'une capsidie icosaédrique de 162 capsomères contenant une molécule d'ADN linéaire double brin de 230 kpb (Figure 6). Cette capsidie est entourée d'une couche protéique, appelée tégument ou matrice, elle-même enfermée dans une double couche lipidique, formée à partir des membranes internes cytoplasmiques, et contenant de nombreuses glycoprotéines virales.

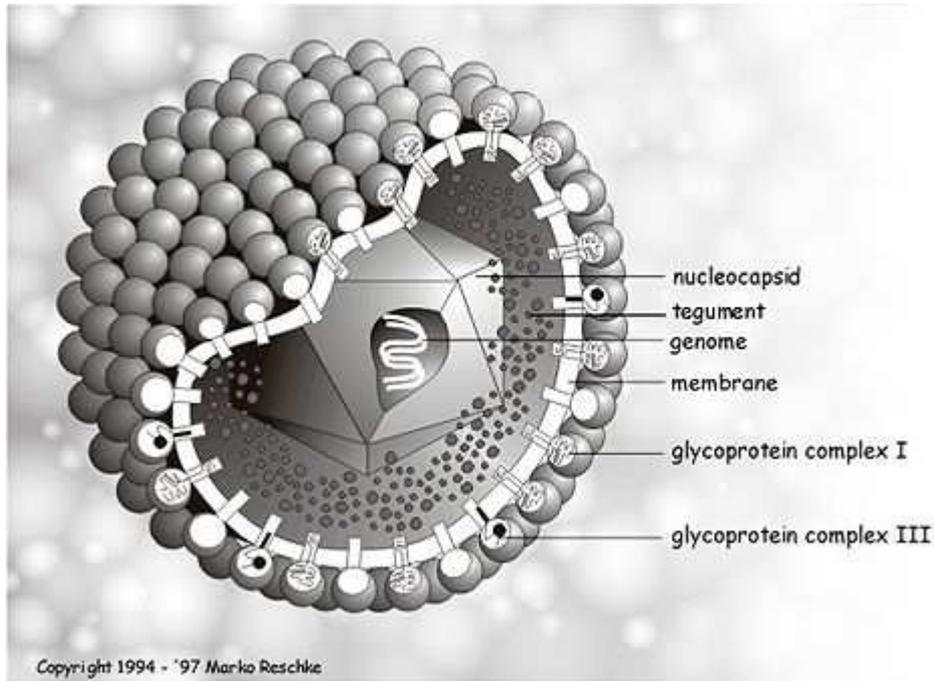


Figure 6 : Représentation du cytomégalovirus humain. (*adapté de Marko Reschke, <http://www.biographix.de/>*).

Le génome est l'un des plus longs et des plus complexes parmi les *herpesviridae* connus. Il comporte deux régions de séquences uniques, une longue (U_L) et une courte (U_S), encadrées par des séquences répétées : TR_L (*terminal repeat long*), TR_S (*terminal repeat short*), IR_L (*internal repeat long*) et IR_S (*internal repeat short*) ; une courte séquence (séquence a) se retrouve sous forme répétée à chaque extrémité du génome et sous forme inversée (à) entre les séquences IR_L et IR_S . Ce génome comporte plus de 200 cadres de lecture ouverts (*open reading frame* : ORF) représentant autant de gènes potentiels. Selon la nomenclature adoptée en 1993, ces gènes sont désignés par la région (U_L , U_S , TR_L , TR_S , IR_L , IR_S) dans laquelle ils sont situés et par un numéro indiquant leur position dans la région (Figure 7).

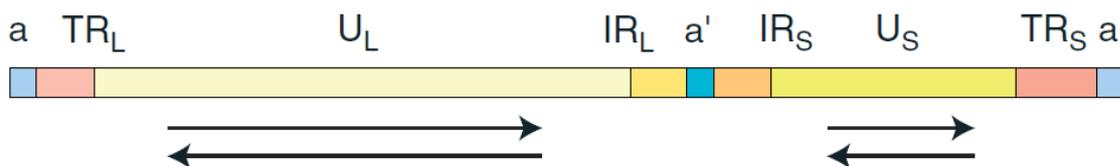


Figure 7: Structure du génome du cytomégalovirus (d'après Segondy, 2009). U_L : séquence unique longue ; U_S : séquence unique courte ; TR_L : *terminal repeat long* ; TR_S : *terminal*

repeat short ; IR_L : *internal repeat long* ; IR_S : *internal repeat short* ; a : courte séquence sous forme répétée à chaque extrémité du génome et sous forme inversée (a') entre les séquences IR_L et IR_S.

Les protéines du CMV sont désignées par le numéro du cadre de lecture correspondant, précédé d'une indication de la nature de la protéine (p : protéine, pp : phosphoprotéine, gp : glycoprotéine).

La capside, d'un diamètre d'environ 130 nm, a une structure icosaédrique et est constituée de 150 hexons, de 12 pentons et de 4 autres protéines (pUL86, pUL85, pUL46 et pUL48/49).

Le tégment est constitué de plusieurs phosphoprotéines ; les plus abondantes sont : pp150, pp71, pp65 et pp28.

L'enveloppe est constituée par un double feuillet lipidique provenant des membranes de la cellule infectée. Les glycoprotéines insérées dans cette enveloppe sont encodées par le génome viral. Les plus abondantes sont : la gpUL55 et la gpUL75.

3- Cycle viral:

L'entrée du virus se fait par fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. La capside et les protéines du tégment sont libérées dans le cytoplasme et sont rapidement transloquées dans le nucléole où la protéine pp65 est détectée moins d'une heure après l'infection. La capside, après libération dans le cytoplasme, est transportée jusqu'à un pore nucléaire par lequel seul pénètre le complexe ADN-protéines viral. La durée du cycle de réplication prend environ 4 jours dans les fibroblastes.

Au cours d'une infection active, ce cycle de réplication peut être subdivisé en trois étapes principales :

- la phase précoce immédiate (*immediate early* : IE), dans les deux premières heures de l'infection, correspond à la synthèse des protéines très précoces, indispensable à la poursuite du cycle de réplication par leurs fonctions de transactivateurs ;

- la phase précoce (*early* : E), à partir de la quatrième heure après l'infection, correspond à la synthèse des protéines précoces ; ces protéines sont essentiellement des

protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral : ADN polymérase, DBPs (*ADN-binding proteins*), etc. ;

- la phase tardive (*late* : L), correspond à l'expression des gènes tardifs et à la synthèse des protéines tardives qui sont essentiellement des protéines structurales : protéines et phosphoprotéines de la capsidie et du tégument et glycoprotéines de l'enveloppe.

L'assemblage des protéines de capsidie et de l'ADN se déroule dans le noyau, conduisant, du fait de leur accumulation, à une inclusion nucléaire. Les particules virales s'enveloppent ensuite du feuillet interne de la membrane nucléaire et migrent dans le réticulum endoplasmique du cytoplasme. Après une perte transitoire de l'enveloppe, la nucléocapsidie est revêtue du tégument et c'est dans les vésicules d'endocytose que l'enveloppe virale définitive est acquise. Cette phase cytoplasmique est objectivée par la formation d'une inclusion cytoplasmique constituée de virions matures et de corps denses. La libération des virions se fait par un mécanisme d'exocytose. La production de virus débute vers le quatrième jour de l'infection cellulaire. La cellule infectée devient alors très vacuolisée et elle meurt par éclatement 5 à 7 jours après l'infection.

4- Latence et réactivation :

De nombreux organes hébergent le virus à l'état latent et peuvent le transmettre au receveur lors d'une transplantation. Cependant, à ce jour, la capacité d'héberger naturellement le virus latent n'a été démontrée que pour les monocytes du sang périphérique et les progéniteurs CD34+ de la moelle osseuse (Sinclair *et al.*, 2006). Ces derniers, constituent le réservoir du virus.

Chez l'individu sain, un monocyte sur 10.000 est infecté de façon latente. Ce site de latence est responsable de la transmission du virus par transfusion de produits sanguins labiles non déleucocytés provenant de donneurs séropositifs pour le CMV. Goodrum *et al.* ont récemment découvert le gène *UL138* responsable de l'établissement et/ou du maintien de l'infection latente. Son mécanisme d'action est inconnu, mais il est tentant d'imaginer que son expression inhibe certains produits de la région IE pour induire la latence (Goodrum *et al.*, 2007).

Ces études suggèrent que, *in vivo*, le CMV est présent dans les progéniteurs CD34+ et transporté lorsque ces cellules se différencient en monocytes, et que les génomes viraux sont maintenus sous forme épisomale au cours de ce transport. Le virus se réactive périodiquement chez le sujet immunocompétent, ce qui conduit à des épisodes d'excrétion intermittente du virus dans les sécrétions respiratoires, l'urine, le sperme et les sécrétions cervicales.

La réactivation du virus est médiée par une régulation différentielle dépendante de l'expression des gènes viraux *IE*, essentiels pour l'induction de la production virale (Sinclair, 2008). Cette théorie s'appuie sur des données expérimentales montrant notamment que la stimulation allogénique T et B de PBMC de donneurs sains CMV+, dans des conditions environnementales imitant le milieu physiologique, conduit au développement de macrophages dérivés de monocytes alors permissifs à l'infection lytique à CMV (Soderberg-Naucler *et al.*, 1997).

Parmi les facteurs susceptibles d'induire une réactivation, le TNF α sécrété en grande quantité au cours des réponses inflammatoires aux infections, peut activer le facteur de transcription NF- κ B et la protéine activatrice-1 (AP-1), entraînant ainsi une augmentation de l'activité du promoteur IE. La stimulation allogénique imitant ce processus pourrait en partie expliquer la réactivation virale chez l'immunodéprimé (Hummel et Abecassis, 2002).

5- Physiopathologie :

Lors de la primo-infection, le virus dissémine par voie sanguine et atteint les organes cibles. Le tropisme cellulaire du virus est très étendu *in vivo*. Le virus peut se répliquer dans des cellules endothéliales, épithéliales, dendritiques, des macrophages, fibroblastes, cellules nerveuses, cellules musculaires lisses, hépatocytes (Sinzger *et al.*, 1995). Du fait de la distribution ubiquitaire de ses cibles et de leur variété, il peut atteindre tous les organes. La diffusion du virus se fait de cellule à cellule. Les fibroblastes apparaissent comme une cible majeure de l'infection dans de nombreux organes tels que le placenta, le poumon, l'intestin. L'infection des cellules stromales de la moelle osseuse joue un rôle majeur dans l'inhibition de l'hématopoïèse. L'infection lytique des cellules musculaires lisses du tractus digestif conduit à la formation d'ulcérations. La couche musculaire des vaisseaux sanguins peut aussi être infectée ; cependant des lésions structurales n'y sont pas décrites.

6- Epidémiologie :

Les infections à CMV sont endémiques et surviennent tout au long de l'année sans recrudescence saisonnière. La séroprévalence dans la population adulte atteint presque les 100% dans certaines régions du monde (pays en voie de développement, d'Afrique et d'Asie) et est inférieure à 50% en France (Gouarin *et al.*, 2001).

Le CMV est un virus strictement humain. En raison de sa fragilité dans les milieux extérieurs, la transmission interhumaine nécessite un contact étroit entre individus. Le virus étant présent dans le sang et les organes sous forme intracellulaire et sous forme libre dans diverses sécrétions, les principaux modes de transmission sont présentés par l'exposition au sang (transfusion sanguine, allogreffe de CSH), aux urines, la transplantation d'organe, la transmission salivaire, la transmission sexuelle et la transmission de la mère à l'enfant.

Deux périodes de la vie sont particulièrement concernées :

- les premières années de vie avec acquisition de l'infection *in utero*, lors du passage de la filière génitale ou au cours de l'allaitement maternel. Ceci concerne essentiellement les pays en voie de développement. Dans les pays industrialisés, le premier pic est associé à l'entrée en collectivité (Ahlfors *et al.*, 1983 ; Stagno *et al.*, 1986).
- le début de la vie sexuelle est associé au deuxième pic de contamination dans les pays industrialisés (Stagno *et al.*, 1977).

7- Réponse immunitaire :

Les réponses immunitaires tant innées qu'adaptatives ont été impliquées dans la maîtrise de la reproduction virale, en mettant en évidence que les cellules NK, les cellules B et les cellules T CD4+ et CD8+ jouent des rôles indépendants.

7-1- Réponse humorale spécifique

Au cours de la primo-infection, les individus immunocompétents produisent des immunoglobulines de classe M (IgM) anti-CMV qui persistent pendant 3-4 mois, suivies

quelques semaines plus tard par des IgG qui persistent toute la vie. Des études expérimentales et cliniques montrent que la réponse immunitaire humorale est bénéfique. Des souris vaccinées contre la glycoprotéine gB du CMV murin sont protégées d'une évolution létale (Rapp *et al.*, 1992).

La réponse humorale est dirigée contre un nombre restreint de protéines virales. Les plus immunogènes sont des protéines du tégment pp150, pp65 et pp28. La quasi-totalité des individus infectés possèdent des anticorps dirigés contre pp150. D'autres protéines sont aussi reconnues par les sérums de nombreux individus comme la protéine majeure de capsid, la protéine d'assemblage UL80.5, les protéines non structurales très précoces majeures IE₁ et IE₂, l'ADN polymérase UL54 et les protéines de liaison à l'ADN.

La protéine UL44, protéine accessoire de l'ADN polymérase, est la cible principale des immunoglobulines M (IgM) synthétisées précocement par la cellule infectée. Les glycoprotéines d'enveloppe, gB et gH sont la cible d'anticorps neutralisants. Cependant, ces anticorps ne sont pas en mesure de réagir avec la surface des virions et des cellules infectées et sont d'une importance limitée dans une réponse de protection. La présence d'anticorps neutralisants à titre élevé n'empêche pas les réinfections ou réactivations, mais pourrait en limiter les conséquences.

Le rôle de la réponse humorale dans la protection contre l'infection à CMV est secondaire.

7-2- Réponse cellulaire spécifique

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle majeur dans la protection contre l'infection à CMV. Ils reconnaissent les antigènes viraux présentés dans le contexte HLA de classe II à la surface des CPA. Les épitopes connus appartiennent principalement aux glycoprotéines d'enveloppe gB et gH, aux protéines très précoces majeures IE₁, IE₂ et UL69 et à la protéine du tégment pp65 (Walter *et al.*, 1995).

Les lymphocytes T CD4⁺ activés produisent des cytokines qui activent la réponse cytotoxique T CD8⁺ ou induisent la réponse anticorps par activation des lymphocytes B. Ils possèdent également une activité cytotoxique vis-à-vis des cellules qui expriment des épitopes viraux dans le contexte HLA de classe II.

La cinétique de la réponse immunitaire a été étudiée au cours d'une primo-infection CMV chez des receveurs d'organe symptomatiques et asymptomatiques (Gamadia *et al.*, 2003). En cas d'infection asymptomatique, le pic de cellules CD4⁺ IFN γ ⁺ apparaît 7 jours après la détection de l'ADN-CMV et est suivi 7 jours plus tard par l'apparition des IgM et IgG et 14 jours plus tard par l'apparition des T CD8⁺ CMV spécifiques. Lorsque l'infection est symptomatique, le seul élément qui varie dans cette cinétique est le pic de CD4 IFN γ ⁺ qui est retardé.

La réponse cytotoxique T CD8⁺ est indispensable au contrôle de la réplication virale. Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent un nombre restreint d'antigènes viraux présentés en association avec les molécules du CMH de classe I. La protéine pp65 est une cible majeure et des épitopes dominants y ont été identifiés. La protéine très précoce majeure IE₁, les glycoprotéines gB et gH, les phosphoprotéines pp150 et pp28 portent également des épitopes reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (Walter *et al.*, 1995). Les Lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du CMV ont un phénotype effecteur : CCR7-CD27⁺CD45RA⁻. Cependant, il a été montré que chez l'homme, les lymphocytes T CD8⁺ fonctionnels ne sont pas suffisants pour contrôler la réplication virale et que les lymphocytes T CD4⁺ IFN γ ⁺ spécifiques du CMV sont nécessaires pour résoudre l'infection (Gamadia *et al.*, 2003).

7-3- Échappement au système immunitaire

Le virus, parfaitement adapté à son hôte, a développé des stratégies d'échappement à la réponse immunitaire par dissimulation, action antagoniste et détournement du système immunitaire au profit de sa dissémination.

La diffusion du virus se fait essentiellement de cellule à cellule, ce qui permet au virus d'échapper à l'action des anticorps neutralisants. La fixation de la β 2-microglobuline à la surface des virions, en masquant les sites antigéniques, pourrait aussi jouer un rôle dans l'échappement à la réponse humorale. L'état de latence met le virus à l'abri des défenses immunitaires cellulaires.

L'infection à CMV induit :

- une diminution de la réponse lymphocytaire proliférative vis-à-vis des mitogènes et des antigènes bactériens et viraux (y compris les antigènes du CMV),

- une inversion du rapport lymphocytes T CD4+/CD8+ du fait d'une augmentation du nombre de CD8+,
- une diminution de la réponse CD8+ cytotoxique,
- une inhibition de l'expression des molécules du CMH de classe I et II (Lin *et al.*, 2007).

8- Manifestations cliniques :

8-1- Chez les individus immunocompétents

L'infection à CMV, dont la fréquence augmente avec l'âge, est inapparente dans 90% des cas chez les sujets immunocompétents, et bien tolérée lorsqu'elle est symptomatique. Les manifestations cliniques sont plus souvent observées à l'occasion de la primo-infection maternelle que lors d'une infection secondaire.

La forme typique consiste en une fièvre parfois élevée mais bien tolérée, en plateau. Elle persiste en moyenne 3 semaines mais peut se prolonger jusqu'à 7 semaines. Les signes associés les plus fréquents sont des céphalées et des myalgies diffuses (Faucher *et al.*, 1998).

8-2- Chez les individus immunodéprimés

Chez le sujet immunodéprimé, le CMV est redoutable et responsable de la morbidité la plus significative en transplantation. L'infection à CMV, qu'il s'agisse d'une primo-infection ou d'une réactivation du virus latent, intervient le plus souvent entre le premier et le quatrième mois après la greffe (Fishman et Rubin, 1998). Chez les receveurs d'allogreffe de CSH, l'infection à CMV reste une cause majeure de mortalité et de morbidité (85 à 95%).

Lorsque l'infection à CMV s'accompagne de symptômes, on parle de maladie à CMV. Elle s'observe dans 60 % des cas de primo-infections, 40 % des cas de réinfections et 20 % des cas de réactivations chez des patients qui présentent un ou plusieurs facteurs de risque. Les maladies les plus fréquentes sont les pneumonies, les hépatites, les atteintes du tube digestif ou une fièvre supérieure à 38°C pendant plus de 48 heures. Par ailleurs, une infection à CMV peut favoriser un rejet de la greffe ou une réaction de GvH. Enfin, elle peut elle-même aggraver l'immunosuppression (Fishman et Rubin, 1998).

Contrairement à ce que l'on observe en culture cellulaire, *in vivo* chez l'immunodéprimé, la réplication du CMV est rapide. Ainsi, Emery *et al.*, en utilisant des modèles mathématiques analogues à ceux utilisés pour le VIH et le VHC ont montré que la durée de demi-vie dans le sérum du CMV est de l'ordre de 24 heures avec un temps moyen de doublement également de 24 heures (Emery *et al.*, 1999). Ces auteurs soulignent que ces chiffres doivent être modulés en fonction du nombre de cellules cibles et de la qualité et de l'intensité de la réponse immunitaire.

La même équipe a étudié la cinétique de la charge virale chez des patients développant une maladie à CMV (Emery *et al.*, 2000). Trois cent cinquante-neuf patients ont été inclus dans cette étude dont 162 transplantés hépatiques, 87 transplantés rénaux et 110 de MO. La virémie CMV a été quantifiée par une technique de PCR quantitative sur 200 ml de sang une fois par semaine. La réplication du CMV a été détectée chez 127 des 359 patients et 49 d'entre eux ont présenté des signes cliniques de maladie à CMV. Les auteurs rapportent que la charge virale mesurée dans le premier prélèvement positif est proportionnelle à celle mesurée au moment du pic et que l'augmentation de la charge virale est plus rapide chez les patients qui développent une maladie à CMV. En analyse multivariée, le risque de développer la maladie est plus important chez les patients dont la charge augmente vite. Cette étude montre que la vitesse de l'augmentation de la charge virale permet d'identifier les malades à risque et qu'elle doit être prise en compte dans le suivi des patients.

L'infection et la maladie à CMV sont beaucoup moins fréquentes après autogreffe de CSH, vraisemblablement du fait d'une reconstitution immunitaire plus précoce et plus efficace (Mendes *et al.*, 2002). En revanche, après une allogreffe de CSH, le risque de maladie à CMV est beaucoup plus élevé (50 %). La mortalité associée à une pneumonie à CMV peut atteindre 90%. La plupart des équipes en charge de ces patients mettent en place soit un traitement prophylactique, soit un traitement préemptif dès le premier prélèvement positif détectant la réplication du CMV. Ce genre de stratégie nécessite un suivi virologique par des techniques très sensibles.

9- Techniques de diagnostic :

Le virus et/ou ses structures (antigènes, acides nucléiques) sont recherchés dans le sang et/ou divers échantillons comme les urines, les sécrétions pharyngées, le liquide de LBA, le LCR, les biopsies, les prélèvements de col utérin, le liquide amniotique et les tissus fœtaux.

Il existe plusieurs techniques de diagnostic de l'infection à CMV, parmi elles :

- *L'examen cytologique*, qui conserve son intérêt pour l'étude des biopsies d'organes. Les cellules infectées *in vivo* sont de grande taille et possèdent des inclusions intranucléaires et intracytoplasmiques.
- *L'isolement en culture cellulaire*, qui est la technique de référence permettant d'affirmer la présence de virus infectieux au site de prélèvement et de conserver les souches virales.
- *La détection des antigènes viraux*, qui est réalisée par immunofluorescence ou immunoperoxidase. Par exemple, la phosphoprotéine pp65 est détectée à l'aide d'un anticorps ou d'un mélange d'anticorps monoclonaux spécifiques fluorescents.

- *Détection des acides nucléiques viraux*

Les méthodes de PCR qualitatives sont nombreuses et variées. La séquence amplifiée est choisie dans une région spécifique du CMV ou dans une région d'homologie avec les autres herpes virus humains, ce qui permet la détection simultanée de plusieurs d'entre eux. Une trousse commerciale fondée sur ce principe (Herpes Consensus Generique®) permet la détection synchrone du génome de plusieurs herpes virus dans le LCR (EBV-CMV-HSV1-HSV2-VZV-HHV6). La technique est sensible et spécifique, mais nécessite plusieurs heures de manipulations, retardant d'autant le rendu du résultat et la prise en charge adaptée du patient.

La détection qualitative par PCR de l'ADNémie est actuellement supplantée par la quantification du génome. Depuis 1993, de nombreux protocoles de mesure de la charge virale sanguine ont été proposés. Leur diversité, tant dans la méthode de quantification (dilution limite, comparaison à un standard externe ou comparaison à un standard interne) que

dans l'expression semi-quantitative ou quantitative des résultats rend délicates les comparaisons.

Les techniques de quantification par PCR classique sont progressivement remplacées au sein des laboratoires par les techniques de PCR en temps réel, plus sensibles, plus précises, plus reproductibles, plus rapides à mettre en oeuvre et adaptées aux grandes séries. La PCR en temps réel permet de faire simultanément l'amplification du gène d'intérêt et l'analyse des produits d'amplification, ce qui réduit la durée du test par rapport à celle d'une PCR classique. Le risque de faux positif par contamination est également réduit.

Actuellement, le sang total tend à supplanter les préparations de leucocytes ou le plasma (Deback *et al.*, 2007). La diversité des techniques de PCR en temps réel pratiquées dans les différents laboratoires, tant pour le protocole de PCR utilisé, que pour le compartiment sanguin analysé, rend les comparaisons délicates et retarde l'établissement d'une approche consensuelle des patients immunodéprimés. Depuis peu, plusieurs trousse commerciales sont disponibles et pourraient permettre une homogénéisation des techniques à l'origine d'une meilleure standardisation des résultats (Gouarin *et al.*, 2007).

Les techniques d'hybridation *in situ* sont peu sensibles. Elles sont réservées aux études physiopathologiques. Elles peuvent être combinées avec la détection d'antigènes viraux ou cellulaires par immunocytochimie, ce qui permet de reconnaître des infections mixtes ou d'identifier la cellule infectée.

Les méthodes de mise en évidence des ARN messagers tardifs, développées pour diagnostiquer l'infection active et la maladie à CMV, sont actuellement abandonnées au profit de la mesure de la charge virale par PCR en temps réel. Les trousse ne sont plus commercialisées

10- Traitement des infections à CMV:

Il existe différents traitements pour prévenir et traiter les infections à CMV.

10-1- Antiviraux actifs sur le CMV

Les antiviraux actifs sur le CMV sont des molécules présentant une toxicité élevée. Le ganciclovir présente surtout une toxicité hématologique, le cidofovir présente une toxicité rénale.

L'utilisation prolongée des antiviraux peut entraîner l'apparition de résistances liées au développement de mutations. La résistance au ganciclovir est associée à des mutations sur le gène de la phosphotransférase (UL97) et/ou de l'ADN polymérase (UL54). Les résistances au cidofovir sont liées au développement de mutations spécifiques sur le gène UL54 (Erice, 1999).

Le maribavir est une nouvelle molécule dérivée du benzimidazole qui inhibe la phosphotransférase codée par le gène UL97 (Biron *et al.*, 2002). Il ne présente pas de résistance croisée avec les autres antiviraux actifs sur le CMV. La résistance à cette molécule est liée à des mutations sur le gène UL97 différentes de celles responsables de la résistance au ganciclovir (Drew *et al.*, 2006 ; Chou *et al.*, 2007).

En cas d'inefficacité du traitement antiviral, il est possible de rechercher l'existence d'une résistance du CMV aux antiviraux. Cette recherche peut se faire par un test phénotypique, consistant à déterminer *in vitro* les concentrations inhibitrices (CI₅₀) d'antiviral sur la souche isolée chez le patient, ou par un test génotypique consistant à identifier par séquençage les mutations conférant une résistance sur le gène UL97 (ganciclovir) et/ou UL54 (ganciclovir et cidofovir).

10-2- traitement prophylactique

Le traitement prophylactique est utilisé principalement en transplantation d'organe pour éviter le risque de survenue d'une maladie à CMV. Le valaciclovir est indiqué pour la prévention des infections et maladies à CMV chez les greffés d'organes, en particulier chez les transplantés rénaux. Le ganciclovir par voie parentérale est indiqué chez les patients présentant un risque accru d'infection à CMV en raison d'un traitement immunosuppresseur lourd, si le receveur est préalablement séropositif pour le CMV, particulièrement en transplantation cardiaque (Segondy, 2009).

10-3- Traitement préemptif

Le traitement *préemptif* consiste à instaurer un traitement à dose curative sur la base de la détection du CMV en l'absence de signes cliniques, afin de prévenir l'apparition d'une maladie à CMV sévère. Ce traitement préemptif est indiqué en greffe de CSH pour prévenir la pneumopathie interstitielle à CMV qui est de très mauvais pronostic dans ce contexte. Il est basé sur l'administration de ganciclovir par voie parentérale dès la positivité de la recherche virale dans le sang (Segondy, 2009).

10-4- Traitement curatif

Le traitement curatif est indiqué lorsqu'il y a une maladie à CMV chez un patient immunodéprimé. Il s'agit essentiellement des transplantés et des patients présentant une infection à VIH au stade sida. Le traitement en première intention est basé sur l'administration de ganciclovir. En cas de résistance au ganciclovir, observée surtout chez les patients atteints de SIDA, le traitement fait appel à l'utilisation du cidofovir (Segondy, 2009). Le traitement par ganciclovir est préconisé chez les nouveaux nés présentant une infection congénitale symptomatique. Les rares essais cliniques ne concernant qu'un petit nombre d'enfants paraissent démontrer un bénéfice du traitement sur l'évolution de la maladie.

III- L'Adénovirus humain (ADV)

Famille : <i>Adenoviridae</i>
Genre : <i>Mastadenovirus</i>
7 familles, 54 sérotypes
Taille du virus : 80-110 nm
Génome :
ADN 35,9 kpb
8 unités de transcription
Réplication dans le noyau
Capside :
Icosaédrique
252 capsomères
Virus nu

1- Classification :

L'ADV humain appartient à la famille *Adenoviridae* et au genre *Mastadenovirus*. En effet, il existe à ce jour 54 sérotypes d'ADV différents répartis en 7 espèces A-G sur la base de propriétés structurales ou biologiques distinctes (Jones *et al.*, 2007 ; Walsh *et al.*, 2009). (Tableau 2).

Tableau 2 : Propriétés des adénovirus humains.

Espèces	Sérotypes	Oncogénicité	% G+C	% d'homologie
A	12, 18, 31	Forte	48-49	48-69
B1	3, 7, 16, 21, 50	Faible	50-52	89-94
B2	11, 14, 34, 35	Faible	50-52	89-94
C	1, 2, 5, 6	0	57-59	99-100
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42- 49, 51	0	58	94-99
E	4	0	57-61	-
F	40, 41	0	57-59	62-69
G	52-54	ND	ND	ND

ND : non déterminé

2- Structure :

L'ADV est de taille moyenne, non enveloppé, de forme icosaédrique de 70-90 nm de diamètre. Le génome est un ADN double brin linéaire de 36kb et de 40 gènes approximativement. Les protéines de la capside sont formées par 252 capsomères, incluant 240 hexons et 12 pentons. Chaque penton consiste en une base et une fibre avec un bouton terminal qui interagit avec les récepteurs de la cellule (Figure 8).

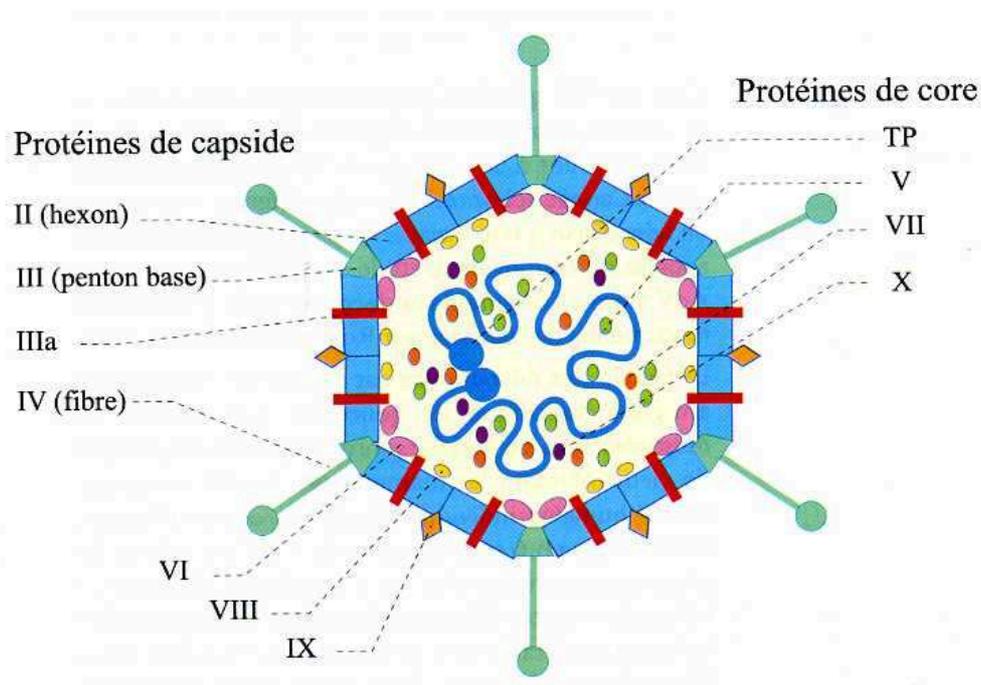


Figure 8: Représentation schématique de l'Adénovirus (d'après Freymuth, 2003).

La particule virale est composée de onze protéines. La protéine hexon est composée de l'association de trois molécules de polypeptide II, VI, VIII et IX qui est la protéine la plus abondante du virion. L'association de trois molécules du polypeptide III forme le penton et trois copies du polypeptide IV forment la protéine de fibre. Cette dernière contient des sites spécifiques de sérotypes et de certaines espèces de déterminants antigéniques qui sont responsables de l'hémagglutination *in vitro*. A l'exception des espèces B, tous les autres ADV utilisent les récepteurs coxsackie (Roelvink *et al.*, 1998).

Le core est constitué de quatre protéines connues et du génome viral. Les polypeptides VII, principal constituant du core, V et Mu sont des protéines basiques au contact avec l'ADN

viral. La protéine terminale (TP, *terminal protein*) est liée de façon covalente avec l'extrémité 5' de l'ADN viral. Elle permet l'initiation de la réplication de l'ADN viral et l'attachement du génome viral à la matrice nucléaire.

Le génome de l'ADV est une molécule linéaire double brin de 30 à 38 kb et correspond à 30 à 40 ORF. Il comporte de courtes séquences répétées inversées aux extrémités qui interviennent dans la réplication de l'ADN. Les deux brins d'ADN sont transcrits. Il est constitué de gènes très conservés comme celui de la protéine hexon, ou au contraire très variables comme les gènes précoces (*early*, E). Il comporte (Figure 9) :

- cinq unités de transcription précoces E1A, E1B, E2A, E3 et E4,
- deux unités précoces retardées pIX et Iva2,
- et une unité de transcription retardée qui code cinq familles d'ARN messagers (L1 à L5) (Russell, 2000).

Tous ces gènes sont transcrits par l'ADN polymérase II.

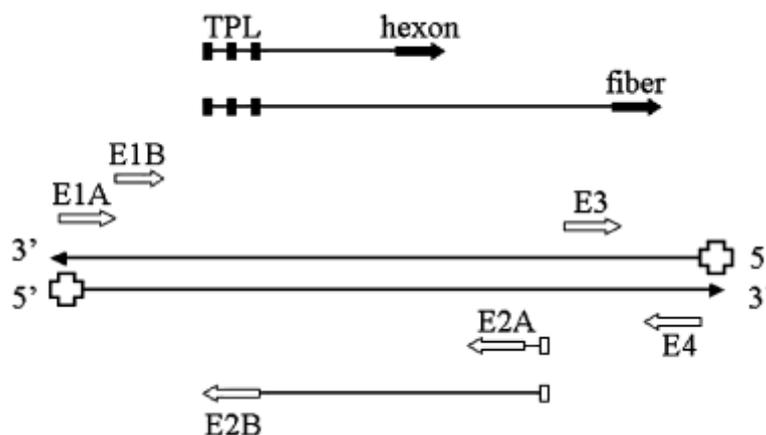


Figure 9 : Organisation du génome de l'adénovirus (d'après Russell, 2000).

3- Cycle viral:

La pénétration de l'ADV dans la cellule hôte se fait par l'intermédiaire de la protéine fibre hémagglutinine par le domaine carboxi-terminal et le récepteur cellulaire coxsackie adénovirus (*coxsackievirus adenovirus receptor*, CAR), membre de la superfamille des immunoglobulines. Le virus pénètre par endocytose et en quelques minutes, l'ADN viral est

injecté dans le noyau cellulaire. Seul 10% de l'ADN viral après réplication et 20% des protéines hexon sont incorporés dans les virions (Figure 10).

Pendant la phase précoce, les régions E1A et E1B sont transcrites en premier, puis suivent les régions E3 et E4. Les premières codent des protéines de régulation et des protéines protégeant les cellules infectées de l'apoptose, les secondes codent des protéines qui bloquent les mécanismes de défense antivirale (E3), ou qui régulent l'expression des gènes viraux ou cellulaires (E4).

Pendant la phase tardive, les ARNm tardifs sont transcrits. Ils codent les protéines de structure, et quelques protéines non structurales nécessaires à l'assemblage. Deux petits VA-RNA (*viral associated-RNA*) sont transcrits à la fin du cycle. Leurs produits protègent les cellules infectées de la lyse par l'IFN γ . Toutes les protéines synthétisées migrent vers le noyau où s'effectue l'assemblage.

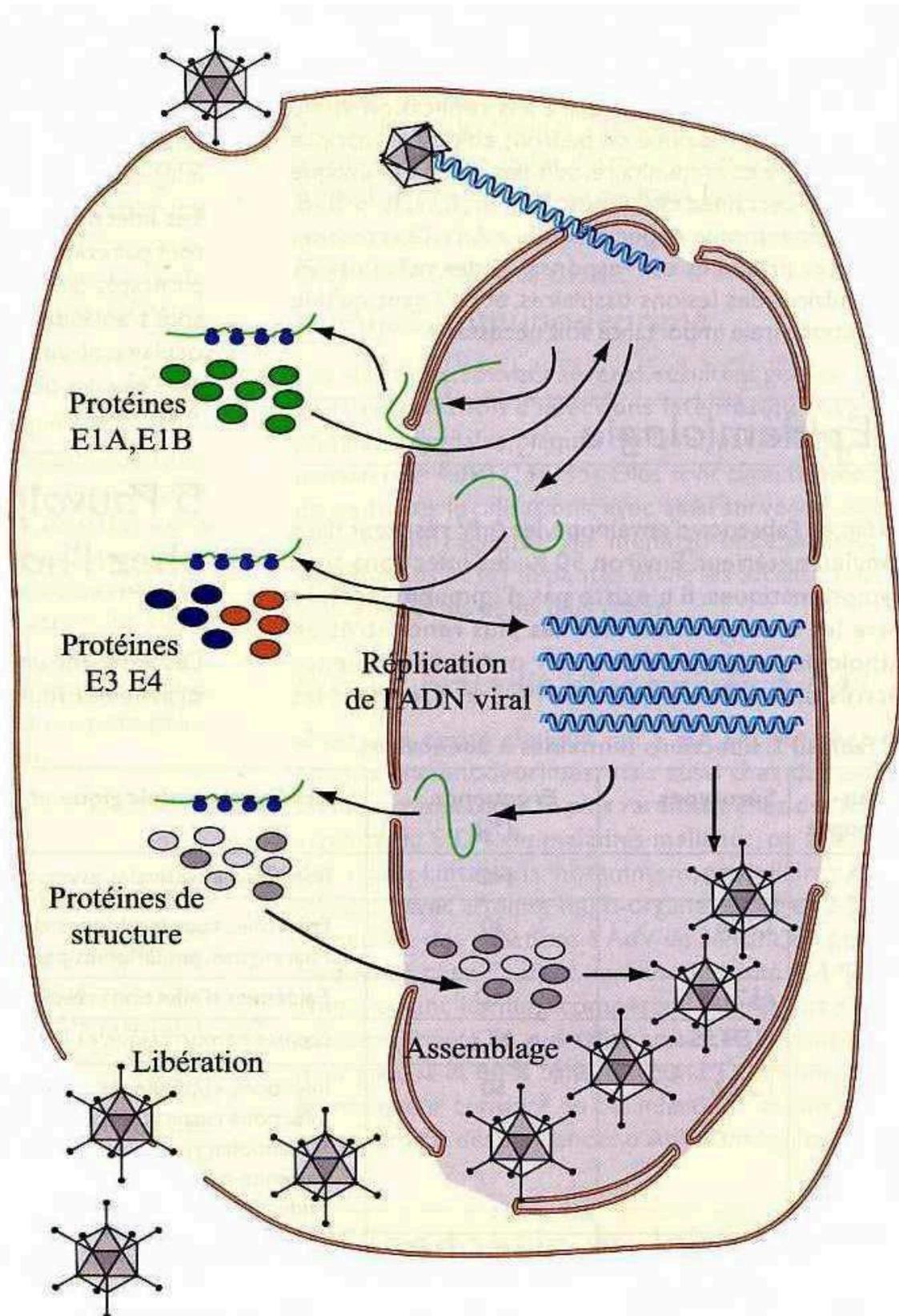


Figure 10 : Cycle viral de l'adénovirus (d'après Freymuth, 2003).

4- Latence et réactivation :

L'ADV consacre une partie significative de son génome et des produits de ses gènes à une fonction unique qui semble être la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Ces mécanismes pourraient jouer un rôle dans le maintien du virus dans l'état persistant. Ce mécanisme a été particulièrement observé pour l'espèce C (sérotypes 1, 2 et 5) qui persiste pendant plusieurs années, spécifiquement, dans les lymphocytes T des amygdales et les végétations adénoïdiennes en hébergeant l'ADN viral (Garnett *et al.*, 2007). Cette condition peut présenter des caractéristiques spécifiques de la pathogénicité du virus, tels que les modes d'infection et de réactivation. La réactivation endogène peut se produire durant la période d'immunosuppression.

5- Épidémiologie :

La répartition des ADV est mondiale et du fait de l'absence d'enveloppe, ces derniers résistent dans le milieu extérieur (Ginsberg *et al.*, 1994). Environ 50% des infections sont asymptomatiques.

Les ADV les plus rencontrés en pathologie respiratoire sont par ordre de fréquence décroissant les sérotypes 2, 1, 7, 3 et 5, et dans les diarrhées les ADV 40 et 41.

Les infections respiratoires à ADV 1, 2, 5 et 6 sont endémiques alors que les sérotypes 3, 4, 7, 14 et 21 causent de petites épidémies favorisées par la vie en communauté.

Les atteintes oculaires à ADV 8, 19 et 37, ou intestinales à ADV 40 et 41, sont endémiques ou épidémiques.

Chez les enfants les infections à ADV constituaient moins de 5% des étiologies des infections aiguës des voies respiratoires inférieures nécessitant l'hospitalisation.

Les infections respiratoires à ADV se transmettent surtout par contact direct ou indirect avec les sécrétions respiratoires (aérosols, mains sales). Les souches entériques sont transmises par la voie fécale et orale. La contamination oculaire, aboutissant à des conjonctivites, se fait parfois par l'eau des piscines ou le matériel d'ophtalmologie (Leuleu *et al.*, 1995).

6- Réponse immunitaire :

La protéine **hexon** constitue le composant majeur de la capside et joue le rôle principal dans l'établissement de la réponse immunitaire adoptive (humorale ou cellulaire). Les protéines **penton** et **fibre** jouent également un rôle dans l'induction des anticorps neutralisants (Hong *et al.*, 2003 ; Stallwood *et al.*, 2000).

Les études de physiopathologies sont limitées du fait du manque de modèles animaux nécessaires pour reproduire les maladies rencontrées chez l'Homme. L'ADV possède des mécanismes d'évasion à la réponse immunitaire de l'hôte par :

- inhibition des fonctions de l'IFN γ par l'association virale ARN et E1A (protéine précoce de l'ADV),
- inhibition intrinsèque de l'apoptose cellulaire et régulation de l'expression des molécules du CMH de classe I à la surface des cellules infectées (Mahr *et al.*, 1999).

6-1- L'immunité humorale

L'adénovirus est un virus endémique ce qui explique que plus de 80 % de la population adulte possède des anticorps contre un ou plusieurs sérotypes. Les anticorps opposent une barrière à la diffusion du virus. Ils sont principalement dirigés contre la protéine hexon située au niveau de la capside du virus.

Les receveurs de CSH présentant une virémie à ADV montrent une augmentation du taux d'anticorps spécifiques anti-sérotypes lorsqu'ils stoppent l'infection (Heemskerk *et al.*, 2005). Il a été démontré que l'anticorps monoclonal anti-hexon peut bloquer l'infection par arrêt du transport cytoplasmique dépendant des microtubules (Smith *et al.*, 2008).

6-2- L'immunité cellulaire

L'immunité cellulaire est importante pour permettre une rémission après une infection aiguë. Elle joue un rôle majeur dans le contrôle d'une infection à ADV. En réponse à une infection, il est constaté une augmentation des lymphocytes T puis un retour à la normale une fois le contrôle de l'infection assurée. Les patients immunodéprimés, qui n'ont pas de cellules immunitaires effectrices, présentent un haut risque d'infection à ADV.

Des études ont rapporté le rôle prédominant des lymphocytes T CD4 dans le contrôle de l'infection (Sester *et al.*, 2002 ; Heemskerk *et al.*, 2003-2005). Les auteurs ont montré que le déficit en lymphocytes T CD4 était de mauvais pronostic dans la survenue d'une infection à ADV et la maladie invasive. Quant aux lymphocytes T CD8, aucune différence significative n'est rapportée dans la littérature ce qui paraît être une originalité de cette infection.

Chatziandreou *et al.*, expliquent le rôle prépondérant des lymphocytes T CD4 par leur pouvoir cytotoxique. Ils ont mis en évidence une forte concentration de perforine dans les lymphocytes T CD4 anti-ADV associée à un pouvoir cytotoxique élevé *in vitro* (Chatziandreou *et al.*, 2006).

Molinier-Frenkel *et al.*, ont montré que la plupart des lymphocytes reconnaissent les 3 protéines majeures de la capsidie soient l'hexon, le penton et la fibre tétramérique (Molinier Frenkel *et al.*, 2000). Et parmi ces 3 protéines, il semble que l'hexon soit la cible principale des lymphocytes (Molinier Frenkel *et al.*, 2002).

Olive *et al.*, ainsi que Tang *et al.*, sont les premiers à avoir décrit des épitopes immunodominants dans la protéine hexon. Ils ont montré que ces épitopes présentés par le CMH de classe I et classe II se situaient dans des régions très conservées de la protéine (Olive *et al.*, 2002 ; Tang *et al.*, 2004), ce qui pourrait expliquer la « cross-réactivité » des lymphocytes T avec différents sérotypes d'adénovirus (Heemskerk *et al.*, 2003; Leen *et al.*, 2004).

7- Manifestations cliniques:

Les ADV ont une affinité pour de nombreux tissus et organes et leur pouvoir pathogène est très étendu (Tableau 3). Certains sérotypes sont plus souvent associés à un syndrome clinique donné (Echavarria, 2008).

7-1- Atteintes respiratoires

Les atteintes respiratoires de type rhino-pharyngite, d'angine, d'otite moyenne aiguë, de laryngite, de bronchiolite ou de pneumonie sont généralement modérées avec des symptômes usuels tels que la fièvre, le rhume, la toux, des myalgies et des céphalées.

Chez les enfants, les pneumonies à ADV nécessitent une hospitalisation dans 8% des cas ; leur début est généralement brutal avec une rhinite, une dyspnée, une toux rebelle et des râles de bronchite.

Les sérotypes les plus courants sont les ADV 1, 2, 5, 6. Les ADV 4 et 7 peuvent provoquer de véritables épidémies. Les formes graves et rares sont principalement dues à l'ADV 7 : la détresse respiratoire est alors associée à des signes nerveux de type méningite et à des troubles de la conscience. La mortalité peut atteindre 30%.

7-2- Atteintes oculaires

Les conjonctivites congestives sont fréquentes, isolées ou associées à un syndrome pharyngé. Elles sont accompagnées d'une adénopathie satellite et apparaissent après 6 à 9 jours d'incubation. Elles sont principalement liées aux ADV 3 et 7.

Des atteintes plus sévères de type kérato-conjonctivite, parfois hémorragique, sont observées avec l'ADV 8, mais aussi les ADV 19 et 37. La kératite superficielle apparaît après une incubation de 8 jours, notamment chez des sujets présentant des microtraumatismes de la conjonctive. Elle évolue sous un mode épidémique dans les milieux où l'empoussièrement est important ou dans les services d'ophtalmologie. L'évolution est lente mais l'infection est majoritairement résolutive sans séquelles.

7-3- Atteintes intestinales

Les gastroentérites aiguës à ADV constituent 5 à 15% des gastroentérites nécessitant une hospitalisation et sont le plus souvent dues aux ADV 40 et 41 dans 67% des cas.

Les atteintes intestinales peuvent être des diarrhées de courte durée accompagnant une infection respiratoire à ADV, de la fièvre et des vomissements.

Chez les enfants, les infections à ADV se manifestent par des excréments asymptomatiques dans les selles.

7-4- Infections chez les sujets immunodéprimés

Les infections à ADV chez les patients immunodéprimés, sont souvent sévères et sont l'une des principales causes de mortalité et morbidité chez les receveurs de CSH. Cette manifestation résulte généralement de la réactivation d'infections latentes dans le tissu lymphoïde (amygdales par ADV 1, 2 et 5) ou du rein (par ADV 11, 34 et 35). Elles sont caractérisées par de multiples localisations, avec la survenue de cystites hémorragiques, de méningo-encéphalites, les pneumonies et les hépatites étant les localisations les plus fréquentes et les plus graves (Walls *et al.*, 2003).

Tableau 3 : Fréquence de l'infection à ADV, les maladies et la mortalité chez les receveurs de greffe de MO et/ou CSH, méthodes diagnostiques et les sérotypes impliqués (Echavarria, 2008).

Auteurs	Types de greffe (période)	% infection ADV (nb patients infectés/ nb total patients)	% maladies à ADV (nb de patients symptomatiques / nb patients infectés)	% mortalité liée à ADV (nb de décès/ nb patients infectés)	Types d'échantillon positif à ADV (méthode)	Espèces ou sérotypes
Wasserman <i>et al.</i> , 1988	MO (allo et auto), E, ICT (1979-1986)	18 (17/96)	ND	6 (1/17)	U, S, G, Sg (culture)	1, 2, 3, 4, 11, 12, 15
Ljungman <i>et al.</i> , 1989	MO (1987)	6 (5/78)	ND	20 (1/5)	G (culture, histopathologie, IFI)	34
Flombenberg <i>et al.</i> , 1994	MO (allo et auto), DT, ICT (1987-1990)	21 (42/201); A, 14 (16/118); E, 31 (26/83)	31 (13/42)	17 (7/42)	E, G, U, Sg (culture)	1, 2, 4, 5, 29, 35
Blanke <i>et al.</i> , 1995	MO (allo), DT (1990-1992)	14 (10/74)	10 (1/10)	50 (5/10)	U, P, S, G (culture)	1, 11, 12
Hale <i>et al.</i> , 1999	MO (allo et auto), E, ICT (1990-1994)	6 (13/206)	46 (6/13)	50 (7/13)	U, G, S, P, Sg, F (culture)	5, 7, 11
Howard <i>et al.</i> , 1999	CSH (allo et auto), DT, ICT (1986-1997)	12 (64/532) ; A, 9 (35/405) ; E, 23 (29/127)	64 (41/64)	17 (11/64)	U, S, P, F, MO, Sg, C, NP (culture, histopathologie)	ND
Venard <i>et al.</i> , 2000	MO (allo et auto), E, ICT (1995-1996)	20 (13/65)	61 (8/13)	70 (9/13)	U, S, G, LBA, CO, Sa (culture)	1, 2, 3
Hoffman <i>et al.</i> , 2001	CSH, E (allo) (1998)	47 (17/36)	82 (14/17)	12 (2/17)	U, G, Sg (culture)	ND
Bordignon <i>et al.</i> , 2001	CSH, E (allo), ICT (1985- 1999)	12 (35/303)	60 (21/35)	68 (15/22)	U, S, G, CO (culture)	1, 2, 3, 5, 8, 31
Echavarria <i>et al.</i> , 2001	CSH (allo) (1985-1999)	12 (38/328)	45 (17/38)	18 (7/38)	U, G, S (culture), Sérum (PCR)	1, 2, 5, 12/31

La Rosa <i>et al.</i> , 2001	MO, CSH, A (allo et auto) (1990-1998)	3 (85/2889)	89 (76/85)	23 (20/85)	U, NP, S, LBA, MO, CO (culture)	ND
Leruez-Ville <i>et al.</i> , 2004	MO, autres DI A, E (2002)	18 (8/44)	ND	25 (2/8)	Sg, MO, NP, LBA, U, BE (IFI, culture, RT-PCR)	2, 5, 6, 12
Kampmann <i>et al.</i> , 2005	CSH (allo), ICT (1999-2002)	41 (63/155)	ND	19 (5/26)	Sg, S (culture, PCR, histopathologie)	A, B, C
Van Tol <i>et al.</i> , 2005	CSH, E (allo) (1985-1999)	11 (37/328)	46 (17/37)	19 (7/37)	S, U, Sg, G (culture, PCR)	Nd
Yusuf <i>et al.</i> , 2006	CSH, E (2001-2004)	32 (57/177)	75 (43/57)	2 (1/57)	CMN (RT-PCR)	ND
Kroes <i>et al.</i> , 2007	CSH, E (2001-2004)	40 (33/83)	29 (8/28)	30 (10-33)	S, U, G (culture)	1, 2, 3, 5, 6, 7, 11, 21, 31, 36% multiples infections)
Kalpoe <i>et al.</i> , 2007	CSH A et E (2001-2005)	A, 5 (5/107); E, 14 (8/58)	A, 20 (1/5); E, 50 (4/8)	A, 20 (1/5); E, 38 (3/8)	Sg (RT-PCR)	ND

A, adulte; allo, allogénétique; auto, autologue; Sg, sang; LAB, lavage bronchoalvéolaire; MO, moelle osseuse; C, cerveau; BE, biopsie d'échantillon; E, enfant; CO, conjonctive; CSH, cellules souches hématopoïétiques; IFI, immunofluorescence indirecte; P, poumons; F, foie; NO, nasopharynx; ND, non déterminé; CMN, cellules mononucléées; RT-PCR, *real time-poly chaine reaction*; S, selles; Sa, salive; ICT, irradiation corporelle totale; DT, déplété en cellules T; G, gorge; U, urine.

8- Techniques de diagnostic :

Les méthodes de diagnostic dépendent du type de la maladie et des échantillons obtenus. Le diagnostic des infections à ADV est principalement effectué en utilisant des méthodes directes et de façon moindre des méthodes indirectes.

8-1- Diagnostic direct

Le diagnostic direct consiste à isoler le virus dans une culture cellulaire, à détecter l'antigène ou à détecter le génome, avec ou sans amplification.

8-1-1- La culture cellulaire :

La culture cellulaire est l'une des bases du diagnostic virologique, elle permet le diagnostic en 3 à 7 jours. Le prélèvement susceptible de contenir de l'ADV est inoculé dans plusieurs types cellulaires humains: MRC5, A549, Hep-2 et HeLa (Huang et Turchek, 2000), à l'exception des ADV 40 et 41 qui prolifèrent mieux dans les cellules épithéliales humaines, lesquels produisent un effet cytopathique caractérisé par un arrondissement des cellules et un aspect de dentelle de la nappe cellulaire (Lispon *et al.*, 1993).

Bien que la culture cellulaire reste la méthode standard, elle peut être non sensible avec plusieurs échantillons cliniques et non interprétable suite aux contaminations bactériennes ou fongiques.

8-1-2- Détection d'antigène :

La recherche d'antigène est très utilisée dans les infections respiratoires et gastro-intestinales pour sa rapidité et sa sensibilité. L'immunofluorescence (sécrétions respiratoires) et les tests immunoenzymatiques (excrétions fécales) sont les deux approches les plus communes (Gleaves *et al.*, 1993). La sensibilité de la technique d'immunofluorescence pour l'ADV atteint 40 à 60% en comparaison avec la culture cellulaire (Setty *et al.*, 2003).

D'autres méthodes plus rapides sont utilisées pour la détection de l'antigène telles que l'immunochromatographie, l'agglutination (Fujimoto *et al.*, 2004). Ces approches sont essentiellement utilisées pour la détection dans les échantillons fécaux alors qu'avec l'immunofluorescence celle-ci ne peut pas être réalisée et un faible nombre d'échantillons

peut être testé en une seule fois. Une seule étude évaluant le kit d'immunochromatographie avec des sécrétions respiratoires montre 90% de sensibilité en comparaison avec la culture cellulaire (Fujimoto *et al.*, 2004).

8-1-3- Détection du génome viral :

Ces dernières années, le développement et l'application des méthodes moléculaires utilisant l'amplification de l'ADN viral par PCR ont augmenté la sensibilité et la rapidité du diagnostic. Cette technique est spécialement applicable lorsque le virus présent est non infectieux et l'amplification virale est trop faible pour être détectée par culture cellulaire (Echavarria, 2008).

Elle est réservée au diagnostic des infections disséminées chez les patients immunodéprimés qui présentent une symptomatologie non spécifique et à la recherche systématique.

La détection du génome viral peut être réalisée à partir de biopsies, du liquide céphalo-rachidien ou du sang total après extraction de l'ADN. Etant adaptée au suivi des patients immunodéprimés, elle doit permettre de détecter le plus grand nombre de sérotypes, pour cela les amorces sont généralement choisies dans le gène de l'hexon ou de la fibre parce qu'ils contiennent des régions très conservées (Jeulin, 2007).

8-2- Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect utilisant la sérologie est limité à cause du manque de sensibilité, les réponses hétérotypiques, ou la production inadéquate d'anticorps, spécialement chez les patients immunodéprimés.

9- Traitement des infections à ADV:

Actuellement, il n'y a pas de traitement antiviral spécifique pour l'ADV, bien que les médicaments tels que le ganciclovir, vidarabine, ribavirine et le cidofovir soient utilisés (Arav-Boger *et al.*, 2000 ; Legrand *et al.*, 2001 ; Bordigoni *et al.*, 2001 ; Hoffman *et al.*, 2001). Les études cliniques sur les patients immunodéprimés se sont concentrées sur le cidofovir et la ribavirine mais des essais contrôlés et randomisés manquent encore.

- La ribavirine est un analogue de la purine avec une activité *in vitro* ciblant l'ARN ou l'ADN des virus. Différents mécanismes d'action ont été proposés, incluant l'inhibition de la coiffe de l'ARN, l'inhibition directe de la polymérase virale, et l'augmentation de mutations dans l'ADN néosynthétisé. L'effet indésirable le plus rencontré est une anémie réversible. Son utilisation avec succès a été rapportée dans le traitement des cystites hémorragiques induites par l'ADV, de la pneumonie après greffe de CSH et des hépatites après greffe de foie (Arav-Boger *et al.*, 2000 ; Howard *et al.*, 1999). Néanmoins, d'autres auteurs ont décrit les échecs thérapeutiques (Chakrabarti *et al.*, 1999 ; Hale *et al.*, 1999). Les succès de la ribavirine semblent liés au traitement précoce et aux sérotypes d'ADV impliqués. Une étude récente évaluant ce médicament *in vitro* montre que seulement l'espèce C (sérotypes 1, 2, 5 et 6) est sensible à la ribavirine (Morfin *et al.*, 2005).

- Le cidofovir est un analogue nucléotidique de la cytidine non cyclique utilisé en tant qu'agent antiviral. L'incorporation du cidofovir diphosphate se fait pendant l'élongation de la chaîne d'ADN. Tous les sérotypes de l'ADV lui sont sensibles *in vitro*. Malgré ses effets secondaires significatifs (néphrotoxicité, myelosuppression et inflammation de la langue), le cidofovir est couramment utilisé pour les receveurs de CSH. Les succès du traitement sont définis par la disparition des signes et symptômes de l'infection adénovirale. Chez 71% de receveurs de CSH présentant une cystite hémorragique la charge adénovirale a diminué (Nagafuji *et al.*, 2004).

RECONSTITUTION IMMUNITAIRE POST-GREFFE

1- Reconstitution immunitaire Générale :

L'allogreffe de CSH présente la particularité, par rapport à l'allogreffe d'organe, de mettre en conflit deux systèmes immunitaires : celui du donneur et celui du receveur. La reconstitution immunitaire s'effectue chez le receveur à partir de cellules souches du greffon. Cette situation immunitaire, de premier abord complexe à maîtriser au décours de la greffe, constitue un bénéfice à moyen et long terme conduisant le système immunitaire reconstitué à partir du greffon à prendre la place de celui du receveur permettant ainsi d'arrêter tout traitement immunosuppresseur. Le receveur, en l'absence d'effets secondaires de l'allogreffe, peut alors vivre sans traitement immunosuppresseur.

Chez le receveur, l'immunité, qui est abolie par le conditionnement, ne se normalise que très lentement après la greffe. Les patients sont ainsi exposés pendant au moins un an après la greffe aux infections bactériennes, fongiques et virales.

L'immunité innée (médiée par les cellules NK et les cellules myéloïdes) est la première à être rétablie après allogreffe, quelle que soit la compatibilité entre donneur/receveur. La récupération de l'immunité adaptative (reconstitution des cellules B et T) est un processus de longue durée, signifiant que les receveurs d'allogreffe de CSH passent par une période dangereuse d'immunodépression associée avec l'augmentation des risques d'infection et de rechute de l'hémopathie maligne. Le risque de développer ces complications est notamment corrélé avec le rétablissement des cellules T CD4+ (Neven *et al.*, 2009).

1-1- Cinétique de la reconstitution immunitaire

La reconstitution des différentes sous-populations cellulaires impliquées dans l'immunité suit une cinétique particulière.

Les polynucléaires neutrophiles qui sont en quantité très réduite pendant la phase d'aplasie (neutropénie) qui suit le conditionnement sont reconstitués environ 14 jours après une

allogreffe de CSP, 21 jours après une allogreffe de MO et 30 jours après un sang placentaire. Les infections survenant pendant cette phase sont principalement des infections bactériennes. Les cellules NK impliquées dans l'immunité innée sont ensuite reconstituées dans les 100 premiers jours qui suivent l'allogreffe. La sous-population NK qui se développe en premier est CD56^{bright} c'est-à-dire sécrétrice de cytokines. Puis, très rapidement, apparaît la sous-population NK CD56^{dim} cytotoxique. La contraction de la population NK peut ne survenir qu'après 1 an.

A la différence de la reconstitution immunitaire innée, la reconstitution immunitaire adaptative est un processus long et complexe qui généralement nécessite des mois voire des années pour être finalisé (Hakim *et al.*, 1997).

La reconstitution cellulaire T post-greffe implique deux mécanismes séquentiels : l'expansion des lymphocytes T matures du donneur qui sont injectés avec toutes les cellules du greffon et engendrée par les cytokines et la présence d'antigènes alloréactifs ; puis la génération *de novo* de lymphocytes T naïfs à partir des cellules souches du greffon et après maturation thymique chez le receveur. Cette dernière reconstitution est très longue ; en effet, pour aboutir à un taux normal de lymphocytes T naïfs circulants (CD45RA⁺), il faut un délai d'un an après la greffe chez un enfant et de 2 ans chez un adulte, en moyenne.

Enfin, la reconstitution du compartiment B, acteur principal de l'immunité humorale peut prendre jusqu'à 2 ans post-greffe.

1-2- La reconstitution immunitaire T

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la reconstitution immunitaire T fait appel à deux mécanismes distincts qui se succèdent dans le temps. Le premier est une expansion des lymphocytes T matures présents dans le greffon et le second, plus tardif, une génération *de novo* de lymphocytes T naïfs dépendante du thymus du receveur. Cette deuxième étape est indispensable pour l'obtention d'un répertoire T diversifié, sans lequel le risque d'infections opportunistes et de rechute leucémique est augmenté et aggravé par la survenue d'une GvH (Seggewiss *et al.*, 2010). A titre indicatif, un répertoire T normal chez l'adulte est composé de 25×10^6 TCR $\alpha\beta$ différents. La diversité est apportée par les lymphocytes T naïfs. Même si les T mémoires représentent environ 1/3 du pool total des lymphocytes T, ils contribuent à moins de 1% de la diversité TCR $\alpha\beta$ (Arstila *et al.*, 1999).

1-2-1- Expansion des lymphocytes T du donneur

Les lymphocytes T matures du donneur répondent rapidement aux agents pathogènes rencontrés antérieurement par le donneur. Ils sont le plus fréquemment dirigés contre les herpès virus qui se réactivent périodiquement, comme le CMV ou l'EBV qu'ils maintiennent sous contrôle (Toubert *et al.*, 2001). Ils constituent la majorité des expansions oligoclonales chez les adultes sains, particulièrement dans la population CD8⁺ (Schwab *et al.*, 1997). En effet, les lymphocytes T CD8⁺ sont sujets à cette expansion, conduisant à l'inversion fréquente du rapport CD4/CD8 après allogreffe de CSH. Cette population dépend moins que la population T naïve de la reconnaissance du complexe CMH-peptide pour s'expander et survivre, ce qui favorise probablement la reconnaissance allogénique, la GvH et la réponse immunitaire anti-virale étant souvent concomitantes (Toubert *et al.*, 2001). Elle est responsable de l'apparition de l'effet GvH (les cellules T alloréactives) mais également de la protection contre la rechute et les maladies infectieuses (les cellules T non alloréactives) (Koh *et al.*, 2007). D'ailleurs, la fréquence et la sévérité de la GvH sont moindres lorsque le greffon est déplété en lymphocytes T ou dans les greffons de sang placentaires qui ne contiennent pas cette population. De plus, dans ce dernier contexte, la survenue d'infections est plus fréquente.

Toutefois, le transfert adoptif confère une immunité limitée puisque ce mécanisme ne permet pas d'aboutir à un répertoire diversifié.

L'expansion périphérique des populations CD4⁺ et CD8⁺ est sous l'influence des cellules T régulatrices (Treg). Les cellules Treg sont CD127⁻ CD25⁺⁺ CD4⁺ et ont pour fonction de contrôler la réponse autoimmune (Liu *et al.*, 2006 ; Sakaguchi *et al.*, 2006). Caractérisées par la présence du facteur de transcription FoxP3, les cellules Treg peuvent devenir matures dans le thymus ou peuvent être générées dans la périphérie à partir des cellules CD25⁻ CD4⁺ (Sakaguchi *et al.*, 2006). La génération des cellules Treg dans la périphérie est dépendante de la cytokine TGFβ, mais l'expansion et la survie cellulaire sont IL2 dépendantes.

La preuve initiale de la régulation des cellules T CD8⁺ par les Treg, a été apportée indirectement par l'augmentation significative des cellules T CD8⁺ mémoires après administration de l'anticorps anti-IL2 (Ku *et al.*, 2000). Cette dernière a été corroborée par des études ultérieures montrant que des souris KO IL2^{-/-} ont augmenté la prolifération cellulaire T CD8⁺ mémoires en comparaison des souris normales (Kamimura *et al.*, 2004).

Les travaux de Shen ont montré que les Tregs exerçaient un contrôle majeur de la prolifération des lymphocytes T, en bloquant l'entrée en division cellulaire, en inhibant la différenciation des cellules effectrices et en induisant la mort cellulaire (Shen *et al.*, 2005).

1-2-2- Reconstitution des lymphocytes T naïfs

La restauration des réponses immunitaires diversifiées sur le long terme après allogreffe est dépendante de la production de lymphocytes T naïfs par le thymus du receveur à partir des cellules souches du greffon. Cette reconstitution est un processus long qui implique que le thymus soit fonctionnel pour permettre une ontogénie des lymphocytes T complète et correcte (Haynes *et al.*, 2000). La néo-thymopoïèse est évaluée en quantifiant les *T-cell receptor rearrangement excision DNA circles* (TRECs). Le taux de TRECs reste faible dans les 3 à 6 mois qui suivent l'allogreffe de CSH (Doueck *et al.*, 2000).

La contribution du thymus dans la récupération des lymphocytes T naïfs dépend de plusieurs facteurs : le degré d'involution thymique associé à l'âge, la prise des CSH du greffon, et l'étendue de l'altération thymique liée aux traitements administrés avant la greffe et au cours du conditionnement de la greffe. De plus, il est clairement admis que la GvH est délétère pour le thymus. En effet, plusieurs études rapportent que la GvH est associée à un répertoire T restreint et à un taux de TRECs diminué (Weinberg *et al.*, 2001). Le mécanisme physiopathologique commence à être compris. En effet, il semble que la population thymique double positive (DP : CD4+CD8+) est considérablement diminuée au cours de la GvH. Cette population DP possède un TcR $\alpha\beta$ réarrangé et va subir les sélections thymiques (positive puis négative) conduisant au stade simple positive (SP, CD4+ ou CD8+). Deux phénomènes expliquent cette diminution considérable de la population DP. D'une part, la population T naïve, qui est la première population à entrer dans le thymus, ne parvient pas à entrer en cycle et à se diviser, et le réarrangement des gènes des chaînes α et β du TcR ne peut pas avoir lieu. Or la poursuite du développement thymique est liée à l'expression d'un TcR $\alpha\beta$ nouvellement réarrangé. D'autre part, la population DP est l'objet d'une apoptose accrue par la GvH (Krenger *et al.*, 2008).

Ces perturbations thymiques sont en lien étroit avec la composition et l'organisation de l'environnement thymique. Les cellules épithéliales thymiques (TEC) favorisant la prolifération des précurseurs T et impliquées dans la sélection thymique ont été identifiées comme des cibles de la reconnaissance allogénique (Hauri-Hohl *et al.*, 2007). L'altération

thymique engendrée par les cellules allogéniques n'est pas proportionnelle au degré de GvH classiquement évalué sur une base clinique et histologique. En effet, il a été montré que des patients présentant une GvH de grade I ont un taux de TRECs plus proches de patients présentant une GvH de grade II-IV que de patients ne présentant pas de GvH (Clave *et al.*, 2009). On peut s'interroger sur le fait que puisse survenir une GvH infra-clinique ayant pour seule cible le thymus et conduisant ainsi à une reconstitution immunitaire altérée voire à l'apparition de phénomènes d'auto-immunité. Cependant, à ce jour les outils pour évaluer une GvH thymique ne sont pas disponibles (Krenger *et al.*, 2008).

Des études pré-cliniques ont montré le rôle du FGF-7 (Fibroblast growth factor 7, également connu sous le nom de KGF, Keratinocyte Growth Factor) dans la protection des TEC. En effet, après exposition des TEC à du FGF7 exogène, les cellules stromales thymiques prolifèrent et expriment plusieurs facteurs de croissance et de différenciation qui favorisent la thymopoïèse. Ce facteur de croissance est actuellement évalué dans des études cliniques (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2009).

1-2-3- Facteurs influençant la reconstitution des lymphocytes T

Le développement des conditionnements d'intensité réduite pour les allogreffes de CSH a conduit à diminuer la toxicité liée au conditionnement et de ce fait à reculer l'âge limite des patients pouvant bénéficier d'une allogreffe. Toutefois, nous l'avons rapporté précédemment, le thymus involue avec l'âge conduisant à des reconstitutions immunitaires T imparfaites et des risques infectieux accrus. De plus, l'âge du donneur est à prendre en considération car les capacités de reconstitution immunitaire diminuent avec l'âge.

Le type de greffon influe sur la reconstitution immunitaire. En effet, les greffons de sang placentaire renferment très peu de lymphocytes T matures susceptibles de s'expandre. De plus, le sang placentaire contient des Treg possédant des propriétés suppressives supérieures à celles des Treg de l'adulte. Ces facteurs expliquent la fréquence élevée des épisodes infectieux dans les allogreffes de sang placentaire (Seggewiss *et al.*, 2010).

1-3 La reconstitution immunitaire B

La population B a initialement été décrite comme normalisée dans le sang périphérique dans les 3 mois post-greffe (Lum *et al.*, 1987). Cependant, cette population B émergente était fortement CD5+, CD38+, IgM+ et IgD+ (Storek *et al.*, 1993). De plus, elle était

fonctionnellement déficiente avec un défaut de réponse proliférative vis-à-vis du SAC (*Staphylococcus aureus Cowan strain I*) et un défaut de production d'Ig *in vitro* (Small *et al.*, 1990). Une étude récente montre que 5 mois après allogreffe, la population B est à plus de 50% transitionnelle, c'est-à-dire qu'il s'agit d'une population immature présente en périphérie, de phénotype CD24^{high} et CD38^{high} (Marie-Cardine *et al.*, 2008). Progressivement, cette population transitionnelle diminue au profit des lymphocytes B matures, de façon concomitante à la récupération de la fonctionnalité. Il semble acquis que cette population B transitionnelle constitue une étape indispensable dans le développement des lymphocytes B et serait critique dans la tolérance B (Wardemann *et al.*, 2003) (**Figure 11**).

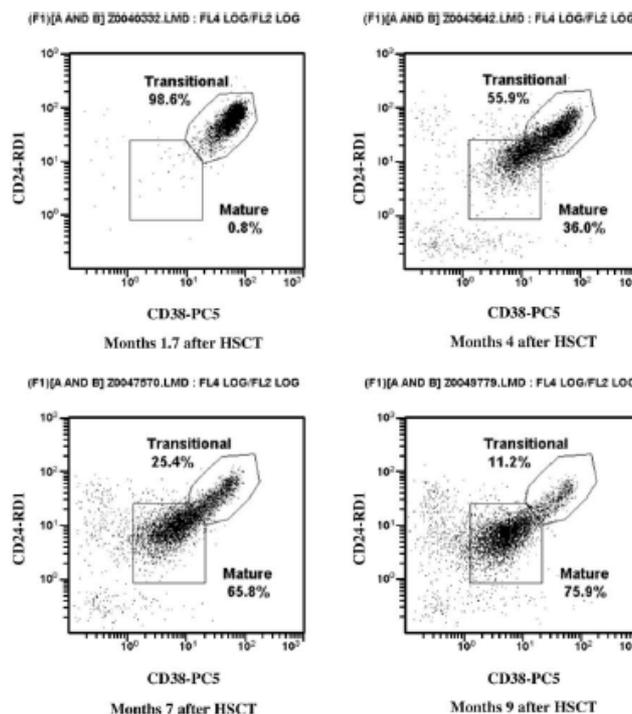


Figure 11 : Différenciation périphérique des cellules B transitionnelles en cellules B matures naïves après allogreffe de CSH. Les histogrammes montrent les taux d'expression des CD24 et des CD38 parmi la population cellulaire B CD19+ à 1,7, 4, 7 et 9 mois après allogreffe de CSH chez un seul patient. Les cellules B transitionnelles CD24^{high} et CD38^{high} apparaissent en premier et se différencient progressivement en cellules B matures naïves. D'après Wardemann *et al.*, 2003.

2- Reconstitution immunitaire spécifique anti-infectieuse :

La réponse lymphocytaire T est essentielle pour contrôler les infections virales. En effet, lorsque la réponse immunitaire est affaiblie, suite à une allogreffe de CSH, le risque de réactivation de certains virus latents est très grand. Plusieurs études ont pointé l'importance de suivre la reconstitution immunitaire vis-à-vis de l'EBV, du CMV et de l'ADV, pendant les premiers mois qui suivent une allogreffe de CSH (Clave *et al.*, 2004; Pourgheysari *et al.*, 2009 ; Myers *et al.*, 2007).

2-1- Reconstitution immunitaire spécifique anti-EBV

La quantification de l'ADN-EBV par PCR dans le plasma (van Esser *et al.*, 2001) ou dans les CMN du sang périphérique (Gustafsson *et al.*, 2000) ont montré que la réactivation de l'EBV est très fréquente après allogreffe de CSH (van Esser *et al.*, 2001). L'utilisation de la RT-PCR a permis la quantification de la charge virale EBV et a fait évoluer les critères diagnostiques. Les patients présentant un haut risque de développer un PTLD avec une charge virale EBV positive reçoivent un traitement préemptif (rituximab) après allogreffe de CSH déplétée en cellules T (van Esser *et al.*, 2002).

Selon le traitement du greffon, le risque pour un receveur de développer un lymphome EBV varie (Marshall *et al.*, 2000). L'évolution de la fréquence des lymphocytes T anti-EBV chez les patients après allogreffes HLA compatibles, ou ayant reçu un greffon sans manipulation est corrélée avec l'évolution de leur charge virale EBV, ce qui signifie que les lymphocytes T présents dans le greffon sont capables d'induire une réponse immunitaire anti-EBV. Dans les greffes T déplétées ou les allogreffes de sang placentaire, la survenue d'une charge virale EBV+ n'est pas corrélée à l'apparition d'une immunité T anti-EBV, les lymphocytes T matures spécifiques capables de s'expandre étant absents.

Selon l'intensité du conditionnement (MA ou NMA), le risque de développer un lymphome EBV induit varie (Chakrabarti *et al.*, 2003). Le taux de lymphocytes T circulants fonctionnels contre différents épitopes de l'EBV présentés par les molécules HLA de classe I a été mesuré chez des patients ayant subi une greffe de CSH après conditionnement MA ou NMA. Chez tous les patients, l'immunité est rétablie un an après la greffe. En revanche le délai après lequel débute la reconstitution immunitaire chez les patients ayant subi un conditionnement

NMA est plus long que celui de ceux ayant reçu un conditionnement MA. L'immunité anti-EBV est correcte chez 3 patients sur 6 ayant un conditionnement MA trois mois après la greffe et 6/9 après six mois. Au contraire pour les patients ayant reçu un conditionnement NMA seulement 1/9 a une immunité détectable 6 mois après la greffe de CSH.

A travers les deux études précédentes, on s'aperçoit que le développement d'un lymphome EBV est fonction de la charge virale EBV mais aussi du degré de reconstitution immunitaire anti-EBV. Ces deux paramètres doivent être suivis en parallèles. Dans le travail de *Meij et al.*, la technique des tétramères a été utilisée pour quantifier les lymphocytes T CD8⁺ anti-EBV, et la PCR quantitative pour suivre la charge virale régulièrement, après allogreffe géno- ou phénoïdique déplétée partiellement en cellules T (*Meij et al.*, 2003). Dans les 3 premiers mois suivant la greffe, le taux de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'EBV reste indétectable et sous le seuil normal. Au bout de 6 mois, le nombre est détectable mais toujours insuffisant. Et après 12 mois, l'immunité anti-EBV est rétablie. Néanmoins, la plupart des réactivations EBV surviennent pendant la période d'immuno-insuffisance du patient, et surtout durant les 6 premiers mois consécutifs à la greffe. Il est démontré que les patients ayant retrouvé leur immunité anti-EBV au cours des 3 premiers mois ont moins de risque de subir une réactivation du virus que ceux pour lesquels elle n'est pas encore détectable. La valeur prédictive négative de déclenchement d'un lymphome EBV induit est de 100% si l'immunité anti-EBV est présente et suffisante.

Clave et al., ont mesuré à l'aide de la technique des tétramères la reconstitution cellulaire T spécifique anti-EBV et ont déterminé la charge virale de l'EBV par PCR en temps réel chez 56 receveurs d'allogreffe de CSH, MO non T déplétée, en situation génoïdique ou non apparentée, ou sang placentaire. (*Clave et al.*, 2004). Dans cette étude, 8 tétramères de classe I présentant des épitopes de protéines latentes et lytiques de l'EBV ont été utilisés afin d'évaluer la réponse immunitaire durant les premiers mois post-allogreffe de CSH. Les auteurs montrent que chez tous les patients qui ont contrôlé la réactivation EBV sans rituximab, en présence d'une charge virale EBV positive pouvant atteindre 2110 gEq/150000 PBMC (seuil de positivité 1000 gEq/150000 PBMC), présentaient un taux de lymphocytes CD8⁺ EBV spécifiques représentant plus de 1.4% de la population CD8⁺. En prenant en considération à la fois la charge virale EBV et la reconstitution immunitaire spécifique EBV, les auteurs montrent qu'il est possible de différencier les patients qui nécessitent absolument la mise en place d'un traitement préemptif par Rituximab de ceux qui peuvent spontanément négativer la charge virale EBV.

Cette conclusion est également apportée par Annels *et al.*, à travers une étude rétrospective suivie d'une étude prospective (Annels *et al.*, 2006). Cette dernière a porté sur une cohorte de 52 patients allogreffés dont 14, à haut risque de développer un lymphome EBV ont bénéficié d'une étude de la reconstitution immunitaire spécifique par tétramères. Une réactivation EBV a été documentée chez 3 patients. Chez deux d'entre eux, l'administration de Rituximab a pu être évitée, du fait d'une reconstitution immunitaire spécifique T anti-EBV rapide et significative. Les auteurs recommandent une analyse fréquente de la reconstitution immunitaire spécifique EBV chez les patients présentant une charge virale élevée et qui sont à haut risque de développer un lymphome induit par l'EBV.

De récentes méthodes permettent de suivre la réponse cellulaire T spécifique anti-EBV : les tétramères HLA de classe I spécifiques de peptides que nous avons évoqués dans les articles précédents et qui ne donnent pas d'information sur la fonctionnalité des cellules contrairement aux autres techniques : le dosage des cytokines intracellulaires ou encore l'Elispot IFN γ , technique la plus sensible. La disponibilité de ces techniques rapides doit permettre de mieux définir les patients devant recevoir un traitement préemptif par Rituximab. Bien que la thérapie avec le Rituximab soit une avancée majeure dans la prévention et le traitement des PTLD induits par l'EBV, son utilisation n'est pas dénuée d'effets secondaires. Cette drogue n'a pas d'effet anti-EBV en soi, mais est considérée comme un agent anti-tumoral. Le choix de l'antigène CD20 comme cible sur les cellules infectées par l'EBV est attrayant parce qu'il n'est pas perdu, ni modulé, ni internalisé. Parce qu'il est exprimé sur les cellules B normales à partir des cellules pré-B actives, le traitement anti-CD20 pourrait détériorer la récupération immunitaire des cellules B.

2-2- Reconstitution immunitaire spécifique anti-CMV

La quantification de l'ADN-CMV par RT-PCR est une technique standard pour la surveillance des infections à CMV chez les receveurs d'allogreffe de CSH (Gimero *et al.*, 2008). La quantification de la charge virale dans le sang ou le plasma permet la détection de l'infection active à CMV afin d'évaluer la réponse aux traitements antiviraux, de prédire les risques de rechute virémique, ainsi que l'apparition de résistance (Emery *et al.*, 2000 ; Razonable *et al.*, 2002 ; Caliendo *et al.*, 2007).

L'incidence de l'infection à CMV augmente avec l'intensité et la durée du traitement immunosuppresseur jusqu'à 70% chez les receveurs d'allogreffe de CSH qui sont séropositifs pour le CMV (R+) et/ou reçoivent une allogreffe de CSH d'un donneur séropositif pour le CMV (D+) (Hebart *et al.*, 2001). Sans intervention antivirale, environ 50% des patients avec une infection à CMV développent une maladie à CMV ; en présence d'un traitement antiviral prophylactique ou préemptif (Ganciclovir), 15-25% des patients développent une maladie à CMV (George *et al.*, 2010). Les facteurs prédictifs d'une réactivation du CMV incluent également le type de conditionnement, la déplétion des cellules T et la GvH (Osarogiagbon *et al.*, 2000). Ozdemir *et al.*, ont rapporté que les patients immunodéprimés par des stéroïdes pour le traitement de la GvHa, présentaient une faible production de cytokines par les cellules T. Ceci suggère que l'échec du contrôle de la réactivation du CMV pourrait être responsable de détérioration fonctionnelle des cellules T spécifique anti-CMV (Ozdemir *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont confirmé l'importance des lymphocytes T pour la protection contre l'infection et la maladie à CMV chez les receveurs de greffe de CSH provenant d'un donneur séronégatif pour le CMV (Gratama *et al.*, 2001). L'équipe de Lacey *et al.*, utilisant le marquage de tétramères couplé avec des anticorps fluorescents de la région variable (V β) du TcR, a suggéré que les lymphocytes T CD8+ anti-CMV détectés chez les receveurs d'allogreffe de CSH de donneur séropositif pour le CMV sont probablement dérivés des cellules T du donneur et prolifèrent chez le receveur après stimulation antigénique en raison de la réactivation du CMV (Lacey *et al.*, 2002).

L'équipe de Lilleri, a étudié la reconstitution immunitaire cellulaire T CD4+ et CD8+ spécifique anti-CMV chez les enfants ayant reçu une allogreffe de CSH déplétée en lymphocytes T à partir d'un donneur HLA non identique (Lilleri *et al.*, 2009). Cette étude indique que la séropositivité CMV pré-greffe (du donneur ou du receveur ?) est le principal facteur conditionnant l'infection CMV post-greffe et la stimulation de la reconstitution immunitaire cellulaire T spécifique anti-virale. Chez ces patients, la reconstitution immunitaire est retardée en cas d'apparition du CMV dans le sang, contrairement à ce qui est observé chez les patients recevant une greffe non manipulée. Cependant, la reconstitution immunitaire cellulaire T spécifique anti-CMV est variable selon les receveurs et semble être corrélée au nombre résiduel des cellules T dans la greffe (Lilleri *et al.*, 2009).

La même équipe a suivi la reconstitution immunitaire cellulaire T CD4⁺ et CD8⁺ spécifique anti-CMV chez les receveurs adultes d'une allogreffe de CSH non déplétée en cellules T après un conditionnement MA. Des DC autologues présentatrices d'antigène (pp65 ou IE1) ont été utilisées afin de suivre la production d'IL2 et d'IFN γ par les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ durant la première année post-greffe (Lilleri *et al.*, 2008). Ils ont détecté une infection à CMV chez 87% des patients au bout de 29 jours après la greffe. Une reconstitution immunitaire cellulaire T suivant la réactivation du CMV latent à environ 2 mois. Cinq patients ayant reçu de fortes doses de stéroïdes pour le traitement de l'effet GvH ont développé l'infection CMV exigeant un traitement prophylactique malgré les taux élevés en IFN γ produits par les cellules T en réponse au CMV. La production spécifique d'IL2 n'a pas été détectée chez les patients présentant une infection à CMV exigeant un traitement, tandis que 90% des patients qui ont spontanément contrôlé l'infection à CMV avaient des cellules T produisant de l'IL2 et de l'IFN γ . Ils ont également observé que chez les receveurs CMV⁺ pré-greffe, la reconstitution immunitaire post-greffe vis-à-vis du CMV est rapide et meilleure que chez les receveurs séronégatifs pour le CMV (Lilleri *et al.*, 2008).

Cette étude a permis d'observer que le contrôle de l'infection à CMV exigeait probablement la présence d'IFN γ et de l'IL2 produites par les cellules T (Lilleri *et al.*, 2008).

Pourgheysari *et al.*, ont observé la reconstitution immunitaire précoce (30 jours post-greffe) des cellules T effectrices CD4⁺ et CD8⁺ anti-CMV dirigés contre la réactivation du CMV après allogreffe de CSH afin de vérifier si la détection précoce de faibles CTL spécifiques anti-antigène peut prévoir une réactivation du CMV (Pourgheysari *et al.*, 2009). Cette étude a révélé que la réponse immunitaire cellulaire T CD4⁺ dirigée contre le CMV, dans les premiers 50 jours post-greffe, est prédictive du risque d'une réactivation virale. La protection contre la réactivation du virus est médiée par la population de cellules T CD4⁺ effectrices mémoires, définie par leur profil cytokinique, produisant un taux élevé d'IFN γ . Ils ont également montré que la reconstitution immunitaire cellulaire CD8⁺ n'était pas prédictive de la réactivation à un stade précoce mais qu'une reconstitution pauvre en CD8⁺ est prédictive d'une réactivation virale récurrente.

Plusieurs études montrent clairement que les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques anti-CMV sont importants pour la reconstitution de la réponse cellulaire CD8⁺ anti-CMV et pour la

protection contre la maladie : (i) chez les receveurs de CSH, les faibles taux de lymphocytes T CD4⁺ anti-CMV sont associés avec la faible fonctionnalité et reconstitution des CTL CD8⁺ anti-CMV (Gratama *et al.*, 2003). En effet, pour les receveurs de CSH, l'absence de prolifération des lymphocytes anti-CMV *in vitro* était liée au risque de la maladie (Boeckh *et al.*, 2003). (ii) Gamadia *et al.*, ont annoncé que chez les receveurs de greffe de reins avec une maladie à CMV symptomatique, les réponses des cellules T CD4⁺ anti-CMV sont retardées et pourraient être détectées seulement après la thérapie antivirale (Gamadia *et al.*, 2003). (iii) Dans les essais classiques d'immunothérapie adoptive contre le CMV par injection de clones T CD8⁺ anti-CMV du donneur, il a été montré que chez les patients déficients en cellules T CD4⁺ anti-CMV, les CTL anti-CMV diminuent, suggérant que les cellules CD4⁺ sont nécessaires pour la persistance des cellules CD8⁺ (Walter *et al.*, 1995).

2-3- Reconstitution immunitaire spécifique anti-ADV

Peu d'études ont été publiées à ce jour sur ce sujet et elles ont toutes été réalisées chez l'enfant. Les techniques mises en œuvre pour l'étude de la reconstitution immunitaire ADV sont l'Elispot IFN γ et les cytokines intracellulaires. Les tétramères ne sont pratiquement pas utilisés car d'une part il ne sont pas disponibles pour tous les typages HLA et d'autre part la réponse immunitaire ADV étant faible (en moyenne un Log de moins que la réponse EBV ou CMV), elle est en dessous du seuil de détection de la technique des tétramères.

La première étude prospective a porté sur 48 enfants ayant reçu une allogreffe de CSH (Heemskerk *et al.*, 2005). Les auteurs ont montré que la reconstitution lymphocytaire jouait un rôle prépondérant dans la clearance de l'ADV et dans la survie du receveur. En effet, 44% des enfants ont présenté une infection à ADV et 6 d'entre eux ont eu une virémie à ADV croissante. La survie des patients avec une virémie ADV a été associée à une augmentation lymphocytaire dans les semaines suivant l'infection. Chez ces patients, des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques produisant de l'IFN γ sont détectés dans les semaines ou les mois qui suivent la négativation de la charge virale ADV.

La deuxième étude prospective a porté sur 46 enfants après allogreffe de CSH déplétée en lymphocytes T (Feuchtinger *et al.*, 2005). Vingt et un patients ont réactivé l'ADV et 7 d'entre eux sont décédés. Les auteurs ont étudié par cytokines intracellulaires la population CD4⁺IFN γ ⁺ spécifique de l'ADV. Ils ont montré l'absence complète de lymphocytes T

spécifiques chez les 7 patients décédés. Chez les 14 patients ayant survécu après réactivation ADV, ils ont observé une fréquence élevée de T CD4+IFN γ + (0.56 \pm 0.5%), comparable à celle de donneurs sains (en moyenne 0.38%) et surtout supérieure à celle retrouvée chez les patients sans réactivation ADV (0.12 \pm 0.1%) (p = 0.0031). Ces données suggèrent qu'une fréquence de cellules T spécifiques de l'ADV comparable à celle des donneurs sains protège les patients d'infections ADV affectant le pronostic vital.

Plus récemment, Myers *et al.*, ont publié une étude portant sur 22 patients pédiatriques ayant reçu une allogreffe de CSH (Myers *et al.*, 2007). Parmi ces enfants, 68% ont développé une infection à ADV symptomatique. Par la technique d'Elispot IFN γ , les auteurs ont montré que la reconstitution immunitaire spécifique était retardée chez les patients ayant un donneur non apparenté (6 mois) ou haplo-identique (1 an). En revanche, les patients ayant un donneur familial génoidentique présentaient une immunité anti-ADV comparable aux témoins sains dans les 30 jours qui suivaient la greffe.

Enfin, une étude actuellement soumise, s'est attachée à étudier par la technique de cytokines intracellulaires les profils de sécrétion de cytokines (IL2 et IFN γ) des T CD4+ spécifiques au cours de la reconstitution immunitaire après une allogreffe de CSH réalisée chez 37 enfants parmi lesquels 2 ont présenté une réactivation ADV (Guérin *et al.*, 2010 soumis). Les résultats montrent que chez la majorité des patients n'ayant pas réactivé l'ADV, les cellules T CD4 spécifiques produisent majoritairement de l'IFN γ et ne prolifèrent pas *in vitro* entre le 1^{er} et le 3^{ème} mois post-greffe alors qu'ils acquièrent un profil IFN γ /IL2 et prolifératif entre le 3^{ème} et le 6^{ème} mois post-greffe. La modification du profil cytokinique signe probablement la capacité de maîtriser les réactivations virales. Aucune récupération immunitaire spécifique de l'ADV n'a été retrouvée chez les 2 patients ayant réactivé l'ADV.

IMMUNOTHERAPIE ADOPTIVE ANTI-INFECTIEUSE

La plupart des infections virales surviennent dans les deux ans qui suivent la greffe, principalement en l'absence de reconstitution immunitaire spécifique. Les traitements anti-viraux ne sont pas efficaces contre tous les agents viraux, entraînent l'émergence de résistance et ne sont pas dénués de toxicité. De plus, leur efficacité est souvent relative lorsque la reconstitution immunitaire n'est pas encore intervenue. De même, de nouvelles réactivations virales peuvent survenir après l'arrêt du traitement antiviral.

L'alternative aux agents pharmacologiques qui peut être proposée et qui restaure une immunité spécifique après allogreffe de CSH sans être associée à une forte toxicité est **l'immunothérapie adoptive**. Elle consiste à administrer à un patient des cellules immunitaires, le plus souvent issues du donneur de CSH, et reconnaissant un ou plusieurs antigènes viraux. D'usage encore limité en clinique, ce traitement a montré son efficacité dans plusieurs études et offre de nouvelles perspectives, surtout avec le développement de nouvelles technologies et la production de réactifs spécifiques permettant d'identifier et d'isoler les lymphocytes T d'intérêt, de façon simple et rapide.

Nous concentrerons notre exposé sur l'immunothérapie anti-infectieuse et nous n'aborderons pas l'immunothérapie anti-tumorale.

Parmi les stratégies d'Immunothérapie adoptive, la plus ancienne qui reste pratiquée pour son effet anti-leucémique mais qui a été abandonnée pour un effet anti-infectieux est la réinjection de Lymphocytes du donneur (**Donor Lymphocyte infusion ; DLI**). Cependant, quelques expériences intéressantes ont été rapportées dans les années 1990 et au début des années 2000 qui ont été à l'origine du développement d'immunothérapies adoptives spécifiques. Nous les évoquerons brièvement.

L'immunothérapie adoptive spécifique peut être pratiquée soit en éliminant les lymphocytes alloréactifs des cellules du donneur à réinjecter et en conservant intact, en particulier, tout le contingent de cellules anti-infectieuses (**déplétion alloréactive**), soit en sélectionnant les lymphocytes T anti-infectieux (**CTL anti-infectieux**).

Nous présenterons ces différentes stratégies.

1- Immunothérapie non spécifique :

Une dizaine de publications font état de l'injection de DLI pour le traitement d'infections post greffes de CSH. De bons résultats d'un point de vue anti-infectieux ont été rapportés. Malgré ces résultats encourageants liés à la présence de lymphocytes spécifiques anti-virus, les cliniciens ont parfois été confrontés à des réactions de GvH sévères et à des aplasies expliquées par la présence de lymphocytes T alloréactifs du donneur (Tableau 4).

Papadopoulos *et al.*, ont été les premiers à rapporter le succès des DLI dans le traitement des PTLD associés à l'EBV après allogreffe de CSH (Papadopoulos *et al.*, 1994). Cinq patients, présentant un lymphome induit par l'EBV ont été traités par une dose de DLI de 1×10^6 CD3/kg capable d'engendrer une rémission complète du PTLD, soutenue dans le temps pour les trois patients suivis au long cours, sans induire de GvH de grade supérieur à II chez le receveur. Cette équipe a ensuite traité 17 autres patients avec des DLI (de 2.1×10^5 - 5.0×10^5 CD3 /kg) et a rapporté des résultats tout aussi encourageants (O'Reilly *et al.*, 1998). Au total, une rémission complète clinique du lymphome EBV a été observée chez 20 patients /22 dans les 14 à 30 jours suivant l'injection. Trois patients ont développé une GvH aiguë : 2 de grade I et 1 de grade II, résolutive sous traitement immunosuppresseur et 9 patients ont développé une GvH chronique (limitée dans 4 cas et extensive dans 5 cas). Des résultats moins encourageants en terme de survenue de GvH ont été rapportés par Heslop *et al.*, (Heslop *et al.*, 1994).

Pour l'ADV, Hromas *et al.*, ont rapporté le cas d'un patient présentant une cystite hémorragique associée à l'ADV traitée avec succès par une injection de 1×10^6 CD3/kg (Hromas *et al.*, 1994). Le patient n'a pas développé de GvH. Chakrabarti rapporte l'expérience de deux patients ayant nécessité une injection de DLI (3×10^7 CD3/kg et 1×10^7 CD3/kg, en situation génoidentique) pour une rechute de leur hémopathie maligne. Ces deux patients présentaient des infections à ADV complètement résolutes après l'administration des DLI (Chakrabarti *et al.*, 2000). Bordigoni *et al.*, ont rapporté des résultats obtenus après traitement par DLI de donneurs HLA non apparentés ($1-5 \times 10^5$ CD3+/kg) associées ou non à un traitement antiviral anti-ADV (vidarabine, cidofovir ou ribavirin) chez 3 receveurs d'allogreffe de CSH (Bordigoni *et al.*, 2001). Chez deux patients sur 3 l'ADV a été rapidement éliminé, alors que le 3^{ème} patient est décédé de l'infection adénovirale. Une autre équipe a rapporté des résultats bien moins encourageants. Chez 4 patients atteints de cystites associées à l'ADV, aucune amélioration clinique n'a été observée après administration de DLI

Tableau 4 : Résultats d'essais cliniques utilisant l'immunothérapie non spécifique à visée anti-infectieuse (DLI).

Virus	Patients	Dose CD3/Kg	Type de greffe	Evolution clinique	Références
EBV	22 patients atteints d'un PTLD lié à l'EBV	5/22 : 1×10^6 17/22 : 2.1×10^5 - 5.0×10^5	Allogreffe de CSH	20/22 : rémission complète du lymphome EBV 3/22 ont développé une GvH aiguë résolutive sous IS 9/22 ont développé une GvH chronique	Papadopoulos et al., 1994 O'Reilly <i>et al.</i> , 1998
EBV	Patients atteints d'un PTLD lié à l'EBV	ND	Allogreffe de CSH	Augmentation de l'effet GvH	Heslop et al., 1994
ADV	1 patient présentant une cystite hémorragique associée à l'ADV	Une injection 1×10^6	Allogreffe de CSH	traitée avec succès	Hromas et al., 1994
ADV	4 patients atteints de cystites associées à ADV	ND	Allogreffe de CSH	Aucune amélioration clinique n'a été observée après administration de DLI	Childs et al., 1998
ADV	1 patient présentant une cystite hémorragique, une néphrite à ADV	Une injection	Allogreffe de CSH haplo-identique	Sans succès	Howards et al., 1999
ADV	2 patients présentant une rechute de l'hémopathie maligne	3×10^7 et 1×10^7	Allogreffe de CSH Génoïdientique	2/2 : infections à ADV complètement résolutes après l'administration des DLI	Chakrabarti et al., 2000
ADV	3 patients avec virémie	$1-5 \times 10^5$	Allogreffe de CSH HLA non apparentés	2/3 : l'ADV a été rapidement éliminé, 1/3 : décédé de l'infection adénovirale	Bordigoni et al., 2001

DLI : Donor Lymphocyte Infusion ; **IS** : Immunosuppresseur ; **ND** : Non définie

tout en conservant l'immunosuppression par ciclosporine A (Childs *et al.*, 1998). Cette dernière observation met en lumière l'importance de lever l'immunosuppression avant toute immunothérapie. Enfin, Howards *et al.*, relatent l'histoire clinique d'un patient qui présentait une cystite hémorragique, une néphrite et une insuffisance rénale obstructive probablement secondaire à un ADV résistant au traitement IV par Ribavirine (Howards *et al.*, 1999). Une injection de lymphocytes de son donneur haplo-identique a été réalisée sans succès.

2- La Déplétion alloréactive :

La déplétion alloréactive consiste à s'affranchir des lymphocytes T alloréactifs responsables de la réaction de GvH- soit par élimination physique des lymphocytes T alloréactifs du greffon soit par neutralisation de leur effet alloréactif par induction d'anergie – tout en préservant le capital des lymphocytes T anti-infectieux. Deux essais cliniques français successifs ont été réalisés par l'équipe de Necker chez des patients atteints de déficits immunitaires primitifs pour la majorité d'entre eux afin de tester l'impact de l'injection de doses de lymphocytes T allodéplétés sur la reconstitution immunitaire. 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 1.88×10^4), après un conditionnement associant Busulfan, Endoxan et SAL. Aucune prophylaxie de la GvH 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 de l'IL2 (CD25) 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 GvH de grade \geq II. Au total, deux patients ont développé une GvH

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 de même qu'une augmentation des CTL après injection.

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/dose pour 8 d'entre eux et de 10^5 cellules/kg/ dose pour les 8 autres. La reconstitution immunitaire T et l'immunité anti-virale ont été considérablement améliorées (2 décès sont liés à une cause infectieuse) principalement lorsqu'une dose de 10^5 cellules/kg était administrée. Un patient a présenté une GvH de grade IV évoluant vers une GvH chronique hépatique létale et un autre patient a présenté une GvH de grade II, évoluant également en GvH chronique résolutive sous immunosuppression. Le taux de rechute de l'hémopathie maligne est élevé dans cette étude (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 allodéplétés 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 GvH de grade II à IV observé a été de $46\% \pm 13\%$ et de GvH de grade III à IV de $12\% \pm 8\%$. Les auteurs soulignent que dans cette population de patients, l'incidence de la GvH de grade II à IV est classiquement de 58% et l'incidence de la GvH de grade III à IV est classiquement 34% , avec une prophylaxie standard de la GvH. Les auteurs concluent à un bénéfice de la déplétion alloréactive dans la prévention de la GvH 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.

Les résultats encourageants et prometteurs apportés par ces trois études cliniques sont ternis par un certain nombre de limites comme la disponibilité d'une immunotoxine de grade clinique, le nombre de lymphocytes T allodéplétés à produire pour réaliser des injections efficaces, la faible marge de manœuvre entre la dose minimum efficace et la dose maximum toxique et enfin, le fait que le transfert d'immunité vis-à-vis de virus autres que l'EBV ou le CMV est souvent peu efficace, le nombre de lymphocytes T spécifiques circulants étant très faible (Leen *et al.*, 2010)

3- Immunothérapie spécifique anti-infectieuse :

Comme décrit précédemment, les complications virales chez les receveurs de greffe de CSH sont associées à l'absence de reconstitution immunitaire cellulaire spécifique anti-virale. L'immunothérapie adoptive spécifique consiste à transférer au receveur des lymphocytes T spécifiques d'un ou plusieurs virus, isolés et éventuellement amplifiés *in vitro* à partir des cellules du donneur, dans le but de prévenir et/ou traiter les infections virales concernées.

Une bonne compréhension du processus immunitaire de contrôle de l'infection virale et des mécanismes utilisés par les virus pour échapper au système immunitaire est un pré-requis à la conception d'une immunothérapie spécifique. Deux grandes stratégies d'obtention de CTL anti-virales ont été développées : d'une part l'isolement et l'amplification des CTL anti-infectieuses par 4 à 6 semaines de culture cellulaire *in vitro* et d'autre part la sélection rapide des CTL circulants chez le donneur (par sélection de tétramères HLA-dépendants ou par sélection immunomagnétique des cellules T sécrétant de l'FN γ) et réinjectés au receveur immédiatement après isolement et en très faible nombre en comptant sur une expansion *in vivo*, en réponse à la stimulation liée à la charge virale (Figure 12).

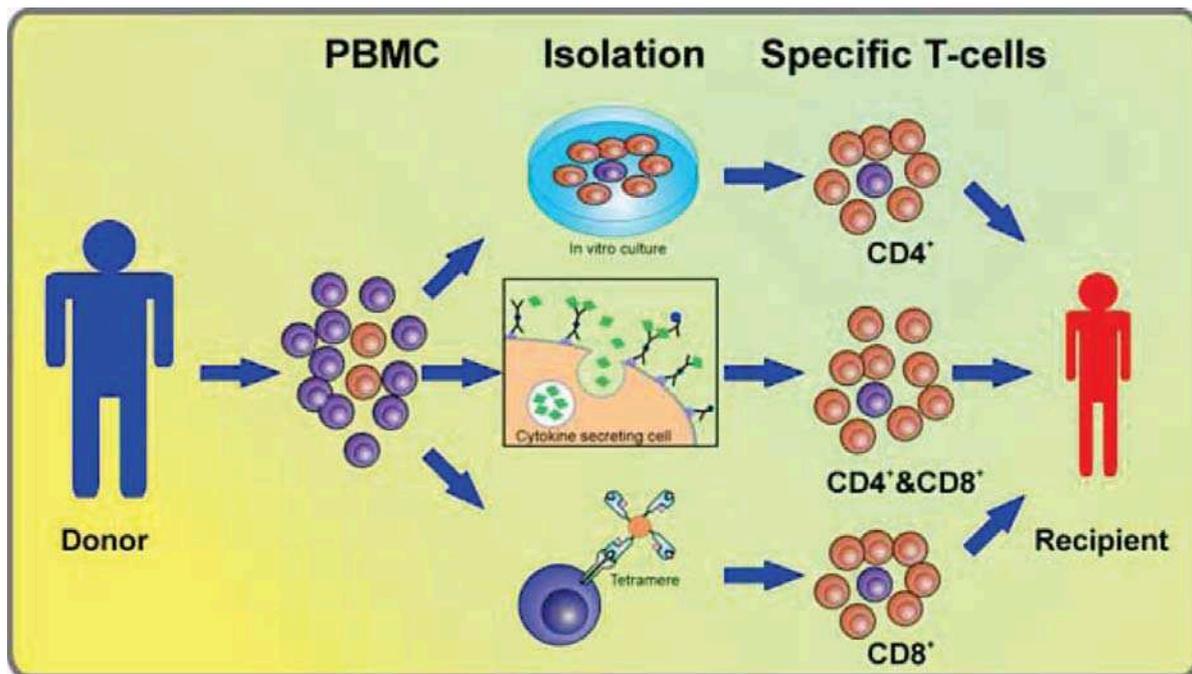


Figure 12 : Les principales voies de thérapie cellulaire adoptive T contre les infections virales après allogreffe de CSH (d'après Feuchtinger *et al.*, 2007).

3-1-Production des CTL anti-virus par culture cellulaire

3-1-1- Les CTL anti-EBV :

Nous n'évoquons dans ce chapitre que les études ayant porté sur les syndromes lymphoprolifératifs induits par l'EBV après allogreffe de CSH (Tableau 5). Toutefois, il faut savoir que des CTL anti-EBV ont été générées dans de multiples indications (EBV-BLPD après allogreffes d'organe, lymphome de hodgkin, carcinome naso-pharyngé) (Figure 13, Merlo *et al.*, 2010).

Tableau 5 : Essais cliniques utilisant des CTL spécifiques anti-EBV après allogreffe de CSH.

Protocole d'expansion	Cellules injectées	Patients traités	Résultats cliniques	Références
<i>In vitro</i>	CTL polyclonal	10 (3 comme traitement et 7 comme prophylaxie)	3/3 ont contrôlé l'infection	Rooney <i>et al.</i> , 1995 ; Heslop <i>et al.</i> , 1996
<i>In vitro</i>	CTL polyclonal	39 avec traitement prophylactique	Aucun patient n'a développé de PTLD en comparaison avec 11,5% du groupe contrôle	Rooney <i>et al.</i> , 1998
<i>In vitro</i>	CTL polyclonal	6 patients traités	5 patients en rémission complète ; 1 décédé	Rooney <i>et al.</i> , 1998 ; Gottschalk <i>et al.</i> , 2001
<i>In vitro</i>	CTL polyclonal	114 patients (101 ont reçu un traitement prophylactique ; 13 ont reçu un traitement curatif)	101/101 : aucun développement d'un EBV-PTLD 11/13 : rémission complète	Heslop <i>et al.</i> , 2010
<i>In vitro</i>	CTL polyclonal	6 avec une forte charge virale	5/6 ont réduit la charge virale post-CTL. 1/6 décédé suite à un PTLD	Gustafsson <i>et al.</i> , 2000
<i>In vitro</i>	CTL polyclonal	1 patient traité pour une lymphoprolifération induite par l'EBV	Pas de réponse à la thérapie	Imashuku <i>et al.</i> , 1997
<i>In vitro</i>	CTL polyclonal	6 patients (dont 5 ayant développé un PTLD) ont été traités par CTL anti-EBV (2 n'ont pas répondu au Rituximab ; 4 ont vu leur charge virale EBV réaugmenter à l'arrêt du traitement)	Une négativation de la charge virale EBV, une résolution clinique des PTLD chez tous les patients. Aucun évènement indésirable, ni aucune réaction de GvH.	Comoli <i>et al.</i> , 2002 ; 2007 ; 2008
<i>In vitro</i>	Partly-matched polyclonal CTL	8 patients avec un PTLD progressif ne répondant pas aux traitements conventionnels ont été traités.	3 patients ont une réponse complète ; 2 patients sans réponse ; 3 patients n'ont pas fini le traitement	Haque <i>et al.</i> , 2002
<i>In vitro</i>	Partly-matched polyclonal CTL	33 patients avec un PTLD ne répondant pas aux traitements conventionnels ont été inscrits.	14 patients ont une réponse complète ; 3 avec réponse partielle ; 16 sans réponse	Haque <i>et al.</i> , 2007

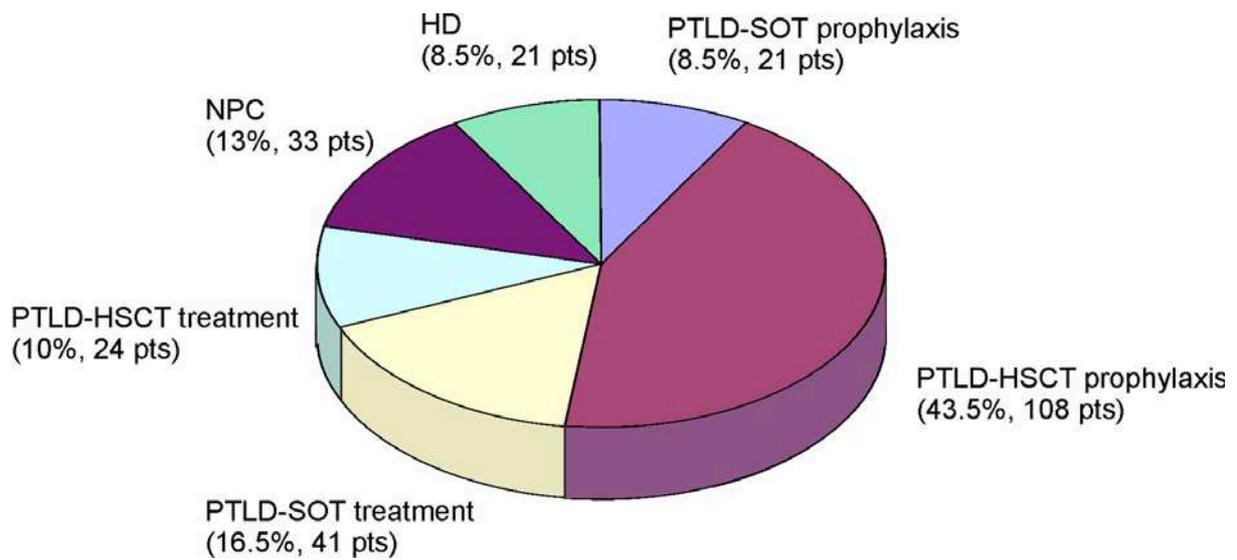


Figure 13: Diagramme montrant le nombre total des patients (248) traités par des CTL anti-EBV, générés par restimulations répétées avec des LCL-EBV autologues dans de multiples indications, d'après Merlo *et al.*, 2010.

A partir des années 1993, l'équipe de Malcom Brenner a été la première à développer une immunothérapie adoptive à visée préventive et curative des syndromes lymphoprolifératifs induits par l'EBV après allogreffe de CSH (Rooney *et al.*, 1995 ; Heslop *et al.*, 1996). D'autres équipes ont également travaillé sur le sujet (Gustafsson *et al.*, 2000 ; Comoli *et al.*, 2005). En effet, avant l'avènement du Rituximab au début des années 2000 (Kuehnle *et al.*, 2000) et son utilisation dans le traitement de l'EBV-PTLD, la morbidité et la mortalité liée à l'EBV après une allogreffe T-déplétée était très élevée (entre 1 à 25%).

Les cellules B infectées par l'EBV dans les PTLD ont le même phénotype et la même expression d'antigènes viraux que les lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) transformées *in vitro* par l'EBV (produites en infectant les cellules B du sang périphérique du donneur par la souche EBV B 95.8). Les LCL ont été utilisées comme des CPA, afin de produire des CTL anti-EBV en co-cultivant les PBMC du donneur avec la LCL du donneur. Au cours de la culture s'étalant sur un mois environ, de l'IL 2 est ajoutée à chaque changement de milieu et une re-stimulation par la LCL du donneur est réalisée. Grâce à cette méthode, les CTL anti-EBV produits sont polyclonaux et contiennent des cellules T CD4+ et CD8+ anti-EBV, reconnaissant plusieurs antigènes latents ou lytiques du virus.

Heslop *et al.*, ont rapporté récemment les résultats de l'injection des CTL anti-EBV chez 114 patients. Cent un patients ont reçu ce traitement en prophylaxie et aucun d'entre eux n'a développé de syndrome lymphoprolifératif induit par l'EBV (Heslop *et al.*, 2010). De plus, aucune GvH *de novo* n'a été observée et 8 patients qui avaient déjà présenté une GvH ont eu une réactivation rapidement maîtrisée. Sur 13 patients traités en curatif par des CTL anti-EBV, 11 ont été mis en rémission complète. Les deux premiers patients avaient été décrits antérieurement (Rooney *et al.*, 1998). L'un des deux patients n'avait pas répondu au traitement, la tumeur ne présentant plus les 2 épitopes principaux (notamment EBNA-3B) contre lesquels réagissaient les CTL anti-EBV, entraînant une résistance au traitement (Gottschalk *et al.*, 2001). C'est pourquoi, il est préférable que le produit cellulaire soit polyclonal (CD4 et CD8) avec des spécificités antigéniques larges afin de diminuer les risques d'échappement de la tumeur au système immunitaire (Leen *et al.*, 2010). Cette équipe a conclu qu'une dose de 2×10^7 CTL anti-EBV/m² était sans danger et était efficace pour une utilisation prophylactique ou curative. Les 26 premiers patients ont reçu des CTL anti-EBV marqués génétiquement avec un vecteur rétroviral contenant le gène de résistance à la néomycine (*neo*). Ce marquage a permis de montrer que les CTL pouvaient survivre jusqu'à 9 ans après l'injection (Heslop *et al.*, 2010).

Gustafsson a rapporté en 2000 une expérience de traitement de 6 patients par CTL anti-EBV produits selon un protocole proche de celui de l'équipe d'Heslop (Gustafsson *et al.*, 2000). Cinq patients ont reçu les CTL anti-EBV dès que leur charge virale EBV a dépassé un seuil fixé arbitrairement par les auteurs alors que le 6^{ème} patient a été traité en prophylactique. Ce dernier n'a d'ailleurs pas réactivé l'EBV. Parmi les 5 patients traités en pré-emptif, 4 n'ont pas évolué vers un syndrome lymphoprolifératif induit et ont vu leur charge virale diminuer de 2 à 4 log dans les 3 à 4 semaines qui ont suivi la première injection, même si des réactivations de charge virale EBV sont intervenues secondairement. Le cinquième patient est décédé rapidement d'un EBV-BLPD, les CTL injectées n'étant pas spécifiques de la lignée EBV autologue (cytotoxicité équivalente *in vitro* vis-à-vis de la lignée EBV autologue et de la lignée EBV allogénique).

L'équipe italienne de F Locatelli a publié dernièrement une mise à jour de ses résultats de traitement des PTLD par injection de CTL anti-EBV produits selon une méthode similaire à celle de l'équipe de M Brenner (Comoli *et al.*, 2008 ; Comoli *et al.*, 2002). Sur 46 patients ayant reçu une allogreffe déplétée en lymphocytes T en situation haplo-identique, 12 ont développé une charge virale EBV positive nécessitant l'instauration d'un traitement par Rituximab. Deux patients n'ont pas répondu au traitement et 4 patients ayant initialement

répondu au rituximab ont vu leur charge virale EBV réaugmenter à l'arrêt du traitement. Ces 6 patients (dont 5 ayant développé un PTLD) ont été traités par CTL anti-EBV qui ont engendré une négativation de la charge virale EBV, une résolution clinique des PTLD chez tous les patients en médiane après 20 jours. Aucun événement indésirable, ni aucune réaction de GvH n'ont été observés.

Enfin, une équipe japonaise a rapporté en 1997 une expérience malheureuse chez un patient présentant un EBV-BLPD (Imashuku *et al.*, 1997). Les auteurs ont suggéré que l'injection de CTL anti-EBV était intervenue trop tard par rapport au diagnostic (20 et 30 jours après) et à des doses plus faibles que celles rapportées par l'équipe de M Brenner.

3-1-2- Les CTL anti-CMV (Walker *et al.*, 1995 ; Peggs *et al.*, 2003) :

Le transfert adoptif des CTL anti-CMV activées et amplifiées *in vitro* a également été utilisé comme traitement prophylactique et curatif des infections CMV post-greffe (Tableau 6).

L'équipe de Riddell a été la première à s'intéresser à l'immunothérapie adoptive anti-CMV en développant des clones de cellules T CD8+ anti-CMV (réactifs contre les protéines des virions CMV), isolés à partir du sang du donneur de CSH amplifiés *in vitro* puis administrés à des doses croissantes de $3 \times 10^6/\text{kg}$ à $1 \times 10^9/\text{kg}$, à 14 patients après allogreffe de CSH (Walter *et al.*, 1995). Les auteurs ont montré que ces injections de clones T CD8+ anti-CMV étaient bien tolérées et qu'elles permettaient la restauration d'une immunité anti-CMV chez le receveur. Les clones ont persisté pendant au moins 8 semaines avant de disparaître progressivement chez les patients qui n'avaient pas développé une immunité CD4 anti-CMV endogène. Cette étude a révélé l'importance de disposer de CTL anti-CMV renfermant à la fois une population spécifique CD4+ et une population spécifique CD8+. Puis Einsele *et al.*, ont généré des lignées polyclonales de CTL anti-CMV en utilisant un lysat CMV permettant d'activer les cellules T CD4+ et les CD8+ (Einsele *et al.*, 2002a, b). Les CTL anti-CMV injectés à la dose de $1 \times 10^7/\text{m}^2$ ont permis la réduction de la charge virale chez 7 patients traités sur 8, cet effet étant soutenu dans le temps pour 5 patients, les 2 autres ayant réactivé le CMV. Cependant, une deuxième injection de CTL anti-CMV a entraîné la négativation de la charge virale pour l'un d'entre eux (Einsele *et al.*, 2002b). Peggs *et al.*, ont utilisé une approche de production légèrement différente en stimulant les PBMC du donneur avec des cellules dendritiques du donneur chargées avec des antigènes CMV dérivés d'une souche CMV inactivée (Towne strain) (Peggs *et al.*, 2001). Seize patients ayant présenté une

réactivation CMV ont reçu 1×10^5 CTL anti-CMV/kg après 36 jours (en médiane) post-greffe (Peggs *et al.*, 2003). Aucune réaction de GvH n'a été observée et une expansion des CTL anti-CMV a été mise en évidence *in vivo*, par la technique des tétramères. Une immunité spécifique anti-virale s'est développée chez les patients permettant d'arrêter toute thérapeutique médicamenteuse anti-CMV chez 8 patients.

Plus récemment et dans un souci de s'affranchir de l'utilisation de lysat CMV ou d'antigènes dérivés d'une souche CMV pour la stimulation cellulaire T, une autre équipe a produit des CTL anti-CMV obtenues après stimulation des PBMC du donneur par des cellules dendritiques du donneur chargées avec un peptide synthétique immunodominant NLVPMVATV dérivé de la protéine pp65 et restreint HLA-A2 CD8+. Ces CTL anti-CMV ont été transférés à des receveurs adultes ou pédiatriques d'allogreffe de CSH non myéloablative sans aucune déplétion T *in vivo* ou *in vitro* (Micklethwaite *et al.*, 2007). Chez six patients sur neuf une augmentation modérée de la fréquence des cellules T spécifiques post-injection a été observée, mais celles-ci ont disparu après quelques jours voire quelques semaines, probablement du fait de l'absence de CD4+. Les autres patients ont réactivé le CMV. Une GvH aiguë a été observée chez 3 patients dans les 14 jours qui ont suivi l'injection des CTL anti-CMV, conduisant au décès d'un des patients. Pendant cette étude, tous les patients avaient développé une GvH avant l'injection des CTL anti-CMV et l'incidence de la GvH a coïncidé avec une diminution des doses de corticoïdes, mais la possibilité que les cellules T puissent avoir causé ou renforcé la GvH ne peut être éliminée.

Malgré l'avantage de proposer une production de CTL anti-CMV de grade clinique, ce protocole présente plusieurs limites : la restriction HLA A2, le fait que la stimulation ne soit faite que par un seul peptide et non un ensemble de peptides issus de la protéine immunodominante, et enfin l'absence de cellules CD4+, indispensable au maintien de la réponse immunitaire dans le temps chez les patients.

Tableau 6 : Essais cliniques utilisant des CTL spécifiques anti-CMV après allogreffe de CSH.

Protocole d'expansion	Cellules injectées	Patients traités	Résultats cliniques	Références
<i>In vitro</i>	Clones cellules T CD8+	Injection prophylactique pour 14 patients	Pas d'infection à CMV	Walter <i>et al.</i> , 1995
<i>In vitro</i>	CTL polyclonal	8 avec infection	5 patients ont négativé après 1 dose de CTL ; 1 patient a négativé après la 2 ^{ème} dose ; 1 n'a pas négativé	Einsele <i>et al.</i> , 2002b
<i>In vitro</i>	CTL polyclonal	16 avec virémie	8 patients ont négativé sans antiviraux ; 8 avec antiviraux ; 2 ont réactivés le CMV	Peggs <i>et al.</i> , 2003
<i>In vitro</i> / Sélection IFN γ	CTL polyclonal	23 patients avec virémie (16 ont reçu des CTL cultivés <i>in vitro</i> ; 7 ont reçu des CTL-IFN γ (5 après réactivation de la charge virale et 2 en prophylactique))	8/16 : suppression du CMV sans antiviraux 8/16 : réactivation du CMV et suppression concomitante à l'injection de CTL. 7/7 : expansion des CTL anti-CMV, qu'il y ait ou non une charge virale CMV détectable (5/7 ont reçu une thérapie médicamenteuse anti-virale concomitante, mais de plus courte de durée pour 4 d'entre eux)	Mackinnon <i>et al.</i> , 2008
Sélection Tétramers	Sélection de cellules T CD8+	9 avec virémie ou post-réactivation	9 patients ont diminué la charge virale ; 8 patients sans infection	Cobbold <i>et al.</i> , 2005
<i>In vitro</i>	Cellules T CD8+ spécifique anti-Peptide	Injection prophylactique pour 9 patients	6/9 ont augmenté les cellules T spécifiques anti-CMV post-injection ; 2/9 pas de réactivation sans antiviraux	Micklethwaite <i>et al.</i> , 2008
<i>In vitro</i>	CTL polyclonal	1 patient recevant des CTL anti-CMV de leur donneur de CSH séronégatif pour le CMV	Diminution de la charge virale CMV	Horn <i>et al.</i> , 2009

3-1-3- Les CTL multivirus (Leen *et al.*, 2006):

Leen *et al.*, ont produit des lignées de CTL bivirus et trivirus contenant des CTL spécifiques polyclonales contre l'EBV et l'ADV, ou contre l'EBV, le CMV et l'ADV, respectivement (Leen *et al.*, 2006). Ces lignées de CTL ont été produites en modifiant génétiquement les monocytes et les LCL transformées par l'EBV (LCL-EBV) avec un vecteur adénoviral chimérique Ad5f35 exprimant le transgène CMV-pp65 :Ad5f35pp65 (pour la génération des CTL trivirus). Les LCL-EBV servent comme source d'antigènes EBV, tandis que le vecteur adénoviral stimule les CTL anti-ADV et la protéine pp65 est utilisée pour activer les CTL anti-CMV-pp65. En utilisant ce protocole, l'équipe de Leen a activé et amplifié les lignées de CTL avec des spécificités appropriées (Figure 14).

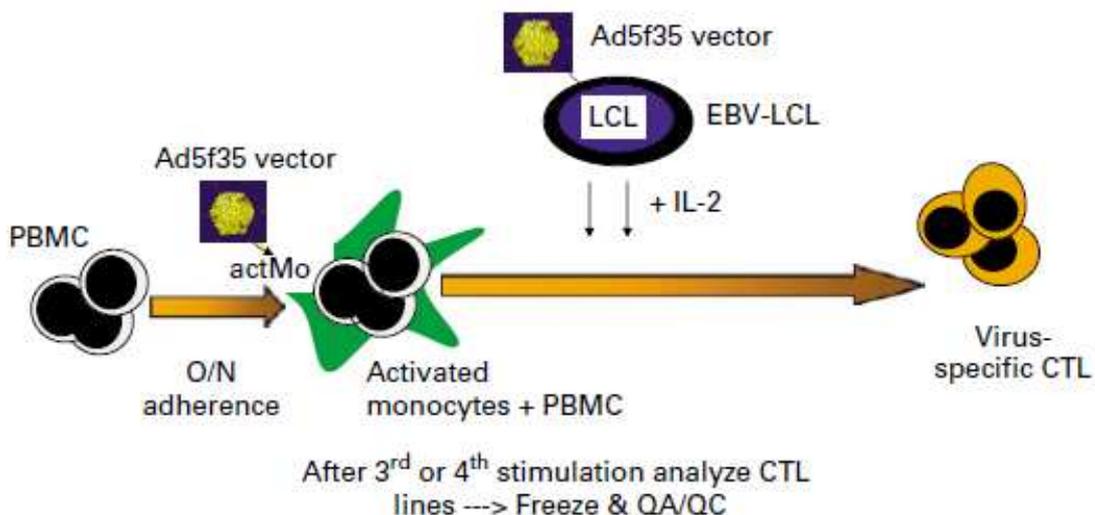


Figure 14 : Génération des CTL multivirus (d'après la revue de Fujita *et al.*, 2008).

Avec cette méthode, Leen *et al.*, ont injecté les CTL anti-EBV, -CMV, -ADV chez 11 patients (Leen *et al.*, 2006). Chaque patient a reçu en médiane 5×10^7 cellules/m² à J₆₂ en médiane post-greffe. Aucun patient n'a développé de GvH et aucune toxicité n'a été déplorée. La réponse CMV a pu être évaluée pour 10 patients ; 7 d'entre eux ont montré une augmentation de la réponse T IFN γ anti-CMV dans les 2 semaines qui ont suivi l'infection, ce qui a été confirmé pour 4 patients avec la technique des Tétramères. *In vivo*, 3 patients ont eu une augmentation de la charge virale CMV dans les 2 à 7 semaines suivant l'injection des CTL. Aucun traitement médicamenteux n'a été nécessaire, la charge virale s'étant négativée en une semaine. La réponse EBV a pu être évaluée chez 11 patients. Une augmentation médiane d'un

facteur 6 de la réponse $IFN\gamma$ a été observée en Elispot vis-à-vis de l'EBV dans les 2 semaines suivant l'injection pour 10 patients. *In vivo*, 3 patients ayant présenté une réactivation EBV, dont 1 avec manifestations cliniques d'un PTLD, 4 à 9 semaines après l'injection des CTL, ont spontanément résolu l'infection et les signes cliniques ont disparu, en même temps que se développaient chez les patients des cellules T spécifiques de l'EBV. Enfin, parmi les 11 patients, 5 présentaient des cultures à ADV positives dans le sang, les selles et le nasopharynx. Les 6 autres n'étaient pas infectés par le virus. Pour les 5 patients infectés, les auteurs ont mis en évidence une expansion des CTL anti-ADV associée à une diminution de la charge virale. Ils rapportent également une amélioration clinique d'un patient qui présentait une pneumopathie. Quant aux 6 autres patients non infectés, les auteurs n'ont pas mis en évidence d'expansion des CTL anti-ADV et ne rapportent aucune infection à ADV pendant la durée du suivi.

Les auteurs concluent que ces CTL multivirus sont dépourvues d'effet délétère et sont parfaitement fonctionnelles *in vivo*. L'expansion rapide des cellules T spécifiques de l'EBV, du CMV ou de l'ADV, en l'absence d'un changement significatif du nombre de lymphocytes T global est en faveur d'une contribution réelle des CTL injectées dans le développement de la réponse immunitaire (Tableau 7).

Tableau 7 : Essais cliniques utilisant des CTL spécifiques anti-ADV, Multivirus et Bi-virus après allogreffe de CSH.

CTL	Protocole d'expansion	Cellules injectées	Patients traités	Résultats cliniques	Références
ADV	Sélection IFN γ	Sélection polyclonal de cellules T	9 avec une infection systémique	5/6 patients ont diminué ou supprimé complètement l'infection	Feuchtinger <i>et al.</i> , 2006
Multivirus (CMV, EBV, ADV)	<i>In vitro</i>	CTL polyclonal	11 patients (Injection prophylactique pour 10 ; 1 traité pour une infection à ADV)	3/3 ont contrôlé la réactivation du CMV sans antiviraux ; 3/3 ont supprimé l'infection à EBV sans antiviraux ; 5 patients avec infection et 1 avec maladie ont supprimé l'ADV post-CTL	Leen <i>et al.</i> , 2006
Bi-virus (ADV, EBV)	<i>In vivo</i>	CTL polyclonal	12 patients avec un traitement prophylactique pour une infection à ADV et 1 patient a reçu une dose de CTL en compassionnel	10/12 n'ont pas réactivé l'EBV 3/12 : diminution de la charge virale EBV concomitante à l'apparition de CTL anti-EBV 2/12 : réactivation de l'ADV et diminution de la charge virale concomitante à l'injection de CTL anti-ADV	Leen <i>et al.</i> , 2009

réactifs de catégorie clinique. Jusqu'à présent, les multimères n'ont pas été produits aux normes GMP, ce qui limite leur utilisation. Cette approche est également limitée aux patients qui expriment des allèles HLA pour lesquels des peptides viraux sont disponibles et pour lesquels la fréquence circulante de cellules T réactives dans le sang périphérique est détectable par marquage de multimères. Ainsi, les infections associées aux virus (tel que l'ADV) où la fréquence circulante de cellules T réactives est plus faible que pour le CMV, ne seront pas concernées par ce type d'approche (Leen *et al.*, 2008).

3-2- Production des CTL par techniques immunomagnétiques

Deux équipes ont décrit un protocole qui permet de sélectionner par technique immunomagnétique, les CTL anti-ADV et les CTL anti-CMV par leur sécrétion d'IFN γ après stimulation antigénique *ex vivo* sur le CliniMACS (Miltenyi Biotec) afin d'isoler les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ anti-virus (Feuchtinger *et al.*, 2004 ; Mackinnon *et al.*, 2008, respectivement).

L'équipe de T. Feuchtinger a publié une étude qui consistait à injecter des lymphocytes T spécifiques anti-adénovirus (entre 1,2-50 x 10³/kg) à 9 patients après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (Feuchtinger *et al.*, 2006). Les 9 patients traités présentaient une infection systémique à adénovirus en échec de traitement conventionnel, sans immunité cellulaire spécifique anti-adénovirus détectée (Tableau 7).

Les auteurs ont montré la faisabilité de l'essai et ont rapporté la bonne tolérance de l'immunothérapie. Le seul effet indésirable rapporté chez un patient présentant avant l'injection des CTL anti-ADV une GvH chronique cutanée était une aggravation de la GvH, toutefois résolutive sous corticoïdes.

Pour 5 des 6 patients évaluable, l'immunothérapie adoptive a été associée à une diminution ou disparition de la charge virale et à une expansion des lymphocytes T spécifiques après injection. Chez 3 patients, les auteurs ont montré une persistance des lymphocytes T spécifiques au-delà de 4 à 6 mois associées à l'absence de détection de la charge virale. Chez 3 autres patients, l'absence de persistance des lymphocytes T spécifiques a été associée à un maintien ou à une augmentation de la charge virale ADV.

Parmi les 3 autres patients, 2 sont décédés pendant l'étude d'une adénovirose systémique, le dernier a rechuté de son lymphome malin non Hodgkinien.

3-1-4- Les Effets secondaires survenant après l'injection de CTL anti-infectieuses (Cruz *et al.*, 2010):

L'équipe de M Brenner a récemment fait le bilan des effets secondaires observés après injection de CTL anti-infectieuses au cours de 10 années d'expérience (Cruz *et al.*, 2010). Les auteurs ont identifié un taux d'évènements indésirables de 17.3%, dont aucun grave. La majorité des évènements indésirables seraient plutôt attribuables au cryoprotecteur (le DMSO) ou au diphenhydramine administré en pré-médication qu'aux CTL eux-mêmes. Les auteurs concluent qu'une surveillance du patient d'1 heure après l'injection des CTL est suffisante.

3-1-5- Les Limites de la production de CTL anti-infectieuses par culture cellulaire (Leen *et al.*, 2010):

Malgré les résultats extrêmement encourageants qui ont été rapportés avec une technique d'immunothérapie par culture cellulaire au long cours, plusieurs limites freinent le développement et la généralisation de cette approche.

Le ***temps de production*** entre 4 et 6 semaines (voire plus pour la production de la lignée EBV) nécessite d'anticiper la production pour tous les patients avant ou au moment de la greffe, sans savoir si le patient réactivera les virus concernés. Cela représente une charge de travail considérable, peu compatible avec les structures de Thérapie cellulaire actuellement en place, notamment en France. Un des moyens de contourner cela est le développement depuis quelques années des banques de CTL anti-EBV allogéniques mettant à disposition de tout patient des CTL préparés, cryoconservés et sélectionnés pour chaque patient sur la base d'une compatibilité HLA minimale et la validation par une cytotoxicité *in vitro* de l'efficacité des CTL vis-à-vis de la lignée EBV du donneur de CSH (Haque *et al.*, 2002 ; Haque *et al.*, 2007). Une telle banque a vu le jour à Nantes.

Dans une stratégie de traitement préemptif, il serait intéressant de disposer de techniques rapides qui pourraient être mises en œuvre dès que l'on a connaissance de l'augmentation de la charge virale. Nous présenterons dans la deuxième partie de cet exposé les techniques développées à ce jour.

Le ***procédé de production*** est relativement complexe, nécessitant une bonne expertise des laboratoires le mettant en œuvre et rendant difficile l'obtention d'une autorisation d'application de grade clinique par les instances régulatrices officielles.

réactifs de catégorie clinique. Jusqu'à présent, les multimères n'ont pas été produits aux normes GMP, ce qui limite leur utilisation. Cette approche est également limitée aux patients qui expriment des allèles HLA pour lesquels des peptides viraux sont disponibles et pour lesquels la fréquence circulante de cellules T réactives dans le sang périphérique est détectable par marquage de multimères. Ainsi, les infections associées aux virus (tel que l'ADV) où la fréquence circulante de cellules T réactives est plus faible que pour le CMV, ne seront pas concernées par ce type d'approche (Leen *et al.*, 2008).

3-2- Production des CTL par techniques immunomagnétiques

Deux équipes ont décrit un protocole qui permet de sélectionner par technique immunomagnétique, les CTL anti-ADV et les CTL anti-CMV par leur sécrétion d'IFN γ après stimulation antigénique *ex vivo* sur le CliniMACS (Miltenyi Biotec) afin d'isoler les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ anti-virus (Feuchtinger *et al.*, 2004 ; Mackinnon *et al.*, 2008, respectivement).

L'équipe de T. Feuchtinger a publié une étude qui consistait à injecter des lymphocytes T spécifiques anti-adénovirus (entre 1,2-50 x 10³/kg) à 9 patients après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (Feuchtinger *et al.*, 2006). Les 9 patients traités présentaient une infection systémique à adénovirus en échec de traitement conventionnel, sans immunité cellulaire spécifique anti-adénovirus détectée (Tableau 7).

Les auteurs ont montré la faisabilité de l'essai et ont rapporté la bonne tolérance de l'immunothérapie. Le seul effet indésirable rapporté chez un patient présentant avant l'injection des CTL anti-ADV une GvH chronique cutanée était une aggravation de la GvH, toutefois résolutive sous corticoïdes.

Pour 5 des 6 patients évaluable, l'immunothérapie adoptive a été associée à une diminution ou disparition de la charge virale et à une expansion des lymphocytes T spécifiques après injection. Chez 3 patients, les auteurs ont montré une persistance des lymphocytes T spécifiques au-delà de 4 à 6 mois associées à l'absence de détection de la charge virale. Chez 3 autres patients, l'absence de persistance des lymphocytes T spécifiques a été associée à un maintien ou à une augmentation de la charge virale ADV.

Parmi les 3 autres patients, 2 sont décédés pendant l'étude d'une adénovirose systémique, le dernier a rechuté de son lymphome malin non Hodgkinien.

Les auteurs ont observé une disparition de la charge virale ADV associée à une amplification des lymphocytes T spécifiques *in vivo*. L'absence de détection de la charge virale associée à une persistance de lymphocytes T spécifiques *in vivo* s'était prolongée au-delà de 6 mois. Ils ont expliqué les échecs du traitement par l'état clinique sévère des patients et le stade invasif de l'adénovirose. Ils ont donc suggéré de traiter les patients à haut risque de développer une adénovirose maladie à titre préemptif avant l'apparition de tout symptôme clinique.

Une expérience similaire a été menée par Mackinnon *et al.*, avec le CMV (Mackinnon *et al.*, 2008). Les auteurs mentionnent la production de CTL anti-CMV sélectionnés sur la base de la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T stimulés pendant 20 heures avec la protéine pp65. Les CTL anti-CMV ont été administrés à 7 patients, 5 après réactivation de la charge virale et 2 en prophylactique. Une expansion des CTL anti-CMV a été retrouvée chez tous les patients, qu'il y ait ou non une charge virale CMV détectable. Les 5 patients qui avaient réactivé le CMV ont reçu une thérapie médicamenteuse anti-virale concomitante, mais de plus courte durée pour 4 d'entre eux.

Cette approche offre plusieurs avantages, parce qu'elle est simple à mettre en oeuvre, rapide et peut être aisément standardisée avec différents antigènes infectieux pour des approches d'immunothérapie cellulaire adoptive spécifique. L'une de limites actuellement de cette approche est la disponibilité encore faible d'antigènes de catégorie GMP (Good Manufacturing Practices) pour la stimulation des cellules T.

La même technologie a été utilisée pour générer rapidement à l'échelle recherche des CTL tri-virus, par l'équipe de M. Brenner (Fujita *et al.*, 2008). Les antigènes de stimulation étaient les mêmes que ceux utilisés pour la génération de CTL tri-virus par culture cellulaire c'est-à-dire des lignées EBV (LCL-EBV) modifiées génétiquement avec un vecteur adénoviral chimérique Ad5f35 exprimant le transgène CMV-pp65 :Ad5f35pp65. Aucun essai clinique n'a été publié pour le moment.

3-3- Production des CTL à partir de donneurs n'ayant aucune immunité vis-à-vis des virus concernés.

La production des CTL anti-infectieuses telle que nous l'avons présentée jusqu'ici consiste à isoler et éventuellement amplifier une population de lymphocytes T spécifique pré-existante. Cependant, cette approche n'est pas applicable avec les donneurs séronégatifs, n'ayant jamais rencontré les agents viraux concernés ou avec les sangs placentaires allogéniques, dont

l'utilisation en allogreffe de CSH est croissante. La production de CTL anti-infectieuses à partir de tels donneurs nécessite au préalable le « priming » des lymphocytes T. Les CPA capables d'effectuer ce « priming » sont les DC. L'équipe de M Brenner a proposé récemment une méthode de production de CTL tri-virus à partir de sangs placentaires en produisant avec une partie du sang placentaire décongelé des DC pulsées, après 5 jours de culture, avec le vecteur adénoviral chimérique Ad5f35 exprimant le transgène CMV-pp65 :Ad5f35pp65 (Fujita *et al.*, 2008). Ces DC pulsées sont mises en co-culture avec les cellules mononucléées du sang placentaire pendant 3 semaines. Les CTL sont restimulées toutes les semaines par la LCL-EBV- Ad5f35pp65 en présence d'IL2.

Ce travail fait la preuve de concept qu'il est possible de produire des CTL anti-virus à partir de donneurs séronégatifs. En pratique, cela semble difficilement réalisable, le sang placentaire devant être cryoconservé en plusieurs poches et la partie utilisable pour l'allogreffe se trouvant réduite de 20% environ. Or, on sait qu'un sang placentaire est souvent insuffisant pour réaliser une allogreffe. C'est d'ailleurs pour cela que l'on s'oriente vers les doubles allogreffes de sang placentaires chez les adultes.

Un article récent rapporte également le traitement d'une infection CMV post-greffe de CSH, réfractaire aux traitements anti-viraux, avec une injection de CTL anti-CMV produits à partir d'un donneur séronégatif pour le CMV (Horn *et al.*, 2009). Le donneur a reçu le vaccin CMV (Towne strain) et les CTL ont été obtenues après stimulation *in vitro* par les monocytes pulsés avec un pool de peptides se chevauchant et recouvrant la protéine pp65. La charge virale CMV a diminué après l'injection des CTL et une cytotoxicité spécifique du CMV croissante a été observée chez le patient.

Deuxième partie :

MATÉRIEL
&
MÉTHODES

1- Les pools de peptides et les différents antigènes utilisés :

1-1- Pools de peptides

Le PepTivator-ADV5 Hexon est un pool de peptides de 15 acides aminés se chevauchant tous les 11 acides aminés et recouvrant la totalité de la protéine hexon de l'ADV5 (Miltenyi Biotec, Germany). 60 nmol/peptide sont utilisés pour une stimulation *ex vivo* de 1×10^9 CMN.

Le PepTivator-CMVpp65 est un pool de peptides de 15 acides aminés se chevauchant tous les 11 acides aminés et recouvrant la totalité de la phosphoprotéine pp65 du CMV (Miltenyi Biotec, Germany). 60 nmol/peptide sont utilisés pour une stimulation *ex vivo* de 1×10^9 CMN.

1-2- Protéine hexon de l'ADV2

La protéine hexon de l'ADV2 est utilisée à une concentration finale de 30µg/ml (Virion-Serion, Wuerzburg, Germany). Il s'agit d'une protéine produite sur cellules de la lignée tumorale Hep2.

1-3- Préparation des lysats ADV

Des lysats de l'ADV2, 5 (groupe C), 3 (groupe B1), ou 25 (groupe D) ont été préparés en infectant des cellules MRC5 pendant 48h de culture dans du milieu MEM Earle à 10% de SVF. Afin de lyser les cellules et récupérer le virus, les MRC5 sont congelées (-20°C) et décongelées (température ambiante) 3 fois. Le surnageant obtenu après centrifugation à 20.000g et contenant les particules virales, est aliquoté en 5 ml/tube. Le virus est ensuite inactivé pendant 30 min à 56°C. La concentration virale des lysats produits a été déterminée par PCR et par dilution limite. Les lysats viraux ainsi produits, sont utilisés à une concentration variant de $1,1 \times 10^9$ à $1,5 \times 10^9$ PFU/ml (Laboratoire de Virologie, Nancy).

1-4- Lysat CMV

Le lysat CMV (Biodesign) est utilisé à une concentration finale de 6,25 µg/ml.

1-5- Lignées EBV des donneurs de CSH

Les lignées cellulaires EBV (LCL) sont générées à partir de 2×10^6 CMN du donneur et sont incubées avec 0,4 ml de surnageant d'une lignée cellulaire B95-8 productrice d'EBV, pendant

1 heure à 37°C. De la ciclosporine A (Novartis, Pharma S.A., Reuil-Malmaison, France) est ajoutée directement aux CMN infectées à J₀, J₂, J₄ et J₆ afin d'inhiber les cellules T spécifiques. La culture cellulaire est incubée à 37°C avec 5% de CO₂ dans un milieu de culture (RPMI Glutamax : (Invitrogen, Gibco BRL Life Technologies, Paisley, Scotland) supplémenté avec des antibiotiques et 20% de sérum bovin foetal). Les LCL sont par la suite amplifiées dans ce milieu de culture. Après 3 à 4 semaines, les LCL sont prêtes pour être utilisées en Elispot.

2- Elispot IFN γ :

Les anticorps monoclonaux humains anti-IFN γ , 1-D1 K (Mabtech, Stockholm, Sweden) sont fixés sur une plaque Multiscreen Immobilon-P (96 puits, Millipore, Bedford, MA), à la concentration de 10 μ g/ml pendant 16 heures d'incubation. Les puits sont ensuite rincés en PBS (6 fois). La saturation des sites est réalisée par 20mg/ml (100 μ l/puits) de lait écrémé pendant 2 heures. Les CMN sont ajoutées dans les puits en triplicate à une concentration finale de 5 x 10⁶ cellules/ml pour l'Elispot ADV et de 1 x 10⁶ cellules/ml pour l'Elispot EBV (100 μ l/puits) et sont incubées pendant 20h (37°C, 5% CO₂) soit avec la protéine hexon ADV2, le PepTivator-ADV5 Hexon, le lysat ADV2 et ADV5, la Phytohémagglutinine (PHA, 1 μ g/ml final) comme contrôle positif ou le RPMI 1640 + 10% SAB comme contrôle négatif. Pour tester la réponse des cellules T vis-à-vis de l'EBV, les LCL des donneurs de CSH sont utilisées comme cellules présentatrices d'antigènes. Le test est réalisé en RPMI SVF 10%. Un contrôle négatif supplémentaire est préconisé : la lignée EBV seule en présence de RPMI 1640 + 10% SVF.

Après incubation, les cellules sont éliminées et la plaque est lavée 6 fois avec du PBS. Un second anticorps humain anti-IFN γ , 7B 6-1, biotinylé (Mabtech) est ajouté (dilué au 1/1000 en PBS) et incubé pendant 1h (37°C, 5% CO₂). Après incubation, la plaque est lavée 6 fois avec du PBS. La streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (Mabtech) est ajoutée (dilué au 1/1000 en PBS) et est incubée pendant 1h30 à température ambiante et dans l'obscurité. Les substrats de la phosphatase alcaline (kit, Biorad, Richmond, CA) sont ajoutés. Après incubation pendant 15 minutes à température ambiante et dans l'obscurité, la réaction est arrêtée en enlevant les substrats et par 3 lavages avec de l'eau stérile. Après séchage de la

plaque, les spots apparus sont comptés en utilisant un lecteur automatique d'Elispot : Bioreader 4000 PRO-S (BIO-SYS, SERLABO, Entraigues sur la Sorgues, France). Le nombre des cellules T répondant à la stimulation, est calculé après avoir soustrait les valeurs des contrôles négatifs. Les résultats sont rendus en Nombre de Spots Forming Cells pour 10^6 CMN (SFC/ 10^6 PBMC).

3- Le Cytokine Capture System (Miltenyi Biotec) (cf. schéma) :

La production des Lymphocytes T cytotoxiques anti-ADV et/anti-CMV est réalisée avec le kit de grade clinique : Cytokine Capture System (Miltenyi Biotec). Il est nécessaire de préparer du sérum autologue avant la manipulation ou d'utiliser du sérum AB de grade clinique (Etablissement Français du Sang, Lyon, France). Le sérum autologue est produit à partir d'une poche de plasma du donneur (obtenue en même temps que la leukaphérèse) en ajoutant une ampoule de CaCl₂ (1g/10ml, Laboratoire AGUETTANT, Aigueperse, France) jusqu'à prise du caillot de fibrine. Le sérum est ensuite récupéré.

3-1- Phase de stimulation

Les CMN sont obtenues soit directement sur leukaphérèse, soit par isolement sur gradient de densité (Abcys, Paris, France) à partir d'une poche de sang total. Elles sont lavées 2 fois dans du milieu froid RPMI 1640 (Eurobio, Courtaboeuf, France) à 4°C à 200 g 10 minutes (sans frein). Les CMN sont mises en culture dans une poche poreuse (Cell Differentiation Bag (tube)-100, Miltenyi Biotec, Germany) à raison de 10×10^6 CMN/ml en milieu RPMI 1640 + 10% sérum autologue (ou AB), dans un volume maximal de 100 ml. Les CMN sont stimulées par 20µl de PepTivator-ADV5 Hexon ou -CMVpp65 (0,6 nmol/peptide/ml) pendant 6 heures à 37°C, 5% CO₂. Une cinétique a permis de déterminer que le temps de stimulation optimale est de 6 heures.

3-2- Marquage avec le Catchmatrix reagent

Après 6 heures de stimulation, les CMN sont transférées dans une poche de 600ml. Par connexion stérile, 450 ml de RPMI + 2% de sérum autologue (ou AB) froid sont ajoutés dans la poche des CMN stimulées et lavées par centrifugation (300 g, 10 minutes, +4°C). Le culot cellulaire (10 ml maximum) est marqué avec 7,425 ml d'anticorps bispécifique « anti-CD45 et anti-IFN γ » (IFN γ Catchmatrix Reagent, Miltenyi Biotec, Germany) pendant 5 minutes sur

la glace pilée. Cette première incubation permet la fixation de l'anticorps anti-CD45 sur les leucocytes. La température basse (4°C) limite la sécrétion d'IFN γ par les cellules stimulées.

3-3- Phase de sécrétion de l'IFN γ

Après marquage des CMN par « *IFN γ Catchmatrix Reagent* » le culot de CMN marquées est dilué à la concentration de 10⁶ CMN/ml en ajoutant 500 ml de milieu RPMI 1640 + 10% sérum autologue (ou AB) préchauffé à 37°C, par connexion stérile. Puis, les cellules sont réparties à raison de 125 ml par poche, dans 4 poches de 600ml contenant chacune 125 ml de milieu RPMI 1640 + 10% sérum autologue préchauffé à 37°C, soit 250 ml par poche. Les cellules sont ensuite incubées pendant 45 minutes à 37°C sous agitation constante afin de permettre la sécrétion d'IFN γ par les cellules stimulées. Le facteur de dilution important ainsi que l'agitation constante permettent de séparer les cellules les unes des autres afin que l'IFN γ sécrété par une cellule se fixe sur l'anticorps bivalent anti-CD45/anti-IFN γ déjà fixé sur cette même cellule.

A la fin de la phase de sécrétion, 250 ml de tampon de lavage froid (+4°C) CliniMACS (PBS/EDTA, Miltenyi Biotec, Germany) SAH 0,5% (VIALEBEX 200 mg/ml, LFB, Les Ullis, France) sont ajoutés par connexion stérile, à chacune des 4 poches, amenant les poches à un volume final de 500 ml. Ces dernières sont maintenues pendant 10 minutes dans la glace pilée. Les CMN sont lavées 3 fois par centrifugation (300 g, 10 minutes, +4°C) et poolées en une seule poche.

Un échantillon est conservé à ce stade pour évaluer le % de lymphocyte T IFN γ + en haut de colonne, avant enrichissement sur colonne.

3-4- Marquage avec le réactif d'enrichissement

A la fin de la centrifugation, le culot cellulaire (10 ml maximum) est marqué avec 7,425 ml de « IFN-GAMMA ENRICHMENT REAGENT » contenant un deuxième anticorps anti-IFN γ couplé à des billes magnétiques, pendant 15 minutes sur la glace pilée. Après incubation, les CMN sont lavées par centrifugation (300 g, 10 minutes, +4°C) avec 500 ml de tampon PBS/EDTA SAH 0.5% à +4°C. Après le lavage, le culot cellulaire est repris dans 100ml de tampon PBS/EDTA SAH 0.5 % à +4°C.

3-5- Enrichissement sur le CliniMACS

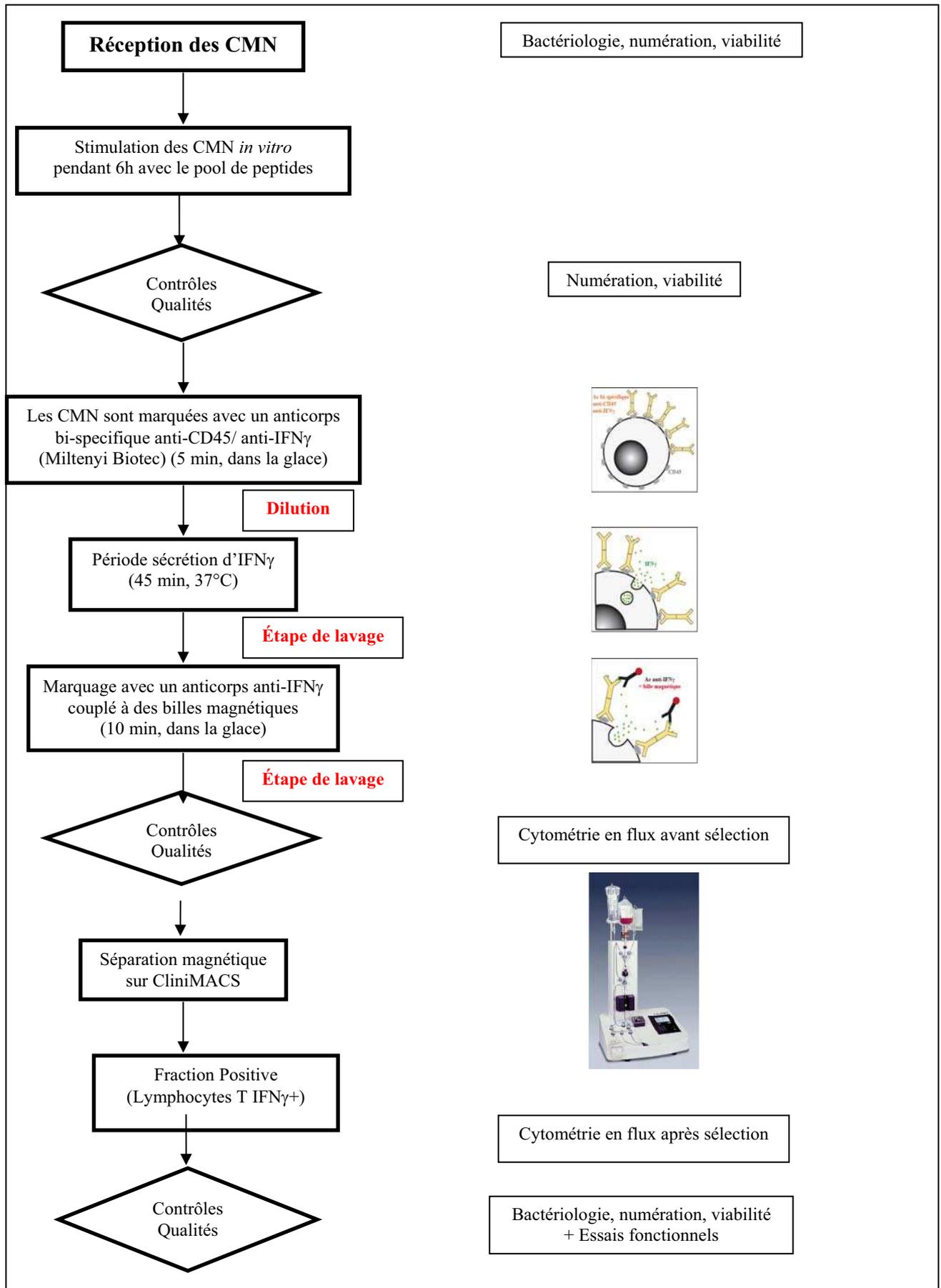
Après installation du kit de séparation (Tubing Set, ref: 161-01, Miltenyi), le programme «3.1» est sélectionné sur l'automate CliniMACS. Lorsque toutes les vérifications réalisées par l'appareil sont conformes, la procédure peut être initiée pour la sélection immunomagnétique des lymphocytes T IFN γ +

3-6- Récupération des Fractions positive et négative

A la fin de la procédure, la fraction positive enrichie en lymphocytes T IFN γ est récupérée dans une poche puis lavée par centrifugation (300 g, 10 minutes, +4°C) avec 100 ml de tampon PBS/EDTA SAH 0.5% à +4°C. La même procédure est suivie pour la fraction négative. Un millilitre est prélevé sur chaque fraction afin de réaliser l'ensemble des contrôles qualité: numération, viabilité, cytométrie en flux, bactériologie, amplification des cellules pour contrôles qualité fonctionnels.

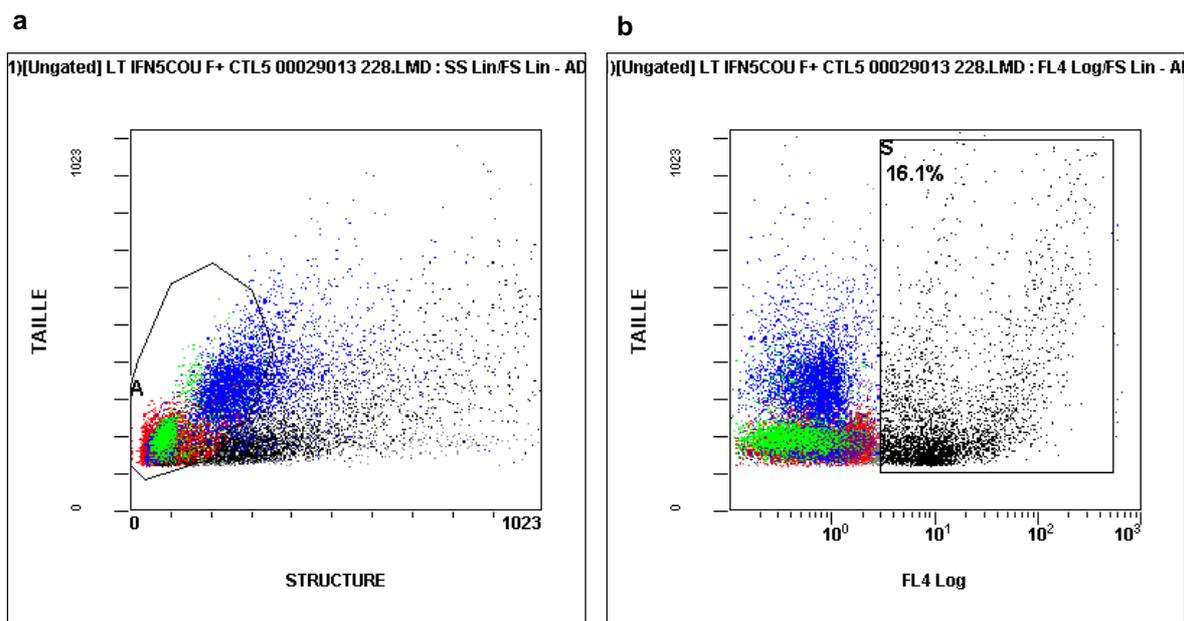
4- IFN γ Detection Assay (Cytokine Detection Assay, CDA):

La technique CDA est réalisée avec le kit *Cytokine Secretion Assay* (Miltenyi Biotec) en suivant le même procédé que le *Cytokine Capture System* (CSA, décrit ci-dessus). Les étapes de stimulation et de marquage sont les mêmes que celles décrites précédemment, à l'exception du deuxième anticorps anti-IFN γ qui est marqué PE. Les cellules ainsi marquées peuvent être analysées par cytométrie en flux. Aucune sélection immunomagnétique n'est réalisée.



5- Analyse phénotypique par cytométrie en flux :

La fréquence des Lymphocytes T $\text{IFN}\gamma$ + en réponse à une stimulation antigénique est mesurée à deux moments du procédé de production (avant passage sur colonne et après passage sur colonne, sur les fractions positive et négative) en utilisant un marquage de surface dans des conditions de saturation avec les anticorps suivants : anti-CD4-ECD (Beckman Coulter, Villepinte, France), anti-CD8-PC7 (Beckman Coulter), anti-CD14-FITC (Beckman Coulter). Les cellules CD14+ (monocytes) et les cellules mortes, identifiées par le marquage 7AAD, sont écartées lors de l'analyse. Les cellules qui sécrètent de l' $\text{IFN}\gamma$ sont identifiées par l'anticorps humain anti- $\text{IFN}\gamma$ -PE (Miltenyi Biotec). Plus de 100.000 cellules sont analysées par le cytomètre FC500 (Beckman Coulter). Les $\text{CD4}+\text{IFN}\gamma+$ et les $\text{CD8}+\text{IFN}\gamma+$ sont sélectionnés à partir des CD4 et des CD8 totaux, respectivement, après avoir éliminé les cellules mortes 7AAD+ et les monocytes CD14+ de la population des lymphocytes (Figure 15).



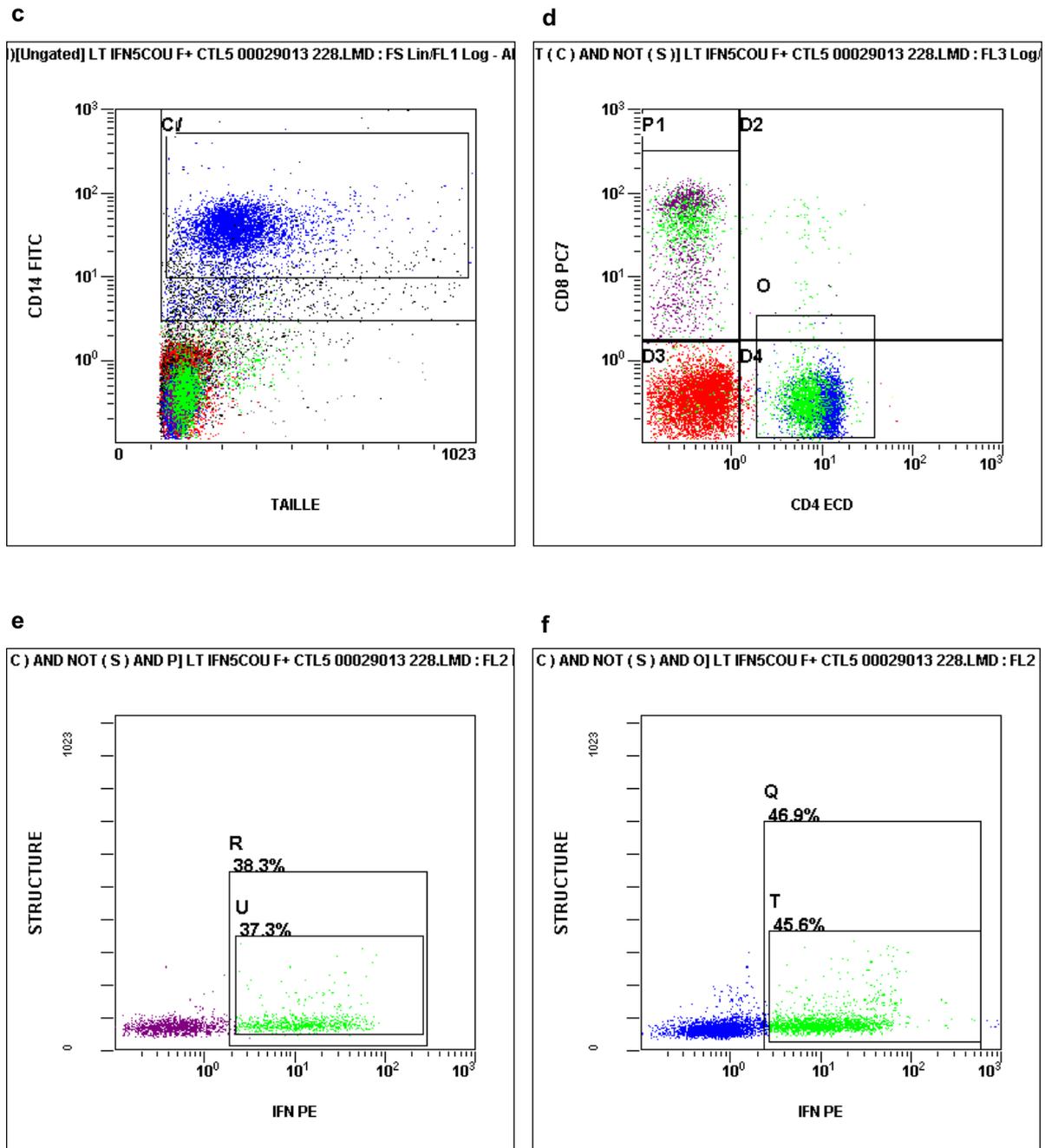


Figure 15: Analyse phénotypique par Cytométrie en flux des CTL anti-ADV après immunosélection. (a) Les lymphocytes totaux, (b) Les cellules colorées en noir correspondent aux cellules mortes 7AAD⁺ qui seront éliminées, (c) les cellules colorées en bleu correspondent aux monocytes CD14⁺ qui seront également éliminées lors de l'analyse, (d) Le cadre P correspond aux cellules T CD8 et le cadre O aux cellules T CD4, (e) La population CD8⁺IFN γ ⁺ colorée en vert est sélectionnée à partie du cadre P, (f) La population CD4⁺IFN γ ⁺ colorée en vert est sélectionnée à partie du cadre O.

6-Amplification des Lymphocytes T IFN γ + spécifiques:

Afin d'amplifier les lymphocytes T IFN γ + spécifiques, un échantillon des cellules de la fraction positive ($0,1-1 \times 10^6$ cellules) est mis en culture de 1 à 4 semaines dans du milieu de culture RPMI 1640 + 10% SAB complété avec 100 UI/mL d'interleukine (IL)-2 (PeproTech, TEBU, Paris, France) dans des flacons de culture à une concentration finale de $0,1 \times 10^6$ cellules/ml. Des PBMC autologues irradiées à 25 Gy (récupérées de la fraction négative) sont ajoutées à J₀ à un ratio de 100 :1 et à J₇ à 10 :1. Le milieu de culture contenant 100 UI/mL d'IL2 est renouvelé tous les jours. La viabilité cellulaire est déterminée par coloration au bleu de Trypan.

7-Contrôles qualité fonctionnels réalisés sur cellules amplifiées:

7-1- Dosage des cytokines intracellulaires

Le marquage des cytokines intracellulaires est réalisé afin de voir si les lymphocytes T IFN γ + spécifiques d'un antigène, après amplification, sont capables de sécréter de l'IFN γ suite à une nouvelle stimulation avec le même antigène (PepTivator-ADV5 Hexon ou -CMVpp65). Les Lymphocytes T IFN γ + amplifiés sont stimulés pendant 14h avec le PepTivator-ADV5 Hexon ou -CMVpp65. Un microlitre de Brefeldine A (Becton Dickinson, San José) est ajouté pendant 12h d'incubation. Après stimulation, un marquage extracellulaire des cellules est réalisé avec des anticorps humain : anti-CD4-ECD (Beckman Coulter), anti-CD8-PC7 (Beckman Coulter), IFN γ -Ax488 (Becton Dickinson), et IL2-PE (Becton Dickinson). Les cellules sont ensuite perméabilisées et fixées avec une solution Perm/Fix (Becton Dickinson) durant 30 minutes. Le Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 2 μ g/mL, Sigma Aldrich) complété avec la Ionomycine (5 μ g/mL, Calbiochem) est utilisé comme contrôle positif. L'analyse par cytométrie en flux est réalisée sur plus de 100.000 événements sur le cytomètre FC500. Les CTL anti-ADV CD4+IFN γ + et les CD8+IFN γ + sont sélectionnés à partir des CD4+ et des CD8+ respectivement, à partir de la population des lymphocytes (Figure 16).

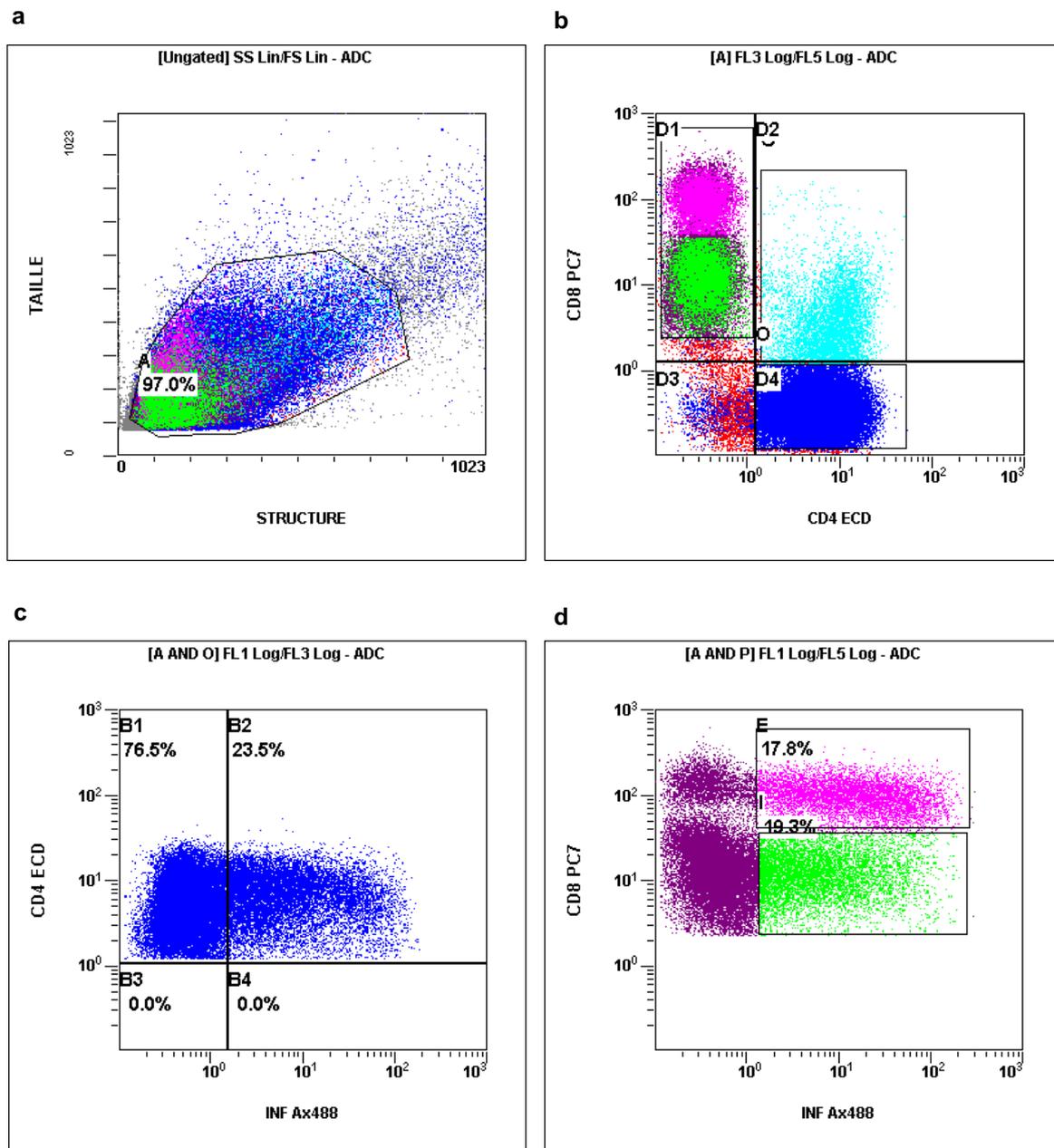


Figure 16: Analyse cytométrique des CTL anti-ADV après amplification *in vitro* par dosage de cytokines intracellulaires. (a) Gating des lymphocytes totaux, (b) Le cadre P correspond aux cellules T CD8 et le cadre O aux cellules T CD4, (c) La population CD4+IFN γ + est sélectionnée à partie du cadre O, (d) La population CD8+IFN γ + est sélectionnée à partie du cadre P.

7-2- Test de prolifération ou transformation lymphoblastique (TTL)

La prolifération spécifique des Lymphocytes T IFN γ + spécifiques d'un antigène, après amplification est étudiée en présence de tous les antigènes disponibles (pour l'ADV :

PepTivator-ADV5 Hexon et lysats ADV 2, 3, 5, 10 et 25 ; pour le PepTivator-CMVpp65 et lysat CMV) ou la PHA. Les lymphocytes T IFN γ + spécifiques d'un antigène sont mis en culture à raison de 1×10^5 cellules/puits avec les PepTivators ou avec la PHA durant 4 jours (37°C, 5% CO₂) dans une plaque à fonds plats de 96 puits et avec les lysats pendant 6 jours. Cinquante microlitres de ³H-thymidine (1 μ Ci, GE Healthcare, Orsay, France) sont ajoutés pendant les 18 dernières heures de culture. A la fin du test, les cellules sont transférées sur un filtre et la radioactivité incorporée est déterminée à l'aide d'un compteur β (Top Count, Perkin Elmer). Les réponses prolifératives sont exprimées en cpm ou en Index de Stimulation (IS) selon la formule suivante :

Moyenne des cpm pour les cellules stimulées incorporant la ³H-thymidine / Moyenne des cpm pour les cellules non stimulées incorporant la ³H-thymidine.

7-3- Test de cytotoxicité

7-3-1- Production des cellules cibles autologues :

Les cellules cibles que nous avons utilisées dans le test de cytotoxicité sont des cellules dendritiques autologues et des blastes PHA autologues. Environ 1×10^8 CMN sont prélevés sur le prélèvement d'origine (leukaphérèse ou poche de sang après séparation sur gradient de densité). L'enrichissement des cellules CD14+ est réalisé avec un anticorps anti-CD14 couplé avec des billes magnétiques (Miltenyi Biotec) et par sélection immunomagnétique MACS (Miltenyi Biotec). Une pureté moyenne de 95% est obtenue. Une fois purifiés, les monocytes sont mis en culture dans du RPMI 1640 + 10% SAB complémenté avec 100 ng/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; R&D Systems, Lille, France) et 25 ng/mL IL-4 (R&D Systems) pendant 6 jours (37°C, 5% CO₂). Les cellules dendritiques (DC) autologues ainsi obtenues, sont analysées par cytométrie en flux (anti-CD11c-PE-Cy5 (BD Pharmingen), Lineage Cocktail-FITC (lin1) (Becton Dickinson), anti-CD83-PE, -anti-CD86-PE, -anti-CD45-PC7, et -anti-HLA-DR-ECD (Beckman Coulter). Elles sont ensuite incubées pendant 24h en présence des lysats ADV2, 5, 3, ou 25, le lysat CMV, le PepTivator-ADV5 Hexon ou par le PepTivator-CMVpp65. Les DC autologues et hétérologues non infectées sont également utilisées comme contrôles négatifs. Durant les 14 dernières heures d'incubation, 100 mg/ml de Poly I : C (Sigma, La Verpillière, France) sont ajoutés.

Parallèlement, les blastes PHA sont produits en utilisant 5×10^6 CMN autologues, stimulés avec 1 mg/mL de PHA (Oxoid, Dardilly, France) à J₀ et tous les 2 jours avec 100 UI/mL d'IL-

2 à J₃ pendant une semaine. Les blastes PHA ainsi obtenus sont pulsés avec les PepTivator-ADV5 Hexon ou -CMVpp65 pendant 16h.

7-3-2- Test de cytotoxicité:

Les cellules cibles pulsées sont marquées avec du chrome 51 (⁵¹Cr, 50 µCi/10⁶ cellules) pendant 1h à 37°C et lavées 2 fois avec le milieu de culture. Elles sont ensuite réparties en plaques de 96 puits à fonds ronds à une concentration de 1 x 10⁴ cellules/puits. Les cellules effectrices (Lymphocytes T IFN γ + spécifiques d'un antigène, après amplification) sont ajoutées aux cellules cibles à un rapport de 10 :1 en triplicate et de 40 :1 à 5 :1 à chaque fois que le nombre de cellules le permet. Après 4h d'incubation (37°C, 5% CO₂), les plaques sont centrifugées (200 g, 5 min) et 30 µl du surnageant de chaque puits sont prélevés afin que le ⁵¹Cr relargué soit compté par un compteur γ (Top Count, Perkin Elmer, Ontario, Canada). Le pourcentage de lyse spécifique est calculé selon la formule suivante :

% de la lyse spécifique = (relargage expérimental – relargage spontané) / (relargage total – relargage spontané) x 100.

Le relargage expérimental correspond au nombre moyen de cpm en présence des cellules effectrices, le relargage spontané est la moyenne des cpm des cellules cibles en présence de milieu de culture seul, et le relargage total est la moyenne des cpm des cellules cibles en présence de 100 µl à 0,1% de Triton x100.

7-4- Culture mixte lymphocytaire (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR)

Les CMN de 3 donneurs différents sont utilisées comme cellules stimulantes irradiées à 25 Gy et mises en plaque de 96 puits à fonds ronds (1 x 10⁵ cellules/puits dans 100 µl). Les CMN autologues et les Lymphocytes T IFN γ + spécifiques d'un antigène, après amplification sont ajoutées à la même concentration (1 x 10⁵ cellules/puits dans 100 µl) et incubées 6 jours (37°C, 5% CO₂). Cinquante microlitres ³H-thymidine (1 µCi, GE Healthcare, Orsay, France) sont ajoutés pendant les 18 dernières heures de culture. A la fin du test, les cellules sont transférées sur un filtre et la radioactivité incorporée est déterminée à l'aide d'un compteur β (Top Count, Perkin Elmer). Les réponses prolifératives sont exprimées en cpm.

8- Analyses statistiques :

Le test de Student t est utilisé afin de comparer (i) l'efficacité de la stimulation *in vitro* entre la protéine hexon de l'ADV2 et le PepTivator-ADV5 Hexon et (ii) la lyse spécifique des DC pulsées avec les antigènes et les DC non pulsées. Les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées significatives.

Troisième partie :

RÉSULTATS

Etude de la Reconstitution immunitaire après allogreffe de CSH

Exemple du monitoring de la reconstitution immunitaire anti-EBV

Article 1:

The clinical value of concomitant Epstein Barr Virus (EBV)-DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation

*Lamia AÏSSI-ROTHÉ**, Maud DAVENI*, Véronique VENARD, Alexandra SALMON, Aude FALENGA, Véronique DECOT, Laurence CLEMENT, Jean Marc VIRION, Véronique LATGER-CANNARD, Cécile TOMOWIAK, Jean François STOLTZ, Pierre BORDIGONI, Danièle BENSOUSSAN.

* *Co-auteurs.*

Soumis à Transplantation Infectious Disease

Conscients que le suivi régulier de la charge virale EBV ne permet pas à lui-seul de cibler parfaitement, parmi les patients qui présentent une augmentation de la charge virale EBV, ceux qui nécessitent la mise en œuvre d'un traitement à dose curative (principalement par Rituximab), nous avons souhaité évaluer l'intérêt d'associer un suivi de la reconstitution immunitaire anti-EBV. Nous avons réalisé une étude prospective de la reconstitution immunitaire anti-EBV pendant un an après allogreffe de CSH au CHU de Nancy, en mettant en œuvre la technique Elispot IFN γ utilisant les lignées EBV (LCL) du donneur de CSH comme cellules présentatrices d'antigène. Nous n'avons pas informé les cliniciens des résultats afin de ne pas influencer leurs pratiques. Rétrospectivement, nous avons analysé les résultats.

Entre Janvier et Décembre 2006, 40 patients ont été inclus dans cette étude (13 enfants et 27 adultes) et ont été suivis à différents temps après allogreffe de CSH (J₆₀, J₁₀₀, J₁₈₀ et J₃₆₀). La moyenne d'âge des patients était de 30 ans (0-64). Les indications de greffes étaient principalement des leucémies aiguës. Les patients ont reçu un conditionnement d'intensité

réduite pour 26 d'entre eux et myéloablatif pour 14 d'entre eux. Des Thymoglobulines (ATG) ont été adjointes au conditionnement pour 29 patients. La prophylaxie de la GvH consistait en une combinaison de traitements immunosuppresseurs. Aucune greffe n'a été préalablement déplétée *ex vivo* en cellules T.

Le but de cette étude est de définir l'impact clinique de l'Elispot IFN γ dans le suivi de la réactivation EBV après allogreffe de CSH, en identifiant rétrospectivement les patients qui présentaient une charge virale EBV élevée et qui ont développé une réponse immunitaire suffisante pour maîtriser l'infection sans instauration d'un traitement pré-emptif. Au cours de cette étude, j'ai contribué à la réalisation technique des Elispots IFN γ et à l'analyse et à la mise en forme des résultats.

Dans un premier temps, nous avons recherché quels étaient les facteurs de risque associés à une réactivation EBV afin de vérifier que notre population était similaire à celle des études précédemment publiées. Parmi les 35 patients évaluables, 35% ont présenté une réactivation EBV, 14% d'entre eux nécessitant la mise en place d'un traitement pré-emptif. Nous avons identifié comme principal facteur de risque la présence d'ATG dans le conditionnement ($p = 0.005$). Nous n'avons pas identifié les paramètres suivants, précédemment décrits dans la littérature, comme des facteurs de risque de réactivation EBV : le diagnostic, les donneurs non apparentés, l'incompatibilité HLA, l'intensité du conditionnement ou la GVH aiguë.

Dans un second temps, nous avons recherché quels étaient les facteurs qui influençaient significativement la reconstitution immunitaire cellulaire spécifique anti-EBV. Quatre facteurs ont été identifiés comme favorisant la reconstitution immunitaire spécifique anti-EBV: **le jeune âge** du receveur (< 18 ans) à J60, J100 et J180 post-greffe ; **la réactivation EBV** à J100 et J180 ; le **nombre de lymphocytes T CD4+ et CD8+** ainsi que la réponse proliférative aux mitogènes; le **statut sérologique EBV du donneur** à J60. Nous avons pu observer que la survenue d'une GvH aiguë semblait retarder la reconstitution immunitaire cellulaire spécifique anti-EBV à J100 (résultat à la limite de la significativité).

En analyse multivariée, quatre facteurs ont une influence sur la reconstitution immunitaire cellulaire spécifique anti-EBV à différents temps post-greffe: **le jeune âge du receveur**, la **réactivation EBV**, la **reconstitution lymphocytaire T** et la **GvH aiguë**.

Enfin, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux patients qui ont présenté une réactivation de l'EBV et qui ont spontanément éliminé le virus. Au moment de la

réactivation, les résultats obtenus en Elispot pour 6 patients sur 7 étaient supérieurs à 1000 SFC/10⁶ PBMC, le 7^{ème} patient ayant franchi ce seuil dans les jours qui ont suivi. Deux patients ayant présenté une charge virale supérieure à 40 000 cp/ml ont nécessité la mise en place d'un traitement pré-emptif par Rituximab. Deux injections ont été suffisantes pour observer une négativation de la charge virale associée à une reconstitution immunitaire cellulaire spécifique anti-EBV.

Cette étude nous a conduits à proposer la stratégie thérapeutique suivante pour les patients à haut risque : quand la charge virale EBV-DNA est supérieure à 40 000 cp/ml en l'absence de symptômes cliniques, deux tests Elispot IFN γ permettent d'évaluer la cinétique de reconstitution immunitaire spécifique. Quand la charge virale EBV-DNA est inférieure à 40 000 cp/ml, un résultat d'Elispot IFN γ supérieur à 1000 SFC/10⁶ PBMC apporte l'information qu'une réponse immunitaire de qualité doit permettre l'élimination spontanée du virus. Si le résultat d'Elispot IFN γ est inférieur à 1000 SFC/10⁶ PBMC, il est important de répéter le test afin de vérifier comment évolue la réponse immunitaire.

Cette stratégie thérapeutique doit être évaluée dans une étude prospective.

The clinical value of concomitant Epstein Barr Virus (EBV)-DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Maud DAVENI^{1,2*} MD, Lamia AISSI-ROTHE^{1,3,*}, Véronique VENARD⁴ PHD, Alexandra SALMON² MD, Aude FALENGA¹, Véronique DECOT^{1,3} PHD, Laurence CLEMENT² MD, Jean Marc VIRION⁵ MD, Véronique LATGER-CANNARD⁶ MD,PHD, Cécile TOMOWIAK² MD, Jean François STOLTZ^{1,3} PHD, Pierre BORDIGONI² MD,PHD, and Danièle BENSOUSSAN^{1,3} PHD.

**The first two authors contributed equally to this work*

- 1- CHU de Nancy, Unité de Thérapie cellulaire et Tissus, Vandoeuvre-lès-Nancy, F54511-France
- 2- CHU de Nancy, Unité de Transplantation Médullaire, Hôpital d'Enfants, Vandoeuvre-lès-Nancy, F54511-France
- 3- Nancy Université-UHP, CNRS UMR 7561 and FR 3209 CNRS-INSERM, Nancy, F-54000 -France
- 4- CHU de Nancy, Laboratoire de Virologie, Vandoeuvre-lès-Nancy, F54511-France
- 5- CHU de Nancy, Service d'Epidémiologie et Statistique, Vandoeuvre-lès-Nancy, F54511-France
- 6- CHU de Nancy, Service d'Hématologie Biologique, Vandoeuvre-lès-Nancy, F54511-France

ABSTRACT

Background: Monitoring of EBV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is necessary, but not sufficient, to identify patients at risk of EBV-induced post-transplantation lymphoproliferative disorders (PTLD). Combining this with quantifying EBV-specific cellular immunity was shown to be helpful. In this study, we evaluated the value of IFN γ -Elispot assay in monitoring EBV reactivation after HSCT.

Methods: EBV-DNA load in whole blood was monitored at least weekly using real-time PCR in 40 recipients of HSCT. Quantitative and qualitative T-cell recovery, including EBV-specific T-cell quantification by Elispot assay, were studied 60, 100, 180 and 360 days after HSCT. **Results:** Among the 35 evaluable patients, 14 (35%) presented EBV reactivation, only 2/14 (14%) needing pre-emptive treatment with rituximab. The greatest risk factor for EBV reactivation was the presence of anti-thymocyte globulin (ATG) ($p=0.005$). Using multivariate analysis, four factors were found to significantly influence EBV-specific cellular immune recovery at defined times post-HSCT: EBV reactivation, young age, T-cell recovery and severe acute GVHD.

In those cases where EBV reactivation occurred and cleared spontaneously, Elispot results gave over 1000 spot-forming cells (SFC)/ 10^6 PBMC. **Conclusion:** Elispot assay may be usefully combined with EBV-DNA load monitoring to determine when a patient should receive pre-emptive treatment.

INTRODUCTION

Epstein Barr Virus is a ubiquitous human gamma herpes virus infecting oropharyngeal epithelium and B-cells. T lymphocytes control the proliferation of primary and latent EBV-infected cells. In hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), recipients are strongly T-cell immunocompromized which results in uncontrolled growth and transformation of infected B cells due to the expression of survival signals. The tumor known as post transplantation lymphoproliferative disorder (PTLD) develops from donor B cells and expresses the same full spectrum of latent cycle antigens as *in vitro* lymphoblastoid cell lines (LCL). Peak incidence of tumor formation occurs during the first 6 months after HSCT (1-3%). It then decreases due to the increase in EBV-specific T-cells [1]. Major risk factors for PTLD are [2]: *ex vivo* or *in vivo* T-cell depletion (antithymocyte globulin (ATG), alemtuzumab) [3], severe acute graft *versus* host disease (aGVHD) and donor/recipient HLA mismatch (≥ 2) [4]. Other risk factors reported include age over 50 years at time of transplantation, a second transplantation [5] and a high CD34 cell count ($>1.35 \cdot 10^6/\text{kg}$) [6]. Interestingly, a low rate ($<2\%$) of PTLD was reported among umbilical cord blood transplantations [7-8]. PTLD incidence increases from 1.1% to 3.6 or 8% in the presence of 1, 2 or 3 risk factors, respectively [5]. One year post-HSCT, the only risk factor is chronic graft *versus* host disease (cGVHD).

Currently, the diagnosis of PTLD is presumed from the presence of risk factors, EBV reactivation and clinical signs and is confirmed by histology. Before the availability of therapies that impacted the immunobalance of infected B-cells and specific cytotoxic T-cells, the prognosis of PTLD was very poor (mortality rate over 70%). Thus, preventive treatment combining donor B-cell and T-cell depletion before HSCT was studied and proved successful [9]. As curative treatment, donor lymphocyte infusion (DLI) was successfully administered [10]. EBV-specific cytotoxic T-lymphocytes [11-13] and then monoclonal anti-CD20

1
2
3
4 antibody [14] were developed to repress EBV reactivation for both prophylaxis and curative
5
6 treatment. Because of certain side effects, prospective studies have tried to identify methods
7
8 to target patients at the highest risk of PTLD who could benefit from pre-emptive therapy.
9
10 EBV-DNA load was first studied with semi-quantitative PCR [15] and more recently with
11
12 quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) amplification [16] and was defined
13
14 as a criterion to start pre-emptive or antitumor therapy [17-18]. However, the sensitivity and
15
16 specificity of this qPCR related to the threshold number of copies defining positive predictive
17
18 value and negative predictive value depend on patient-related risk factors [19-20]. Moreover,
19
20 all these studies were performed with different units and, to our knowledge, no universal
21
22 threshold has been defined [21-22]. Although EBV-DNA load monitoring is essential for
23
24 managing EBV infections, it does not discriminate between patients who recover EBV-
25
26 specific immune response and who can control infection from those who do not and who
27
28 therefore need immunotherapy [23]. At the onset of EBV reactivation, quantifying EBV-
29
30 specific cellular immunity, combined with early and close monitoring of EBV reactivation,
31
32 can help to distinguish those patients whose EBV-specific T-cells can control viral
33
34 reactivation from those whose cells cannot [24-25]-[26].

35
36 We report hereafter a retrospective study of EBV-specific T-cell reconstitution post-HSCT by
37
38 Elispot assay using LCLs as antigen-presenting cells. We explored the feasibility and
39
40 reliability of LCLs Elispot assay in a population of 40 patients and looked for factors
41
42 correlating with Elispot results. The aim of this study was to assess the value of IFN γ -Elispot
43
44 assay for monitoring EBV reactivation after HSCT by identifying retrospectively those
45
46 patients with high EBV-DNA load who developed a specific immune response sufficient to
47
48 resolve the infection without any pre-emptive treatment. Associated risk factors were taken
49
50 into account.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIALS AND METHODS

Patients and transplant characteristics (Table 1).

The cohort consisted of 40 consecutive patients (13 children and 27 adults) who underwent an allogeneic HSCT at the Nancy-Brabois Hospital between January and December 2006.

Clinicians were not informed of Elispot results to avoid influencing their clinical behaviour.

The median age was 30 years (range 0-64). Most patients were transplanted for acute leukemia. The conditioning regimen was of reduced intensity for 26 patients and myeloablative for 14 patients. Graft *versus* host disease prophylaxis consisted of combined immunosuppressive therapies. No graft was *ex vivo* T-cell depleted. Antithymocyte globulin (ATG) was given in the conditioning regimen of 29 patients.

Monitoring of EBV reactivation.

Using real-time PCR, recipient whole blood samples were checked for the presence of EBV-DNA at least once a week (twice a week during the first 3 months after transplantation and in case of reactivation).

Quantitative real-time PCR. Briefly, DNA was extracted from 200 μ l of EDTA-treated whole blood with the QIAamp blood kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The real-time assay was routinely performed as described by Gärtner *et al.* [22] on a Light Cycler[®] 2.0 Real-Time PCR System (Roche, Meylan, France), using the MIX reaction 5X from Light Cycler Fast Start DNA Master Plus (Roche, Meylan, France). qPCR amplified a EBV VCA gene region sequence using the primers: P23-LO 5'TGG CGT TGG GGT CGT TTG AT 3' and P23-UP 5'CGC CTG GCT CGC CTG GAG T 3', and the following probes: EBFL probe 5' GCG GAG GCA CTG GAG CAG AAG GAA CA Fluo 3' and EBLC probe 5' (LCRed 640) AGG TAG ACG AGG CAC AGG CAC CCC CT 3'. For each PCR, a 20 μ L mixture contains: 4 μ L of MIX reaction 5X from Light cycler Fast Start DNA Master Plus, 2 μ L H₂O, 2 μ L EBLC

1
2
3
4 probe at 1.5 μ M, 2 μ L EBLF probe at 1.5 μ M, 1 μ L primer P23-LO sens at 10 μ M, 1 μ L primer
5
6 P23-UP antisens at 10 μ M, 1.5 U of *Taq* DNA polymerase, 200 μ M of each dGTP, dATP,
7
8 dCTP, and dTTP (Roche Diagnostics, Meylan, France). A plasmid DNA containing a part of
9
10 the p23 sequence of the VCA gene with a deletion of 30 bp (kindly provided by Prof. Gärtner
11
12 and Pr. Müller-Lantzsch, Homburg, Germany), was used as the external standard, was serially
13
14 diluted and used as a quantification standard for the real-time qPCR. Appropriate negative
15
16 and positive controls were included in all tests.
17
18

19
20 PCR conditions (external and internal) were as follows: activation 95°C for 8 min; 45 cycles
21
22 of 95°C (10 s), 60°C (10 s for the fluorescence acquisition), and 72°C (18 s). Results were
23
24 calculated as the number of EBV genomic equivalent copies per millilitre (cp/mL) of whole
25
26 blood [22]. The detection limit of this assay was 1000 cp/mL.
27
28
29
30
31

32 **Monitoring of cellular immunity reconstitution**

33
34 Quantitative and qualitative T-cell recovery was studied in recipient blood samples at days 60,
35
36 100, 180 and 360 after allogeneic HSCT.
37
38

39 **Flow cytometry.** Lymphocyte phenotype was performed on EDTA whole blood samples, with
40
41 a FACSCalibur flow cytometer (Beckton Dickinson, San Jose, USA), by direct
42
43 immunofluorescence using the following specific conjugated monoclonal antibodies : anti-
44
45 CD3, -CD4, -CD8, -CD19, -CD16 and CD56 (Becton Dickinson, San Jose, USA).
46
47

48 **Mitogen and antigen induced proliferation.** Proliferation assays in response to PHA, PMA-
49
50 ionomycin were performed as previously described [27].
51
52
53
54

55 **Monitoring of EBV-specific T-lymphocyte reconstitution**

56
57 EBV-specific T-cells were detected in recipient blood samples at days 60, 100, 180 and 360
58
59 after allogeneic HSCT, against LCL culture obtained from donors.
60

Isolation of PBMC and generation of LCL

PBMC were isolated from donor peripheral blood by Ficoll gradient density centrifugation. For LCL generation, 2×10^6 PBMC were incubated with 0.4 mL supernatant from the B95-8 EBV-producer cell line for 1 hour at 37°C under shaking. Cyclosporine A (Novartis, Pharma S.A., Reuil-Malmaison, France) was added directly to PBMC infected at day 0, 2, 4, and 6 in order to inhibit specific T-cells. The culture was incubated at 37°C with 5% CO₂ in culture medium (RPMI Glutamax: (Invitrogen, Gibco BRL Life Technologies, Paisley, Scotland) with antibiotics and supplemented with 20% Fetal Bovine Serum (FBS)). LCL were expanded in this medium. After 3 to 4 weeks, enough LCL was available to be used in an Elispot assay.

ELISPOT assay

Elispot assay was performed as previously described[28]. Briefly, after overnight coating of 96 well-Multiscreen Immobilon^R-P plates (MAIPS) (Millipore, Bedford, MA) with a monoclonal anti-human IFN- γ antibody, 1-D1K (Mabtech, Stockholm, Sweden), donor LCL were added to each well at 5×10^4 cells/well in RPMI supplemented with 20% (FBS), as antigen presenting cells. Then, thawed PBMC were added in triplicate at 1×10^6 cells/ml and incubated for 20 hours at 37°C. Negative controls of each type of cell were incubated alone with 100 μ L RPMI 20% FBS. Positive controls were recipient cells incubated with PHA at 1 μ g/mL. Allogeneic T-cell response was studied against HLA-mismatched LCL. After undisturbed incubation for 20 hours at 37°C with 5% CO₂, the cells were discarded and revelation using a second biotinylated anti-human IFN- γ 7B 6-1 biotin (Mabtech), a streptavidin conjugated alkaline phosphatase (Mabtech) and an alkaline phosphatase-conjugate substrate kit (Biorad, Richmond, CA) was performed. After 15 minutes, the reaction was stopped, the plates washed and air-dried. Dark spots were counted using an automated Elispot reader: Bioreader 4000 PRO -S (BIO-SYS, SERLABO, Entraigues sur la

1
2
3
4 Sorgues, France). The number of specific T-cell was calculated after subtracting negative
5
6 control values. Results were expressed in spot-forming cells (SFC) per 10^6 PBMC.
7

8
9 According to the Society of Biological Therapy, Elispot assays are defined by the detection of
10
11 a 2 or 3 fold increase over unstimulated control wells [29].
12

13 14 15 **Statistical analysis** 16

17
18 Wilcoxon's nonparametric test was used to compare quantitative factors. The X2 test (Pearson
19
20 or Fischer's exact test, two tailed) was used to compare nominal or discrete factors and
21
22 Spearman rank correlation was used for assessing relationships between variables. For all
23
24 tests, a p value < 0.05 was considered significant. For multivariate analysis, a p value < 0.10
25
26 was considered significant. The analyses were generated using SAS/STAT software, Version
27
28 9.1.3 of the SAS System for Windows. Copyright © 2002-2003 SAS Institute Inc.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

Clinical outcome

Patient characteristics after stem cell transplantation are described in Table 2. Unfortunately, 5 patients were excluded from the study: 3 because of early transplant-related mortality (TRM) and 2 because of early relapse before D60. Among the 35 evaluable patients, surviving over D100, 29/35 presented an aGVHD (grade ≥ 2) and 23/35 had cGVHD. Viral infections such as cytomegalovirus (CMV), herpes simplex virus (HSV), adenovirus (ADV), human herpes virus 6 (HHV6), varicella zona virus (VZV), respiratory syncytial virus (RSV) were diagnosed for 25 patients and 14 patients presented EBV reactivation.

Incidence of EBV reactivation and PTLD

In this cohort, EBV reactivation was detected in 14 patients (35%) (Table 3). The median time to first reactivation was 67 days (range 38-303). EBV clearance occurred spontaneously for 12 patients while the 2 remaining patients received pre-emptive treatment for presumed PTLD (rituximab 375 mg/m², one infusion per week until symptom regression). Noticeably, all the 14 patients received ATG in the conditioning regimen. Our study confirmed that treatment with ATG is the greatest risk factor for EBV reactivation (p=0.005). The incidence of EBV reactivation was 51.8% (14/27) in ATG+ HSCT and 0% (0/8) in ATG- HSCT. We did not identify the following as risk factors in EBV reactivation: diagnosis of underlying disease, unrelated donor, HLA mismatch, conditioning regimen intensity or acute GVHD.

Simultaneous EBV-specific and general T-cell immune reconstitution

Because delayed recovery of the immune system might be of importance in the onset and progression of EBV reactivation, the absolute lymphocyte counts of uninfected patients and EBV reactivating patients were compared. The time to lymphocyte reconstitution (set at $0.2 \cdot 10^9$ lymphocytes/L) was the same for both groups but patients with EBV reactivation had

1
2
3
4 a reverse CD4/CD8 ratio just after the onset of virus reactivation ($p=0.08$). This ratio persisted
5
6 until clearance of EBV (Figure 1a).
7
8
9

10 **Factors influencing EBV-specific T-cell reconstitution studied by Elispot assays**

11
12 Among the 35 evaluable patients, 4 had no Elispot results available because of donor LCL
13
14 culture failure, 1 patient died rapidly after D60, one patient was lost to follow-up and one
15
16 patient was not collected at day 60. Our study was based on 28 Elispot assays at day 60, 24 at
17
18 day 100, 27 at day 180 and 22 at day 360 because of TRM.
19
20
21

22 We observed five factors modulating the recovery of EBV-specific cellular immunity. The
23
24 young age of recipients (<18 years) resulted in significantly higher Elispot results at days 60,
25
26 100, 180 (Table 4a) and EBV reactivation (before Elispot assay was performed) at days 100
27
28 and 180 (Table 4b). As expected, significant correlations were observed between Elispot
29
30 assay results and CD8, CD4 T-cell counts and mitogen proliferative assays (Figures 1b and
31
32 1c). Moreover, donor EBV+ serological status influenced EBV-specific T-cell increase at day
33
34 60 ($p < 0.05$) and acute GVHD reactivation delayed EBV-specific T-cell recovery ($p = 0.057$
35
36 at D100) but we had insufficient data to reach significance at each time post transplant. Viral
37
38 reactivation (other than EBV) and the CD19 and CD3 cell counts in the graft infused had no
39
40 significant impact on EBV-specific T-cell recovery.
41
42
43
44
45

46 In multivariate analysis, the young age of recipients (D180, $p < 0.008$), EBV reactivation
47
48 (D100 and D180, $p = 0.11$), aGVHD (D60, $p < 0.05$) and T-cell reconstitution (D60, D100,
49
50 D360, $p < 0.01$) were the only parameters significantly correlated with specific reconstitution.
51
52
53
54
55

56 **Elispot assay threshold of EBV-specific T-cell reconstitution**

57
58 Assessment of the level of T-cell reconstitution at the time of EBV reactivation is relevant for
59
60 clinical decision-making. For 9 patients with an Elispot evaluation among the 14 with EBV

1
2
3
4 reactivation, we tried to find a threshold which could determine effective EBV-specific
5
6 cellular immunity and thus target those recipients who need immunotherapy. In our cohort,
7
8 7 patients had EBV reactivation which decreased spontaneously and 2 were treated by
9
10 immunotherapy (Figure 2). At the time of EBV reactivation, 6 out of 7 patients presented
11
12 EBV-specific T-cell frequency over 1000 SFC/10⁶ PBMC and the last patient rapidly
13
14 recovered a result above this arbitrary threshold (Table 5).
15
16

17
18 Two patients were treated because their EBV-DNA load exceeded 40 000 cp/mL with PTLN
19
20 compatible symptoms. They received only 2 infusions of rituximab followed by clearance of
21
22 EBV-DNA load associated with EBV-specific T-cell increase (Figure 2a and 2b).
23
24 Retrospectively, we assume that the second rituximab infusion was performed when the EBV-
25
26 DNA load had already cleared.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DISCUSSION

EBV-LPD prognosis after allogeneic HSCT has improved over recent years, mostly due to close PCR-EBV load monitoring and implementation of innovative pre-emptive immunotherapy. However, high risk patients are still not identified clearly and may be abusively treated. Combining EBV-DNA load assessment with EBV-specific immune monitoring has been shown to be very helpful [24-25]. We report here a retrospective, one year study investigating EBV infection and EBV-specific immune recovery using the functional IFN γ Elispot assay in 40 allogeneic HSCT patients. As previously reported, we identified ATG treatment as the greatest risk factor associated to EBV reactivation. By multivariate analysis, four factors were found to significantly influence EBV-specific cellular immune recovery: EBV reactivation (D100 and D180), young age (<18 years old) (D180), T-cell recovery (D60, D100 and D360) and severe acute GVHD (aGVHD, D60). Finally, we observed that when EBV reactivation occurred and cleared spontaneously, Elispot results were over 1000 spot-forming cells (SFC)/10⁶ PBMC, suggesting a relevant threshold.

Elispot assays with EBV-LCL as antigen-presenting cells offer advantages over other techniques. Limiting dilution assay (LDA) is labor intensive (12 days to generate results) and underestimates the frequencies of antigen-reactive T-cells. Elispot assay requires fewer cells, less time and gives values 2 to 10 fold higher than those obtained with LDA [30]. Measuring T-cell binding peptide-HLA tetramers [31] is a more accurate and sensitive approach [32]. However, it is HLA-restricted and detects the presence of EBV epitope-specific T-cells without any requirement for function, whereas Elispot assay with LCL is not HLA-restricted and relies on the ability to secrete cytokine upon activation. Moreover, when T-cell frequencies measured by Elispot assay are below 20/10⁶ PBMC, tetramer and IFN γ + Intra-Cytoplasmic Cytokine (ICC) staining, both performed by cytometric analysis [33-34] fail to reach a signal, attesting the sensitivity limits imposed by flow cytometry detection. Elispot

1
2
3
4 assay may provide advantages for detecting such antigen-specific T-cells at lower frequencies
5
6 [35-36], without HLA-restriction, and is particularly relevant in the analysis of an
7
8 immunocompromized population [37]. However, obtaining LCL is time consuming, and must
9
10 be anticipated at the time of HSCT. Recent availability of overlapping peptide pools for the
11
12 EBV immunodominant proteins will give more flexibility.

13
14
15 Compared to adult recipients, children had significantly faster EBV-specific immune
16
17 reconstitution. Although we did not show any significant correlation between a higher number
18
19 of infused T-cells and a faster T-cell reconstitution after HSCT, we did observe a correlation
20
21 between EBV seropositive donors and higher EBV-Elispot results, suggesting, firstly, an
22
23 effective peripheral T-cell expansion against EBV antigens and, secondly, the absence of
24
25 thymus involvement [38], as might be expected in children. However, it may not be the only
26
27 mechanism involved as one child (patient 35), who received HSCT from an EBV
28
29 seronegative donor, experienced a dramatic early increase in EBV-specific IFN γ -positive
30
31 cells.
32
33
34
35

36
37 Patients with EBV reactivation had significantly higher Elispot results at D100 and D180.
38
39 Although no difference in lymphocyte count was observed, a reverse CD4/CD8 ratio occurred
40
41 at the onset of EBV reactivation. Although we lack absolute evidence, the predominant
42
43 increase in CD8+T-cells, simultaneous to EBV reactivation (correlated to Elispot results at
44
45 D60 and D100), could result from the expansion of EBV-specific CD8 T-cells. Persistent
46
47 EBV-specific immune response relies on CD4+ T-cells as suggested by significant
48
49 correlations between Elispot results and CD4 T-cell counts and also mitogen proliferative
50
51 assay at D100 and D360. EBV persists in the target cells due to an immunobalance between
52
53 the proliferation of infected cells and the response of virus-specific T-cells [39], particularly
54
55 CD4+ T-cells with T-helper 1 (Th1)-like function and CD4+ and CD8+ cytotoxic T-cells [40].
56
57
58
59 From 180 to 360 days after allogeneic HSCT, EBV immune regulation seems to be based on
60

1
2
3
4 low IFN γ secreting T-cells. It would be interesting to study cytokine patterns of the EBV-
5
6 specific T-cells after D180 by, for example, a concomitant IL2 Elispot. It could be that these
7
8 cells, after expansion, no longer secrete IFN γ but IL2, which has been described as a
9
10 functional signature of antigen clearance [41].

11
12 Cwynarski *et al.* [42] have defined a cut-off level for CMV-specific T-cell count protecting
13
14 against CMV infection, but when EBV replicates, the antigenic load quickly expands due to
15
16 B-cell proliferation, and T-cells continuously adapt to it [25]. In our centre, direct
17
18 quantification of specific T-cells may provide a threshold value useful for controlling viral
19
20 reactivation. In order to complete our centre guidelines based on an EBV-DNA load threshold
21
22 of 40 000 cp/mL, we propose the following strategy for high risk patients, which requires
23
24 confirmation in a prospective study. When EBV-DNA load is over 40 000 cp/mL and in the
25
26 absence of symptom, two Elispot assays are adequate for evaluating EBV-specific T-cell
27
28 recovery kinetics. When EBV-DNA load is lower than 40 000 cp/mL, one Elispot result over
29
30 1000 SFC/10⁶ PBMC is sufficient to allow for spontaneous EBV clearance. However, if the
31
32 Elispot result is lower than 1000 SFC/10⁶ PBMC, the assay should be repeated in order to
33
34 detect any increase in EBV-specific T-cells.
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 Performing EBV Elispot can reduce rituximab indications to patients with insufficient EBV-
45
46 specific T-cell reconstitution, in order to limit detrimental effects induced by rituximab [43].
47
48 It may be also a useful tool to identify patients lacking specific immune reconstitution who
49
50 could benefit from specific CTL infusion, as well as in the follow-up of EBV T-cell recovery
51
52 after specific CTL infusion [6].
53
54

55
56 In conclusion, EBV Elispot assay together with EBV-DNA load determination may prove
57
58 relevant tools to determine whether a patient needs pre-emptive therapy for PTLD and for
59
60 following patients after immunotherapy.

1
2
3 **ACKNOWLEDGEMENTS**
4

5
6 This work was supported by a grant from the *Direction de la Recherche Clinique* from Nancy
7
8 Hospital. We wish to thank Mrs Maix, Mrs Masson, Mrs Brassard, Mrs Binot-Saintot, Mrs
9
10 Haler, and Mr Burton from the UTCT for their excellent technical assistance.
11

12
13 There is no conflict of interest.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Review

REFERENCES

1. Lucas KG, Small TN, Heller G, Dupont B and O'Reilly RJ. The development of cellular immunity to Epstein-Barr virus after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:2594-2603
2. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, et al. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood* 1999;94:2208-16
3. Hale G, Waldmann H. Risks of developing Epstein-Barr virus-related lymphoproliferative disorders after T-cell-depleted marrow transplants. *CAMPATH Users. Blood* 1998;91:3079-3083
4. Gerritsen EJ, Stam ED, Hermans J, et al. Risk factors for developing EBV-related B cell lymphoproliferative disorders (BLPD) after non-HLA-identical BMT in children. *Bone Marrow Transplant* 1996;18:377-382
5. Landgren O, Gilbert ES, Rizzo JD, et al. Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2009;113:4992-5001
6. van Esser JW, Niesters HG, van der Holt B, et al. Prevention of Epstein-Barr virus-lymphoproliferative disease by molecular monitoring and preemptive rituximab in high-risk patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002;99:4364-4369
7. Brunstein CG, Weisdorf DJ, DeFor T, et al. Marked increased risk of Epstein-Barr virus-related complications with the addition of antithymocyte globulin to a nonmyeloablative conditioning prior to unrelated umbilical cord blood transplantation. *Blood* 2006;108:2874-80
8. Barker JN, Martin PL, Coad JE, et al. Low incidence of Epstein-Barr virus-associated posttransplantation lymphoproliferative disorders in 272 unrelated-donor umbilical cord blood transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:395-399
9. Cavazzana-Calvo M, Bensoussan D, Jabado N, et al. 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. *Br J Haematol* 1998;103:543-551
10. Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D, et al. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994;330:1185-1191
11. Rooney CM, Heslop HE and Brenner MK. EBV specific CTL: a model for immune therapy. *Vox Sang* 1998;74 Suppl 2:497-498
12. Haque T, Wilkie GM, Jones MM, et al. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 2007;110:1123-1131
13. Gustafsson A, Levitsky V, Zou JZ, et al. Epstein-Barr virus (EBV) load in bone marrow transplant recipients at risk to develop posttransplant lymphoproliferative disease: prophylactic infusion of EBV-specific cytotoxic T cells. *Blood* 2000;95:807-814
14. Kuehnle I, Huls MH, Liu Z, et al. CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hemopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2000;95:1502-1505
15. Sirvent-Von Buelzingsloewen A, Morand P, Buisson M, et al. A prospective study of Epstein-Barr virus load in 85 hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 2002;29:21-28
16. Kimura H, Morita M, Yabuta Y, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999;37:132-136
17. Meerbach A, Wutzler P, Hafer R, Zintl F and Gruhn B. Monitoring of Epstein-Barr virus load after hematopoietic stem cell transplantation for early intervention in post-transplant lymphoproliferative disease. *J Med Virol* 2008;80:441-454

18. Stevens SJ, Verschuuren EA, Pronk I, et al. Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of posttransplant lymphoproliferative disease in high-risk patients. *Blood* 2001;97:1165-1171
19. Aalto SM, Juvonen E, Tarkkanen J, et al. Epstein-Barr viral load and disease prediction in a large cohort of allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2007;45:1305-1309
20. Juvonen E, Aalto S, Tarkkanen J, Volin L, Hedman K and Ruutu T. Retrospective evaluation of serum Epstein Barr virus DNA levels in 406 allogeneic stem cell transplant patients. *Haematologica* 2007;92:819-825
21. Wagner HJ, Cheng YC, Huls MH, et al. Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. *Blood* 2004;103:3979-3981
22. Gartner BC, Fischinger J, Schafer H, Einsele H, Roemer K and Muller-Lantzsch N. Epstein-Barr viral load as a tool to diagnose and monitor post-transplant lymphoproliferative disease. *Recent Results Cancer Res* 2002;159:49-54
23. Meij P, van Esser JW, Niesters HG, et al. Impaired recovery of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8+ T lymphocytes after partially T-depleted allogeneic stem cell transplantation may identify patients at very high risk for progressive EBV reactivation and lymphoproliferative disease. *Blood* 2003;101:4290-4297
24. Annels NE, Kalpoe JS, Bredius RG, et al. Management of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation after allogeneic stem cell transplantation by simultaneous analysis of EBV DNA load and EBV-specific T cell reconstitution. *Clin Infect Dis* 2006;42:1743-1748
25. Clave E, Agbalika F, Bajzik V, et al. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation in allogeneic stem-cell transplantation: relationship between viral load, EBV-specific T-cell reconstitution and rituximab therapy. *Transplantation* 2004;77:76-84
26. Gottschalk S, Heslop HE and Rooney CM. Adoptive immunotherapy for EBV-associated malignancies. *Leuk Lymphoma* 2005;46:1-10
27. Bordigoni P, Faure G, Bene MC, et al. Improvement of cellular immunity and IgA production in immunodeficient children after treatment with synthetic serum thymic factor (FTS). *Lancet* 1982;2:293-297
28. Aissi-Rothe L, Decot V, Venard V, et al. Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother* 2010;33:414-424
29. Comin-Anduix B, Gualberto A, Glaspy JA, et al. Definition of an immunologic response using the major histocompatibility complex tetramer and enzyme-linked immunospot assays. *Clin Cancer Res* 2006;12:107-116
30. Tan LC, Gudgeon N, Annels NE, et al. A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* 1999;162:1827-1835
31. Kuzushima K, Hayashi N, Kudoh A, et al. Tetramer-assisted identification and characterization of epitopes recognized by HLA A*2402-restricted Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cells. *Blood* 2003;101:1460-1468
32. Marshall NA, Howe JG, Formica R, et al. Rapid reconstitution of Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2000;96:2814-2821
33. Koehne G, Smith KM, Ferguson TL, et al. Quantitation, selection, and functional characterization of Epstein-Barr virus-specific and alloreactive T cells detected by intracellular interferon-gamma production and growth of cytotoxic precursors. *Blood* 2002;99:1730-1740
34. Kuzushima K, Hoshino Y, Fujii K, et al. Rapid determination of Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T-cell frequencies by flow cytometry. *Blood* 1999;94:3094-100
35. Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Huls H, et al. Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2006;108:1797-1808

- 1
2
3
4 36. Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Yvon E, et al. Selective depletion of donor alloreactive
5 T cells without loss of antiviral or antileukemic responses. *Blood* 2003;102:2292-2299
6 37. Chakrabarti S, Milligan DW, Pillay D, et al. Reconstitution of the Epstein-Barr virus-
7 specific cytotoxic T-lymphocyte response following T-cell-depleted myeloablative and
8 nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2003;102:839-842
9 38. Chen X, Barfield R, Benaim E, et al. Prediction of T-cell reconstitution by assessment of
10 T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in
11 pediatric patients. *Blood* 2005;105:886-893
12 39. Klenerman P, Hill A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat*
13 *Immunol* 2005;6:873-879
14 40. Nazaruk RA, Rochford R, Hobbs MV and Cannon MJ. Functional diversity of the CD8(+)
15 T-cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the pathogenesis of EBV-
16 associated lymphoproliferative disorders. *Blood* 1998;91:3875-3883
17 41. Pantaleo G, Harari A. Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring
18 virus-associated diseases. *Nat Rev Immunol* 2006;6:417-423
19 42. Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, et al. Direct visualization of cytomegalovirus-
20 specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2001;97:1232-
21 1240
22 43. Masjosthusmann K, Ehlert K, Eing BR, et al. Delay in B-lymphocyte recovery and
23 function following rituximab for EBV-associated lymphoproliferative disease early post-
24 allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:679-684
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

LEGENDS**Figure 1: Correlation between general T-cell reconstitution after HSCT and Elispot results.**

SI, stimulation index; LTT, lymphoblastic transformation test. Spearman rank correlation was used for assessing relationships between variables.

1a. Reverse CD4/CD8 ratio for patients with EBV reactivation compared to patients without EBV reactivation at day 100. Wilcoxon's nonparametric test was used to compare quantitative factors. Lymphocyte subset counts were determined at days 60, 100, 180, 360. We observed that patients with EBV reactivation had a reverse CD4/CD8 ratio just after the onset of reactivation ($p=0.08$).

1b. CD8 T-cell count correlates to Elispot results at days 60 ($p = 0.01$) and 100 ($p < 0.01$). CD4 T-cell count at days 100 ($p < 0.01$) and 360 ($p = 0.03$) correlates to Elispot results.

1c. There is a significant correlation between Elispot assay results and mitogen proliferative assay, performed with PHA and PMA ionomycin, at day 100 ($p = 0.03$ and $p = 0.01$, respectively) and day 360 ($p = 0.03$ and $p < 0.01$, respectively).

Figure 2: EBV-DNA load studied with Elispot results.**2a, 2b. Two patients treated with rituximab.**

↓, rituximab

The first patient presented EBV reactivation which reached 194200 cp/mL in 7 days, with an Elispot result at day 7 showing reactivation at 1880 SFC/ 10^6 PBMC. This patient received a weekly infusion of rituximab $375\text{mg}/\text{m}^2$ twice and total clearance of EBV viremia occurred on the 6th day after the peak load. Simultaneously, Elispot reached 4330 SFC/ 10^6 PBMC which could explain why this patient with very fast and high EBV reactivation cleared the EBV-DNA load after only one infusion of rituximab. For the second patient, the EBV-DNA

1
2
3
4 load reached 64 000 cp/mL at day 160 when the Elispot result at day 100 was 430
5
6 SFC/10⁶PBMC, but the Elispot result at day 180 was 1440 SFC/10⁶PBMC.
7

8
9 **2c-2i. Patients with EBV reactivation who experienced clearance of EBV without**
10 **rituximab**

11
12
13 **2j. Example of one patient without EBV reactivation**
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Review

TABLES

Table 1. Patient characteristics

Patients	Characteristics	Number
TOTAL		40
SEX	MALE	20
	FEMALE	20
MEDIAN AGE		30 YEARS
DIAGNOSIS	AML	18
	ALL	8
	LYMPHOMA	5
	MYELOYDYSPLASIA	2
	APLASTIC ANEMIA	1
	CONGENITAL IMMUNODEFICIENCY	1
	HEMOGLOBINOPATHY	1
	CHRONIC MYELOID LEUKEMIA	1
	CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA	1
	OTHER	2
RISK	HIGH	18
	LOW	22
CONDITIONING REGIMEN	MYELOABLATIVE	14
ATG	THYMOGLOBULIN	5
	FRESENIUS 40MG/KG	18
	FRESENIUS <40MG/KG	6
	NO ATG	11
GVHD PROPHYLAXIS	CYCLOSPORINE+MTX	11
	CYCLOSPORINE+MMF	26
	CYCLOSPORINE+SOLUMEDROL	2
	CYCLOSPORINE ALONE	1
DONOR	SIBLING	17
	UD	23
HLA IDENTITY	9/10	6
	10/10	27
	3/6	1
	4/6	4
	5/6	1
	6/6	1
GRAFT ORIGIN	BONE MARROW	17
	PBSC	16
	UCB	7
EBV SEROLOGY	D+/R+	26
	D+/R-	4
	D-/R+	7
	D-/R-	3
MEAN GRAFT CONTENT	NUCLEAR CELLS.10 ⁶ /KG	3,8
	CD34.10 ⁶ /KG	4,14
	CD3.10 ⁷ /KG	10,49
	CD19.10 ⁷ /KG	2,6
	CFU-GM.10 ⁴ /KG	131,2

AML, acute myeloblastic leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; ATG, antithymocyte globulin ; GVHD, graft *versus* host disease; MTX, methotrexate; MMF, mycophenolate mofetil; UD, unrelated donor; PBSC, peripheral blood stem cells; UCB, unit cordon blood; D+, positive EBV serology; D-, negative EBV serology.

Twenty-six patients (65%) were transplanted for acute leukemia, 18 patients were considered to be at high risk of underlying disease and 3 patients were transplanted for the second time after relapse. The conditioning regimen was of reduced intensity for 26 patients (including fludarabine/melphalan for 12/26 patients), and myeloablative for 14 patients (including 9 ICT/endoxan and 5 busulfan/cyclophosphamide). Graft *versus* Host disease prophylaxis consisted of an association of cyclosporine A (3mg/kg) and a short course of methotrexate for 11 patients, or cyclosporine A and mycophenolate mofetil for 26 patients. Antithymocyte globulin (ATG) was given in the conditioning regimen of 29 patients. Thirty recipients had a donor with positive EBV serology (EBV+), and 26 recipients were also EBV+ when the donor was EBV+. UCB were considered EBV-.

Table 2. Patient outcome after HSCT

Follow-up post-graft		Number
EVALUABLE ELISPOT PATIENTS	D60	28
	D100	27
	D180	27
	D360	23
MEDIAN DAY OF EBV REPLICATION ONSET		67
EBV LOAD	UNDETECTABLE	21
	DETECTABLE BUT <40 000 CP/ML	10
	>40 000 CP/ML	4
PTLD	PRESUMED	2
	CONFIRMED	0
TREATMENT	RITUXIMAB	2
	OTHER IMMUNOTHERAPY	0
OTHER VIRAL INFECTION	CMV	12
	HHV6	4
	HSV	5
	VZV	2
	SRV	2
ACUTE GVHD	GRADE I	4
	GRADE II	27
	GRADE III	1
	GRADE IV	1
	NO	7
CHRONIC GVHD	LIMITED	14
	EXTENSIVE	9
	NO	12
DEATH	RELAPSE	7
	INFECTIONS (EXCEPTED EBV)	5
	CHRONIC GVHD	2
	OTHER	1

EBV, Epstein Barr virus; PTLN, post transplantation lymphoproliferative disorder; CMV, cytomegalovirus; HHV6, human herpes virus 6; HSV, herpes simplex virus; VZV, varicella zona virus; SRV, syncytial respiratory virus; GVHD, graft *versus* host disease.

5 patients were excluded from this study: 3 because of early Transplant-Related Mortality (TRM) and 2 because of early relapse before D60. We could analyse 28 Elispot assays at day 60, 24 at day 100, 27 at day 180 and 22 at day 360 because of TRM. Presumed diagnosis of PTLN included EBV reactivation, clinical symptoms such as adenomegaly, liver or spleen enlargement, or lung or central nervous system involvement. Confirmed diagnosis of PTLN was defined by histopathologic proof (disruption of underlying cellular architecture by a lymphoproliferative process, presence of mono or oligoclonal cell population with evidence of EBV infection). Among the 35 evaluable patients, surviving over D100, 29/35 presented an aGVHD (grade ≥ 2) and 23/35 had a cGVHD. Fourteen patients presented EBV replication and 25 patients presented other viral infections.

Table 3. Patients with EBV reactivation after HSCT

Patients	Age (year)	Diagnosis	ATG	EBV serostatus (donor/recipient)	Grade of aGVHD	cGVHD	Start of EBV Reactivation (days after HSCT)	PTLD symptoms	Treatment	Peak DNA load (cp/mL)	EBV Elispot > 1000 SFC/10 ⁶ (day after HSCT)
2	30	AML CR1	+	D+/R+	2	EXTENSIVE	63	NO, SP C		8645	360
4	6	ALL	+	D+/R-	3	EXTENSIVE	59	NO, SP C		16610	100
12	2	T-ALL CR1	+	D+/R+	2	NO	40	NO, SP C		27985	< 60
18	47	AML PHI +	+	D+/R+	2	LIMITED	38	NO, SP C		2451	ND
19	6	APLASTIC ANEMIA	+	D+/R-	2	EXTENSIVE	39	PULMONARY + SPLENIC LESIONS	RITUXIMAB	194200	< 60
23	39	AML	+	D+/R+	2	LIMITED	94	NO, SP C		2969	< 60
24	18	HODGKIN LYMPHOMA	+	D+/R+	2	LIMITED	69	NO, SP C		18155	100
28	46	SEZARY SYNDROME	+	D+/R+	2	LIMITED	127	NO, SP C		81750	ND
29	53	MDS	+	D+/R+	1	NO	87	NO, SP C		3365	ND
35	7	SICKLE CELL DISEASE	+	D-/R+	1	NO	64	NO, SP C		45500	< 60
36	36	CML	+	D+/R+	0	EXTENSIVE	168	NO, SP C		2874	180
37	3	B-ALL	+	D+/R-	2	LIMITED	160	SINUSITIS + LYMPHADENOPATHY	RITUXIMAB	64000	180
38	30	HODGKIN LYMPHOMA	+	D+/R+	1	LIMITED	303	NO, SP C		6280	180
40	51	AML	+	D+/R+	0	NO	63	NO, SP C		2250	ND

AML, acute myeloblastic leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; MDS, myelodysplasia; aGVHD, acute graft *versus* host disease; cGVHD, chronic graft *versus* host disease; PTLD, post transplantation lymphoproliferative disease; Sp C, Spontaneous clearance; ND, Not done.

Table 4a. Comparison of Elispot results 60, 100, 180, 360 days after HSCT according to the age (< or ≥ 18 years old)

Days after HSCT	Mean of Elispot results for patients		Statistical Significance
	< 18 years old (SFC/10 ⁶ PBMC)	≥ 18 years old (SFC/10 ⁶ PBMC)	
D60 (n= 28)	1589	329	p = 0.01
D100 (n= 24)	2078	417	p < 0.01
D180 (n= 27)	2464	671	p < 0.01
D360 (n= 22)	1114	1131	p > 0.05

Table 4b. Comparison of Elispot results 60, 100, 180, 360 days after HSCT for patients with EBV reactivation against patients without EBV reactivation.

Days after HSCT	Mean of Elispot results for patients		Statistical Significance
	with EBV reactivation (SFC/10 ⁶ PBMC)	without EBV reactivation (SFC/10 ⁶ PBMC)	
D60 (n= 28)	2843	643	p = 0.08
D100 (n= 24)	2360	567	p = 0.01
D180 (n= 27)	2090	751	p = 0.01
D360 (n= 22)	1200	1084	p > 0.05

n = patient number. Wilcoxon's nonparametric test was used to compare quantitative factors

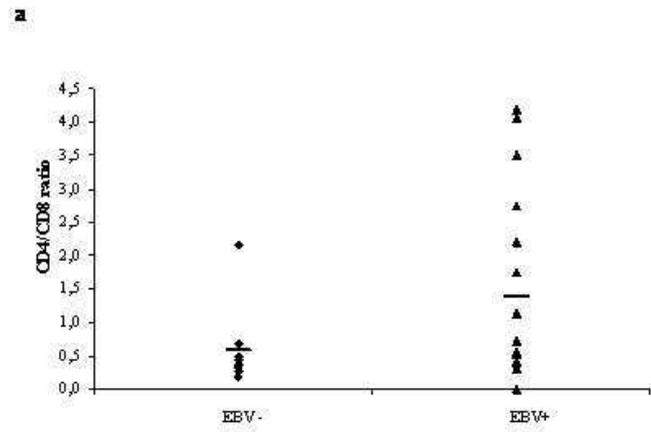
Table 5. EBV clearance for 7 patients with Elispot results >1000 SFC/10⁶PBMC

Patients	Start of EBV replication (days after HSCT)	Peak load (cp/mL)	Time during EBV replication (days)	Elispot		
				D60	D100	D180
4	59	16610	52	1830	4030	ND
12	40	27985	27	4100	5940	2140
23	94	2969	1	1440	1150	170
24	69	18155	4	2940	1830	480
35	64	45500	365	1190	1980	1470
36	168	2874	1	180	1210	420
38	303	6280	8	100	1030	1410

EBV, Epstein Barr Virus; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; D, days after transplantation; ND, not done. ELISPOT assays were used to determine the frequency of EBV-specific T-cells in patient PBMC producing interferon gamma in response to stimulation with donor LCL [40]. In 6 out of 7 cases, Elispot results ranged from 1150 to 4040 SFC/10⁶PBMC. In the remaining case, we saw the onset of EBV replication at day 59 after HSCT, and this replication persisted for four months before decreasing. Despite a low EBV DNA replication sometimes occurred after these 4 months, EBV clearance began simultaneously to a rapid increase in EBV-specific T-cells detected by Elispot assay from 160 SFC/10⁶ PBMC (at the beginning of the reactivation) to 1830 SFC/10⁶ PBMC at the time of decreasing viral load.

Transplant Infectious Disease

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

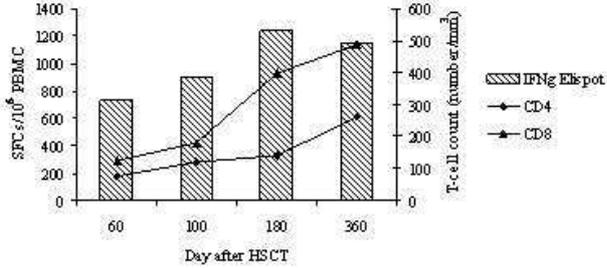


190x254mm (72 x 72 DPI)

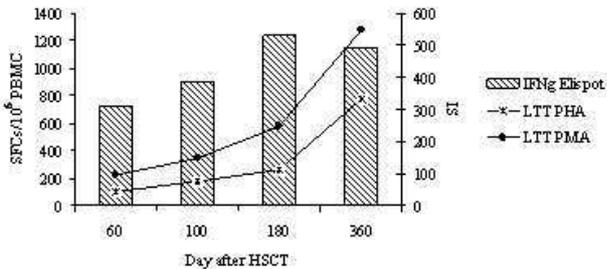
Transplant Infectious Disease

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

b

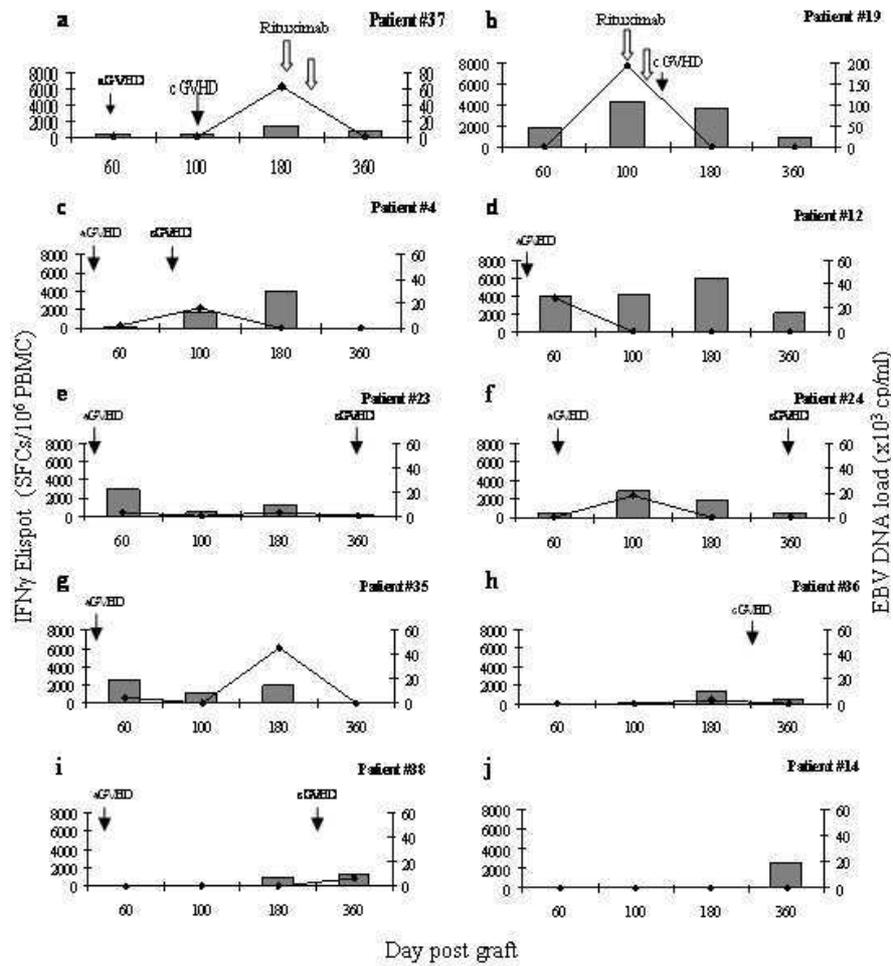


c



190x254mm (72 x 72 DPI)

Transplant Infectious Disease



190x254mm (72 x 72 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

**Production de grade clinique de lymphocytes T cytotoxiques anti-
adénovirus à des fins d'immunothérapie adoptive après allogreffe
de cellules souches hématopoïétiques.**

Article 2:

**Rapid Generation of Full Clinical-Grade Human anti-Adenovirus
Cytotoxic T Cells for Adoptive Immunotherapy**

Lamia AÏSSI-ROTHÉ, Véronique DECOT, Véronique VENARD, Hélène JEULIN, Alexandra SALMON, Laurence CLEMENT, Anne KENNEL, Christine MATHIEU, Jean Hugues DALLE, Georg RAUSER, Christophe CAMBOURIS, Marcelo DE CARVALHO, Jean François STOLTZ, Pierre BORDIGONI, Danièle BENSOUSSAN.

J. Immunother. 2010 May; 33(4):414-424.

Les infections représentent l'une des principales complications post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Parmi les agents infectieux impliqués, on retrouve l'ADV. Les infections à ADV sont souvent de mauvais pronostic, peu de molécules étant actives à leur rencontre en l'absence de reconstitution immunitaire. L'incidence des infections à ADV varie de 5 à 80 %, les enfants étant plus sensibles. La mortalité peut atteindre 60 à 73%.

L'objectif de ce travail est de développer une méthode de production de grade clinique de lymphocytes T spécifiques anti-ADV à visée thérapeutique afin de restaurer une défense anti-ADV chez le receveur.

Les travaux publiés précédemment par Feuchtinger *et al*, utilisaient comme antigène de stimulation la protéine Hexon de l'ADV2 (Serion/Viron). Comme mentionné précédemment, cette protéine est produite sur lignée tumorale Hep 2, rendant très difficile son utilisation en clinique en France. C'est pourquoi, nous avons cherché à utiliser un antigène de stimulation synthétique qui soit GMP et nous nous sommes orientés vers le PepTivator-ADV5 Hexon de Miltenyi Biotec. Nous avons débuté nos travaux en réalisant une cinétique de stimulation afin de définir le temps permettant d'obtenir une stimulation optimale des

lymphocytes T spécifiques, objectivée par la technique de Cytokine Detection Assay (CDA, Miltenyi Biotec). Le temps de 6 heures a été identifié comme le temps permettant la meilleure sécrétion d'IFN γ par les cellules spécifiques.

Ensuite, nous avons souhaité comparer la capacité stimulante du PepTivator-ADV5 Hexon à celle de la protéine Hexon de l'ADV2 (Serion Virion) utilisée par l'équipe de Feuchtinger. Deux techniques ont été réalisées : la technique CDA et l'Elispot IFN γ (Tableau 1 et Figure 1 de l'article). Avec la technique CDA, on observe une meilleure stimulation des CD4 IFN γ + avec le PepTivator-ADV5 Hexon mais une plus faible stimulation des CD8 IFN γ + qu'avec la protéine Hexon de l'ADV2 ; cependant, ces différences ne sont pas statistiquement significatives. En revanche, avec la technique Elispot IFN γ on observe un nombre de spots en moyenne significativement plus faible après stimulation par le PepTivator-ADV5 Hexon. Toutefois, chez un bon nombre de donneurs testés, un nombre de spots plus élevé a pu être observé après stimulation par PepTivator-ADV5 Hexon qu'avec la protéine Hexon de l'ADV2.

Nous avons ensuite initié 7 manipulations de grade clinique afin de valider notre système. Après information et signature du consentement des donneurs, du sang périphérique ou une leukaphérèse ont été recueillis par l'EFS-LC. Les donneurs sains ont été testés préalablement pour leur réponse immunitaire anti-ADV par Elispot IFN γ . En pratique, les cellules mononucléées des donneurs sains ont été stimulées par le PepTivator-ADV5 Hexon pendant 6 heures. Les cellules sécrétant l'IFN γ ont ensuite été sélectionnées sur CliniMACS en utilisant le Cytokine Capture System (Miltenyi Biotec).

Après sélection immunomagnétique, $1.01 \pm 0.84 \times 10^6$ cellules nucléées totales ont été obtenues en moyenne. Dans la fraction positive, 56 ± 5.6 % des cellules CD4+ étaient IFN γ + et 42 ± 27 % des cellules CD8+ étaient IFN γ +. Nous avons pu calculer qu'un enrichissement en cellules CD3+ IFN γ + d'un facteur 625 avait été réalisé en moyenne.

Les CTL isolés dans la fraction positive ont été mis en culture en présence d'IL2 et de cellules irradiées de la fraction négative, afin de les amplifier pour disposer de suffisamment de matériel cellulaire pour réaliser des contrôles qualités fonctionnels. Une amplification de 1.7 log a été obtenue en moyenne. Toutefois, cette étape d'amplification introduit un biais ; les clones T présents dans les cellules contrôlées ne reflètent probablement plus tout à fait ceux présents après isolement. Après amplification, il convenait de s'assurer que les cellules étaient toujours capables de répondre à une stimulation par l'antigène utilisé au cours de la stimulation initiale, en sécrétant de l'IFN γ et en proliférant. Par cytokines intracellulaires, on a

observé que le nombre de CD4 IFN γ ⁺ représentait $43.2 \pm 23.5\%$ des cellules CD4⁺ et le nombre de CD8 IFN γ ⁺ représentait $35.4 \pm 23.8\%$ des cellules CD8⁺. Une réponse proliférative élevée a également été observée après restimulation (22180 cpm en médiane). Une cytotoxicité élevée des CTL amplifiés a été observée contre les cellules dendritiques autologues (10 :1) chargées avec du lysat viral d'ADV2, d'ADV3, d'ADV5 ou d'ADV25 ou encore contre des blastes PHA chargés avec le PepTivator-ADV5 Hexon alors qu'une faible cytotoxicité a été observée contre les cellules cibles non chargées ou chargées avec un antigène non relevant (PepTivator-CMVpp65). Enfin, il était important de s'assurer que les CTL anti-ADV étaient dépourvus d'alloréactivité. Nous avons pu déterminer par culture mixte lymphocytaire une diminution de l'alloréactivité contre des PBMC de donneurs sains de 1.27 Log entre les cellules mononucléées du prélèvement initial et les CTL anti-ADV après sélection et amplification.

Nous avons pu mettre au point une technique rapide, de grade clinique permettant de sélectionner des CTL anti-ADV efficaces et dépourvus de toxicité *in vitro*, pré-requis à l'élaboration d'un protocole clinique oligocentrique.

Ce travail a ouvert la voie à la rédaction d'un PHRC interrégional qui a été financé courant 2010 et doit maintenant mener à la rédaction du dossier AFSSaPS du protocole clinique.



BASIC STUDY

Rapid Generation of Full Clinical-Grade Human Antiadenovirus Cytotoxic T Cells for Adoptive Immunotherapy

Lamia Aïssi-Rothé,*† Véronique Decot,*† Véronique Venard,‡ Hélène Jeulin,‡
Alexandra Salmon,§ Laurence Clement,§ Anne Kennel,|| Christine Mathieu,|| Jean Hugues Dalle,¶
Georg Rauser,# Christophe Cambouris,# Marcelo de Carvalho,|| Jean François Stoltz,*†
Pierre Bordigoni,§ and Danièle Bensoussan*†

Summary: Adenovirus (ADV) infections are one of the major causes of morbidity and mortality after hematopoietic stem cell transplantation, despite new antiviral treatment strategies. We describe here a complete clinical-grade generation of human anti-ADV cytotoxic T cells to propose an adoptive immunotherapy. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 7 healthy donors, known for their good cellular immunity against ADV, were stimulated for 6 hours with a synthetic peptide pool covering the ADV5 Hexon protein. γ -interferon (IFN- γ) secreting cells were isolated on a clinical device. After immunoselection, a mean number of $1.01 \pm 0.84 \times 10^6$ total nucleated cells was obtained. The isolated ADV-specific T cells were mainly CD4⁺ (mean = $56\% \pm 20.8\%$, yield = $51\% \pm 32.4\%$) but also CD8⁺ (mean = $42\% \pm 27\%$, yield = $56\% \pm 39.3\%$). Isolated T lymphocytes (CTL) were expanded to carry out functional tests. Ability of the expanded CTL to secrete IFN- γ and to proliferate after restimulation with the ADV peptide pool was confirmed. A high cytotoxicity against autologous target cells loaded with ADV antigens was observed but not against nonloaded target cells. We observed a decrease of 1.27 log of the allogeneic reaction against non HLA identical healthy donor PBMC with CTL compared with the PBMC before selection. Clinical-grade generation of ADV-specific T cells was achieved with a synthetic antigen. This technology has the advantage of being fast, and is sufficiently reactive to be proposed for immunotherapy if antiviral treatment fails.

Key Words: hematopoietic stem cell transplantation, adenovirus-specific T cells, synthetic peptide pool, adoptive immunotherapy
(*J Immunother* 2009;00:000–000)

Hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients, particularly those receiving a T cell depleted graft from an unrelated or a mismatched donor,¹ are susceptible to

viral reactivations and/or primary infections from a variety of infectious agents, including Epstein Barr virus (EBV),² Cytomegalovirus (CMV),³ and adenovirus (ADV).⁴ B-cell depletion of the graft⁵ and anti-CD20 antibodies treatment⁶ contributed to decrease EBV complication incidence. Preemptive antiviral treatment of CMV reactivation markedly improved management of CMV infections. Today, ADV infections still remain one of the main causes of morbidity and mortality after HSCT.^{7,8} The incidence of ADV infections ranges between 5% to 30%, with pediatric recipients transplanted with depleted grafts showing the highest rate of infection: 84%.⁹ The mortality rate is very high in those patients: 60% to 73%, despite new antiviral treatment strategies.

Reconstitution, in the recipient, of the donor immune system after allogeneic HSCT is sometimes a long process,¹⁰ while the recipient presents deep T-cell immunodeficiency. It has been shown that T-cell immunity is crucial for protection against human ADV infection or reactivation.^{11–13} Moreover, antiviral drug therapy efficacy is poor in the absence of specific immune reconstitution.^{4,14,15} As earlier reported, antigen-specific T cells are an essential part of the immune responses required to control viral infection. In response to acute infection, the frequencies of these T cells may dramatically increase and persist until the virus infection is controlled.¹⁵ However, most of the patients who present a graft versus host disease (GvHD) after allogeneic HSCT, are treated by immunosuppressive drugs that impair the development of an ADV specific T-cell response.

To restore the capacity of the recipient to develop an immune response against infections, donor lymphocyte infusions (DLI) have been tried as they were associated with an antiviral activity. Hromas et al, reported the use of DLI to successfully treat recalcitrant severe ADV-associated hemorrhagic cystitis, without induction of GvHD.¹⁶ Bordigoni et al reported encouraging results with DLI in 2 out of 3 patients.¹⁴ Nevertheless, the impact of the immunosuppression on DLI was highlighted in a report in which 4 recipients with severe ADV-associated cystitis did not improve after a donor T-cell add-back.¹⁷ Although, unselected adoptive immunotherapy seemed very attractive, Chakrabarti et al remained cautious considering the disparate clinical results.¹⁸ Thus, unselected DLI have 2 major drawbacks: the paucity in virus-specific cells for clinical benefit and the risk of developing GvHD when given after allogeneic HSCT.

Received for publication July 28, 2009; accepted November 3, 2009.
From the *CHU de Nancy, Unité de Thérapie cellulaire et Tissus; †CHU de Nancy, Laboratoire de Virologie; ‡CHU de Nancy, Unité de Transplantation Médullaire, Hôpital d'Enfants; §CHU de Nancy, Service d'Immunologie, Vandœuvre-Lès-Nancy; ¶Nancy Université-UHP, CNRS UMR 7561 and FR 3209 CNRS-IN-SERM, Nancy; ||Hôpital Robert Debré, APHP, Service d'Hématologie, Paris, France; and #Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany.
This work was supported by a grant from the *Direction de la Recherche Clinique* from Nancy Hospital.
Financial Disclosure: All authors have declared there are no conflicts of interest in regards to this work.
Reprints: Danièle Bensoussan, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, CHU de Nancy, Allée du Morvan, 54511 Vandœuvre-Lès-Nancy, France (e-mail: d.bensoussan@chu-nancy.fr).
Copyright © 2009 by Lippincott Williams & Wilkins

Adoptive transfer of selected T cells to provide specific protection against different viral agents led to very encouraging results.^{19–21} On the basis of these earlier experiences, Feuchtinger et al first described an ADV-specific T cells generating protocol on the basis of the antigen-specific IFN- γ secretion of CD4 and CD8 T cells after ex vivo stimulation with an ADV lysate.¹⁵ This procedure has the advantage of being rapid (within 2 days). Initial reports on ADV-specific adoptive T-cell therapy indicate that feasibility and safety have been established both for the ex vivo isolation and infusion of IFN- γ secreting T cells and for protocols using multispecific monoculture-derived T-cell lines. Leen et al, described how genetic modification of EBV-transformed B cell lines with chimeric adenoviral vectors consistently generates isolated T lymphocytes (CTLs) specific for EBV-associated, ADV-associated, and CMV-associated antigens in a single culture and observed that the multivirus-specific T cells derived from these 3 to 4 week-monocultures can expand in response to viral challenge after infusion to individuals and produce clinically relevant effects against all 3 viruses.²² ADV-specific immunotherapy was shown to be feasible with no acute toxicity or increased risk of GvHD induction and resulted in successful transfer of specific immunity to the host.^{22,23} These preliminary feasibility data showed that, after adoptive T-cell transfer, an in vivo expansion was observed, associated with a reduction, or even a clearance of viral load and clinical improvement of human ADV disease. The main disadvantage of this technology is the limited availability of well-defined antigens for T-cell stimulation. In earlier published studies, ADV2 Hexon protein (Serion-Virion, Germany) was used as it belongs to the structural proteins in the viral coat and it is synthesized during late infection. This antigen is the immunodominant T cell target among capsid proteins and contains multiple epitopes conserved among serotypes.²⁴ However, this protein is not produced for clinical-grade application and is obtained on a tumor cell line (Hep2). More recently, a synthetic peptide pool named PepTivator-ADV5 Hexon (Miltenyi Biotec, Germany) has been specially developed for efficient in vitro stimulation of Hexon-specific T cells.

In this study, we aimed to generate clinical-grade PepTivator-ADV5 Hexon-specific T cells and to evaluate their in vitro efficiency. We show that it is possible to achieve rapid generation of these cells under Good Manufacturing Practice (GMP) conditions, with completely defined and safe products, unlike the ADV2 Hexon protein. We also report a phenotypic characterization, specific cytotoxicity against ADV-presenting cells, and reduced alloreactivity of isolated PepTivator-ADV5 Hexon-specific T cells. As this technology enables fast and efficient selection of ADV-specific T cells, it can be proposed to treat patients with resistant ADV infection.

MATERIALS AND METHODS

Peptide Pool and ADV Antigens

A peptide pool, PepTivator-ADV5 Hexon, consisting of 15mer sequences with 11 amino acid overlap covering all the Hexon protein from ADV type 5 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) was used for ADV-specific T-cell stimulation.

For functional characterization of circulating and/or isolated ADV-specific T cells, additional antigens were used such as Hexon protein from ADV type 2 at a final

concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Virion-Serion, Wuerzburg, Germany) and inactivated ADV2, 5 (group C), 3 (group B1), and 25 (group D) lysates, produced on an MRC5 cell line, 48 hours after infection, at a concentration of 1.4×10^9 , 1.5×10^9 , 1.1×10^9 , and 1.1×10^9 PFU/mL, respectively (Virology laboratory, Nancy, France).

Donor Selection

After obtaining informed consent, peripheral blood or leukapheresis from selected healthy donors were collected in blood collection centers. Donor selection was on the basis of the presence of an anti-ADV specific immune response controlled by IFN- γ enzyme-linked immunospot analysis (Elispot) assay or cytokine detection assay (CDA) (Miltenyi Biotec). All donors tested negative for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human T-cell leukemia virus and for *Treponema pallidum*.

Generation of Clinical-Grade ADV-specific T Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by sedimentation using Lymphoprep, a mononuclear cell separation medium (Abcys, Paris, France) on a 2991 cell washer (Cobe, Colombes, France) ($n = 5$) or from leukapheresis collections ($n = 2$). PBMC were washed twice, and 0.2 to 1×10^9 PBMC were suspended in RPMI 1640 (Eurobio, Courtaboeuf, France) supplemented with 10% heat inactivated autologous serum or clinical-grade human AB serum (*Etablissement Français du Sang*, Lyon, France) at 1×10^7 cells/mL and transferred into a T-cell expansion bag (Miltenyi Biotec). Of note, in 1 case, thawed leukapheresis was used after 2 washing steps followed by 2 hours incubation at 37°C and a sedimentation step. PepTivator-ADV5 Hexon was added for stimulation at a final ratio of 20 μL per mL of cell suspension (0.6 nmol of each peptide per mL), for 6 hours in an incubator at 37°C , 5% CO_2 . Magnetic enrichment of IFN- γ -secreting cells was carried out according to the instructions of the manufacturer using the Cytokine Capture System and the ClinMACS device (Miltenyi Biotec). In brief, cells were washed in cold RPMI SAB 2% and suspended in 10 mL. Then, the Catchmatrix reagent [an anti-IFN- γ monoclonal antibody conjugated to a leukocyte-specific (CD45) antibody] was added to the suspension and incubated 5 minutes on ice. Then, cells were diluted at 1×10^6 cells/mL, and incubated 45 minutes under smooth shaking at 37°C for the IFN- γ secretion and capture period. Thereafter, cells were washed and magnetically labeled with the IFN- γ enrichment reagent (anti-IFN- γ microbeads), and incubated 15 minutes on ice. Cells were washed, resuspended in ClinMACS buffer containing 0.5% of human serum albumin (HSA, LFB, Les Ullis, France) and applied onto a clinical-grade separation column installed on the fully automated CliniMACS device, using the enrichment program 3.1. The positive fraction eluted from the column was enriched in ADV-specific T cells. Positive control stimulation was carried out on 10×10^6 PBMC with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB, Sigma Aldrich, France). As a negative control, 10×10^6 PBMC were incubated with culture medium.

Detection of Circulating ADV-specific T Cells

IFN- γ Elispot Assay

Multiscreen Immobilon-P plates (Millipore, Bedford, MA) were coated with a monoclonal antihuman IFN- γ

1 antibody, 1-D1 K (Mabtech, Stockholm, Sweden). PBMC
 were added in triplicate wells at a final concentration of
 3 5×10^6 cells/mL (100 μ L/well) and incubated for 20 hours
 5 at 37°C with Hexon protein, PepTivator-ADV5 Hexon,
 ADV2, and 5 lysates, a mitogen as positive control
 7 Phytohemagglutinin (PHA), and culture medium as nega-
 tive control. The cells were discarded the next day and
 9 the second biotinylated anti-Human IFN- γ 7B 6-1 biotin
 (Mabtech) was added and left for 1 hour at 37°C.
 11 Thereafter, staining was carried out with a streptavidin
 conjugated alkaline phosphatase (Mabtech) for an addi-
 tional 1 hour and a half. Then, an alkaline phosphatase-
 13 conjugate substrate kit (Biorad, Richmond, CA) was used.
 After incubation at room temperature for 15 minutes, the
 15 reaction was stopped by discarding the substrate solution
 and washing the plates under running water. The plates
 17 were air-dried and dark spots counted using an automated
 Elispot reader: Bioreader 4000 PRO -S (BIO-SYS, SER-
 19 LABO, Entraigues sur la Sorgues, France). The number of
 specific T-cell responders was calculated after subtracting
 21 negative control values.

25 IFN- γ Detection Assay

27 The CDA was carried out with the cytokine secretion
 assay kit (Miltenyi Biotec) at the laboratory scale and the
 labeling principle was similar to the cytokine capture
 29 system. The main difference was the use of a PE-labeled
 IFN- γ detection antibody allowing flow cytometry analysis.
 31 Stimulation was carried out either with hexon protein for
 16 hours or PepTivator-ADV5 Hexon for 6 hours.

35 Phenotypic Analysis and Intracellular Staining

37 Frequency of PepTivator-ADV5 Hexon T lympho-
 cytes was monitored at different time points of the
 production process using surface staining in saturating
 39 conditions with these antibodies: ECD-anti-CD4 (Beckman
 Coulter, Villepinte, France), PC7-anti-CD8 (Beckman
 41 Coulter), FITC-anti-CD14 (Beckman Coulter). CD14
 positive cells and dead cells, identified by 7AAD staining,
 43 were removed from analysis. IFN- γ secreting cells were
 identified by a PE-anti-IFN- γ antibody (Miltenyi Biotec).
 45 At least 100,000 lymphoid cells were analyzed on a FC500
 analyzer (Beckman Coulter). Intracellular staining was
 47 carried out to identify whether expanded ADV-specific T
 cells still secrete IFN- γ in response to PepTivator-ADV5
 49 Hexon stimulation. In brief, expanded ADV-specific T cells
 were stimulated 16 hours with PepTivator-ADV5 Hexon.
 51 One microliter of Brefeldin A (Becton Dickinson, San José)
 was added for the last 12 hours of incubation. The
 53 next day, the samples were permeabilized by perm/fix
 solution (Becton Dickinson) and stained with ECD-anti-
 55 CD4 (Beckman Coulter), PC7-anti-CD8 (Beckman Coul-
 ter), and A \times 488-IFN- γ (Becton Dickinson). Phorbol
 57 12-myristate 13-acetate (PMA) (2 μ g/mL, Sigma Aldrich)
 complemented with Ionomycin (5 μ g/mL, Calbiochem) was
 59 used as positive control. Flow cytometric analysis was
 carried out on 10,000 events per sample on a FC500
 61 analyzer. Analysis of dendritic cells (DCs) was carried out
 using PE-Cy5-anti-CD11c (BD Pharmingen), FITC-Lineage
 63 Cocktail (lin1) (Becton Dickinson), PE-anti-CD83,
 PE-anti-CD86, PC7-anti-CD45, and ECD-anti-HLA-DR
 (Beckman Coulter).

ADV-specific T-Cell Expansion 65

67 To expand the isolated ADV-specific T cells, a sample
 of these cells (0.1 to 1×10^6 cytokine-secreting cells) was
 69 cultured for 1 to 4 weeks in a culture medium including
 100 IU/mL of interleukin (IL)-2 (PeproTech, TEBU, Paris,
 France) and seeded in a culture flask at a final concentra-
 71 tion of 0.1×10^6 /mL. Irradiated autologous cells taken
 from the negative fraction were added (25 Gy) at day 0 at a
 73 ratio of 100:1 and day 7 at 10:1. Cultures were fed with
 fresh medium containing 100 IU/mL of IL-2 every day.
 75 Viability was determined by Trypan blue exclusion staining.

Proliferative Assay 77

79 Specific proliferation of ADV-specific T cells was
 studied in the presence of PepTivator-ADV5 Hexon or
 PHA in a proliferative assay. In brief, 1×10^5 expanded
 81 ADV-specific T cells were incubated with PepTivator-
 ADV5 Hexon or PHA during 4 days at 37°C. Fifty
 microliters per well of 3 H-thymidine (1 μ Ci, GE Healthcare,
 83 Orsay, France) were added during the last 18 hours of
 culture. At the end of the test, cells were harvested onto
 85 a filter plate and the counts per minute (cpm) were
 determined using a liquid scintillation counter (Top Count,
 87 Perkin Elmer). Proliferative responses are expressed in cpm
 or as a Stimulation Index calculated according to this
 89 formula:

91 Median 3 H-thymidine incorporation of the stimulated
 cells/ 3 H-thymidine incorporation of the unstimulated
 93 control.

Cytotoxicity Assay 95

Target Cell Production 97

99 ADV-specific T-cell cytotoxicity was evaluated against
 2 target cells: DCs or PHA blasts.

101 One hundred million autologous PBMC were kept for
 CD14 enrichment by MACS immunomagnetic selection
 (Miltenyi Biotec). A mean purity of 95% was achieved.
 103 Then, DCs were derived after 6-day culture in earlier
 described complete culture medium supplemented with
 105 100 ng/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating
 factor (GM-CSF; R&D Systems, Lille, France) and 25
 ng/mL IL-4 (R&D Systems). Autologous DCs, after
 107 control of the phenotype, were pulsed for 24 hours with
 ADV2, 5, 3, or 25 lysates or PepTivator-ADV5 Hexon
 109 or PepTivator-CMV pp65 as negative control. Unpulsed
 autologous and allogeneic DCs were used as negative
 111 controls. During the last 14 hours of this incubation period,
 100 μ g/mL Poly (I:C) (Sigma, La Verpillière, France) was
 113 added and cells were incubated overnight.

115 At the same time, PHA blasts were generated using
 5×10^6 autologous PBMC stimulated with 1 μ g/mL PHA
 (Oxoid, Dardilly, France) on day 0 and with 100 IU/mL
 117 IL-2 on day 3 and every 2 days for a median of 7 days.
 Then, autologous PHA blasts were pulsed for 16 hours with
 119 PepTivator-ADV5 Hexon.

Cytotoxicity Assay 121

123 Pulsed target cells were loaded with 51 Chromium
 (51 Cr, 50 μ Ci/ 10^6 cells) for 1 hour at 37°C and subsequently
 125 washed twice in complete culture medium. Target cells were
 placed in 96-well round-bottom plates at 1×10^4 cells/well.
 127 Effector cells were added to target cells at effector-to-target
 cell ratios of 10:1 in triplicate and from 40:1 to 5:1 each time
 129 enough cells were available. After 4-hour incubation at

1 37°C, 5% CO₂, plates were centrifuged (200 g, 5 min) and
3 30 µL of supernatant removed from each well. ⁵¹Cr release
5 was counted on a γ counter (Top Count, Perkin Elmer,
7 Ontario, Canada). The percentage of ⁵¹Cr release was
9 calculated according to this formula:

$$\% \text{ of specific lysis} = \frac{(\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release}) \times 100.}$$

11 Experimental release is the mean cpm release in the
13 presence of effector cells, spontaneous release is the mean
15 cpm spontaneously released by target cells incubated with
17 medium alone, and maximum release is the mean cpm
19 release of 100-µL target cells lysed with 0.1% of Triton
21 × 100.

23 Mixed Lymphocyte Reaction

25 PBMC from 3 allogeneic blood donors used as
27 stimulating cells were irradiated (25 Gy) and plated in a
29 96-well round-bottom plate (1 × 10⁵ per well in 100 µL).
31 Autologous PBMC and expanded ADV-specific T cells
33 used as responder cells were added at the same concentra-
35 tion and incubated for 6 days at 37°C, 5% CO₂. Fifty
37 microliters per well of ³H-thymidine (1 µCi) were added
39 for the last 18 hours of culture. As described above for
41 proliferative assay, at the end of the test, cells were
43 harvested onto a filter plate and the cpm was determined
45 using a liquid scintillation γ counter. Proliferative responses
47 are expressed in cpm.

49 Statistical Analysis

51 To carry out the comparison between in vitro
53 stimulation efficiency of PepTivator-ADV5 Hexon and
55 ADV2 Hexon protein, and the comparison between specific
57 lysis of DCs pulsed with ADV2 or 5 and unpulsed DCs, a
59 paired Student *t* test was applied. *P*-values < 0.05 were
61 considered significant.

63 RESULTS

65 Comparison of Stimulation With Hexon Protein 67 or PepTivator-ADV5 Hexon Using IFN-γ Elispot 69 and CDA

71 PBMC from healthy donors were used to compare
73 their anti-ADV IFN-γ secretion by Elispot assay (n = 43)
75 and CDA (n = 10) in response to Hexon protein or
77 PepTivator-ADV5 Hexon stimulation (Table 1).

79 **TABLE 1.** IFN-γ Secretion After Hexon Protein or Peptivator-
81 ADV5 Hexon Stimulation (Elispot and Cytokine Detection Assays)

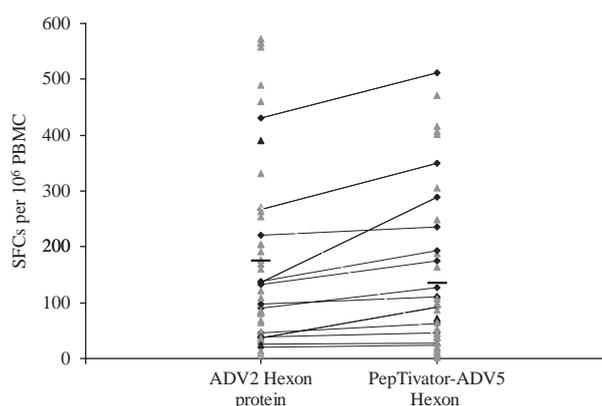
	n	ADV2 Hexon Protein		Peptivator-ADV5 Hexon	
		Median	Range	Median	Range
CD4 ⁺ IFN-γ ⁺ (%)	10	0.08	(0-0.33)	0.12	(0.04-0.58)
CD8 ⁺ IFN-γ ⁺ (%)	10	0.13	(0-0.3)	0.09	(0.02-0.72)
IFN-γ Elispot (SFCs/10 ⁶ PBMC)	43	109	(3-565)	72	(3-511)

65 In CDA, median percentages of 0.08% and 0.12%
67 were observed for CD4⁺IFN-γ, 0.13% and 0.09% for
69 CD8⁺IFN-γ⁺ after Hexon protein and PepTivator-ADV5
71 Hexon stimulation, respectively. After PepTivator-ADV5
73 Hexon stimulation, a higher frequency of CD4⁺IFN-
75 γ-positive cells whereas a lower frequency of CD8⁺IFN-
77 γ⁺ were observed compared with Hexon protein stimula-
79 tion. However, these differences were not statistically
81 significant (Table 1).

83 In contrast, significantly lower results were obtained
85 with IFN-γ Elispot assay after PepTivator-ADV5 Hexon
87 stimulation (*P* < 0.01). Medians of 109 SFCs/10⁶ PBMC
89 (range: 3 to 565) and 72 SFCs/10⁶ PBMC (range: 3 to 511)
91 were counted after Hexon protein and PepTivator-ADV5
93 Hexon stimulation, respectively (Table 1). However, this
95 variation was donor-dependant with 10/43 (23%) donors
97 presenting a higher IFN-γ secretion after PepTivator-
99 ADV5 Hexon stimulation than after Hexon protein
101 although a marked decrease of IFN-γ secretion was
103 observed for 5/43 (12%) donors after PepTivator-ADV5
105 Hexon stimulation (Fig. 1).

107 Clinical-Grade Isolation of ADV-specific T Cells 109 According to Specific IFN-γ Production

111 We carried out clinical-grade immunomagnetic selec-
113 tion of ADV-specific T cells from 7 healthy donors PBMC
115 (Table 2). We stimulated 0.2 to 1.1 × 10⁹ PBMC with
117 PepTivator-ADV5 Hexon. After 6 hours of stimulation,
119 0.2% (range: 0.04 to 0.59) of CD4⁺IFN-γ⁺ and 0.2%
121 (range: 0.05 to 0.72) of CD8⁺IFN-γ⁺ were obtained before
123 immunoisolation, referring to CD4 and CD8 positive cells,
125 respectively. ADV-specific T cells were immunoselected
127 with the CliniMACS device and a mean number of
129 1.01 ± 0.84 × 10⁶ total nucleated cells were recovered.
131 Among the isolated ADV-specific T cells a mean of
133 56% of CD4 positive cells secreted IFN-γ (mean =
135 56% ± 20.8%, yield = 51% ± 32.4%) and a mean of
137 42% of CD8 positive cells secreted IFN-γ (mean =
139 42% ± 27%, yield = 56% ± 39.3%). Mean viability of



141 **FIGURE 1.** IFN-γ Elispot assay. IFN-γ secretion after Hexon
143 protein or PepTivator- Adenovirus (ADV)5 Hexon stimulation.
145 The same symbols were used for paired experiences. Means are
147 shown as small dashes. Background cell activation level was
149 controlled with irrelevant antigens (PepTivator Cytomegalovirus
151 (CMV) pp65 and pp65 protein for CMV negative donors).
153 Significantly lower results were obtained after PepTivator-ADV5
155 Hexon stimulation (*P* < 0.01). Lines highlight higher IFN-γ
157 secretion response after PepTivator-ADV5 Hexon than that
159 observed after Hexon protein stimulation.

TABLE 2. Generation of ADV-specific T Cells from 7 Healthy Donors: Results Before and After IFN- γ Secretion Assay Using Peptivator ADV-5 Stimulation

	Before Isolation					After Isolation					Viability (%)
	TNC (10 ⁶)	CD4 ⁺ (%) [†]	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) [‡]	CD8 ⁺ (%) [†]	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) [‡]	TNC (10 ⁶)	CD4 ⁺ (%) [†]	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) [‡]	CD8 ⁺ (%) [†]	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) [‡]	
1	484	23.5	0.2	16.7	0.07	0.38	8.75	79.7	3.1	65.4	58
2	52.6	22	0.59	19.9	0.72	0.5	7.2	60.8	1.85	15.6	79
3	140	42.1	0.14	21.3	0.12	2.5	13.3	15.7	10.5	15.4	63.7
4	65	28.6	0.26	14.4	0.28	0.45	18.8	47.4	8.31	37.7	83.1
5	62	42	0.05	5.4	0.05	0.4	9.7	56	10.3	17.1	67.1
6*	465	22	0.04	12.3	0.02	1	2.57	73.2	1.37	59.2	91.6
7*	857	23.3	0.09	9.6	0.15	1.82	3.78	58.5	3.68	80.5	89
Mean	304	29	0.2	14.2	0.2	1.01	9.16	56	5.58	42	76
SD	308.2	9.14	0.19	5.66	0.24	0.84	5.59	20.8	3.98	27	13.1
Range	(52-857)	(22-42.1)	(0.04-0.59)	(5.4-21.3)	(0.05-0.72)	(0.38-2.5)	(2.57-18.8)	(15.7-79.7)	(1.37-10.5)	(15.4-80.5)	(58-91.6)

*PBMC from leukapheresis collections.

[†]Percentage of CD4⁺ and CD8⁺ cells refers to the total number of cells (ungated population).

[‡]Percentage of CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺ cells refers to the total number of CD4⁺ and CD8⁺ cells, respectively.

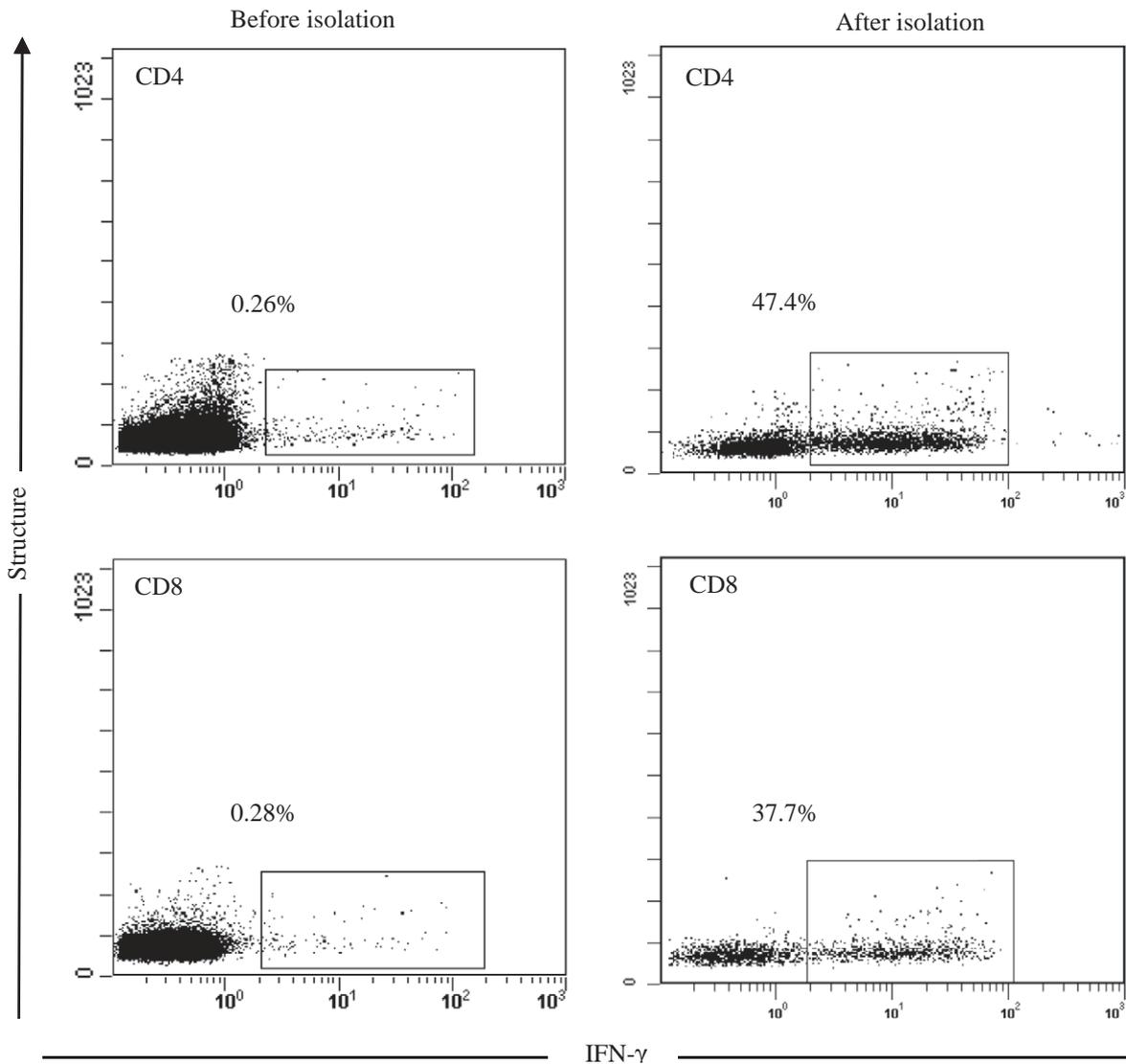


TABLE 3. Comparison of ADV-specific T Cell Generation From the Same Fresh or Thawed PBMC (Leukapheresis Source)

	Before Isolation					After Isolation					Viability (%)
	TNC (10 ⁶)	CD4 ⁺ (%) [†]	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) [‡]	CD8 ⁺ (%) [†]	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) [‡]	TNC (10 ⁶)	CD4 ⁺ (%) [†]	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) [‡]	CD8 ⁺ (%) [†]	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) [‡]	
6	465	22	0.04	12.3	0.02	1	2.57	73.2	1.37	59.2	91.6
6*	951	23.7	0.15	15.2	0.05	39.9	2	22	1.08	10	26.3

*Thawed PBMC from leukapheresis collections.

[†]Percentage of CD4⁺ and CD8⁺ cells refers to the total number of cells (ungated population).

[‡]Percentage of CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺ cells refers to the total number of CD4⁺ and CD8⁺ cells, respectively.

total nucleated cells after selection was of 76% \pm 13.1%. The results obtained for manipulation 4 are shown on Figure 2.

In 1 case, immunomagnetic selection was also carried out on thawed leukapheresis (Table 3). Viability after isolation was significantly lower than that observed on freshly isolated leukapheresis (26.3% vs. 91.6%, respectively). Purities of 22% CD4⁺IFN- γ ⁺ gated on CD4⁺ cells and 10% CD8⁺IFN- γ ⁺ gated on CD8⁺ cells were achieved, in comparison with fresh cells (73.2% and 59.2%, respectively).

Quality Controls

In Vitro Expansion of Isolated Cells and Analysis of ADV Specificity After Expansion

ADV-specific T cells have been expanded after isolation for a median of 2 weeks to generate up to 85 \times 10⁶ total cells (Fig. 3) to be able to carry out functional assays. A mean of 1.7 log expansion was observed. In 6 cases, the percentage of ADV-specific T cells among the expanded cells was observed after restimulation for 16 hours with the PepTivator-ADV5 Hexon followed by ICC. A mean purity of 43.2% \pm 23.5% of ADV-specific CD4 T cells gated on CD4⁺ cells and of 35.4% \pm 23.8% of ADV-specific CD8 T cells gated on CD8⁺ cells was observed. Noticeably, in 2 cases (n^o 3 and 5), a marked increase in the ADV-specific CD8 T cells was observed after the amplification step and in 2 other cases (n^o 1 and 4) a marked decrease in the ADV-specific CD4⁺ T cells was detected. The

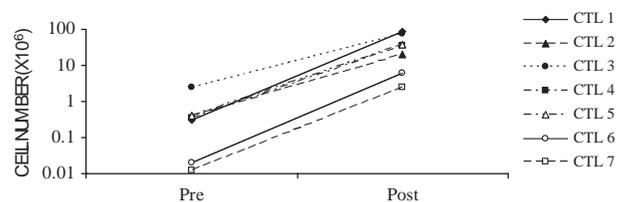


FIGURE 3. Expansion of isolated adenovirus (ADV)-specific T cells. A median of 1.7 log expansion is observed after 2 to 4 weeks of in vitro expansion in the presence of IL-2 and irradiated autologous feeder cells. Results are shown on a log₁₀ scale on the y axis.

FIGURE 2. Cytometry analysis before and after selection. Cytometric analysis of dot plots included initial gating on lymphocytes and exclusion of CD14⁺ and 7AAD⁺ cells. CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺ percentages were defined on CD4 and CD8 positive cells, respectively, and are shown in the gate represented on each dot plot. Except for positive fraction, a minimum of 100,000 events were acquired for analysis.

negative control (expanded cells without any restimulation) showed no IFN- γ response (Fig. 4).

Moreover, specific proliferation of generated ADV-specific T cells to PepTivator-ADV5 Hexon was confirmed in a proliferation assay. An increased proliferative response was observed in the presence of PepTivator-ADV5 Hexon with ADV-specific T cells compared with PBMC (before selection) [median = 22180 cpm (range: 2745 to 60,678) versus 766 cpm, (range: 419 to 1113)] (Table 4). Surprisingly, a markedly lower proliferative response was observed after PHA stimulation with ADV-specific T cells compared with PBMC [median = 3860 cpm, (range: 2407 to 14,165) versus 1,95,522 cpm, (range: 85,687 to 2,34,818)].

Lysis of ADV-infected Target Cells by ADV-specific T Cells

For functional analysis of the generated ADV-specific T cells a cytotoxic chromium assay was carried out, using as target cells: autologous DC pulsed with ADV2, 5, 3, or 25 lysates or with PepTivator-ADV5 Hexon or PepTivator-CMV pp65 as negative control and autologous PHA blasts presenting PepTivator-ADV5 Hexon. The ADV-specific T cells showed specific lysis of ADV-pulsed target cells, regardless of the type of target cell used. At a ratio of 10:1, specific lysis of ADV2 and 5-infected target cells was significantly higher than the one observed with uninfected target cells (22.1 \pm 11.6%, $P < 0.01$; 19.4 \pm 12.1%, $P < 0.02$, and 2.8 \pm 3.2%, respectively). Only ADV2 and ADV5 antigens were tested with each ADV-specific T cells produced. However, a similar cytotoxicity was observed with ADV3 or 25-pulsed target cells (38.8% and 36.6%) and with PepTivator-ADV5 Hexon (53.4 \pm 27.5%). As control, a very low cytotoxicity was observed with irrelevant peptide pool (PepTivator CMV pp65) loaded target cells (2.4%) (Fig. 5A). A similar cytotoxicity was observed when target cells were infected with either ADV2 or ADV5 lysate, meaning cross reactivity against 2 different ADV serotypes from the same group C. As attested by cytotoxicity results, a crossreactivity against ADV serotypes from different groups (B1 and D) was also observed. Moreover, specific lysis was documented twice in effector-to-target cell (ADV-specific T cells : PHA blasts) ratios from 40:1 to 5:1, when enough cells

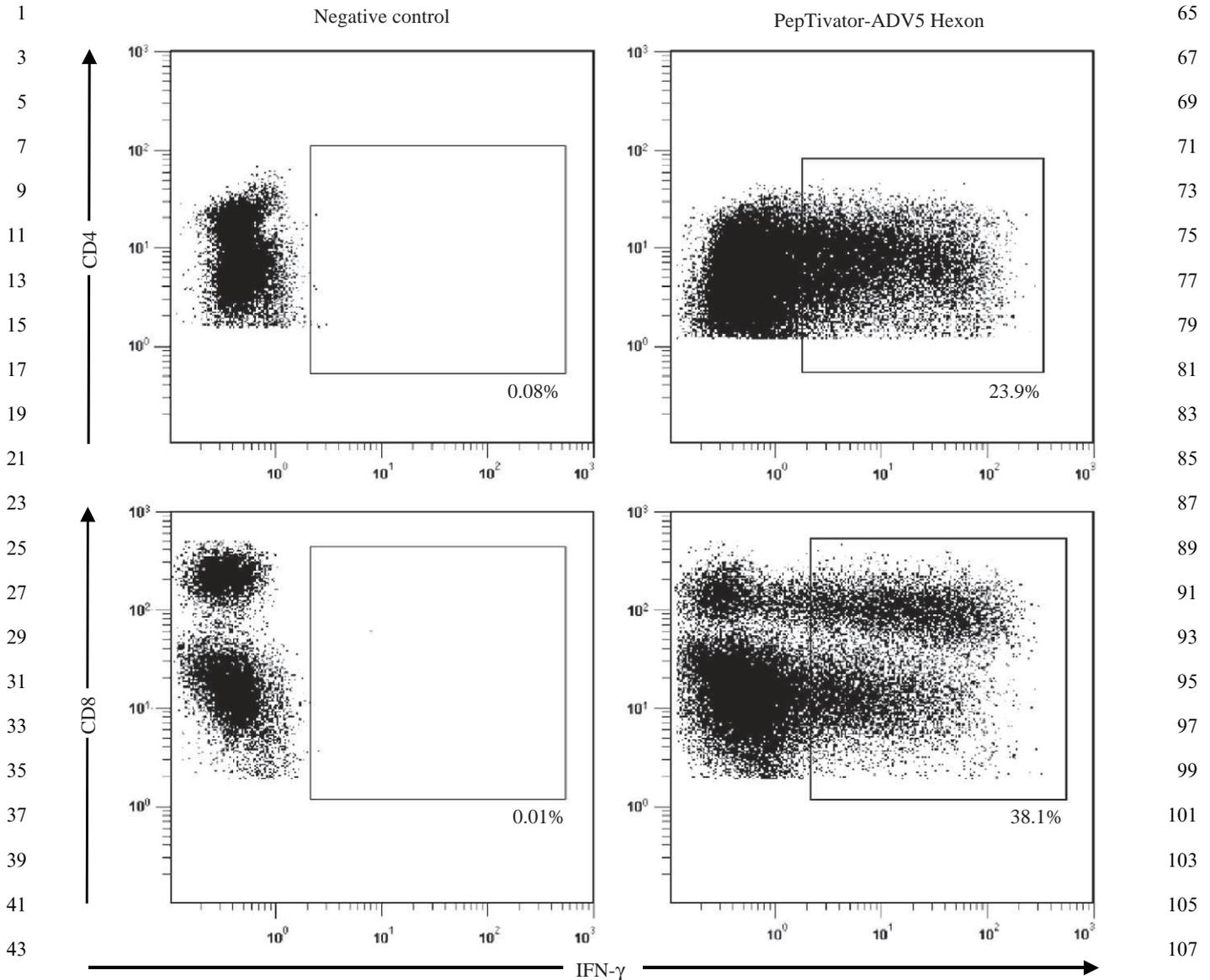


FIGURE 4. IFN- γ Intracellular staining of adenovirus (ADV)-specific T cells from a healthy donor. Detection was carried out using IFN- γ intracellular staining after stimulation for 16 hours with PepTivator-ADV5 Hexon (right dot plots). Negative controls were carried out without any stimulation (left dot plots). CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺ percentages were defined on CD4 and CD8 positive cells, respectively, and are shown in the gate represented on each dot plot. Less than 0.1% IFN- γ secreting cells were observed with negative controls.

were available (Fig. 5B). A high specific lysis was achieved from a 5:1 ratio (34.3% \pm 17.6%) and increased slowly to 43.8% \pm 21.5% for a 40:1 ratio. However, unspecific

lysis of uninfected target cells was observed from a 20:1 ratio that led us to select 10:1 ratio for further experiments.

TABLE 4. Proliferative Assay

	Before Selection		After Selection	
	Median	Range	Median	Range
PepTivator-ADV5				
Hexon (cpm)	766	(419-1113)	22,180	(2745-60,678)
PHA (cpm)	1,95,522	(85,687-2,34,818)	3860	(2407-14,165)

cpm indicates counts per minute.

Analysis of Alloreactivity of Expanded Cells

The residual alloreactive potential of expanded ADV-specific T cells was studied against irradiated PBMC from 3 different mismatched allogeneic donors and compared with the alloreactivity of unselected autologous PBMC. As reported on Figure 6, a reduction of 1.27 log of alloreactivity was observed with ADV-specific T cells (mean proliferations of 49,400 \pm 29,353 cpm and of 2676 \pm 2639 cpm were observed with PBMC before selection and ADV-specific T cells, respectively).

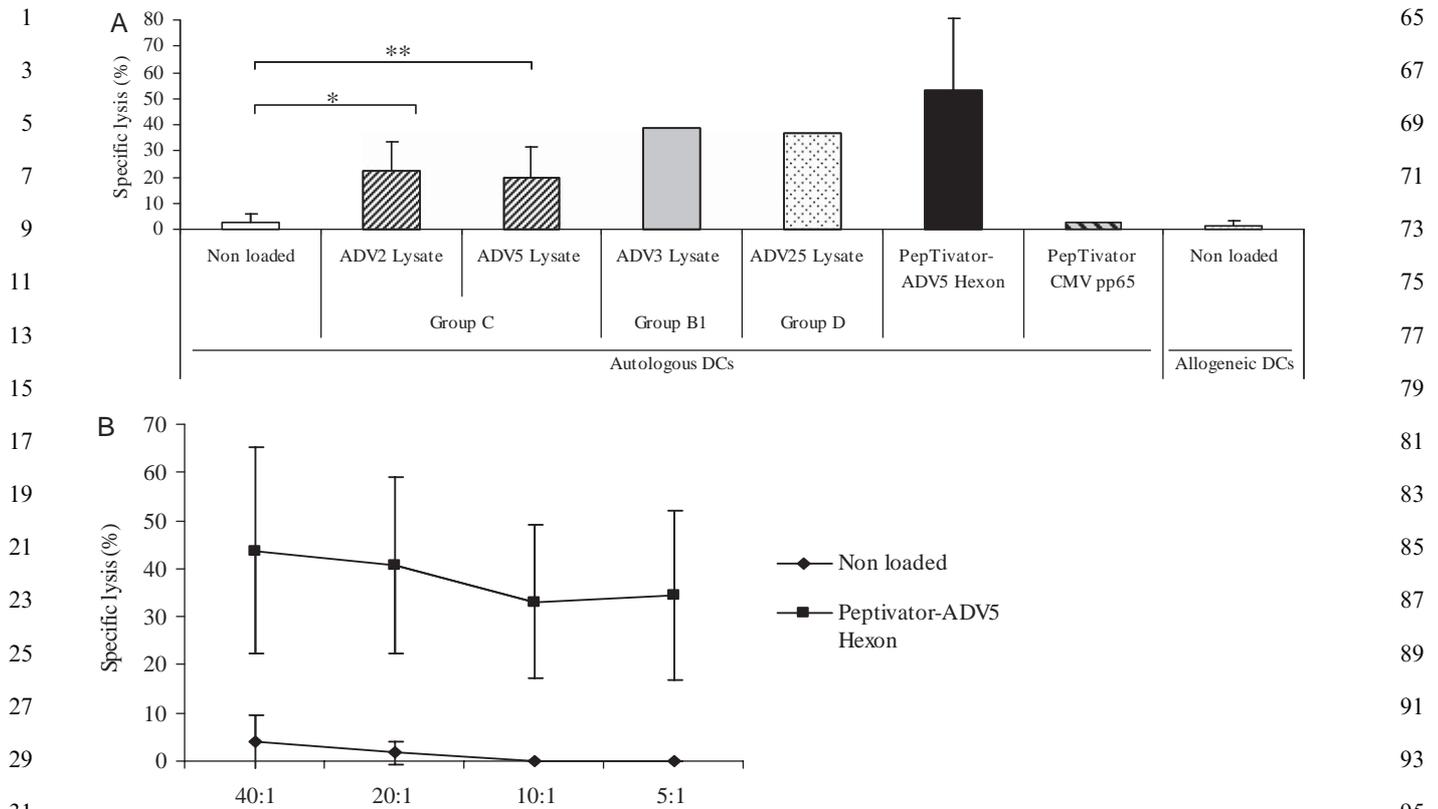


FIGURE 5. Cytotoxicity assay of expanded adenovirus (ADV)-specific T cells. A, Specific lysis was tested using autologous dendritic cells (DCs) infected with ADV2 or ADV5 lysates from group C, or ADV3 lysate from group B1 or ADV25 lysate from group D or PepTivator-ADV5 Hexon or PepTivator-Cytomegalovirus (CMV) pp65 as negative control. Unpulsed autologous and allogeneic DCs were used as negative controls. Only ADV2 and ADV5 antigens were tested for each ADV-specific T cells produced and cytotoxicity was significantly higher than the one observed with uninfected target cells, regardless of the ADV serotype ($*P < 0.01$ with ADV2 and $**P < 0.02$ with ADV5). Crossreactivity against the different ADV species was observed. Absence of alloreactivity of ADV-specific T cells was observed using allogeneic DCs. B, Specific lysis was tested using phytohemagglutinin (PHA) blasts loaded or not with PepTivator-ADV5 Hexon at different effector to target cell ratios (from 40:1 to 5:1). Unspecific lysis of uninfected target cells was observed over a 20:1 ratio.

Absence of alloreactivity of ADV-specific T cells was also confirmed by the cytotoxicity assay, using allogeneic DCs (Fig. 5A).

DISCUSSION

Virus and fungus infections remain serious complications after allogeneic HSCT. The ADV is responsible for

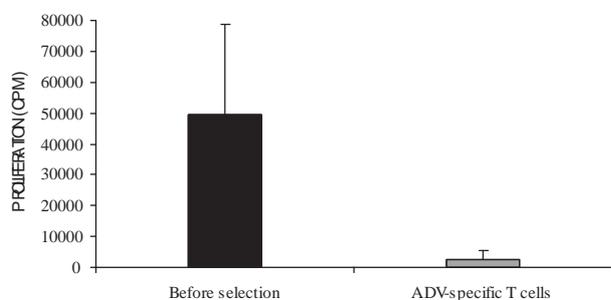


FIGURE 6. Detection of alloreactive proliferation before and after isolation and expansion. A reduction of 1.27 log of alloreactive proliferation after isolation was detected by ^3H -thymidine uptake in a mixed lymphocyte reaction with irradiated allogeneic peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 3 different donors after in vitro expansion.

invasive infections associated with a high mortality rate, mostly in children.^{9,14} Clinical results have improved thanks to viral load monitoring by PCR, contributing to preemptive antiviral treatment instauration.²⁵ Nevertheless, in the absence of specific immune reconstitution, antiviral treatments are not highly effective. Adoptive transfer of donor derived ADV-specific T cells is a very attractive way to restore immunity against ADV and can help the recipient to resolve the infection.²⁶ Specific anti-ADV adoptive immunotherapy was first developed by Leen et al, by a long culture process contributing to selection and amplification.²² Although ADV-specific T cells infused successfully expanded in recipients, such a time-consuming technology needs to be anticipated and cannot be developed at the time of infection when antiviral treatment has failed. Feuchtinger et al developed a fast IFN- γ secretion based isolation approach, using the GMP Miltenyi Biotec CliniMACS device.¹⁵ Donor ADV-specific T cells are isolated in less than 2 days, making it possible to initiate adoptive immunotherapy quickly if antiviral treatment fails. The number of ADV-specific T cells is very low compared with a selection-amplification process requiring several weeks. However, in vivo viral load stimulation seems to be responsible for in vivo CTL amplification.²³ Good clinical results have been reported in preliminary

1 clinical studies. Nevertheless, GMP grade cannot be
 2 reached because of the viral antigen used for stimulation
 3 of T cells. In earlier mentioned studies, ADV2 Hexon
 4 protein (Virion-Serion) was used for the stimulation step.
 5 However, although this protein is highly immunogenic, it is
 6 produced on the Hep2 tumor cell line. Information about
 7 the master cell bank and the detailed production process
 8 must be provided to Regulatory Agencies to obtain
 9 authorization for clinical use. Nevertheless, such informa-
 10 tion is not available when the antigen is only produced for
 11 research.

12 Our study was conducted to circumvent to these
 13 limitations. We reported here the fast immunomagnetic
 14 isolation of ADV-specific T cells for adoptive immunother-
 15 apy under complete GMP conditions, using a synthetic
 16 ADV5 Hexon peptide pool (PepTivator-ADV5 Hexon)
 17 during the stimulation step, the CliniMACS device for the
 18 selection step and carrying out all the manipulations in a
 19 closed system to reduce contamination risk. We were able
 20 to generate IFN- γ secreting ADV-specific T cells presenting
 21 high in vitro expansion rate in the presence of IL-2, and
 22 functional activity. Thus, expanded ADV-specific T cells
 23 were able to secrete IFN- γ and to proliferate further to in
 24 vitro PepTivator-ADV5 Hexon stimulation. Interestingly,
 25 the proliferative potential of ADV-specific T cells was
 26 exclusively dedicated to PepTivator-ADV5 Hexon stimula-
 27 tion whereas low proliferation was observed after PHA
 28 stimulation. Moreover, expanded ADV-specific T cells
 29 provided specific cytotoxicity against ADV presenting
 30 target cells and very low residual alloreactive potential.

31 Before initiating our study, we first compared in
 32 vitro stimulation efficiency of PepTivator-ADV5 Hexon
 33 with ADV2 Hexon protein used by Feuchtlinger et al.¹⁵
 34 Surprisingly, a lower frequency of CD8⁺IFN- γ ⁺ cells was
 35 observed after PepTivator-ADV5 Hexon stimulation com-
 36 pared with ADV2 Hexon protein stimulation, unlike what
 37 was observed for CD4⁺IFN- γ ⁺. However these differences
 38 did not reach significance. As earlier reported with CMV,
 39 the pp65 15mer peptide pool stimulated a similar CD4⁺
 40 response as did pp65 protein.²⁷ These authors also observed
 41 that although 8-12 amino acid peptides produced the
 42 highest level of CD8⁺ responses, 15 amino acid peptides
 43 were still very effective. Finally, Kiecker et al concluded
 44 that sets of peptides of 15 amino acids length with 11 amino
 45 acids overlap represented a good compromise for stimulat-
 46 ing both CD8 and CD4 T cells in a number of applica-
 47 tions.²⁸ Elispot results showed lower IFN- γ secretion
 48 secondary to PepTivator-ADV5 Hexon stimulation as
 49 compared with ADV2 Hexon protein. However, we
 50 observed that this variation was different among the
 51 patients, some presenting better IFN- γ secretion after
 52 PepTivator-ADV5 Hexon stimulation. The advantage of
 53 this peptide pool is the absence of HLA restriction, as with
 54 a single peptide that confers the same flexibility as Hexon
 55 protein. Moreover, the GMP-grade production process of
 56 PepTivator-ADV5 Hexon guarantees clinical use, whereas
 57 production of Hexon protein on the Hep2 tumor cell line
 58 limits safe clinical use, as earlier mentioned. Taking all
 59 these parameters into account, PepTivator-ADV5 Hexon
 60 seems a very interesting ADV stimulating antigen for
 61 isolation of ADV-specific T cells.

62 The enrichment results obtained in our study can
 63 hardly be compared with other published studies as the
 population upon which the percentages are given is not
 always specified. However, in our study, we were able

64 to calculate CD3⁺IFN- γ ⁺ purity after isolation of
 65 52% \pm 22% that is lower than that reported by Feucht-
 66 llinger et al, 63.4 \pm 19.1%.²⁹ Nevertheless, we obtained a 625-
 67 fold enrichment of CD3⁺IFN- γ ⁺ cells that is higher than
 68 that reported by Tramsen et al, with *Aspergillus* stimulation
 69 (60 fold).³⁰ Although a relative reproducibility of
 70 CD4⁺IFN- γ ⁺ cell purity can be observed, great variability
 71 seems with CD8⁺IFN- γ ⁺ cells, usually presenting lower
 72 purities than CD4⁺IFN- γ ⁺ cells. This was also reported by
 73 Feuchtlinger et al.²⁹ The presence of both types of cells is
 74 necessary for the development of sustained immune
 75 response in the recipient.³¹ Surprisingly, the proportion of
 76 CD4⁺ and CD8⁺ cells in total nucleated cells after
 77 isolation is very low, mostly in experiments carried out
 78 with leukapheresis. Part of the explanation is the presence
 79 of red blood cells that probably disturbed the FACS
 80 analysis, even if a specific lysis was carried out before
 81 acquisition. This phenomenon was enhanced on the sample
 82 before isolation. To circumvent this problem, on the next
 83 ADV-specific T-cell isolations we shall carry out, we shall
 84 label cells with an anti-CD45 antibody, choosing a different
 85 clone to the one used for the immunoselection.

86 In a clinical setting, ADV-specific T cells would be
 87 infused immediately after isolation counting on in vivo
 88 ADV load stimulation. In this study, in vitro expansion of
 89 this population was carried out with IL-2 and irradiated
 90 negative fraction, to obtain enough cells to conduct
 91 functional assays, and 1.7 log expansion of total nucleated
 92 cells was achieved after a culture of 2 weeks. Fujita et al
 93 also reported good amplification with IL-15.³² However, we
 94 must remember that these in vitro expansion protocols do
 95 not reproduce exactly what happens in vivo.

96 After expansion, the number of IFN- γ positive T cells
 97 decreased slightly (from 52% \pm 22% to 44% \pm 22%). Such
 98 a variation was also reported in a higher proportion by
 99 Feuchtlinger et al and Tramsen et al after *Aspergillus*
 100 restimulation.^{15,30} Other authors, using ADV lysate resti-
 101 mulation observed a high expansion of CD4⁺IFN- γ ⁺ cells
 102 but a dramatic decrease in CD8⁺IFN- γ ⁺ cells.³³ In our
 103 study, cells were also able to proliferate upon antigenic
 104 restimulation and this was only observed after 4 days with
 105 PepTivator-ADV5 Hexon but not after mitogenic stimula-
 106 tion probably because of the ADV restricted specificity of
 107 the T cells. Surprisingly, in case n°4 a marked decrease in
 108 the CD4⁺IFN- γ ⁺ population was observed (47.4% to
 109 8.3%) whereas high proliferation after PepTivator-ADV5
 110 Hexon restimulation was observed meaning the ADV-
 111 specific CD4⁺ cells do not disappear. One explanation
 112 could be that these cells, after expansion, no longer secrete
 113 IFN- γ but IL-2 that has been described as a functional
 114 signature of antigen clearance for other pathogens.³⁴ A
 115 broad intracytoplasmic cytokine pattern including IFN-
 116 γ , IL-2, and TNF- α would be very useful. We propose
 117 to carry out this study during future research. After
 118 expansion, the efficacy of ADV-specific T cells was also
 119 determined by a cytotoxicity assay using ADV infected or
 120 presenting target cells. Crossreactivity of PepTivator-
 121 ADV5 Hexon-generated T cells against different ADV
 122 groups (C, B1, and D) was observed, allowing clinical use
 123 regardless of the ADV serotype responsible for infection.
 124 PHA blasts were studied here because they can be produced
 125 from a small number of PBMC although DC initiation
 126 requires CD14 immunomagnetic isolation that is cell-
 127 consuming and hardly applicable when the initial sample
 128 is a blood bag. At an effector-to-target cell ratio of 10:1, in

1 which nonspecific cytotoxicity of uninfected target cells was
 2 the lowest, we observed specific lysis comparable with that
 3 earlier reported with different target cells.^{15,23} Although the
 4 efficacy of ADV-specific T cells was shown, absence of
 5 allogeneic effect remained to be shown. We were interested
 6 to compare the allogeneic effect after selection and in vitro
 7 expansion with that of the initial PBMC before selection, as
 8 doses of DLI begin to be defined. As a marked reduction of
 9 1.27 log of alloreactivity determined by mixed lymphocyte
 10 reaction was observed, we suggest that in a clinical setting
 11 we could safely infuse 1 log more of the isolated popula-
 12 tion than the lowest dose of DLI currently carried out
 13 according to the HLA matching. For example, infusion
 14 of a DLI of 1×10^4 CD3/kg was not found to be associated
 15 with GvHD in the presence of a haploidentical mismatch.³⁵
 16 This could even be modulated with regard to the ADV-
 17 specific T-cell proportion. However, only clinical trial results
 18 will help define the maximum threshold of isolated T cells that
 19 do not generate GvHD. In the meantime, it seems safe to
 20 propose in clinical trials the lowest currently carried out DLI
 21 doses according to the HLA matching.

22 Working on thawed leukapheresis could be very useful
 23 when multiple anti-ADV infusions need to be carried out.
 24 Therefore, we also tried an immunoselection with thawed
 25 leukapheresis cells (Table 3). Cells of donor 6 were frozen
 26 and thawed 1 month later to carry out ADV-specific T-cell
 27 selection. We observed a low population of secreting IFN- γ
 28 CD4⁺ and CD8⁺ cells (22% and 10%, respectively)
 29 as compared with fresh leukapheresis isolated cells
 30 (73.2% of CD4⁺IFN- γ ⁺ gated on CD4⁺ cells and 59.2%
 31 of CD8⁺IFN- γ ⁺ gated on CD8⁺ cells). However, after
 32 expansion, cytotoxicity assay led to better results than the
 33 expanded population from the same fresh isolated cells
 34 (16% vs. 6% specific lysis, respectively). The main problem
 35 remains cell viability that is very low after isolation in this
 36 case: 26.3% versus 91.6% with the same fresh cells.
 37 However, the same loss of IFN- γ specific T cells during
 38 the selection process is observed with fresh or thawed cells
 39 (47.5% vs. 46.6%, respectively). Hence, the immunoselec-
 40 tion does not affect cells but mainly concentrates dead cells
 41 in the positive fraction. This was also observed to a lesser
 42 extent with fresh cells (viability: 76% \pm 13.1%), and was
 43 earlier reported.²⁹

44 Such full clinical-grade specific T-cell isolation could
 45 easily be transposed to other infectious pathogens, the
 46 only restriction being the availability of the GMP-grade
 47 immunogenic antigen. For example, it has been described
 48 for CMV,³⁶ and more recently for Aspergillus.³⁰ In
 49 addition, Fujita et al recently reported selecting specific T
 50 cells against 3 viruses: EBV, CMV, and ADV, at research
 51 scale, with the IFN- γ capture technology and the MACS
 52 device.³² Cells were split and stimulated separately using
 53 ADV vectors encoding the CMV-pp65 gene or encoding the
 54 EBV-LMP 2 gene, to avoid antigenic competition. After the
 55 stimulation, cells were pooled for the isolation step.
 56 Selected cells were then expanded to carry out functional
 57 testing. Authors reported that selected and expanded cells
 58 were able to kill target cells pulsed with peptide pools from
 59 each virus antigen. Such an attractive strategy could be
 60 easily transposed using available clinical-grade peptide
 61 pools as stimulating antigens, maintaining or not the
 62 separate stimulation step while following the process on
 63 pooled cells.

As earlier reported, the IFN- γ capture system com-
 bined with synthetic peptide pools of immunodominant

antigens offers great flexibility allowing clinical-grade CTL
 isolation against one or more pathogens, regardless of
 the HLA restriction and low initial CTL frequency (as
 for ADV) that today constitute the limitations for the
 therapeutic use of the multimer technology.²⁶

Our results suggest that full clinical grade in vitro
 efficient ADV-specific T cells with a decreased level of
 alloreactivity compared with PBMC can be successfully
 generated. Now, we need to assess in vivo efficiency and
 nonalloreactivity. Inclusion criteria of the patients should
 take into account failure of antiviral treatment combined to
 absence of ADV-specific circulating T cells in recipients,
 but their presence in donor, as stimulation does not activate
 naive T cells.³⁷ Moreover, as GvHD immunosuppressive
 treatment effect on infused ADV-specific T cells is not
 known, patients with noncontrolled GvHD should be
 excluded. The clinical trial must be carefully designed to
 identify significant results in complicated and unstable
 clinical situations. However, today, we must bear in mind
 that ADV-specific T-cell infusion remains the only alter-
 native if antiviral treatment fails.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mrs Serrurier, Mrs Maix, Mrs
 Masson, Mrs Brassard, Mrs Haler, Mrs Binot-Saintot, and
 Mr Burton from UTCT for their excellent technical
 assistance.

REFERENCES

1. Handgretinger R, Lang P, Schumm M, et al. Immunological aspects of haploidentical stem cell transplantation in children. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;938:340–357.
2. Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM. Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. *N Engl J Med.* 1994;331:679–680.
3. Zaia JA, Sissons JG, Riddell S, et al. Status of cytomegalovirus prevention and treatment in 2000. *Hematol Am Soc Hematol Educ Prog.* 2000;■:339–355.
4. Chakrabarti S, Mautner V, Osman H, et al. Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood.* 2002;100:1619–1627.
5. Cavazzana-Calvo M, Bensoussan D, Jabado N, et al. 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. *Br J Haematol.* 1998;103:543–551.
6. Kuehnle I, Huls MH, Liu Z, et al. CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hemopoietic stem-cell transplantation. *Blood.* 2000;95:1502–1505.
7. Flomenberg P, Babbitt J, Drobyski WR, et al. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis.* 1994;169:775–781.
8. Kampmann B, Cubitt D, Walls T, et al. Improved outcome for children with disseminated adenoviral infection following allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2005;130:595–603.
9. van Tol MJ, Kroes AC, Schinkel J, et al. Adenovirus infection in paediatric stem cell transplant recipients: increased risk in young children with a delayed immune recovery. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36:39–50.
10. Lewin SR, Heller G, Zhang L, et al. Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood.* 2002;100:2235–2242.
11. Feuchtinger T, Lucke J, Hamprecht K, et al. Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection

- 1 after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2005; 128:503–509.
- 3 12. Heemskerk B, Lankester AC, van Vreeswijk T, et al. Immune
5 reconstitution and clearance of human adenovirus viremia
7 in pediatric stem-cell recipients. *J Infect Dis.* 2005;191:
9 520–530.
- 11 13. Myers GD, Bollard CM, Wu MF, et al. Reconstitution
13 of adenovirus-specific cell-mediated immunity in pediatric
15 patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone
17 Marrow Transplant.* 2007;39:677–686.
- 19 14. Bordignon P, Carret AS, Venard V, et al. Treatment of
21 adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hema-
23 topoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2001;32:
25 1290–1297.
- 27 15. Feuchtinger T, Lang P, Hamprecht K, et al. Isolation and
29 expansion of human adenovirus-specific CD4+ and CD8+
31 T cells according to IFN-gamma secretion for adjuvant
33 immunotherapy. *Exp Hematol.* 2004;32:282–289.
- 35 16. Hromas R, Cornetta K, Srouf E, et al. Donor leukocyte
37 infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections
39 after T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood.*
41 1994;84:1689–1690.
17. Childs R, Sanchez C, Engler H, et al. High incidence of adeno-
and polyomavirus-induced hemorrhagic cystitis in bone
marrow allotransplantation for hematological malignancy
following T cell depletion and cyclosporine. *Bone Marrow
Transplant.* 1998;22:889–893.
18. Chakrabarti S, Collingham KE, Fegan CD, et al. Adenovirus
infections following haematopoietic cell transplantation: is
there a role for adoptive immunotherapy? *Bone Marrow
Transplant.* 2000;26:305–307.
19. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, et al. Infusion of cytotoxic
T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-
induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood.*
1998;92:1549–1555.
20. 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.* 1995;333:1038–1044.
21. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, et al. Infusion of cytomegalo-
virus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV
infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood.*
2002;99:3916–3922.
22. Leen AM, Myers GD, Sili U, et al. Monoculture-derived T
lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce
clinically relevant effects in immunocompromised individuals.
Nat Med. 2006;12:1160–1166.
23. Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C, et al. Safe
adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the
treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic
stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2006;134:64–76. 43
24. Tang J, Olive M, Pulmanusahakul R, et al. Human CD8+
cytotoxic T cell responses to adenovirus capsid proteins. 45
Virology. 2006;350:312–322.
25. Neofytos D, Ojha A, Mookerjee B, et al. Treatment of 47
adenovirus disease in stem cell transplant recipients with
cidofovir. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:74–81. 49
26. Leen AM, Heslop HE. Cytotoxic T lymphocytes as immune-
therapy in haematological practice. *Br J Haematol.* 2008;143:
169–179. 51
27. Maecker HT, Dunn HS, Suni MA, et al. Use of overlapping
peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. 53
J Immunol Methods. 2001;255:27–40.
28. Kiecker F, Streitz M, Ay B, et al. Analysis of antigen-specific 55
T-cell responses with synthetic peptides—what kind of peptide
for which purpose? *Hum Immunol.* 2004;65:523–536. 57
29. Feuchtinger T, Richard C, Joachim S, et al. Clinical grade 59
generation of hexon-specific T cells for adoptive T-cell transfer
as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell
transplantation. *J Immunother.* 2008;31:199–206. 61
30. Tramsen L, Koehl U, Tonn T, et al. Clinical-scale generation 63
of human anti-Aspergillus T cells for adoptive immunother-
apy. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43:13–19.
31. Sun JC, Williams MA, Bevan MJ. CD4+ T cells are required 65
for the maintenance, not programming, of memory CD8+
T cells after acute infection. *Nat Immunol.* 2004;5:927–933. 67
32. Fujita Y, Leen AM, Sun J, et al. Exploiting cytokine secretion 67
to rapidly produce multivirus-specific T cells for adoptive
immunotherapy. *J Immunother.* 2008;31:665–674. 69
33. Chatziandreou I, Gilmour KC, McNicol AM, et al. Capture 71
and generation of adenovirus specific T cells for adoptive
immunotherapy. *Br J Haematol.* 2007;136:117–126.
34. Pantaleo G, Harari A. Functional signatures in antiviral T-cell 73
immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev
Immunol.* 2006;6:417–423. 75
35. Lewalle P, Triffet A, Delforge A, et al. Donor lymphocyte 77
infusions in adult haploidentical transplant: a dose finding
study. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31:39–44.
36. Rauser G, Einsele H, Sinzger C, et al. Rapid generation of 79
combined CMV-specific CD4+ and CD8+ T-cell lines for
adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell
transplants. *Blood.* 2004;103:3565–3572. 81
37. Hanley PJ, Cruz CR, Savoldo B, et al. Functionally active 83
virus-specific T-cells that target CMV, adenovirus and EBV
can be expanded from naive T-cell populations in cord blood
and will target a range of viral epitopes. *Blood.* 2009;■:■–■. **AQ3**

Résultats obtenus après injection de CTL anti-ADV chez des patients immunodéprimés atteints d'une infection à ADV :

Présentation de trois cas cliniques compassionnels.

Dans cette troisième partie de nos travaux, nous allons présenter les résultats cliniques obtenus chez 3 patients traités avec des CTL anti-ADV en compassionnel après non opposition de l'AFSSaPS.

I- Cas clinique n°1 : patient CP

Le patient CP est un adulte âgé de 48 ans allogreffé avec une CSP géno-identique pour une maladie de Hodgkin stade IV en 2^{ème} rémission après un conditionnement non myéloablatif (Fludarabine 25 mg/m²/jour, 5 jours et Melphalan 140 mg/m²/j, 6 jours). La prophylaxie de la GvH consistait en l'association Ciclosporine et Cellcept. A J₆₇ après l'allogreffe, le patient développe une GvH aiguë digestive haute de grade II résolutive sous corticoïdes. A J₉₀, suite à un arrêt brutal du traitement immunosuppresseur, le patient est ré-hospitalisé pour une GvH aiguë sévère avec expression cutanée, hépatique et digestive. Plusieurs lignes de traitements immunosuppresseurs ont été réalisées : Zenapax puis Rémicade puis Mabcampath, séances de Photophérèses extra-corporelles, tout en maintenant en parallèle une corticothérapie. Cependant, la GvH s'avère difficilement maîtrisable et des complications infectieuses surviennent.

Parmi les agents infectieux impliqués, l'adénovirus se réactive à partir de J₁₁₀. La charge virale augmente sans signes cliniques, initialement stabilisée par 6 perfusions de Cidofovir (Vistide) puis échappe au traitement.

Des CTL produits à l'UTCT (CHU de Nancy) contre la protéine hexon-ADV2 à partir d'une leukaphérèse de sa donneuse géno-identique, selon le protocole décrit précédemment (Aïssi-Rothé *et al.*, 2010), lui sont injectés à J₁₂₈.

Parallèlement à la production des CTL anti-ADV, nous avons contrôlé par Elispot IFN γ que les cellules de la donneuse répondaient à une stimulation antigénique ADV. Après stimulation des CMN par la protéine hexon-ADV2, 360 SFC/10⁶ PBMC ont été obtenus. Des résultats

similaires ont été obtenus après stimulation par les autres antigènes d'ADV (le PepTivator-ADV5 Hexon, les lysats ADV2/5) ; la PHA a été utilisée comme contrôle positif (Figure 17A).

Nous avons également contrôlé la réponse immunitaire du patient juste avant l'injection des CTL anti-ADV : une réponse de 8 SFC/10⁶ PBMC suite à une stimulation par la protéine hexon-ADV2 a pu être observée et aucune réponse avec les autres antigènes. Une réponse très faible (21 SFC/10⁶ PBMC) a été obtenue avec la PHA (Figure 17A).

I-1- Production des CTL anti-ADV

Nous avons réalisé une sélection immunomagnétique de grade clinique des CTL anti-ADV à partir d'une leukaphérèse du donneur. Nous avons stimulé 1 x 10⁹ CNT (cellules nucléées totales) avec la protéine Hexon-ADV2 ; le reste de la leukaphérèse a été cryoconservé. Après 16h de stimulation, 0,31% CD4+IFN γ + et 0,51% CD8+IFN γ + ont été obtenus avant immunosélection, à partir des cellules CD4+ et CD8+, respectivement (Figure 17B).

Après sélection sur le CliniMACS 19,2 x 10⁶ CNT ont été obtenus, avec une pureté de 13,3% de CD4+IFN γ + sur les CD4+ et 26,6% de CD8+IFN γ + sur les CD8+. Une viabilité cellulaire de 73,3% a été obtenue. Il est important de noter que cette technique ne tue pas les cellules mais concentre les cellules mortes dans la fraction positive, parce que ces dernières fixent les anticorps de sélection de façon non spécifique.

Compte tenu de la pureté médiocre en cellules IFN γ + la décision de ne réinjecter que la moitié des cellules a été prise par le clinicien afin de limiter les risques de GvH. Le patient a reçu une dose de 0,90 x 10⁴ CD3+IFN γ + /kg. Le reste de la fraction positive a été cryoconservé (Tableau 8).

Tableau 8 : Génération des CTL anti-ADV injectés au patient CP.

	CTL anti-ADV (Hexon)				
	Haut de colonne	Fract (-)	Fract (+)	Fract (+) injectée	Fract (+) congelée
Cellules Nucléées totales (10^6)	928	911	19,2	9,6	9,6
Viabilité (%)	99,24	95,75	73,53	73,53	73,53
CD4 (%)	50,73	48,07	33,67	33,67	33,67
CD4 (10^6)	470,77	437,92	6,46	3,23	3,23
CD4/kg (10^4)	588,47	547,40	8,08	4,04	4,04
CD4+/IFN γ + (%)	0,31	0,03	13,33	13,33	13,33
CD4+/IFN γ + (10^6)	1,459	0,131	0,862	0,431	0,431
CD4+ IFN γ + /kg (10^4)	1,82	0,16	1,08	0,54	0,54
CD4/kg non IFN γ (10^4)	586,64	547,23	7,00	3,50	3,50
CD8 (%)	25,5	23,68	11,2	11,2	11,2
CD8 (10^6)	236,64	215,72	2,15	1,08	1,08
CD8/kg (10^4)	295,80	269,66	2,69	1,34	1,34
CD8+/IFN γ + (%)	0,51	0,3	26,63	26,63	26,63
CD8+/IFN γ + (10^6)	1,207	0,647	0,573	0,286	0,286
CD8+/IFN γ + /kg (10^4)	1,51	0,81	0,72	0,36	0,36
CD8/kg non IFN γ (10^4)	294,29	268,85	1,97	0,99	0,99

La réalisation des contrôles qualité fonctionnels nécessite l'amplification *in vitro* d'un échantillon de la fraction positive.

I-1-1- Amplification des CTL anti-ADV :

Un échantillon des CTL anti-ADV ($1,99 \times 10^6$) a été mis en culture *in vitro* pendant 12 jours et les CTL ont été amplifiés de 1,4 Log, permettant ainsi l'obtention de $53,2 \times 10^6$ cellules. Des cellules nourricières (issues de la fraction négative irradiée) ont été ajoutées à J₀ et J₇ et de l'IL2 a été ajoutée à la culture tous les jours. (Figure 17C).

I-1-2- Dosage des cytokines intracellulaires :

La sécrétion d'IFN γ par les CTL anti-ADV après amplification *in vitro* a été étudiée par le test de dosage des cytokines intracellulaires (Figure 17D). Les CTL anti-ADV ont été stimulés 16 heures avec la protéine hexon-ADV2. Après stimulation, 76,1% des CD4+ et 45,7% des CD8+ sécrètent de l'IFN γ .

I-1-3- Cytotoxicité des CTL anti-ADV :

Afin de vérifier la fonctionnalité des CTL anti-ADV après amplification *in vitro*, un test de cytotoxicité (^{51}Cr) a été réalisé en utilisant comme cellules cibles des DC pulsées par les lysats ADV2/5, le PepTivator-ADV5 Hexon ou non et des blastes PHA présentant ou non le PepTivator-ADV5 Hexon pour des rapports de cellules effectrices : cellules cibles de 5 :1, 10 :1, 20 :1 et 40 :1. Les résultats de la cytotoxicité des CTL anti-ADV vis-à-vis des cellules cibles présentatrices d'antigènes sont illustrés dans la figure 17E et présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Cytotoxicité des CTL anti-ADV après amplification *in vitro*.

	DC IN	DC ADV2	DC ADV5	Blastes PHA NI	Blastes PHA PepT-ADV5
5 :1	2,25	5,31	14,14	0	21,85
10 :1	3,61	16,93	10,32	0	24,05
20 :1	3,61	31,62	7,61	0	27,74
40 :1	3,15	24,04	9,78	0	28,59

Une cytotoxicité de 31.6% est observée au rapport 20 :1 vis-à-vis des DC infectées par l'ADV2, alors qu'elle est de 7.6% vis-à-vis des DC ADV5 et de 3.6% vis-à-vis des DC non infectées.

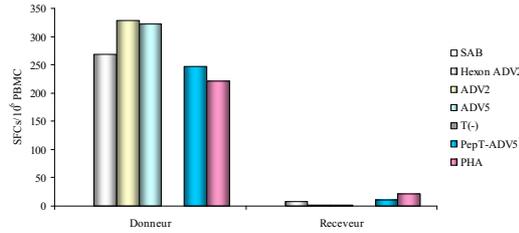
Une cytotoxicité de 28% est observée au rapport 20 :1 vis-à-vis des Blastes chargés avec le PepTivator-ADV5, alors qu'elle est de 0% vis-à-vis des Blastes non chargés.

I-1-4- Prolifération spécifique des CTL anti-ADV :

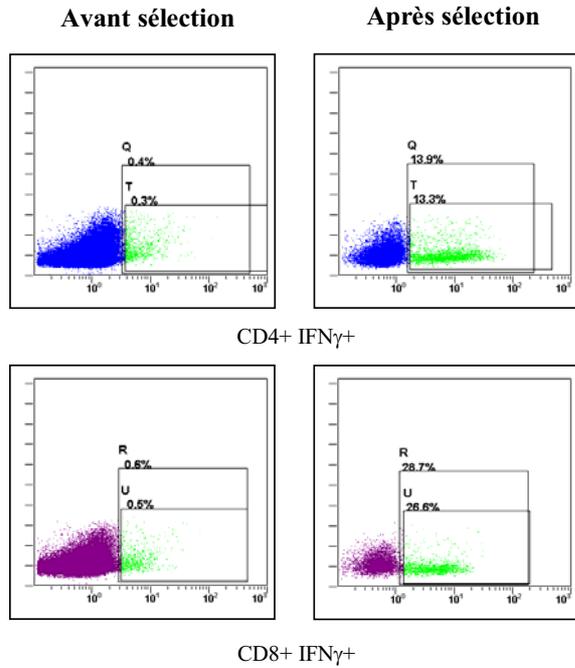
Une prolifération spécifique des CTL anti-ADV a été observée grâce au test de transformation lymphocytaire (TTL) après 4 et 6 jours de stimulation (selon l'antigène utilisé). Nous avons observé une très bonne prolifération des cellules après 4 jours de stimulation par le PepTivator-ADV5 Hexon (174590 cpm). Une faible prolifération de 24661 cpm a été obtenue après stimulation au 4^{ème} ou 6^{ème} jour avec la PHA. De façon surprenante, nous n'avons pas observé de réponse proliférative après stimulation par les antigènes protéiques ADV (protéine Hexon-ADV2 ou lysats d'ADV2/5). Ces derniers résultats traduisent peut-être l'insuffisance de cellules présentatrices d'antigène après amplification (Figure 17F).

I-1-5- Alloréactivité des CTL anti-ADV :

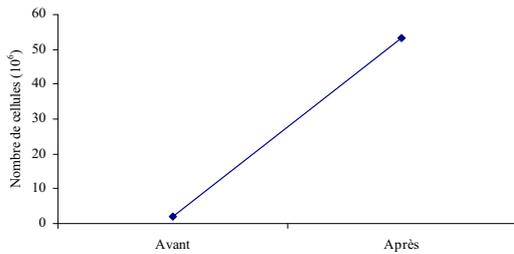
L'alloréactivité résiduelle potentielle des CTL anti-ADV amplifiés *in vitro* a été étudiée contre des CMN irradiées de trois donneurs HLA différents et comparée avec l'alloréactivité des CMN du donneur non sélectionnées. Comme le montre la Figure 17G, une diminution de 1.82 log de l'alloréactivité a été observée avec les CTL anti-ADV en comparaison avec les CMN avant sélection (en moyenne 574 cpm vs. 37934 cpm, respectivement).



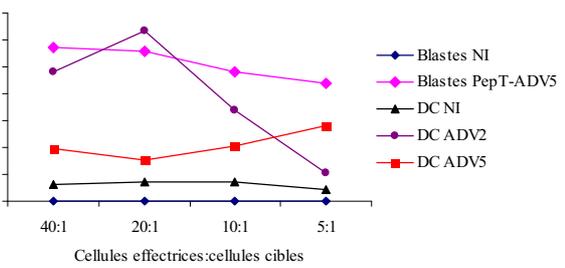
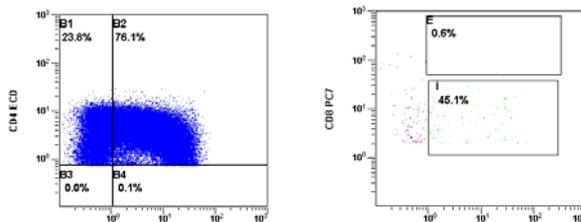
A: Détection des cellules T anti-ADV chez le donneur et chez le receveur par Elispot IFN γ juste avant la production des CTL anti-ADV.



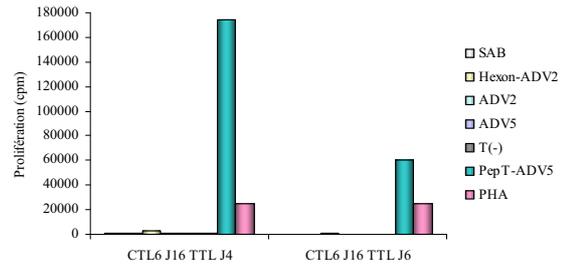
B: Analyse cytométrique avant et après sélection. Le pourcentage des CD4+IFN γ + et CD8+IFN γ + sont définis sur les cellules T CD4+ et CD8+, respectivement, en excluant initialement les cellules CD14+ et les cellules mortes 7AAD+.



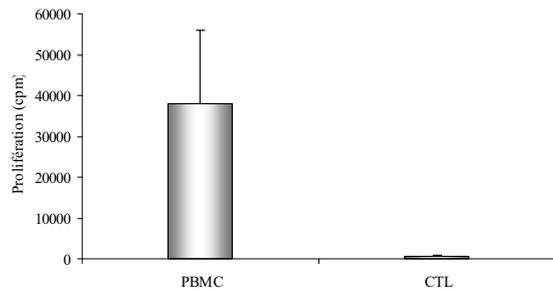
C: Amplification *in vitro* des CTL anti-ADV après sélection. Une expansion de 1,4 log est observée après 12 jours en présence d'IL2 et de cellules nourricières autologues.



E: Cytotoxicité des CTL anti-ADV après amplification *in vitro*. Une lyse spécifique a été observée en utilisant des DC ou blastes PHA comme cellules cibles présentatrices d'antigènes (lysats ADV2/5 ou PepTivator-ADV5 Hexon, respectivement) ou non (NI) avec des rapports de 5 :1 à 40 :1.



F: Prolifération spécifique des CTL anti-ADV après amplification *in vitro*. Une prolifération spécifique des CTL anti-ADV a été détectée à J₄ et J₆ d'amplification *in vitro* par test de prolifération lymphoblastique.



G: Détection de l'alloréactivité avant et après sélection et amplification *in vitro*. Une réduction de 1,82 log de l'alloréactivité des CTL anti-ADV est détectée par culture mixte lymphocytaire contre les CMN de 3 donneurs HLA différents.

D: Marquage des cytokines intracellulaires des CTL CD4+ et CD8+ anti-ADV après amplification *in vitro*. Le dosage de l'IFN γ intracellulaire a été réalisé après stimulation des CTL anti-ADV avec la protéine Hexon-ADV2 pendant 16h.

Figure 17: Tests fonctionnels des CTL anti-ADV injectés au premier patient.

I-2- Evolution clinique du patient après injection des CTL anti-ADV

Au moment de l'injection des CTL anti-ADV, la charge adénovirale était de $1,46 \times 10^4$ copies/ml et aucune réponse cellulaire anti-ADV n'a été détectée par Elispot IFN γ .

Une réponse cellulaire de 177 SFC/ 10^6 PBMC a été obtenue 7 jours après la première injection des CTL anti-ADV. Bien que le contrôle *in vitro* montre l'absence d'alloréactivité la GvH aiguë, mal maîtrisée avant l'injection s'est réactivée et un traitement immunosuppresseur par Zenapax a été administré. Une augmentation de la charge adénovirale a été observée, suite aux traitements immunosuppresseurs malgré 3 injections à demi-dose de cidofovir à 15 jours d'intervalle (Figure 18).

De ce fait, une seconde injection de CTL anti-ADV a été ainsi réalisée à J₁₆₇. Ces CTL anti-ADV ont été obtenus après décongélation des CTL anti-ADV précédemment produits. Après décongélation, une viabilité cellulaire de 14% a été obtenue. Nous n'avons pas pu réaliser les contrôles fonctionnels des cellules après décongélation à cause du nombre faible de CD3+ ($0,22 \times 10^6$ cellules/ml). Aucune réponse cellulaire anti-ADV n'a été obtenue après la deuxième injection des CTL anti-ADV et on a assisté à l'augmentation de la charge adénovirale.

Après l'échec des multiples thérapies entreprises pour les différentes complications secondaires liées à la GvH et aux infections, le patient est décédé 193 jours après l'allogreffe de CSH.

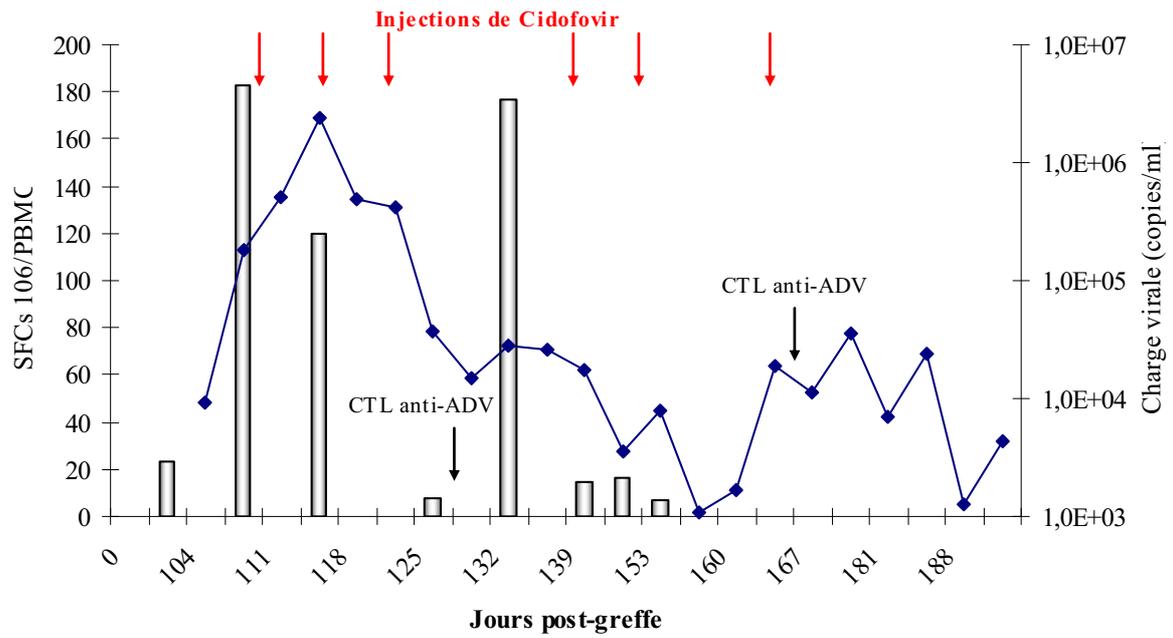


Figure 18: Quantification des cellules T sécrétrices d'IFN γ par Elispot (histogrammes) et courbe de l'évolution de la charge adénovirale par PCR après injection des CTL anti-ADV (losanges bleus).

II- Deuxième cas clinique : *patient NC*

Le patient NC est un adulte âgé de 36 ans allogreffé avec une Moelle osseuse d'un donneur non apparenté 10/10 identique pour une LAM en 2^{ème} rémission complète après un conditionnement NMA (Fludarabine 25 mg/m²/jour pendant 5 jours, Melphalan 140 mg/m²/j pendant 1 jour et SAL Fresenius 30mg/kg/j pendant 3 jours). La prophylaxie de la GvH consistait en l'association Ciclosporine et Cellcept. Après 44 jours de greffe, le patient présentait une GvH aiguë de grade II résolutive sous corticoïdes. A J₁₄₄, il présentait une GvH chronique sévère (digestive, hépatique et hématologique) traitée avec Zenapax, Rémicade puis Mabcampath.

Au décours du traitement par Mabcampath, une réplication ADV est survenue, à J₂₄₇ post-greffe, sans signes cliniques, initialement stabilisée par 6 perfusions de Cidofovir (Vistide) puis un échappement de la réponse a été observé.

Des CTL produits à l'UTCT (CHU de Nancy) avec le PepTivator-ADV5 Hexon à partir d'une leukaphérèse de son donneur non apparenté, selon le protocole décrit précédemment (Aïssi-Rothé *et al*, 2010), lui ont été injectés à J₃₁₀.

Parallèlement à la production des CTL anti-ADV, nous avons contrôlé par Elispot IFN γ que les cellules du donneur répondaient à une stimulation antigénique ADV. Après stimulation des CMN par le PepTivator-ADV5 Hexon, 95 SFC/10⁶ PBMC ont été obtenus. Des résultats similaires ont été observés après stimulation par les autres antigènes d'ADV (la protéine Hexon-ADV2, les lysats ADV2/5). La PHA a été utilisée comme contrôle positif (Figure 19A). Bien qu'une réponse positive soit observée chez le donneur, elle n'est pas très élevée, ce qui constitue un handicap pour la sélection des CTL anti-ADV.

Nous avons également contrôlé la réponse immunitaire du patient juste avant l'injection des CTL anti-ADV : 110 SFC/10⁶ PBMC suite à une stimulation par le PepTivator-ADV5 Hexon ont pu être quantifiés alors qu'aucune réponse n'a été détectée avec les autres antigènes. Une réponse très faible de 50 SFC/10⁶ PBMC a été obtenue avec la PHA.

II-1- Production des CTL anti-ADV

Nous avons réalisé une sélection immunomagnétique de grade clinique des CTL anti-ADV à partir d'une leukaphérèse du donneur. Nous avons stimulé 1×10^9 CNT (cellules nucléées totales) avec le PepTivator-ADV5 Hexon; le reste de la leukaphérèse a été cryoconservé. Après 6h de stimulation, 0,09% CD4+IFN γ + et 0,15% CD8+IFN γ + ont été obtenus avant immunosélection, à partir des cellules CD4+ et CD8+, respectivement (Figure 19B).

Après sélection sur le CliniMACS $1,82 \times 10^6$ CNT ont été obtenus, avec une pureté de 58% de CD4+IFN γ + sur les CD4+ et 80,5% de CD8+IFN γ + sur les CD8+. Une viabilité cellulaire de 80,5% a été obtenue. Un très faible pourcentage de CD4+ et CD8+ a été observé après immunosélection à cause du grand nombre de globules rouges présents dans la leukaphérèse qui ont résistés à la lyse effectuée avant cytométrie en flux (Tableau 10). Le patient a reçu une dose de $0,15 \times 10^4$ CD3+IFN γ + /kg. Cependant, cette dose est peut-être sous-estimée du fait des pourcentages de CD4+ et de CD8+ sous évalués.

Tableau 10 : Génération des CTL anti-ADV injectés au deuxième patient.

	Haut de colonne	Fract (-)	Fract (+)	Rendements
Cellules Nucléées totales (10^6)	857	528	1.82	
Viabilité (%)	99,9	99	89	
CD4 (%)	23.26		3.78	
CD4 (10^6)	199.34		0.07	
CD4/kg (10^4)	316.41		0.11	
CD4+IFN γ + (%)	0.09	0.0107	58.5	
CD4+IFN γ + (10^6)	0.18		0.04	
CD4+ IFN γ + /kg (10^4)	0.285		0.063	22.5 %
CD4/kg non IFN γ (10^4)	314.54		0.046	
CD8 (%)	9.6		3.68	
CD8 (10^6)	82.27		0.067	
CD8/kg (10^4)	130.6		0.106	
CD8+IFN γ + (%)	0.15	0,038	80.55	
CD8+IFN γ + (10^6)	0.123		0.054	
CD8+IFN γ + /kg (10^4)	0.195		0.086	44 %
CD8/kg non IFN γ (10^4)	130.4		0.02	

La réalisation des contrôles qualité fonctionnels nécessite l'amplification *in vitro* d'un échantillon de la fraction positive.

II-1-1- Amplification des CTL anti-ADV :

Les CTL anti-ADV ($0,012 \times 10^6$) ont été mis en culture *in vitro* pendant 16 jours et ont été amplifiés de 2,3 Log, permettant ainsi l'obtention de $2,5 \times 10^6$ cellules. Des cellules nourricières (issues de la fraction négative irradiée) ont été ajoutées à J₀, J₇, J₁₅ et de l'IL2 a été ajoutée à la culture tous les jours (Figure 19C). Après J₁₆, et malgré l'ajout quotidien d'IL2 et de cellules nourricières irradiées à J₂₁, nous avons assisté à la perte des CTL anti-ADV (Figure 19C) avant d'avoir eu suffisamment de cellules pour réaliser l'ensemble des tests fonctionnels.

II-1-2- Cytotoxicité des CTL anti-ADV :

Afin de vérifier la fonctionnalité des CTL anti-ADV après amplification *in vitro*, un test de cytotoxicité (⁵¹Cr) a été réalisé en utilisant comme cellules cibles des DC pulsées par les lysats ADV2/5 ou non pour un rapport de cellules effectrices : cellules cibles de 10 :1. Une lyse spécifique de 23% et de 18% est observée contre les DC pulsées avec le lysat ADV2 et l'ADV5, respectivement (Figure 19D). Aucune lyse spécifique n'a été observée contre les DC non infectées.

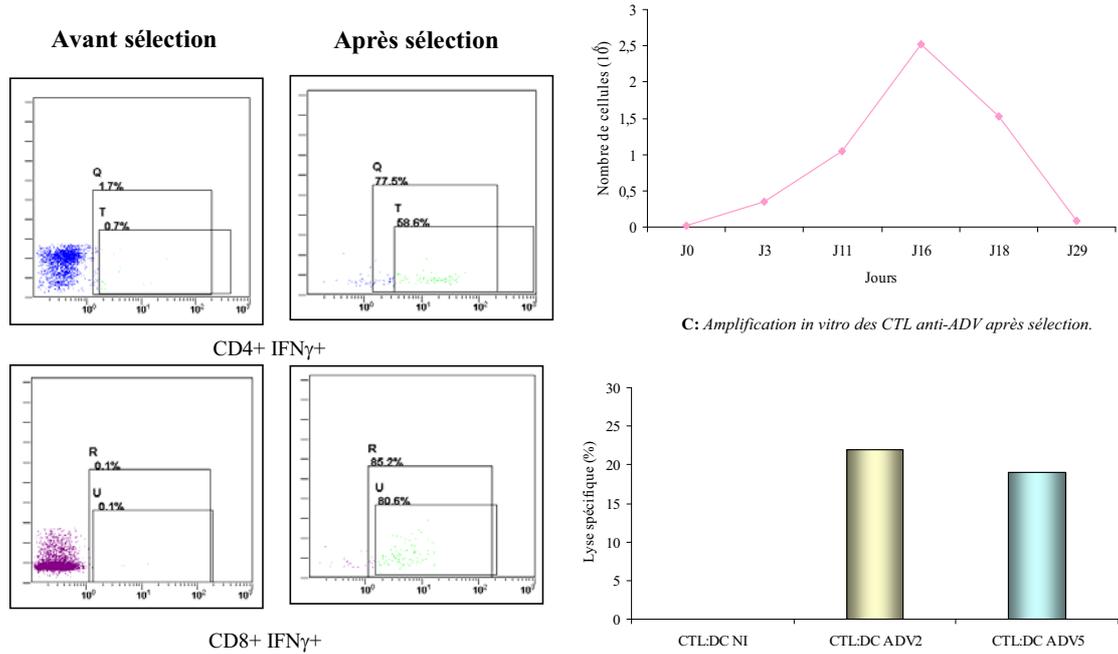
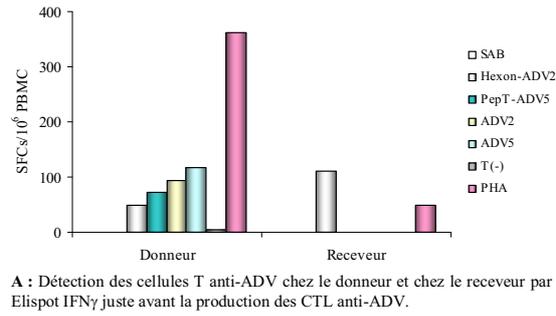


Figure 19: Tests fonctionnels des CTL anti-ADV injectés au deuxième patient.

II-2- Evolution clinique du patient après injection des CTL anti-ADV

Au moment de l'injection des CTL anti-ADV, la charge adénovirale était inférieure à 1×10^6 copies/ml et une faible réponse cellulaire anti-ADV a été détectée avec un antigène uniquement par Elispot IFN γ .

Une réponse cellulaire de 230 SFC/ 10^6 PBMC a été obtenue 7 jours après la première injection des CTL anti-ADV puis aucune réponse anti-ADV n'a pu être détectée de nouveau. Les traitements immunosuppresseurs pour maîtriser la GvH chronique n'ont pas été arrêtés. Malgré les traitements anti-viraux (Cidofovir) et l'injection des CTL anti-ADV, l'évolution clinique du patient a été défavorable avec la constitution d'une adénovirose maladie de localisation pulmonaire et hépatique et une charge virale croissante atteignant 6×10^8 copies/ml (Figure 20). L'évolution de cette adénovirose maladie et les complications de la GvH chronique ont conduit au décès du patient.

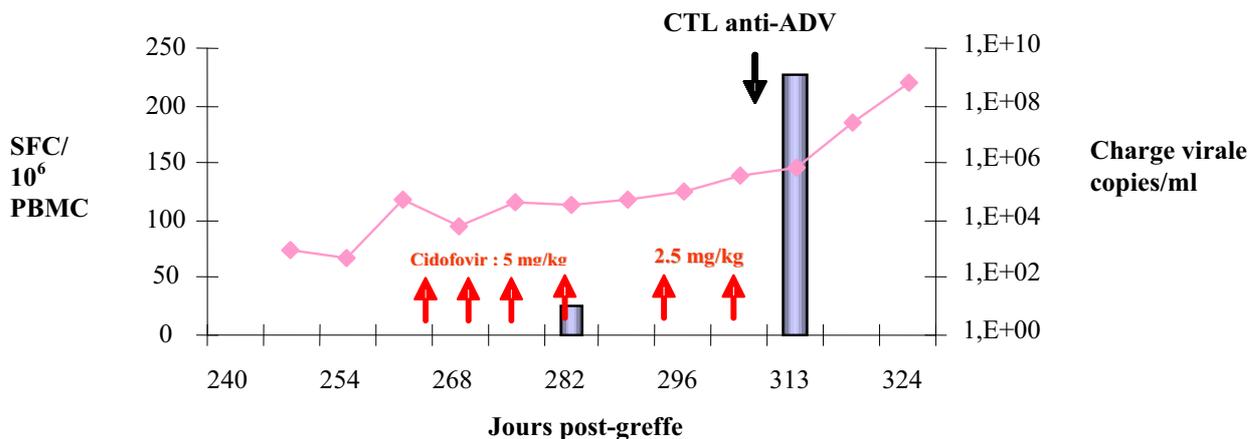


Figure 20 : Quantification des cellules T sécrétrices d'IFN γ par Elispot et mesure de la charge adénovirale par PCR avant et après injection des CTL anti-ADV.

III- Troisième cas clinique : *patient AM*

Le patient AM est un enfant âgé de 13 ans allogreffé à l'hôpital de Robert Debré de Paris avec une Moelle osseuse d'un donneur non apparenté 9/10 identique pour une LAL B en 3ème rémission complète, après un conditionnement myéloablatif (TBI/VP16 et SAL). Deux mois plus tard en l'absence de sortie d'aplasie, il reçoit une deuxième allogreffe avec le même donneur après un conditionnement NMA (Busulfan/Endoxan/Fludarabine/SAL). Le patient ne présente ni GvH aiguë ni GvH chronique.

A J₇₄ post-greffe, apparaît une infection ADV disséminée (PCR ADV positive dans le sang, la Moelle osseuse et au niveau des biopsies digestives). L'infection est traitée par 3 injections de Cidofovir (J₈₅, J₉₂ et J₁₁₆). Cependant, le patient présente une intolérance rénale au traitement par Cidofovir (créatinine élevée et protéinurie). Il est donc décidé de poursuivre le traitement de l'infection ADV par des CTL anti-ADV.

Des CTL anti-ADV produits à l'UTCT (CHU de Nancy) contre le PepTivator-ADV5 Hexon à partir d'une leukaphérèse de son donneur non apparenté, selon le protocole décrit précédemment (Aïssi-Rothé *et al*, 2010), lui ont été injectés à J₉₉.

Devant la faible efficacité de cette injection, une deuxième production de CTL anti-ADV est réalisée à partir d'une fraction de la leukaphérèse du donneur décongelée et est injectée à J₁₂₅.

III-1- Production des CTL anti-ADV

Parallèlement à la production des CTL anti-ADV, nous avons contrôlé par Elispot IFN γ que les cellules du donneur répondaient à une stimulation antigénique ADV. Après stimulation des CMN par le PepTivator-ADV5 Hexon, 393 SFC/10⁶ PBMC ont été obtenus. Des résultats supérieurs ont été observés après stimulation par les autres antigènes d'ADV (la protéine Hexon-ADV2, les lysats ADV2/5). La PHA a été utilisée comme contrôle positif (Figure 21A). La réponse très positive observée chez le donneur était très favorable pour la sélection des CTL anti-ADV.

Le patient étant sur Paris, nous n'avons pas pu contrôler par Elispot IFN γ sa réponse immunitaire vis-à-vis de l'ADV avant l'injection des CTL anti-ADV. Cependant, elle a été étudiée par le Laboratoire d'Immunologie de l'Hôpital Robert Debré dirigé par le Pr G. Sterkers, par la technique de cytokines intracellulaires et les TTL : aucune sécrétion d'IFN γ par les cellules CD4+ n'a pu être observée, ni aucune réponse proliférative des PBMC après stimulation par un antigène d'ADV (Figure 23 et 24).

III-1-1- Première injection de CTL anti-ADV à partir de la leukaphérèse du donneur :

Nous avons réalisé une sélection immunomagnétique de grade clinique des CTL anti-ADV à partir d'une leukaphérèse du donneur. Nous avons stimulé 1×10^9 CNT (cellules nucléées totales) avec le PepTivator-ADV5 Hexon; le reste de la leukaphérèse a été cryoconservé. Après 6h de stimulation, 0,04% CD4+IFN γ + et 0,02% CD8+IFN γ + ont été obtenus avant immunosélection, à partir des cellules CD4+ et CD8+, respectivement (Figure 21B).

Après sélection sur le CliniMACS 1×10^6 CNT a été obtenu, avec une pureté de 73,2% CD4+IFN γ +, sur les CD4+ et de 59,2% CD8+IFN γ +, sur les CD8+. Une viabilité cellulaire de 91,6% a été obtenue. Un très faible pourcentage de CD4+ et CD8+ a été observé après immunosélection à cause du grand nombre de globules rouges présents dans la leukaphérèse, et ce malgré une lyse avant cytométrie en flux.

Le patient a reçu une dose de $0,037 \times 10^4$ CD3+IFN γ + /kg (probablement sous estimée). Malgré les résultats très encourageants de l'Elispot IFN γ réalisé sur les cellules du donneur, on observe que la stimulation des cellules par le PepTivator-ADV5 Hexon au cours de la production des CTL a été médiocre. Le très faible nombre de cellules stimulées a pourtant été retenu sur la colonne avec un rendement de 48% pour les CD4+IFN γ + et de 78% pour les CD8+IFN γ + (Tableau 11).

Tableau 11 : Génération des CTL anti-ADV à partir de cellules fraîches injectés au troisième patient.

	Haut de colonne	Fract (-)	Fract (+)	Rendements
Cellules Nucléées totales (10^6)	465	373	1	
Viabilité (%)	99,74	99	91.6	
CD4 (%)	22.04		2.57	
CD4 (10^6)	102.49		0.03	
CD4/kg (10^4)	138.5		0.04	
CD4+/IFN γ + (%)	0.04	0.01	73.2	
CD4+/IFN γ + (10^6)	0.04		0.019	
CD4+ IFN γ + /kg (10^4)	0.054		0.026	48 %
CD4/kg non IFN γ (10^4)	138.4		0.014	
CD8 (%)	12.31		1.37	
CD8 (10^6)	57.24		0.014	
CD8/kg (10^4)	77.35		0.019	
CD8+/IFN γ + (%)	0.018	0,0046	59.2	
CD8+/IFN γ + (10^6)	0.01		0.008	
CD8+/IFN γ + /kg (10^4)	0.014		0.0108	78 %
CD8/kg non IFN γ (10^4)	77.33		0.008	

La réalisation des contrôles qualité fonctionnels nécessite l'amplification *in vitro* d'un échantillon de la fraction positive.

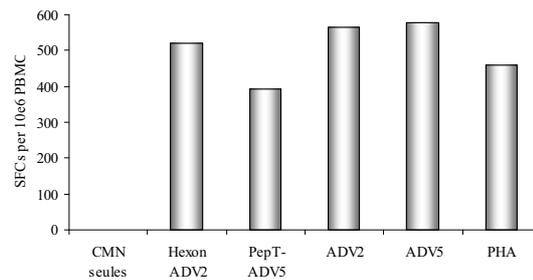
III-1-1-1- Amplification des CTL anti-ADV :

Les CTL anti-ADV ($0,02 \times 10^6$) ont été mis en culture *in vitro* pendant 21 jours et ont été amplifiés de 2,47 Log, permettant ainsi l'obtention de 6×10^6 cellules. Des cellules nourricières (issues de la fraction négative irradiée) ont été ajoutées à J₀, J₇, J₁₅ et J₂₁ et de l'IL2 a été ajoutée à la culture tous les jours. (Figure 21C). Après J₂₁, et malgré l'ajout quotidien d'IL 2 et de cellules nourricières irradiées, nous avons assisté à la perte des CTL anti-ADV (Figure 21C) avant d'avoir eu suffisamment de cellules pour réaliser l'ensemble des tests fonctionnels.

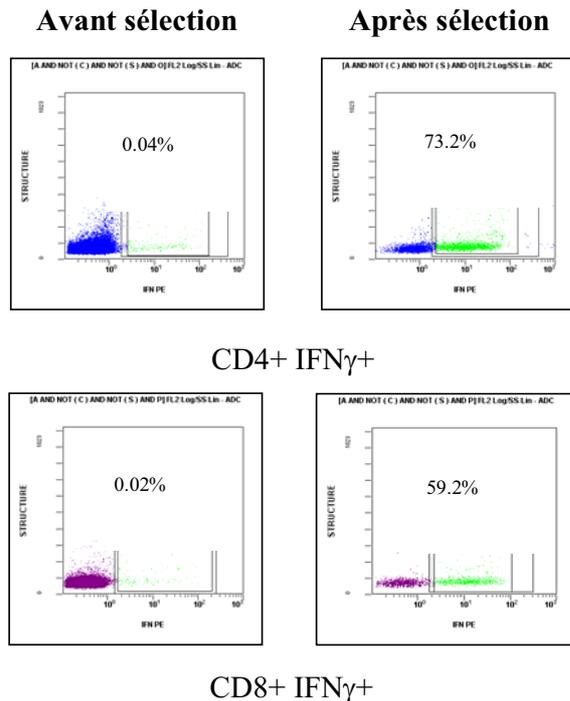
III-1-1-2- Cytotoxicité des CTL anti-ADV :

Afin de vérifier la fonctionnalité des CTL anti-ADV après amplification *in vitro*, un test de cytotoxicité (^{51}Cr) a été réalisé en utilisant comme cellules cibles des DC pulsées par les

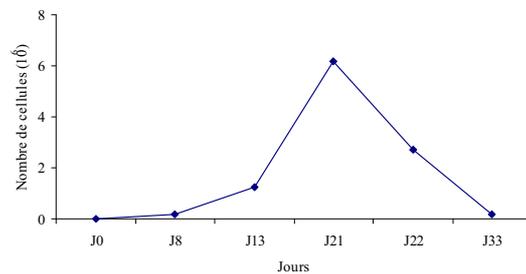
lysats ADV2/5 ou non pour des rapports de cellules effectrices : cellules cibles de 5 :1, 10 :1 et 20 :1. Une lyse spécifique de 8,06% et de 9,67% est observée contre les DC pulsées avec le lysat d'ADV2 et d'ADV5, respectivement, pour un rapport de 20 :1 ; une lyse de 6,42% et 6,49% est observée contre les DC pulsées avec le lysat d'ADV2 et d'ADV5, respectivement, pour un rapport de 10 :1 ; et une lyse de 3,61% et 4,14% est observée contre les DC pulsées avec le lysat d'ADV2 et d'ADV5, respectivement, pour un rapport de 5 :1 (Figure 21D). Aucune lyse spécifique n'est observée contre les DC non infectées.



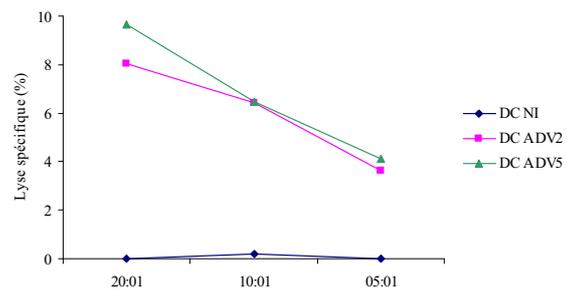
A : Détection des cellules T anti-ADV chez le donneur par Elispot IFN γ juste avant la production des CTL anti-ADV.



B : Analyse cytométrique avant et après sélection. Le pourcentage des CD4+IFN γ + et CD8+IFN γ + sont définis sur les cellules T CD4+ et CD8+, respectivement, en excluant initialement les cellules CD14+ et les cellules mortes 7AAD+.



C : Amplification *in vitro* des CTL anti-ADV après sélection.



D : Cytotoxicité des CTL anti-ADV après amplification *in vitro*. Une lyse spécifique a été testée en utilisant des DC comme cellules cibles présentatrices d'antigènes (ADV2 ou ADV5) ou non (NI) avec des rapports de 5 :1 à 20 :1.

Figure 21: Tests fonctionnels des CTL anti-ADV produits à partir de cellules fraîches et injectés au troisième patient.

III-2- Evolution clinique du patient après la première injection des CTL anti-ADV

La charge virale ADV a de nouveau ré-augmenté chez le patient et l'étude de la reconstitution immunitaire par cytokines intracellulaires et par TTL n'a pas permis de mettre en évidence d'immunité anti-ADV.

La dose de CTL anti-ADV administrée à ce patient était très faible ($< 0,5 \times 10^3$ CD3+IFN γ +). Toutefois, on ne sait pas à ce jour quelle dose minimale permet d'observer une reconstitution immunitaire. Une autre explication peut venir du fait que le patient avait reçu une dose de cidofovir peu avant l'injection des CTL et qu'une négativation de la charge virale avait été observée avant l'injection des CTL anti-ADV. L'absence de stimulation ADV n'a peut-être pas permis au très faible nombre de CTL injectées de perdurer chez le patient.

Devant la ré-évolution de l'infection ADV, il est décidé de réaliser une deuxième production de CTL anti-ADV à partir de la leukaphérèse du donneur cryoconservée.

Juste avant la deuxième injection des CTL anti-ADV, le nombre de lymphocytes T circulants chez le patient était de 0 CD4/mm³ et 1 CD8/mm³. L'étude des cytokines intracellulaires n'a pu être réalisée sur les cellules CD4+. La réponse proliférative vis-à-vis du lysat d'ADV était négative (Figure 23 et 24).

III-3- Deuxième injection de CTL anti-ADV à partir de cellules décongelées du donneur à J₁₂₅

Nous avons réalisé une deuxième sélection immunomagnétique de grade clinique des CTL anti-ADV à partir d'une poche de leukaphérèse du donneur décongelée. Après décongélation, nous avons laissé les cellules reposer pendant 6 heures avant de réaliser une séparation sur gradient de densité pour éliminer les débris et les cellules mortes. Nous avons ensuite stimulé $1,1 \times 10^9$ CNT (cellules nucléées totales) avec PepTivator-ADV5 Hexon. Après 6h de stimulation, 0,15% CD4+IFN γ + et 0,05% CD8+IFN γ + ont été obtenus avant immunosélection, à partir des cellules CD4+ et CD8+, respectivement (Figure 22A).

Après sélection sur le CliniMACS $39,9 \times 10^6$ CNT ont été obtenues, avec une pureté de 22% CD4+IFN γ +, sur les CD4+ et de 10% CD8+IFN γ +, sur les CD8+. Une viabilité cellulaire faible de 26,3 % a été observée (Tableau 12).

Le patient a reçu une dose de $0,304 \times 10^4$ CD3+IFN γ +/kg.

Tableau 12 : Génération des CTL anti-ADV à partir de cellules décongelées injectées au troisième patient.

	Haut de colonne	Fract (-)	Fract (+)	Rendements
Cellules Nucléées totales (10^6)	951	617.6	39.9	
Viabilité (%)	96.64	98	26.3	
CD4 (%)	23.66		2	
CD4 (10^6)	225.01		0.8	
CD4/kg (10^4)	313.38		1.11	
CD4+/IFN γ + (%)	0.15	0.06	22	
CD4+/IFN γ + (10^6)	0.34		0.176	
CD4+ IFN γ + /kg (10^4)	0.473		0.245	52 %
CD4/kg non IFN γ (10^4)	312.9		0.864	
CD8 (%)	15.22		1.08	
CD8 (10^6)	144.74		0.431	
CD8/kg (10^4)	201.6		0.6	
CD8+/IFN γ + (%)	0.05	0,013	10	
CD8+/IFN γ + (10^6)	0.072		0.043	
CD8+/IFN γ + /kg (10^4)	0.1		0.059	59 %
CD8/kg non IFN γ (10^4)	201.49		0.541	

III-3-1- Amplification *in vitro* des CTL anti-ADV:

Les CTL anti-ADV ($0,2 \times 10^6$) ont été mis en culture *in vitro* pendant 14 jours et ont été amplifiés de 1,24 Log, permettant ainsi l'obtention de $3,5 \times 10^6$ cellules. Des cellules nourricières (issues de la fraction négative irradiée) ont été ajoutées à J₀, J₇, et de l'IL2 a été ajoutée à la culture tous les jours. (Figure 22B). Après J14, et malgré l'ajout quotidien d'IL 2 et de cellules nourricières irradiées à J₁₅, nous avons assisté à la perte des CTL anti-ADV (Figure 22B) avant d'avoir eu suffisamment de cellules pour réaliser les contrôles fonctionnels dans leur intégralité.

III-3-2- Cytotoxicité des CTL anti-ADV :

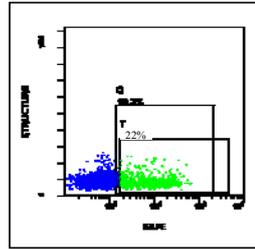
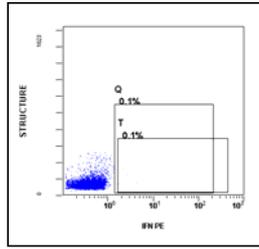
Un test de cytotoxicité (^{51}Cr) a été réalisé en utilisant comme cellules cibles des DC pulsées par les lysats ADV2, 5 ou non et des blastes PHA présentant ou non le PepTivator-ADV5 Hexon à un rapport cellules effectrices / cellules cibles de 10 :1. Une lyse spécifique de 16% et de 15% est observée contre les DC pulsées avec le lysat ADV2 et ADV5, respectivement, et de 23% contre les blastes PHA présentant le PepTivator-ADV5 Hexon. (Figure 22C).

III-3-3- Alloréactivité des CTL anti-ADV :

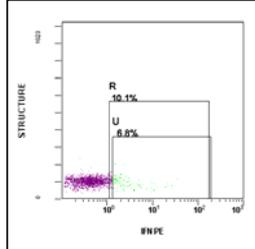
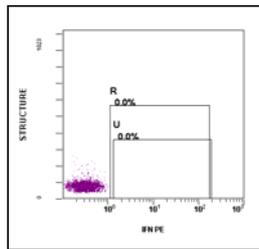
L'alloréactivité résiduelle potentielle des CTL anti-ADV amplifiée *in vitro* a été étudiée contre des CMN irradiées d'un donneur HLA différent et comparée avec l'alloréactivité des CMN autologues non sélectionnées. Comme le montre la Figure 22D, une diminution de 1.5 log de l'alloréactivité a été observée avec les CTL anti-ADV en comparaison avec les CMN avant sélection (en moyenne 488 cpm vs. 15777 cpm, respectivement).

Avant sélection

Après sélection

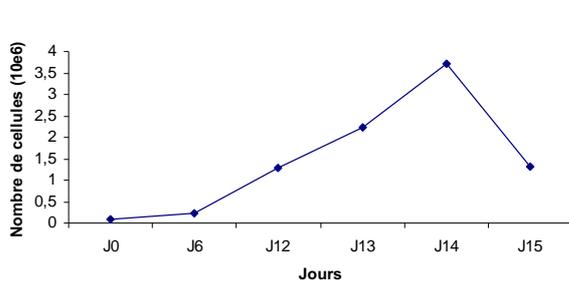


CD4+ IFN γ +

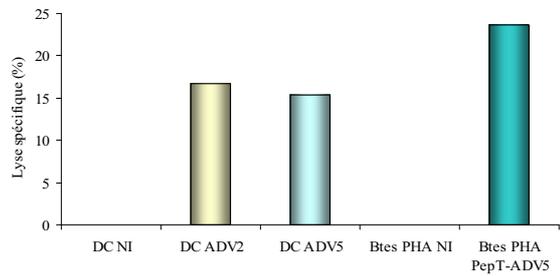


CD8+ IFN γ +

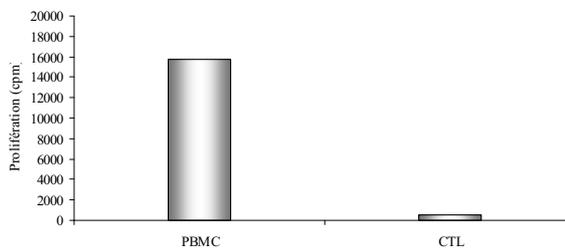
A : Analyse cytométrique avant et après sélection. Le pourcentage des CD4+IFN γ + et CD8+IFN γ + sont définis sur les cellules T CD4+ et CD8+, respectivement, en excluant initialement les cellules CD14+ et les cellules mortes 7AAD+.



B : Amplification *in vitro* des CTL anti-ADV après sélection.



C : Cytotoxicité des CTL anti-ADV après amplification *in vitro*. Une lyse spécifique a été observée en utilisant des DC ou blastes PHA comme cellules cibles présentatrices d'antigènes (ADV2, ADV5 et Peptivator-ADV5 Hexon) ou non (NI) à un rapport de 10:1.



D : Détection de la prolifération alloréactive avant et après sélection et amplification *in vitro*. Une réduction de 1,5 log de l'alloréactivité des CTL anti-ADV est détectée par culture mixte lymphocytaire contre les CMN d'un donneur HLA différent.

Figure 22 : Tests fonctionnels des CTL anti-ADV produits à partir de cellules décongelées et injectés au troisième patient.

III-4- Evolution clinique du patient après la deuxième injection des CTL anti-ADV

L'évolution clinique du patient est très favorable avec négativation de la charge virale ADV. Le patient étant hospitalisé à l'Hôpital Robert Debré, la reconstitution immunitaire spécifique anti-ADV a été suivie dans le Laboratoire d'Immunologie dirigé par le Pr G. Sterkers, par la technique de cytokines intracellulaires et les TTL (Figure 23 et 24).

Nous observons que la production de cytokine $IFN\gamma$ par les cellules $CD4+$ précède la prolifération cellulaire. En effet, 1% des cellules $CD4+$ sécrètent de l' $IFN\gamma$ 8 semaines après la première injection des CTL anti-ADV (soit 5 semaines après la deuxième injection), alors que la prolifération cellulaire des lymphocytes T après stimulation par un antigène ADV est négative. Cette dernière devient positive 10 semaines après la première injection des CTL anti-ADV (soit 7 semaines après la deuxième injection).

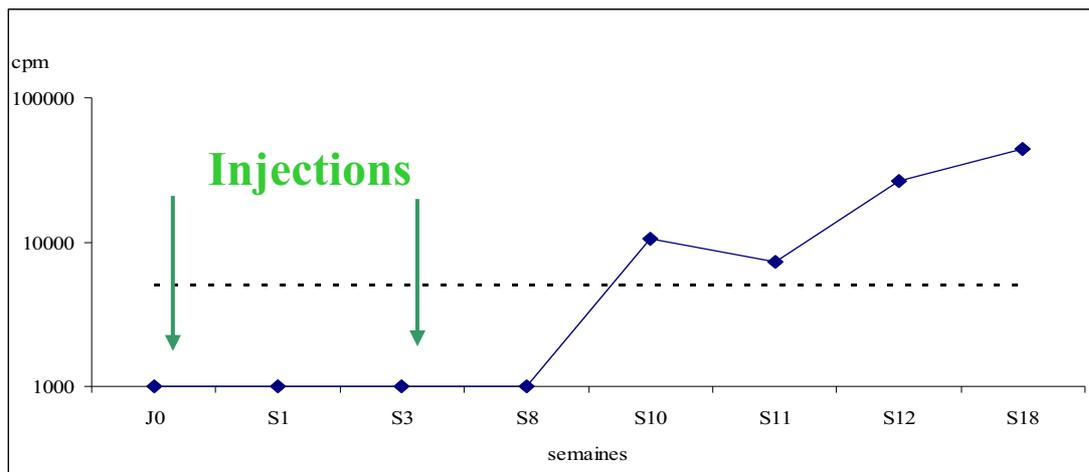


Figure 23 : Cinétique de prolifération *in vivo*

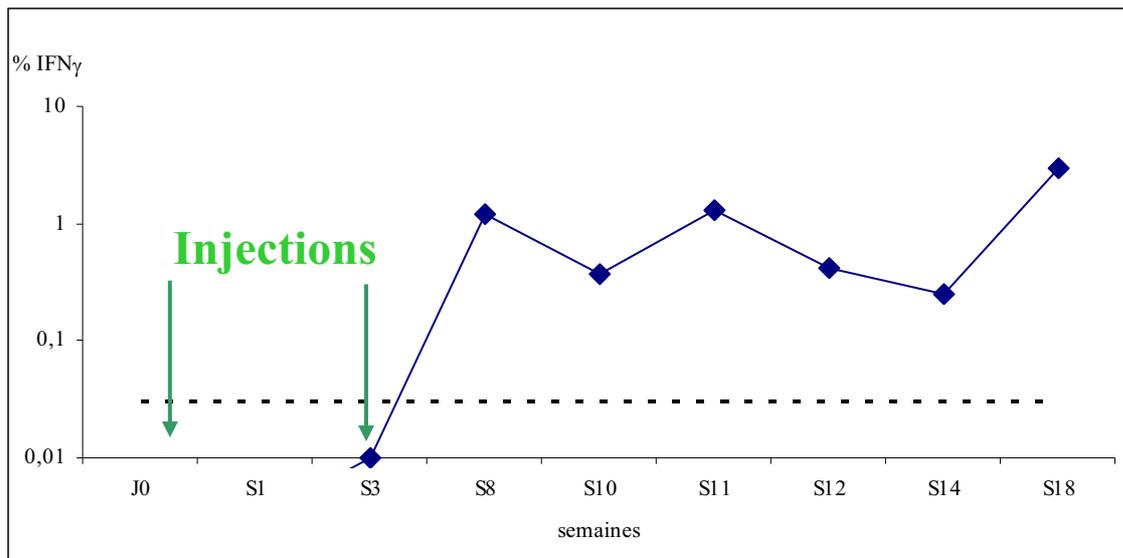


Figure 24 : Cinétique de production d'IFN γ *in vivo*.

Au laboratoire d'Immunologie de Robert Debré, le Dr Valérie Guérin s'est intéressée au profil cytokinique des lymphocytes T CD4⁺ en cours de la reconstitution chez le patient. Elle a étudié simultanément la sécrétion d'IFN γ et d'IL2, détectant ainsi les populations de lymphocytes CD4 sécrétant à la fois l'IFN γ et l'IL2. On observe qu'en 3 semaines (de la semaine 8 à la semaine 11), le profil cytokinique passe d'une population sécrétant exclusivement de l'IFN γ à une population sécrétant pour moitié à la fois de l'IFN γ et de l'IL2. Cette population augmente aux dépens de la population sécrétant de l'IFN γ seul. A la 18^{ème} semaine, sur la population CD4, 1,98% sont CD4+IFN γ +/IL2+ ; 1,03% sont CD4+IFN γ + et 0,66% CD4+IL-2+ (Figure 25).

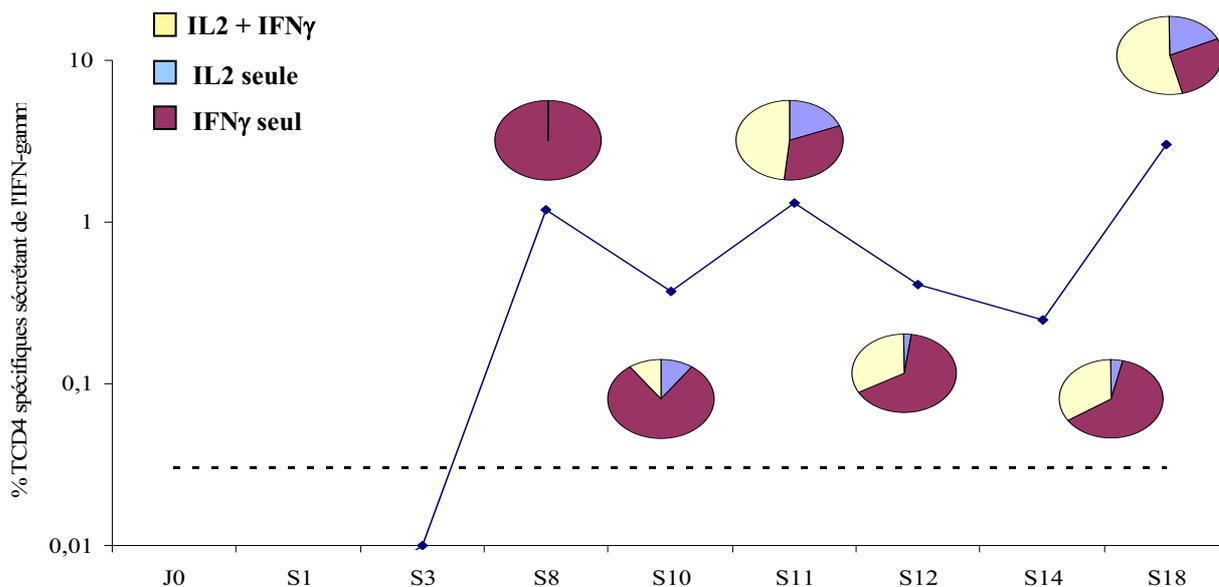


Figure 25 : Profil de sécrétion des cytokines.

L'évolution du profil cytokinique des lymphocytes T CD4+ spécifique de l'ADV traduit peut-être la capacité des lymphocytes T à contrôler toute réactivation d'ADV.

III-2- Les CTL anti-ADV injectés sont-ils à l'origine de la reconstitution immunitaire spécifique anti-ADV observée chez le receveur ?

Pour essayer de répondre à cette question, nous avons initié une collaboration avec le Dr Christophe Ferrand de l'UMR INSERM 645 de l'EFS de Besançon/ Franche Comté.

Nous avons envoyé au Dr C. Ferrand 3 échantillons cellulaires :

- 1- des CTL anti-ADV (2^{ème} production) après amplification,
- 2- des CMN du patient après reconstitution
- 3- des lymphocytes T anti-ADV présents chez le patient et triés par le Cytokine Capture System après stimulation *in vitro* avec le PepTivator-ADV5 Hexon.

A partir de l'ADN génomique (ADNg) extrait de ces 3 échantillons, une PCR a été réalisée à l'aide d'amorces spécifiques des gènes variables (V) et de jonction (J) respectivement de la chaîne β et de la chaîne γ du TcR (JJM van Dongen et al, Leukemia 2003, 17 : 2257-2317).

La PCR réalisée à l'aide d'amorces spécifiques de la chaîne β du TcR a permis d'identifier dans l'échantillon 3 un pic monoclonal de 265 pb correspondant à un réarrangement clonal majoritaire de la chaîne β du TcR. Ce pic monoclonal a également été retrouvé dans l'échantillon 2 (taille identique et pic majoritaire) (Figure 26A). En revanche, un profil polyclonal est retrouvé dans les CTL anti-ADV après amplification (échantillon 1), ne permettant pas d'identifier formellement ce clone, bien qu'un pic soit présent à la taille attendue, mais sans émergence particulière.

La PCR réalisée à l'aide d'amorces spécifiques de la chaîne γ du TcR a permis d'identifier dans l'échantillon 3 un pic monoclonal de 179 pb correspondant à un réarrangement clonal majoritaire de la chaîne γ du TcR. Ce pic monoclonal a également été retrouvé dans l'échantillon 2 et dans les CTL anti-ADV après amplification (échantillon 1) (Figure 26B).

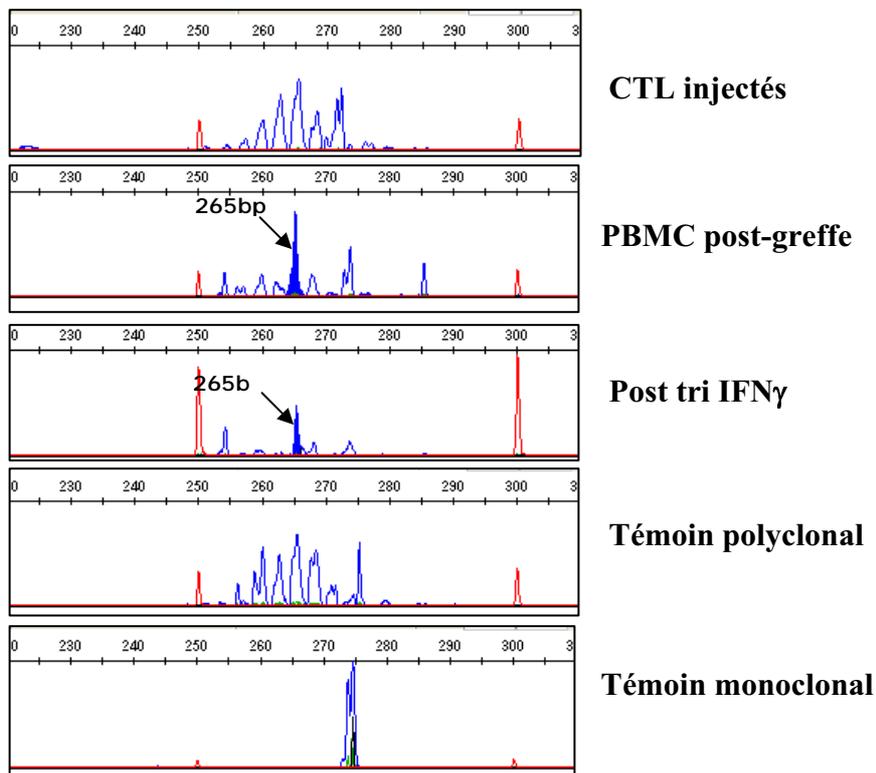


Figure 26A : Amplification de la chaîne du TCR β Clonalité T – Biomed 2 – PCR β B

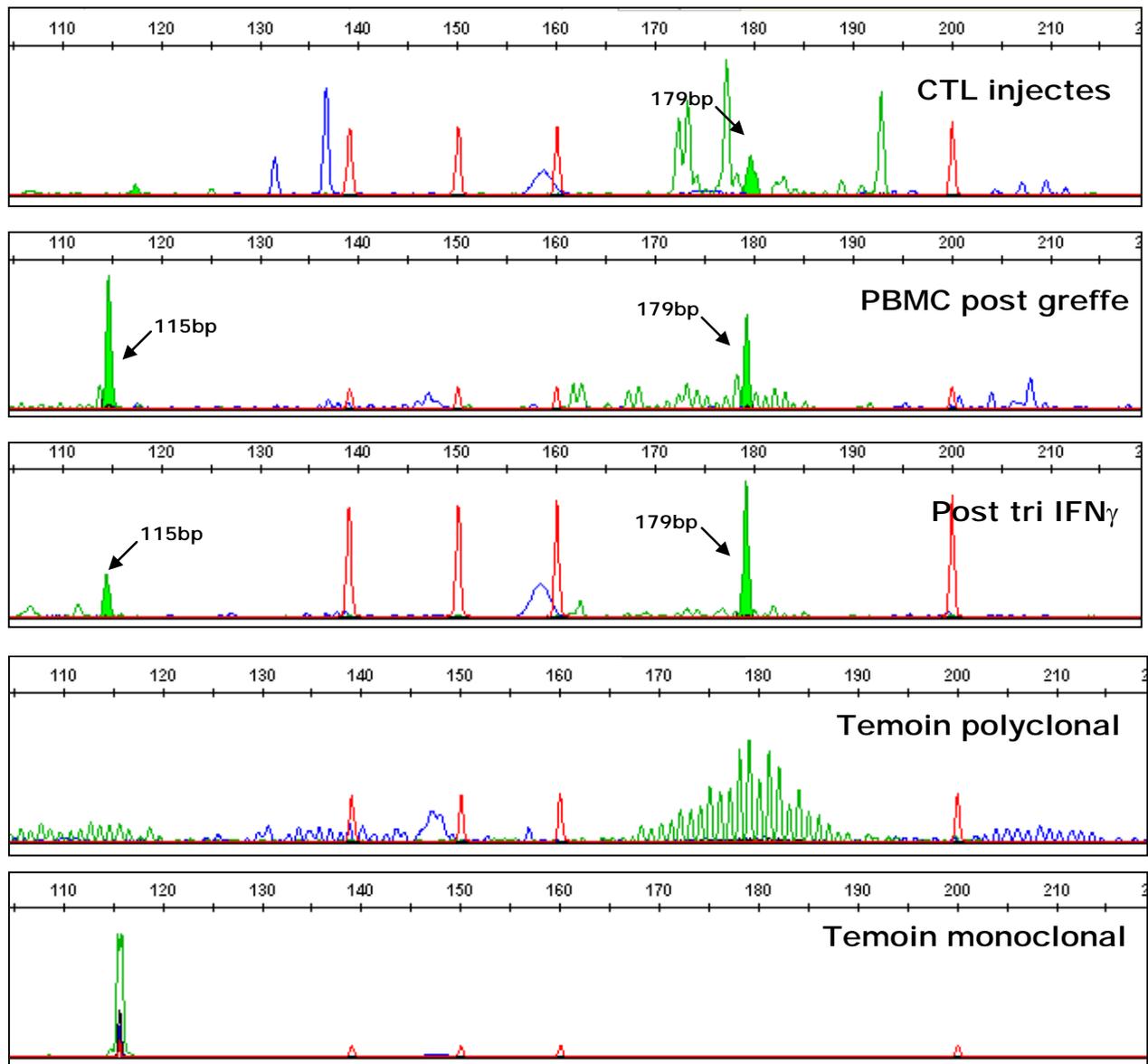


Figure 26B: Amplification de la chaîne du TCR γ Clonalité T – Biomed 2 – PCR $\gamma\beta$.

L'étape suivante a consisté à séquencer, après clonage dans un vecteur T/A cloning (PCR2 .1 topo T/A cloning, in vitrogen), le produit de PCR correspondant au fragment de 265 pb retrouvé dans l'échantillon à l'aide d'amorces complémentaires du vecteur plasmidique de clonage (amorces M13 Fw et R). La séquence consensus, majoritairement identifiée après clonage, et identifiée à partir de l'alignement des séquences obtenues après séquençage sens et anti-sens, est la suivante:

```

tcagtgggtcctggtaccaacagagcctggaccagggcctycagttcctcattcagttatt
ataatggagaagagagagcaaaaggaaacattcttgaacgattctccgcacaacagtccc
ctgacttgactctgaactaaacctgagctctctggagctgggggactcagctttgtatt
tctgtgccagcaccagggatgggtacaatgagcagttcttcggggccagggacacggctca
ccgtgctaggtagaaggga

```

L'introduction de cette séquence dans le logiciel IMGT/V-QUEST (IMGT, <http://imgt.cines.fr/>) a permis d'identifier que le réarrangement clonal correspond à un réarrangement VDJ spécifique qui présente 96.76% d'homologie avec le TcR V β 9. Le réarrangement identifié, dans le cadre de lecture et dans sa totalité est donc VB9/DB1/JB2 (Figure 27).

V name	3'V-REGION	N1	D-REGION	N2	5'J-REGION	J name	D name
TRBV9*01	tgtgccagca.....	ccaggg...	atgggtacaatgagcagttcttc	TRBJ2-1*01	TREB1*01

104	105	106	107	108	109	110	113	114	115	116	117	118	Frame	CDR3-IMGT length	Molecular mass	pI
C	A	S	T	R	D	G	Y	N	E	Q	F	F				
tgt	gcc	agc	acc	agg	gat	ggg	tac	aat	gag	cag	ttc	ttc	+	11	1,537.63	4.4

Figure 27 : Identification du CDR3 chez le patient.

A l'issue de l'identification de la séquence CDR3, spécifique du réarrangement clonal, un essai de PCR clonogénique a été dessiné, utilisant un primer anti-sens complémentaire de la famille du gène JB2.1 et un primer spécifique sens de la région CDR3 5'-TGTGCCAGCACCAGGGATGGG-3'. Ces primers confèrent la spécificité de l'essai. La PCR réalisée sur le matériel résiduel de l'échantillon 1 (CTL anti-ADV amplifiés) a permis de montrer la présence de cette séquence CDR3. Cependant, le matériel étant en quantité insuffisante, il a malheureusement été impossible de quantifier cette séquence par PCR quantitative. De plus, la polyclonalité identifiée dans ce prélèvement n'a pas permis un séquençage satisfaisant après clonage.

Conclusion :

Cette collaboration initiée avec le Dr C. Ferrand de l'EFSB/FC a permis de montrer par la PCR γ B qu'un réarrangement clonal similaire est retrouvé à la fois dans les CTL injectés et chez le patient après reconstitution immunitaire. Cet argument plaide en faveur d'une transmission d'un clone au patient par l'administration des CTL anti-ADV. Le séquençage aurait pu permettre d'affirmer de manière formelle qu'il s'agissait du même clone. La quantité limitée de matériel biologique n'a pas rendu cette identification possible.

La PCR β B suivie d'une étape de séquençage a permis d'identifier la séquence VDJ du TcR prédominant chez le patient dans ses lymphocytes T anti-ADV lors de la reconstitution immunitaire. Cette séquence est retrouvée dans les CTL injectés. Cependant, l'absence de détection du pic monoclonal majoritaire dans les CTL anti-ADV avant injection et le fait que la séquence du CDR3 sur cet échantillon n'ait pas pu être identifiée ou quantifiée ne nous permettent pas d'affirmer que les lymphocytes T qui apparaissent chez le patient au cours de la reconstitution immunitaire proviennent des CTL anti-ADV injectés.

Néanmoins, cette étude moléculaire est en faveur de la participation des CTL anti-ADV dans la reconstitution immunitaire. La poursuite de ces investigations moléculaires sur d'autres patients permettra sans doute de confirmer ces résultats.

Résultats préliminaires de la production des CTL bispécifiques anti-ADV/CMV

Introduction :

Nous souhaitons développer une technique de grade clinique permettant la production de CTL multivirus. Nous avons commencé avec la production de CTL bi-spécifiques anti-ADV et anti-CMV, les antigènes synthétiques de stimulation étant disponibles de grade clinique. Ce travail ayant été initié sur la fin de ma période de thèse, je n'ai pu obtenir que quelques résultats préliminaires. Nous avons souhaité dans un premier temps définir les conditions optimales de la double stimulation et de la double sélection. C'est pourquoi nous avons travaillé à petite échelle (ou échelle « recherche »), tout en utilisant le kit de *Cytokine Capture System* (Miltenyi Biotec) de grade clinique. Deux sélections ont été réalisées jusqu'à maintenant.

1- Réponse immunitaire vis-à-vis de l'ADV et du CMV :

La difficulté principale que nous avons rencontrée a été de sélectionner des donneurs présentant une réponse IFN γ suffisante à la fois pour l'ADV et le CMV. Les CMN de sang total sont stimulées avec le PepTivator-ADV5 Hexon ou le PepTivator-CMVpp65, pendant 20h. Les résultats obtenus par Elispot-IFN γ pour les deux donneurs ayant permis la réalisation des 2 essais sont illustrés dans la Figure 28A.

Sur 10 donneurs testés pour leur réponse immunitaire contre les deux virus : 50% sont ADV-/CMV-, 40% sont ADV+/CMV-, 0% sont ADV-/CMV+ et 10% sont ADV+/CMV+. Il est difficile de trouver des donneurs positifs pour les deux virus.

2- Production des CTL anti-ADV/CMV :

Nous avons sélectionné des CTL anti-ADV/CMV par leur sécrétion d'IFN γ . Les CMN fraîches de sang total de deux donneurs ont été utilisées. Deux cent millions de CNT, 1×10^8 CNT et 2×10^8 CNT ont été stimulées avec le PepTivator-ADV5 Hexon, le PepTivator-

CMVpp65 ou les deux en même temps, respectivement (Figure 28B). Après 6h de stimulation, nous avons obtenu les résultats présentés ci-dessous (Tableau 13) :

Tableau 13 : Production de CTL anti-ADV, -CMV et -ADV/CMV à partir de 2 donneurs après stimulation avec le PepTivator-ADV5 Hexon, le PepTivator-CMVpp65 ou les deux antigènes en même temps : résultats obtenus avant et après sélection.

Stimulation avec	Essai	Avant sélection						Après sélection					
		CNT (10 ⁶)	CD4 (%)	CD4+ IFN γ + (%)	CD8 (%)	CD8+ IFN γ + (%)	Viabilité (%)	CNT (10 ⁶)	CD4 (%)	Pureté CD4+ IFN γ + (%)	CD8 (%)	Pureté CD8+ IFN γ + (%)	Viabilité (%)
PepT-ADV5 Hexon	1	73,66	27,1	0,04	16,04	0,07	97,81	0,32	5,07	3,48	4,01	4,55	82,17
	2	30,8	28,9	0,03	21,61	0,02	98,06	3,96	1,45	2,52	0,6	1,6	91,75
PepT-CMVpp65	1	39	25,7	0,05	18,2	0,04	96,31	0,18	0,91	23,32	0,52	21,78	91,78
	2	13,7	33,9	0,4	23,52	0,56	97,56	1,32	20,1	5,33	14,9	12,44	90,95
PepT-ADV+CMV	1	73,6	25,9	0,13	19,3	0,08	97,16	0,34	1,48	36,29	0,75	42,4	63,7
	2	18	34,9	0,23	24,16	0,79	98,28	0,7	7,12	30,38	8,09	56,88	86,16

L'enrichissement observé après la stimulation avec le PepTivator-ADV5 Hexon est très faible et est peut-être en lien avec la faible fréquence des lymphocytes T IFN γ + spécifiques de l'ADV circulants chez le donneur.

Dans les CTL bispécifiques ADV et CMV, il n'est pas possible à ce stade de distinguer la part des CTL dirigés contre l'ADV des CTL dirigés contre le CMV.

3- Tests fonctionnels des CTL anti-ADV/CMV :

3-1- Amplification in vitro des CTL anti-ADV/CMV

Les CTL ont été mis en culture en présence d'IL-2 et de cellules nourricières durant 2 semaines. Une amplification des CTL anti-ADV de 2 log en moyenne (0.61×10^6 CNT avant et 60.1×10^6 CNT après amplification), des CTL anti-CMV de 2.2 log en moyenne (0.31×10^6 CNT avant et 50.4×10^6 CNT après amplification) et des CTL anti-ADV/CMV de 1.66 log en moyenne (1.87×10^6 CNT avant et 86.8×10^6 CNT après amplification) a été obtenue (Figure 28C).

3-2- Dosage de cytokines intracellulaires des CTL anti-ADV/CMV

Nous avons vérifié le profil cytokinique des CTL anti-virus après amplification *in vitro* et après stimulation de chaque CTL avec l'ADV, le CMV ou les deux antigènes (Figure 28D). Les résultats obtenus après stimulation, sont résumés dans les trois tableaux ci-dessous (Tableaux 14, 15 et 16) :

Tableau 14 : Dosage intracellulaire de l'IFN γ des CTL anti-ADV après stimulation avec les antigènes d'ADV, CMV ou les deux antigènes en même temps.

Stimulation des CTL anti-ADV	Essai	Après amplification								
		CNT (10 ⁶)	CD4 (%)	CD4 (10 ⁶)	CD4+IFN γ + (%)	CD4+IFN γ + (10 ⁶)	CD8 (%)	CD8 (10 ⁶)	CD8+IFN γ + (%)	CD8+IFN γ + (10 ⁶)
PepT-ADV5 Hexon	1	60,4	70,32	42,47	46,69	19,83	5,88	3,55	60,16	2,137
	2	42	47,08	19,77	48,14	9,52	1,4	0,59	41,21	0,242
PepT-CMVpp65	1	60,4	84,54	51,1	0,2	0,1	5,91	3,57	0,18	0,006
	2	42	50,15	21,1	0,55	0,12	1,28	0,54	2,95	0,016
PepT-ADV+CMV	1	60,4	69,47	41,96	49,44	20,74	6,26	3,78	63,65	2,41
	2	42	49,12	20,63	45,94	9,48	1,22	0,51	38,4	0,19

Tableau 15 : Dosage intracellulaire de l'IFN γ des CTL anti-CMV après stimulation avec les antigènes d'ADV, CMV ou les deux antigènes en même temps.

Stimulation des CTL anti-CMV	Essai	Après amplification								
		CNT (10 ⁶)	CD4 (%)	CD4 (10 ⁶)	CD4+IFN γ + (%)	CD4+IFN γ + (10 ⁶)	CD8 (%)	CD8 (10 ⁶)	CD8+IFN γ + (%)	CD8+IFN γ + (10 ⁶)
PepT-ADV5 Hexon	1	50,4	90,8	45,78	0,14	0,06	7,03	3,54	0,89	0,032
	2	60	4,38	2,63	0,61	0,02	49,1	29,4	0,31	0,091
PepT-CMVpp65	1	50,4	80	40,3	51,69	20,85	4,76	2,40	55,04	1,32
	2	60	2,75	1,7	31,18	0,51	37,9	22,7	38,74	8,82
PepT-ADV+CMV	1	50,4	79,1	39,85	41,78	16,65	5,13	2,59	52,72	1,36
	2	60	2,9	1,74	31,46	0,55	39,2	23,5	34,58	8,14

Tableau 16 : Dosage intracellulaire de l'IFN γ des CTL anti-ADV/CMV après stimulation avec les antigènes d'ADV, CMV ou les deux antigènes en même temps.

Stimulation des CTL anti-ADV/CMV	Essai	<i>Après amplification</i>								
		CNT (10 ⁶)	CD4 (%)	CD4 (10 ⁶)	CD4+IFN γ + (%)	CD4+IFN γ + (10 ⁶)	CD8 (%)	CD8 (10 ⁶)	CD8+IFN γ + (%)	CD8+IFN γ + (10 ⁶)
PepT-ADV5 Hexon	1	86,8	40,4	35,07	3,2	1,12	4	3,47	15,6	0,542
	2	63,3	5,54	3,51	3,03	0,11	47,82	30,27	0,21	0,064
PepT-CMVpp65	1	86,8	31	26,6	34,7	9,25	3,2	2,78	36	1
	2	63,3	3,54	2,2	28,74	0,64	38,72	24,51	36,48	8,941
PepT-ADV+CMV	1	86,8	30,6	26,56	43,1	11,45	2,8	2,43	56,3	1,368
	2	63,3	3,57	2,26	31,15	0,7	39,22	24,83	36,14	8,972

Une fréquence similaire de CD4+IFN γ + et CD8+IFN γ + a été obtenue après stimulation des CTL anti-ADV soit avec l'antigène ADV seul soit avec les deux antigènes ADV et CMV en même temps (Tableau 14). Les mêmes résultats ont été obtenus avec les CTL anti-CMV après stimulation avec l'antigène CMV ou les deux antigènes en même temps (Tableau 15). Concernant les CTL anti-ADV/CMV, une très faible fréquence de CD4+IFN γ + et CD8+IFN γ + a été obtenue après stimulation avec l'antigène ADV seul en comparaison avec celle obtenue après stimulation avec l'antigène CMV seul ou les deux antigènes en même temps (Tableau 16). Les figures 25 D1 et D2 résument la fréquence des CD4+IFN γ + et CD8+IFN γ + des CTL anti-ADV, -CMV et -ADV/CMV des deux essais, avant et après amplification *in vitro*.

3-3- Cytotoxicité des CTL anti-ADV/CMV

Un test de cytotoxicité (⁵¹Cr) a été réalisé en utilisant comme cellules cibles des blastes PHA présentant ou non le PepTivator-ADV5 Hexon, le PepTivator-CMVpp65 ou les deux simultanément, pour un rapport de 10 :1 (Figure 28E). La cytotoxicité de chaque CTL vis-à-vis des différentes cellules cibles est résumée dans le tableau 17 :

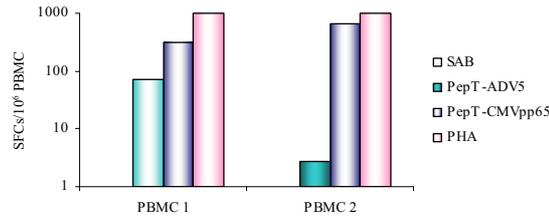
Tableau 17 : Cytotoxicité des CTL anti-ADV, -CMV et -ADV/CMV après amplification *in vitro*. Les blastes PHA présentant ou pas les antigènes PepTivator-ADV5 Hexon, PepTivator-CMVpp65 ou les deux en même temps, sont utilisés comme cellules cibles.

	Blastes PHA			
	NI	PepT-ADV5	PepT-CMVpp65	PepT-ADV/CMV
CTL anti-ADV	0	14,48	1,315	19,825
CTL anti-CMV	0	2,455	50,025	46,93
CTL anti-ADV/CMV	0	4,195	49,705	50,24

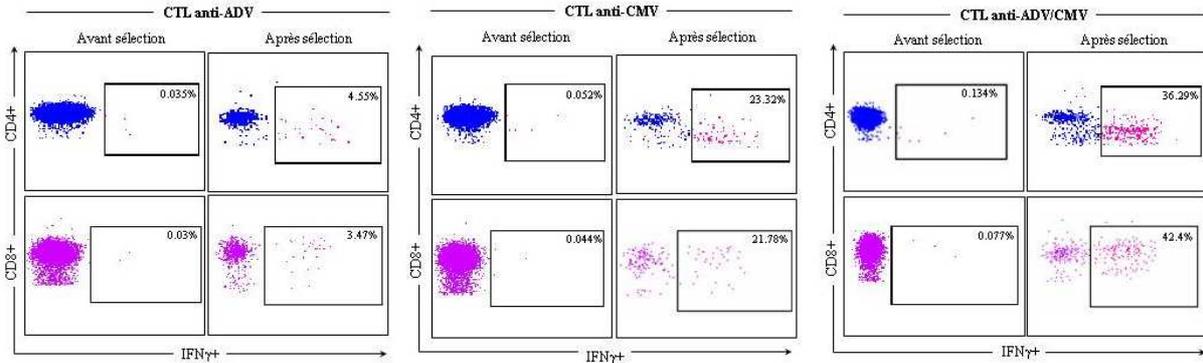
La cytotoxicité observée avec des CTL obtenus après stimulation par un antigène est dirigée contre les cellules présentatrices de cet antigène exclusivement. Lorsqu'on considère les CTL anti-ADV/CMV, on observe que la cytotoxicité est plus importante vis-à-vis des cibles présentant le PepTivator-CMVpp65 que vis-à-vis des cibles présentant le PepTivator-ADV5 Hexon.

3-4- Alloréactivité des CTL anti-ADV/CMV

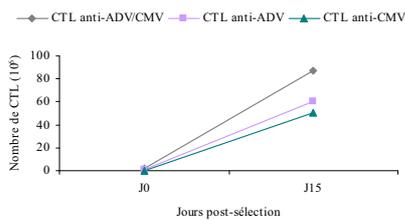
L'alloréactivité résiduelle potentielle des CTL anti-ADV, -CMV et -ADV/CMV amplifiées *in vitro* a été étudiée contre des CMN irradiées provenant de 3 donneurs HLA différents et comparée avec l'alloréactivité des CMN autologues non sélectionnées. Une réduction de 0.6 log de l'alloréactivité avec les CTL anti-ADV, de 0.92 log avec les CTL anti-CMV et de 1 log avec les CTL anti-ADV/CMV a été observée en comparaison avec les CMN avant sélection (en moyenne : 10726 cpm, 4971 cpm, 4089 cpm vs. 41733 cpm, respectivement) (Figure 28F). L'alloréactivité résiduelle observée avec les CTL anti-ADV reste élevée et est probablement en lien avec les très faibles enrichissements obtenus.



A : Détection des cellules T anti-ADV et anti-CMV chez le donneur par Elispot $IFN\gamma$ juste avant la production des CTL.

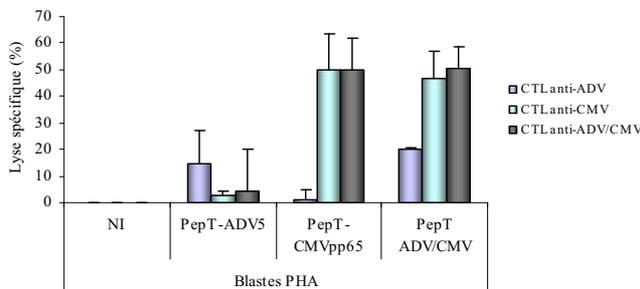
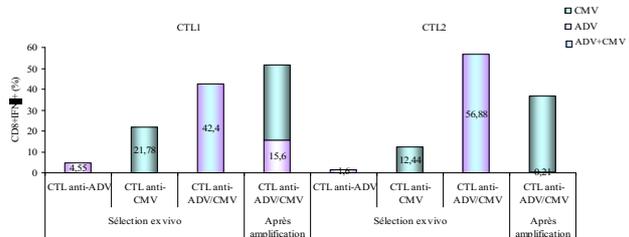
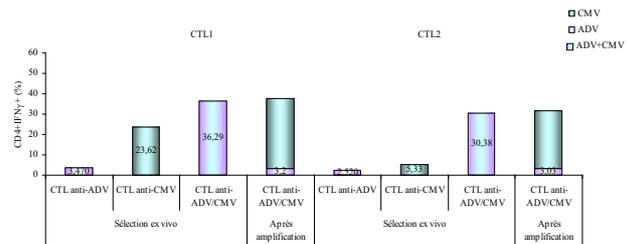


B : Analyse cytométrique avant et après sélection. (1) CTL anti-ADV, (2) CTL anti-CMV, (3) CTL anti-ADV/CMV. Le pourcentage de $CD4+IFN\gamma+$ et $CD8+IFN\gamma+$ sont définis sur les cellules T $CD4+$ et $CD8+$, respectivement, en excluant initialement les cellules $CD14+$ et les cellules mortes 7AAD+.

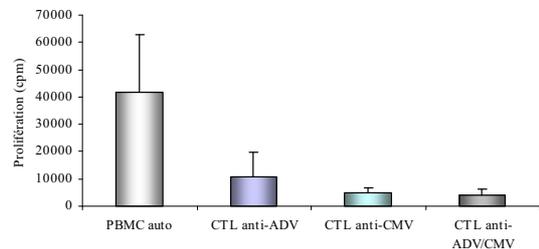


C : Amplification *in vitro* des CTL anti-ADV, -CMV et -ADV/CMV après sélection.

D : Fréquences des CTL (1) $CD4+IFN\gamma+$ et (2) $CD8+IFN\gamma+$ anti-ADV, -CMV et -ADV/CMV avant et après amplification *in vitro*. Le dosage de l' $IFN\gamma$ intracellulaire a été réalisé après stimulation des 3 CTL avec le PepTivator-ADV5 Hexon, PepTivator-CMVpp65 ou avec les deux antigènes.



E : Cytotoxicité des CTL anti-ADV, -CMV et -ADV/CMV après amplification *in vitro*. Une lyse spécifique des blastes PHA présentant le PepTivator-ADV5 Hexon, PepTivator-CMVpp65 ou avec les deux antigènes, a été observée, en présence de CTL anti-ADV, -CMV et -ADV/CMV, respectivement, à un rapport de 10 : 1.



F : Détection de la prolifération alloréactive des CTL anti-ADV, -CMV et -ADV/CMV avant et après sélection et amplification *in vitro*. Une réduction de 0.6 log de l'alloréactivité avec les CTL anti-ADV, de 0.92 log avec les CTL anti-CMV et de 1 log avec les CTL anti-ADV/CMV a été observée en comparaison avec les CMN avant sélection, détectée par culture mixte lymphocytaire contre les CMN de 3 donneurs HLA différents.

Figure 28 : Tests fonctionnels des CTL anti-ADV/CMV (bi-virus).

Conclusion :

Ces résultats préliminaires de la mise au point de la production des CTL bispécifique anti-ADV et CMV, à l'échelle recherche, ont montré une réponse anti-ADV des CTL anti-ADV/CMV amplifiés très faible comparée à celle des CTL anti-ADV amplifiés. Il ne nous est malheureusement pas possible d'analyser la part de la réponse anti-ADV et anti-CMV respectivement des CTL anti-ADV/CMV après sélection. Deux hypothèses peuvent alors être émises :

- Soit la double stimulation ADV et CMV est défavorable pour l'ADV, le nombre de lymphocytes T spécifiques concernés étant en moyenne un log plus faible que ceux impliqués dans la réponse anti-CMV. Ce point est probablement aggravé par la sélection de donneurs présentant une réponse IFN γ vis-à-vis de l'ADV faible. En effet, une compétition s'installe probablement entre deux antigènes comme l'a suggéré Leen *et al.*, (2006). Afin d'améliorer la fréquence des CTL anti-ADV, Leen a développé un système de production des CTL bi-virus (EBV et ADV) en excluant le CMV.
- Soit il s'agit d'un échec de l'étape d'amplification. Cependant, il est difficile d'en identifier les causes, car nous avons obtenu deux fois les mêmes résultats et que de plus, les amplifications réalisées simultanément sur les autres CTL (notamment anti-ADV seul) ont bien fonctionné.

Dans nos prochains essais, nous projetons de :

- 1- Rechercher des donneurs présentant de bonnes réponses IFN γ à la fois vis-à-vis de l'ADV et aussi du CMV+ afin d'obtenir des réponses optimales. Si ces résultats défavorables pour l'ADV se confirment, il pourra alors être envisagé de ne pas poursuivre sur une stimulation simultanée ADV et CMV.
- 2- Et de stimuler séparément les cellules avec l'antigène ADV et CMV pendant 1 heure pour permettre deux présentations optimales de chacun des antigènes puis regrouper les cellules pendant les 5 heures suivantes. Nous avons réalisé un seul essai préliminaire ne nous permettant pas de conclure (résultat non présenté). Cependant, l'inconvénient de cette technique est que le contingent initial de cellules est séparé en deux, générant dès l'étape de stimulation la perte de la moitié des CTL anti-ADV et des CTL anti-CMV.

Quatrième partie :

DISCUSSION

Depuis plusieurs années, et dans le souci de répondre aux besoins de l'Unité de Transplantation Médullaire allogénique du CHU de Nancy, l'UTCT du CHU de Nancy s'est attachée à développer deux axes complémentaires et étroitement intriqués : *l'étude de la reconstitution immunitaire cellulaire spécifique* vis-à-vis des principaux agents infectieux responsables de complications post-allogreffe (CMV, EBV et ADV) et le *développement d'une immunothérapie adoptive anti-virale*. En effet, la connaissance de la qualité de la réponse immunitaire spécifique de l'agent infectieux en parallèle du suivi de la charge infectieuse avec des techniques sensibles permet de cibler plus spécifiquement les patients qui nécessitent l'administration d'un traitement anti-infectieux à dose curative et est un préalable indispensable à la mise en œuvre d'une immunothérapie adoptive (Annels *et al.*, 2006 ; Clave *et al.*, 2004 ; Feuchtinger *et al.*, 2005 ; et Guérin *et al.*, 2010). Par ailleurs, il est important de souligner que les techniques utilisées pour le suivi de la reconstitution immunitaire sont les mêmes que celles qui permettent d'évaluer l'efficacité de l'immunothérapie chez les patients.

Ma thèse d'Université s'inscrit dans cette démarche puisque pendant ces trois dernières années, nous avons mené une étude sur la reconstitution immunitaire anti-EBV après allogreffe de CSH, nous avons initié une étude sur la reconstitution immunitaire anti-ADV, qui est actuellement en cours d'analyse et nous avons mis au point une technique de grade clinique de production de lymphocytes T cytotoxiques anti-ADV afin de proposer une immunothérapie adoptive.

I- Etude de la reconstitution immunitaire anti-virale

L'étude sur la reconstitution immunitaire anti-EBV après allogreffe de CSH a été réalisée sur une cohorte de 40 patients avec la technique Elispot IFN γ en utilisant la lignée EBV du donneur comme cellules présentatrices d'antigène.

Nous avons validé que la cohorte des patients de notre étude était comparable à celles présentées dans la littérature en confirmant que le facteur de risque principal d'une réactivation EBV après allogreffe de CSH était la présence de SAL dans le conditionnement. Puis, nous avons montré par une analyse multivariée que 4 facteurs influençaient la reconstitution immunitaire spécifique anti-EBV : la réactivation EBV (J100, J180), le jeune âge (J180), la récupération lymphocytaire (J60, J100, J360) et la GvH aiguë (J60). Enfin, nous

avons observé que chez les patients qui réactivaient l'EBV puis qui négativaient leur charge virale spontanément, les résultats des Elispots étaient supérieurs à 1000 SFC/10⁶ PBMC, suggérant un seuil critique.

La technique Elispot IFN γ , probablement la plus sensible de toutes les techniques de suivi de reconstitution immunitaire, présente l'avantage d'être rapide et de donner une approche fonctionnelle des cellules spécifiques, contrairement à la technique des tétramères. Le fait de travailler avec la lignée EBV du donneur garantit la présentation exhaustive de tous les antigènes de latence qui peuvent être retrouvés chez le receveur. Cependant, la production des lignées EBV du donneur demande plusieurs semaines de travail, ce qui nécessite d'une part d'anticiper le lancement dès le moment de la greffe et d'autre part de gérer et suivre les lignées EBV au quotidien. De plus, il est parfois très difficile voire impossible d'obtenir une lignée pour certains donneurs, ce qui empêche la réalisation du suivi de reconstitution immunitaire chez le patient. L'utilisation de pools de peptides de 15 AA, se chevauchant tous les 11 AA et recouvrant une ou plusieurs protéines de l'EBV devrait contribuer à simplifier la mise en œuvre de ce test, tout en conservant la flexibilité liée à l'absence de restriction HLA. De plus, la taille des peptides constitue un bon compromis pour une présentation à la fois HLA classe I et classe II (Kieker *et al.*, 2004). Nous recherchons actuellement les pools de peptides nous permettant d'obtenir des résultats comparables à ceux observés avec les lignées EBV comme cellules présentatrices d'antigène. Toutefois, l'une des limites de la technique Elispot IFN γ , est l'absence d'identification, de façon simple et rapide, de la population lymphocytaire sécrétant l'IFN γ (CD4⁺ ou CD8⁺), comme le permet la technique de cytokines intracellulaires par cytométrie en flux, certes moins sensible. De plus, l'étude simultanée de 2 voire 3 cytokines, sécrétées éventuellement par les mêmes cellules n'est pas aussi aisée que par cytométrie en flux. Or, il a été montré pour certains agents infectieux et tout récemment pour l'ADV que le profil cytokinique des lymphocytes T CD4⁺ évolue au cours de la réponse immunitaire : d'une réponse initialement exclusivement CD4 IFN γ ⁺, on voit apparaître progressivement une population de lymphocytes T CD4⁺ sécrétant à la fois l'IFN γ et l'IL2 et traduisant probablement la capacité des lymphocytes T CD4⁺ à maîtriser les réactivations virales successives (Pantaleo *et al.*, 2006 ; Guerin *et al.*, 2010). Nous avons observé dans notre étude que l'immunité anti-EBV à partir de J180 semblait reposer sur des lymphocytes T sécrétant peu d'IFN γ et nous avons émis l'hypothèse que ces cellules spécifiques de l'EBV sécrétaient moins d'IFN γ au profit de l'apparition de la sécrétion d'IL2.

Enfin, en nous appuyant sur les résultats de notre étude, il nous a semblé important de proposer, pour les patients à haut risque de réactivation EBV, un algorithme décisionnel thérapeutique reposant à la fois sur la charge virale EBV et sur les résultats de l'Elispot IFN γ . Pour les patients présentant une charge virale élevée $> 40\,000$ cp/ml, et en l'absence de symptôme, nous suggérons de réaliser à quelques jours d'intervalle deux Elispots IFN γ et d'analyser la cinétique d'évolution de la réponse immunitaire spécifique avant d'instaurer un traitement à dose curative par anticorps anti-CD20 (Rituximab). Pour les patients présentant une charge virale $< 40\,000$ cp/ml, un résultat d'Elispot IFN γ supérieur à 1000 SFC/ 10^6 PBMC est suffisant pour surseoir à la mise en place d'un traitement et considérer que l'immunité du patient est capable de maîtriser l'infection, le suivi de la charge virale EBV étant poursuivi. Toutefois, si le résultat de l'Elispot IFN γ est inférieur à 1000 SFC/ 10^6 PBMC, il est nécessaire de réitérer le test après quelques jours afin d'analyser la cinétique d'évolution de la réponse immunitaire spécifique. Cet algorithme doit être validé dans une étude prospective que nous souhaitons initier prochainement. Il devrait permettre de restreindre l'administration thérapeutique de Rituximab exclusivement aux patients qui en ont besoin.

Au cours de ma thèse, nous avons mené sur le même modèle que l'étude précédente une étude de la reconstitution immunitaire anti-ADV, basée sur les tests de prolifération (TTL) et l'Elispot IFN γ réalisés avec plusieurs antigènes ADV (décrits dans le matériel et méthodes). Différents prélèvements ont été analysés à J₆₀, J₁₀₀, J₁₈₀ et J₃₆₀ provenant de 50 patients allogreffés. L'analyse de ces résultats est actuellement en cours ; c'est pourquoi nous n'avons pas exposé cette étude dans ce document, malgré l'ampleur des manipulations qui ont été réalisées.

II- Développement d'une technique d'Immunothérapie adoptive de grade clinique

Sur la base des travaux publiés ces dernières années par l'équipe de Tobias Feuchtinger à Tübingen, nous avons souhaité développer une technique rapide de production de grade clinique de CTL anti-ADV.

Afin de répondre à cet objectif, nous avons conduit nos expériences avec le Pepivator-ADV5 Hexon (Miltenyi Biotec), un pool de peptides synthétiques recouvrant l'intégralité de

la protéine Hexon de l'ADV 5. Les cellules mononucléées (PBMC) de sept donneurs sains différents, dont l'immunité cellulaire anti-ADV avait été confirmée au préalable, ont été récupérées après obtention du consentement (en moyenne : $0,2-1,1 \times 10^9$). Les PBMC ont été stimulées pendant 6 heures avec le PepTivator-ADV5 Hexon. Les cellules sécrétant de l'IFN γ ont été isolées sur le CliniMACS à l'aide du Cytokine Capture System (Miltenyi Biotec). Après sélection, un nombre moyen de cellules nucléées totales (CNT) de $1,01 \pm 0,84 \times 10^6$ a été obtenu. Les cellules T spécifiques de l'ADV étaient majoritairement CD4 $^+$ (moyenne = $56\% \pm 5,59\%$, rendement = $51\% \pm 32,43\%$) mais aussi CD8 $^+$ (moyenne = $42\% \pm 27\%$, rendement = $56\% \pm 39,3\%$).

Les lymphocytes T isolés (CTL) ont été cultivés en présence d'IL2 et de cellules nourricières autologues afin de pouvoir réaliser les contrôles qualité fonctionnels. La capacité des CTL amplifiées à sécréter de l'IFN γ et à proliférer après re-stimulation par le PepTivator-ADV5 Hexon a été confirmée. Une cytotoxicité élevée, à un rapport de 10 : 1, vis-à-vis des cellules cibles autologues chargées avec un lysat d'ADV2 ou d'ADV5 ou avec le PepTivator-ADV5 Hexon a été mise en évidence alors qu'une cytotoxicité très faible a été observée vis-à-vis des cellules cibles non chargées. Enfin, nous avons observé une diminution de 1,27 log de l'alloréactivité des CTL vis-à-vis de PBMC de donneurs sains HLA différents, comparée à celle des PBMC avant sélection.

Malgré des résultats comparables à ceux publiés par l'équipe de Tübingen (Feuchtinger *et al.*, 2008) ou à ceux publiés sur l'*Aspergillus* (Tramsen *et al.*, 2008), il apparaît que cette technique, reposant sur la sélection des cellules sécrétant de l'IFN γ , permet d'enrichir la population d'intérêt mais ne permet pas d'aboutir à une population pure. Toutefois, il est important de souligner que les deux types cellulaires CD4 et CD8 sont représentés, tous les deux étant nécessaires au maintien d'une immunité spécifique (Sun *et al.*, 2004). Cependant, si les résultats d'enrichissement en cellules CD4+IFN γ^+ sont relativement reproductibles, on assiste à une grande variabilité concernant l'enrichissement en cellules CD8+IFN γ^+ . Nous avons pu identifier quelques paramètres qui interfèrent avec la qualité de la sélection et qui ont un impact sur l'enrichissement final. En premier lieu, le donneur à partir duquel la production de CTL anti-ADV est envisagée doit présenter une réponse cellulaire IFN γ^+ vis-à-vis de l'ADV positive et dans la moyenne de celle que nous avons pu observer pour les donneurs sains : 175 ± 166 SFC/ 10^6 PBMC avec la protéine Hexon de l'ADV2 et 133 ± 142 SFC/ 10^6 PBMC avec le PepTivator-ADV5 Hexon. Si la réponse IFN γ anti-ADV est inférieure à ces valeurs, le nombre de lymphocytes T spécifiques stimulés sera faible et

l'enrichissement insuffisant. Le deuxième paramètre est relatif à la nature du prélèvement issu du donneur. Lorsqu'il s'agit d'une leukaphérèse, l'hématocrite doit être analysé avec attention. En effet, les globules rouges interfèrent avec la sélection des lymphocytes T IFN γ +. De plus, l'analyse cytométrique du prélèvement de départ est perturbée, malgré une lyse des globules rouges. Plusieurs mesures ont été préconisées afin de s'affranchir de l'interférence des globules rouges : d'une part demander aux centres donneurs de prélever avec un hématocrite faible. Si malgré cette requête, l'hématocrite est élevé, nous proposons de réaliser une séparation sur gradient de densité sur Sepax (Biosafe). Enfin, un anticorps anti-CD45 a été ajouté au panel d'anticorps utilisé pour l'analyse cytométrique (cf Matériels et Méthodes), en prenant soin de choisir un clone différent de celui intervenant dans le *Cytokine Capture System*.

III- Expérience clinique compassionnelle d'une Immunothérapie adoptive anti-ADV

Nous avons rapporté dans cette thèse 3 expériences cliniques de traitement compassionnel d'une infection ADV post-allogreffe de CSH. Deux patients présentaient une infection ADV résistante au cidofovir, alors que le troisième présentait une intolérance rénale au cidofovir, ne permettant pas la poursuite du traitement à pleine dose.

Etant donné le faible nombre de cas cliniques réalisés à partir des CTL anti-ADV produits à l'UTCT du CHU de Nancy, nous devons nous garder de tirer des conclusions hâtives. Toutefois, l'efficacité clinique des CTL anti-ADV apparaît inconstante, ce qui soulève des questions d'une part sur les caractéristiques propres des CTL anti-ADV et d'autre part sur le contexte clinique dans lequel est réalisée l'injection des CTL anti-ADV.

Parmi les caractéristiques relatives aux CTL anti-ADV, on peut citer :

- La dose de CD3 IFN γ +/kg injectée

La dose de CD3+IFN γ + reçue par les 3 patients varie entre $0,037 \times 10^4$ CD3+IFN γ +/kg (première injection patient AM) et $0,90 \times 10^4$ CD3+IFN γ +/kg (patient CP), soit une différence de 1,3 log. La deuxième injection réalisée chez le patient AM et qui a été efficace contenait : $0,304 \times 10^4$ CD3+IFN γ +/kg, Il n'est malheureusement pas possible à ce jour de confronter ces données avec la littérature puisqu'elles ne sont pas disponibles. Les seules données publiées

sont celles de Feuchtinger en 2006 où il rapporte la dose de CD3/kg (mais pas de CD3-IFN γ) injectée à 9 patients (Feuchtinger *et al*, 2006). Celle-ci varie entre 0,12 x 10⁴ à 5 x 10⁴ CD3/kg. Les injections ont été efficaces avec négativation de la charge virale ADV pour 4 patients qui avaient reçu des doses variant de 0,12 x 10⁴ à 0,6 x 10⁴ CD3/kg. Ces résultats montrent que l'efficacité des CTL anti-ADV n'est pas en lien avec une dose élevée de CD3/kg injectée.

Toutefois, il manque dans cet article le nombre de cellules CD3+IFN γ + /kg spécifiques de l'ADV réellement injectées. On aborde ici la deuxième caractéristique relative aux CTL anti-ADV qui peut-être critique :

- *La proportion de CD3+IFN γ + parmi les CD3 injectés*

L'analyse de nos résultats montre que pour les deux autres patients (CP et AM deuxième injection, la proportion de CD3+IFN γ + est certes faible (< 18%) mais la dose de cellules spécifiques injectée semble correcte (bien que nous disposions de peu de recul pour l'affirmer). Toutefois, la dose totale de CD3/kg injectée dépasse 1 10⁴/kg. Le risque d'augmenter l'injection de lymphocytes T non spécifiques de l'ADV et de ce fait potentiellement alloréactifs augmente lorsque l'enrichissement en CD3+IFN γ + diminue (Tableau 18).

Tableau 18 : Proportion de CD3+IFN γ + parmi les CD3 injectés.

Patients	CD3+IFNγ+ /kg	CD3/kg	Proportion %
CP	0,90 x 10 ⁴	5,38 x 10 ⁴	16,72
NC	0,15 x 10 ⁴	0,216 x 10 ⁴	69,4
AM1	0,037 x 10 ⁴	0,059 x 10 ⁴	63
AM2	0,304 x 10 ⁴	1,71 x 10 ⁴	17,71

En revanche, la proportion de CD3+IFN γ + parmi les CD3 injectés était supérieure à 60% dans 2 cas : patients NC et AM première injection. Pour ce dernier, il semble toutefois que la dose de CD3/kg injectée était très faible, environ la moitié de la dose la plus faible rapportée par Feuchtinger. Pour le patient NC, la dose et la proportion de CD3+IFN γ + semblent optimales. Ce dernier cas suggère que la dose de CD3+IFN γ + /kg et la pureté en CD3+IFN γ + ne sont pas

les seuls paramètres qui peuvent exercer une influence sur l'efficacité des CTL anti-ADV et que le contexte clinique dans lequel est réalisée l'injection joue probablement un rôle.

Parmi les caractéristiques relatives au contexte, on peut citer :

- *La charge virale ADV et l'apparition des symptômes cliniques*

Feuchtinger *et al* rapportent que les patients qui ont eu une évolution clinique favorable avec expansion *in vivo* des lymphocytes T transférés ont reçu une injection alors que leur charge virale ADV dans le sang était inférieure à 4×10^4 cp/ml de sang (de négative à 4×10^4 cp/ml de sang, la charge virale étant positive dans les selles). L'auteur préconise que face à une charge virale ADV croissante, l'injection de CTL anti-ADV soit faite avant l'apparition des symptômes cliniques. Dans notre expérience, le patient NC a reçu les CTL anti-ADV alors que la charge virale ADV était déjà très élevée (environ 1×10^6 cp/ml de sang). Malgré une légère stabilisation de la charge virale et la présence *in vivo* de cellules T anti-ADV 8 jours après l'injection (230 SFC/ 10^6 PBMC en Elispot IFN γ), la charge virale a repris son ascension pour atteindre 6×10^8 cp/ml. Le stade déjà très avancé de l'infection ADV chez ce patient est un des facteurs qui a pu contribuer à l'échec des CTL anti-ADV, alors que la dose injectée et l'enrichissement en CD3+IFN γ + semblaient corrects. La réalisation d'une PCR dans les selles peut être un outil intéressant et surtout plus précoce de survenue d'une infection ADV et permettrait ainsi d'anticiper la production et l'injection de CTL anti-ADV (Jeulin *et al.*, 2010 soumis).

A l'inverse, lors de la première injection des CTL anti-ADV au patient AM, la charge virale n'était plus détectable et aucune expansion des CTL anti-ADV n'a été observée. Indépendamment de la faible dose injectée, l'absence de stimulation antigénique *in vivo* n'a probablement pas contribué à l'expansion des CTL, permettant ainsi dans les semaines suivantes une nouvelle augmentation de la charge virale ADV.

- *La présence d'une GvH aiguë ou chronique sévère, non stabilisée après plusieurs lignes de traitements immunosuppresseurs*

Dans notre expérience clinique, le seul patient pour lequel une efficacité des CTL anti-ADV a été observée ne présentait pas de GvH et ne nécessitait pas l'administration d'immunosuppresseurs au moment de l'injection des CTL anti-ADV. En revanche, les patients CP et NC présentaient tous les deux une GvH aiguë ou chronique sévère ayant requis l'administration de plusieurs lignes de traitements immunosuppresseurs dont le MabCampath, molécule immunosuppressive extrêmement puissante et dont la cinétique de disparition de la

circulation sanguine des patients est de plusieurs semaines. De plus, le patient CP présentant une nouvelle poussée de GvH quelques jours après l'injection des CTL anti-ADV, un traitement par Zenapax (anticorps anti-CD25) a été administré. Or, on ne sait pas à ce jour quel est l'impact des immunosuppresseurs sur les CTL anti-ADV. Un projet en collaboration avec l'équipe de l'EFS B-FC de Besançon sur l'étude de l'impact des immunosuppresseurs sur les CTL anti-virus pourrait être initié dans les prochains mois, dans le cadre d'une année post-doctorale.

Seul un protocole clinique pourra apporter des éléments de réponse aux questions soulevées précédemment. C'est pourquoi, nous avons souhaité, avec le service de Transplantation Médullaire Allogénique du CHU de Nancy, initier un protocole clinique multicentrique d'immunothérapie adoptive des infections à ADV post-greffe résistantes au traitement par cidofovir.

IV- Présentation du protocole clinique multicentrique

Nous proposons une étude pilote de phase I/II multicentrique (12 centres) sous l'égide de la Société Française de Greffe de Moelle Osseuse et de Thérapie cellulaire (SFGM-TC) et notamment du groupe pédiatrique, incluant 12 à 16 patients.

Ce protocole clinique concerne les adultes et les enfants de sexe masculin et féminin ayant reçu une allogreffe de CSH (MO et CSP) géno-identique ou non apparentée (10/10^e ou 9/10^e), et présentant une infection à ADV sans aucun signe clinique certainement attribuable à celle-ci, ou une adénovirose maladie, en échec après 2 semaines de traitement par cidofovir. Les patients présentant une toxicité rénale ou une intolérance majeure au traitement médicamenteux anti-viral sont également inclus dans cette étude en l'absence de reconstitution immunitaire anti-ADV et s'ils ne présentent pas une GvHa de grade \geq à II ou une GvHc extensive non contrôlée.

L'objectif principal de ce protocole est l'absence d'apparition d'une GvH aiguë de grade supérieur à 2 et/ou d'une GvH chronique extensive ainsi que d'une réactivation ou d'une aggravation d'une GvH aiguë et/ou chronique extensive dans le mois qui suit l'injection.

Les objectifs secondaires sont :

- l'évolution de la charge virale ADV par PCR quantitative.
- l'évolution de la réponse immunitaire anti-ADV chez le receveur (évaluer si une amplification des CTL survient *in vivo* par technique ELISPOT IFN γ ou cytokines intracellulaires).

Les traitements immunosuppresseurs à demi-vie longue (tels que le Sérum anti-lymphocytaire ou le MabCampath) ne doivent pas être administrés en 2^{ème} ligne de traitement de GvH dans le mois qui précède l'administration des CTL anti-ADV.

Les CTL anti-ADV obtenus seront réinjectés si un enrichissement en CD4+IFN γ + ou CD8+IFN γ + est observé après sélection immunomagnétique et à une dose maximale de lymphocytes T CD3 (selon le degré de compatibilité HLA entre donneur et receveur) qui n'excède pas :

- en situation **géo-identique, 1×10^5 CD3/kg.**
- en situation **non apparentée 10/10, 5×10^4 CD3/kg.**
- en situation **non apparentée 9/10, 1×10^4 CD3/kg.**

Le critère d'évaluation principal sur lequel portera l'analyse pour répondre à l'objectif principal est la survenue d'une GvHa de grade supérieur à 2 et/ou d'une GvH chronique extensive ou l'aggravation d'une GvH aiguë et/ ou chronique extensive dans le mois qui suit l'injection.

Les critères d'évaluation secondaires permettant de répondre aux objectifs secondaires sont :

- évolution de la charge virale ADV : une diminution de plus de 0.5 log de la charge virale ADV est considérée comme une réponse au traitement
- évolution de la réponse immunitaire spécifique anti-ADV : une apparition ou une augmentation de la sécrétion d'IFN γ en réponse à la stimulation par un antigène d'ADV est considérée comme une réponse au traitement

Ce protocole bénéficie de plusieurs soutiens financiers d'un montant total de 250 000€ : *le PHRC interrégional 2010* (3 centres cliniques de l'interrégion Est participant à ce protocole et la production des CTL anti-ADV étant réalisée à l'UTCT du CHU de Nancy), *l'Agence de la Biomédecine, l'association Centpoursang la Vie et la Région Lorraine.*

Les productions de CTL anti-ADV de ce protocole ainsi que l'étude de la reconstitution immunitaire spécifique avant et après injection des CTL anti-ADV seront deux de mes missions au cours de mon année post-doctorale.

Actuellement, l'UTCT et la Direction de la Recherche Clinique du CHU de Nancy travaillent sur le dossier d'autorisation AFSSaPS.

Comme mentionné précédemment, ce protocole clinique ne concerne que les patients ayant reçu une allogreffe de CSH provenant d'un donneur de MO ou de CSP géno-identique ou non apparenté 10/10 ou 9/10 identique. Nous avons volontairement écarté les allogreffes en situation haploidentique et les greffons de sang placentaire du fait du risque majeur de GvH lié à l'incompatibilité HLA. En effet, la production de CTL anti-infectieux après allogreffe de sang placentaire peut être réalisée à partir d'un donneur apparenté, HLA semi-compatible (appelé « Third party » ou *troisième partie* dans la littérature) (Schöttker *et al*, 2008). Toutefois, si l'absence d'alloréactivité est confirmée, l'utilisation de CTL anti-ADV produits à partir d'un donneur partiellement compatible au niveau HLA pourrait être envisagée plus largement et simplifierait la logistique afférente à la production des CTL anti-ADV.

Il serait alors légitime d'envisager la création d'une banque de CTL allogéniques comme cela a déjà été fait pour l'EBV par exemple.

V- Banques de CTL allogéniques

L'équipe de T. Hacque en Ecosse a établi une banque de lignées CTL spécifiques anti-EBV allogéniques cryoconservées. Les lignées de CTL sont amplifiées rapidement avec stimulation par des LCL-EBV autologues à partir de donneurs séropositifs pour l'EBV. Elles ont un phénotype TCR $\alpha\beta$ +, et sont constituées de cellules T CD8+ et de cellules T CD4+ en proportion variable. La plupart de ces cellules expriment des marqueurs d'activation et de différenciation : HLA-DR, CD26, CD45RO, CD69, et CD150. Des résultats favorables ont été obtenus en traitant des patients qui présentaient des syndromes lymphoprolifératifs, par des CTL allogéniques HLA partiellement compatibles (Wilkie *et al.*, 2004).

Grâce à cette banque, les receveurs d'allogreffe de CSH ou d'organe solide présentant une LP liée à l'EBV pour lesquels les traitements conventionnels ont échoué peuvent bénéficier d'une immunothérapie par les CTL allogéniques anti-EBV.

La même équipe a mené un essai de phase II multicentrique portant sur 33 patients ayant reçu une transplantation d'organe (n = 31) ou de CSH (n = 2) atteints de LP-EBV résistant aux traitements conventionnels (réduction de l'immunosuppression, administration de Rituximab ou mise en œuvre d'une chimiothérapie) (Haque *et al.*, 2007). Aucun effet secondaire n'a été noté (aucune GvH secondaire à l'injection des CTL n'a été décrite) et un taux de réponse (complète et partielle) de 64% à 5 semaines et de 52% à 6 mois post-injection a pu être observé. Dans cette étude, les patients ont reçu 1 à 6 doses de 2×10^6 CTL anti-EBV/kg. Les lignées de CTL ont été choisies pour leur compatibilité HLA et sélectionnées pour leur forte cytotoxicité contre les LCL-EBV du donneur et leur faible cytotoxicité contre les blastes PHA du receveur. La charge virale a diminué au dessous d'un seuil de détection pour tous les patients qui ont répondu au traitement. Cette étude a révélé de manière significative que les meilleures réponses cliniques étaient observées avec des CTL contenant une forte proportion de CD4 et lorsque l'incompatibilité HLA était la plus faible avec le receveur.

Une équipe française du CHU de Nantes a développé une banque de CTL anti-EBV et propose dans le cadre d'un protocole clinique actuellement ouvert une administration préventive ou curative d'1 à 3 doses de 5×10^6 CTL anti-EBV/kg à 28 jours d'intervalle chez des patients séronégatifs pour l'EBV et présentant une LP-EBV post-greffe et une GvH de grade inférieur à II.

Ces premiers résultats cliniques sont très encourageants et il serait particulièrement intéressant de pouvoir disposer de telles banques pour d'autres agents infectieux comme l'ADV ou le CMV.

Malheureusement, le système de production des CTL anti-virus reposant sur la sélection des cellules sécrétant de l'IFN γ après stimulation par un antigène ADV conduit à l'obtention d'un très faible nombre de cellules spécifiques. Toute la stratégie est basée sur une amplification *in vivo* de ces cellules du fait de la stimulation antigénique liée à la charge virale ADV circulante (Feuchtinger *et al.*, 2006).

Il semble très difficile d'envisager la cryoconservation d'une si faible quantité de cellules. Nous rapportons d'ailleurs une très mauvaise expérience pour le patient CP pour lequel nous avons cryoconservé la moitié des CTL anti-ADV produits. Lors de la décongélation, une viabilité de 14% a été obtenue.

Une autre façon de concevoir une banque allogénique, serait de pouvoir disposer d'un panel étendu de donneurs (comme les donneurs de sang ou de plaquettes de l'EFS), connus pour présenter une bonne réponse immunitaire cellulaire vis-à-vis de l'ADV et dont le typage HLA

allélique est réalisé. Le donneur présentant le typage HLA le plus proche du patient, et une réponse immunitaire cellulaire vis-à-vis de l'ADV contrôlée positive juste avant la production des CTL serait prélevé au moment où les CTL anti-ADV doivent être produites,

VI- CTL tri-virus

Jusqu'ici, nous nous sommes intéressés exclusivement aux CTL anti-ADV. Toutefois, nous avons initié un travail sur la production de CTL bi-spécifiques : anti-ADV et anti-CMV. Nous n'avons pu présenter que des résultats préliminaires qui mettent en lumière la difficulté de disposer de donneurs présentant une réponse immunitaire cellulaire positive à la fois contre l'ADV et le CMV. Malgré un screening consciencieux, nous n'avons pas sélectionné de tels donneurs pour les 2 essais que nous rapportons. Ces essais montrent que les CTL anti-ADV sont très minoritaires par rapport aux CTL anti-CMV. Toutefois, si nous parvenons à optimiser les conditions de stimulation et de sélection de ces CTL bi-spécifiques, nous envisagerons, dès que des pools de peptides de grade clinique seront disponibles pour l'EBV, de travailler sur des CTL tri-virus : anti-ADV, -CMV et -EBV.

Le fait de disposer de CTL tri-virus permettrait d'envisager une utilisation prophylactique. En effet, d'excellents résultats de prévention de la survenue d'infections à CMV ou à EBV en utilisant des CTL anti-CMV ou EBV en prophylaxie ont été rapportés. Heslop et al, rapporte dans un article récent portant sur 114 patients une efficacité dans 100% des cas des CTL anti-EBV utilisées pour prévenir les LP liées à l'EBV survenant après allogreffe de CSH. En effet, aucun des 101 patients ayant reçu cette prophylaxie n'a développé de LP liées à l'EBV (Heslop *et al.*, 2010). De plus, aucune GvH *de novo* n'a été observée et 8 patients qui avaient déjà présenté une GvH ont eu une réactivation rapidement maîtrisée. Les premiers patients avaient reçu des CTL anti-EBV marqués avec le gène de la Néomycine ; les auteurs montrent que des CTL anti-EBV fonctionnels persistent après 9 ans. Micklethwaite et al, ont injecté une seule dose de $2 \times 10^7/m^2$ CTL anti-CMV, 28 jours après allogreffe de CSH chez 12 patients adultes (Micklethwaite *et al.*, 2008). Seuls 4 patients ont présenté une réactivation CMV mais avec des charges virales CMV faibles, ne nécessitant pas la mise en place d'un traitement anti-viral pour 2 d'entre eux. De plus, le taux de survenue d'une GvH suite à l'injection des CTL n'était pas augmenté par rapport à celui attendu classiquement dans ce type d'allogreffe. Enfin, une reconstitution immunitaire spécifique

anti-CMV a été objectivée par Elispot IFN γ chez les 12 patients et a été durable dans le temps pour 8 d'entre eux.

Cependant, l'utilisation prophylactique de CTL tri-virus est contradictoire avec le fait que les CTL, en nombre très faible au moment de l'injection, s'amplifient *in vivo* du fait de la stimulation antigénique. Toutefois, ce phénomène décrit par Feuchtinger est peut-être lié à l'ADV mais pas aux autres virus (Feuchtinger *et al.*, 2006). En effet, Leen *et al.*, rapportent l'injection de CTL tri-virus, produites par une technique de stimulation et d'amplification en culture *in vitro* à long terme, conduisant à l'injection d'un nombre important de CTL. Alors que les auteurs assistent à une expansion *in vivo* des cellules injectées chez les patients ne présentant ni réactivation EBV, ni réactivation CMV, ils n'observent aucune amplification des CTL anti-ADV chez les patients n'ayant pas réactivé l'ADV (Leen *et al.*, 2006). Pour les auteurs, ce résultat illustre probablement les différences biologiques entre des virus latents (EBV et CMV) et l'adénovirus qui est extrêmement infectieux. L'EBV et le CMV se caractérisent par une expression faible des antigènes de latence (voire de certains antigènes du cycle lytique) constituant une stimulation antigénique pour les CTL anti-virales injectées, favorisant ainsi leur expansion. Toutefois, la question de savoir si les CTL anti-ADV persistent chez les patients non infectés reste sans réponse à ce jour.

L'utilisation en prophylaxie de CTL produits grâce au système Cytokine Capture System pourrait donc se concevoir au moins pour l'EBV et le CMV, mais doit être confirmée par des études.

La disponibilité de CTL multivirus en prophylaxie préviendrait la survenue des infections virales concernées. En effet, comme nous l'avons observé dans notre expérience clinique compassionnelle, ces infections surviennent fréquemment lors de l'évolution d'une GvH et de son traitement. L'administration curative de CTL anti-virus s'avère alors périlleuse, d'une part du fait du risque potentiel de GvH lié aux CTL et d'autre part à cause de l'effet probablement délétère des immunosuppresseurs sur les CTL. De plus, le fait de prévenir la survenue de ces infections virales pourrait avoir un effet favorable sur la survenue de la GvH, GvH et infections étant en étroite relation et s'auto-entretenant.

VII- Relation GvH-infections virales

Le rôle de la GvH dans la survenue d'une réactivation CMV est reconnu depuis plusieurs années (Miller *et al.*, 1986). En revanche, depuis près de 20 ans, le rôle des Herpès virus dans la physiopathologie de la GvH est évoqué mais demeure relativement controversé (Appleton *et al.*, 1993). Une première étude a montré que les patients qui présentaient une PCR positive CMV ou une PCR positive HHV6 ou les deux simultanément dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) développaient plus fréquemment une GvH de grade \geq II ($p < 0.05$, $p < 0.05$ et $p < 0.01$, respectivement) (Takemoto *et al.*, 2000). Plus récemment, une étude multivariée a montré qu'une réactivation HHV6 était étroitement corrélée à une plus grande probabilité de survenue d'une GvH de grade \geq II à J₃₀, J₅₀ et J₁₀₀ ($p < 0,0028$) (Wang *et al.*, 2008). Cependant, cette étude n'a pas permis de montrer un lien significatif entre la réactivation CMV et le développement d'une GvH. Cantoni *et al.*, rapportent quant eux des résultats différents puisqu'ils démontrent sur une cohorte de 530 patients que les épisodes de réactivation du CMV sont étroitement corrélés à la survenue d'une GvH de grade \geq II (Cantoni *et al.*, 2010 sous presse). Le mécanisme sous-jacent n'est pas clairement identifié. Dans un modèle murin, il a été montré que le CMV diminuait le seuil d'induction d'une réaction de GvH (Via *et al.*, 1988). Il semble que les infections à Herpès virus favoriseraient la survenue d'une GvH en modifiant le système immunitaire du receveur. Trois hypothèses ont été proposées par Wang *et al.* : **1) la régulation du système immunitaire du receveur serait altérée directement ou indirectement par les Herpès virus.** Par exemple, les infections HHV6, en supprimant les fonctions lymphocytaires T, entraînent un déséquilibre immunitaire en faveur de l'immunité du donneur (Flamand *et al.*, 1995). **2) le seuil d'induction d'une réaction de GvH serait diminué.** En effet, HHV6 favoriserait l'expression des molécules HLA de classe I et II à la surface des cellules du receveur, permettant une plus grande activation des lymphocytes T du donneur (Inoue *et al.*, 1997). **3) l'expression de molécules clés et de cytokines impliquées dans le développement de la GvH serait augmentée.** Ainsi il a été montré qu'HHV6 augmentait l'expression d'ICAM1, de Vascular adhesion molecule 1, de l'IL1, du TNF α et de RANTES (Grivel *et al.*, 2003). Peu d'équipes cliniques administrent à ce jour une prophylaxie médicamenteuse des infections à CMV après allogreffe de CSH. Selon Cantoni *et al.*, il serait intéressant d'étudier l'effet d'une stratégie prophylactique du CMV sur l'incidence de la GvH. C'est également

dans ce contexte que l'administration de CTL multi-virus en prophylaxie pourrait limiter les réactivations virales et réduire l'incidence de la GvH.

CONCLUSION

Ce travail nous a permis de montrer l'importance du suivi quantitatif et fonctionnel de la reconstitution immunitaire spécifique en complément du suivi régulier des charges virales des principaux agents infectieux impliqués dans les complications post allogreffe de CSH. Ces deux informations sont nécessaires pour définir les patients pour lesquels un traitement curatif est justifié. De même, elles sont un pré-requis indispensable pour la mise en œuvre d'une Immunothérapie adoptive en curatif.

L'immunothérapie adoptive, avec le développement de techniques rapides et de grade clinique fait maintenant partie des options thérapeutiques des infections post-greffes. Dans ce travail, nous avons pu montrer que la production de lymphocytes T anti-ADV en condition GMP (Good Manufacturing Practice), grâce au système CliniMACS et au Cytokine Capture System de Miltenyi était réalisable dans un contexte clinique, et nous avons mis en évidence chez un patient traité en compassionnel l'efficacité des CTL anti-ADV. Ce premier pas ouvre la voie vers un protocole clinique (PHRC ayant été financé en 2010) qui devrait apporter des réponses aux questions qui restent encore en suspens quant aux critères d'efficacité de ces CTL.

Il apparaît clairement à ce niveau qu'une structure forte d'Immunologie cellulaire se donnant les moyens de développer des tests spécifiques pour l'étude de la reconstitution immunitaire anti-infectieuse, est complémentaire d'une structure de Thérapie cellulaire qui développe des projets d'Immunothérapie adoptive. C'est aussi une des clés de voûte d'une prise en charge optimale des patients recevant une allogreffe de CSH au même titre qu'un laboratoire de microbiologie performant mettant en œuvre des techniques de diagnostic sensibles.

Ces outils permettront de poursuivre les développements thérapeutiques en envisageant, pour les virus les mieux connus et les plus fréquents, de proposer une immunothérapie en prophylaxie. De plus, d'autres agents infectieux comme HHV6, BK virus ou l'Aspergillus sont associés à une morbidité et une mortalité importante après allogreffe de CSH. Une meilleure connaissance des réponses immunitaires protectrices vis-à-vis de ces agents permettra de développer un suivi de la reconstitution immunitaire spécifique et peut-être de proposer une immunothérapie adoptive.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ahlfors K., M. Forsgren, S. A. Ivarsson, S. Harris, and L. Svanberg. Congenital cytomegalovirus infection: on the relation between type and time of maternal infection and infant's symptoms. *Scand.J.Infect.Dis.* 15 (2):129-138, 1983.
2. Aïssi-Rothé L., V. Decot, V. Venard, H. Jeulin, A. Salmon, L. Clement, A. Kennel, C. Mathieu, J. H. Dalle, G. Rauser, C. Cambouris, M. de Carvalho, J. F. Stoltz, P. Bordigoni, and D. Bensoussan. Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy. *J.Immunother.* 33 (4):414-424, 2010.
3. Aïssi-Rothé L., M. D'aveni, V. Venard, A.Salmon, A. Falenga, V. Decot, L. Clement, J.M. Virion, V. Latger-Cannard, C. Tomowiak, J.F. Stoltz, P. Bordigoni, and D. Bensoussan. The clinical value of concomitant Epstein Barr Virus (EBV)-DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. 2010 (soumis).
4. Aiuti. Advances in gene therapy for ADA-deficient SCID. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 4 (5):515-522, 2002.
5. Amyes E., C. Hatton, D. Montamat-Sicotte, N. Gudgeon, A. B. Rickinson, A. J. McMichael, and M. F. Callan. Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J.Exp.Med.* 198 (6):903-911, 2003.
6. André-Schmutz I, Le Deist F, Hacein-Bey S, Hamel Y, Vitetta E, Schindler J, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Donor T lymphocyte infusion following ex vivo depletion of donor anti-host reactivity by a specific anti-interleukin-2 receptor P55 chain immunotoxin. *Transplant Proc.* Nov;34(7):2927-8. 2002.
7. Annels N. E., J. S. Kalpoe, R. G. Bredius, E. C. Claas, A. C. Kroes, A. D. Hislop, D. van Baarle, R. M. Egeler, M. J. van Tol, and A. C. Lankester. Management of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation after allogeneic stem cell transplantation by simultaneous analysis of EBV DNA load and EBV-specific T cell reconstitution. *Clin.Infect.Dis.* 42 (12):1743-1748, 2006.
8. Appay V., D. F. Nixon, S. M. Donahoe, G. M. Gillespie, T. Dong, A. King, G. S. Ogg, H. M. Spiegel, C. Conlon, C. A. Spina, D. V. Havlir, D. D. Richman, A. Waters, P. Easterbrook, A. J. McMichael, and S. L. Rowland-Jones. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J.Exp.Med.* 192 (1):63-75, 2000.
9. Appleton A. L. and L. Sviland. Pathogenesis of GVHD: role of herpes viruses. *Bone Marrow Transplant.* 11 (5):349-355, 1993.
10. Arav-Boger R., M. Echavarria, M. Forman, P. Charache, and D. Persaud. Clearance of adenoviral hepatitis with ribavirin therapy in a pediatric liver transplant recipient. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 19 (11):1097-1100, 2000.
11. Asano-Mori Y, Kanda Y, Oshima K, Kako S, Shinohara A, Nakasone H, Sato H, Watanabe T, Hosoya N, Izutsu K, Asai T, Hangaishi A, Motokura T, Chiba S, Kurokawa M. Long-term ultra-low-dose acyclovir against varicella-zoster virus

- reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol.* 2008 Jun;83(6):472-6.
12. Atkins M. C., E. F. Bowen, D. A. Clark, M. A. Johnson, I. M. Kidd, J. E. McLaughlin, A. N. Phillips, P. M. Strappe, and P. D. Griffiths. Interactions between beta-herpesviruses and human immunodeficiency virus in vivo: evidence for increased human immunodeficiency viral load in the presence of human herpesvirus 6. *J.Med.Virol.* 57 (3):278-282, 1999.
 13. Aversa F., A. Tabilio, A. Terenzi, A. Velardi, F. Falzetti, C. Giannoni, R. Iacucci, T. Zei, M. P. Martelli, C. Gambelunghe, and . Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 84 (11):3948-3955, 1994.
 14. Avetisyan G, Mattsson J, Sparrelid E, Ljungman P. Respiratory syncytial virus infection in recipients of allogeneic stem-cell transplantation: a retrospective study of the incidence, clinical features, and outcome. *Transplantation.* 2009 Nov 27;88(10):1222-6.
 15. Babcock G. J., D. Hochberg, and A. D. Thorley-Lawson. The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity.* 13 (4):497-506, 2000.
 16. Balfour H. H., Jr., C. J. Holman, K. M. Hokanson, M. M. Lelonek, J. E. Giesbrecht, D. R. White, D. O. Schmeling, C. H. Webb, W. Cavert, D. H. Wang, and R. C. Brundage. A prospective clinical study of Epstein-Barr virus and host interactions during acute infectious mononucleosis. *J.Infect.Dis.* 192 (9):1505-1512, 2005.
 17. Barnes D. W. and J. F. Loutit. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II. *Br.J.Haematol.* 3 (3):241-252, 1957.
 18. Basara N., S. Gunzelmann, W. Willenbacher, A. A. Fauser, and M. G. Kiehl. New immunosuppressants in BMT/GVHD. *Transplant.Proc.* 33 (3):2220-2222, 2001.
 19. Bhushan V., R.H. Jr. Collins. Chronic graft-vs-host disease. *JAMA.* Nov 19; 290 (19):2599-2603. Review. 2003.
 20. Biron K. K., R. J. Harvey, S. C. Chamberlain, S. S. Good, A. A. Smith, III, M. G. Davis, C. L. Talarico, W. H. Miller, R. Ferris, R. E. Dornsife, S. C. Stanat, J. C. Drach, L. B. Townsend, and G. W. Koszalka. Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob.Agents Chemother.* 46 (8):2365-2372, 2002.
 21. Blanke, C. Clark, E. R. Broun, G. Tricot, I. Cunningham, K. Cornetta, A. Hedderman, and R. Hromas. Evolving pathogens in allogeneic bone marrow transplantation: increased fatal adenoviral infections. *Am.J.Med.* 99 (3):326-328, 1995.
 22. Bleakley M.and S. R. Riddell. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat.Rev.Cancer* 4 (5):371-380, 2004.
 23. Blum K. A., G. Lozanski, and J. C. Byrd. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 104 (10):3009-3020, 2004.

24. Boeckh M. Current antiviral strategies for controlling cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: prevention and therapy. *Transpl.Infect.Dis.* 1 (3):165-178, 1999.
25. Boeckh M., W. Leisenring, S. R. Riddell, R. A. Bowden, M. L. Huang, D. Myerson, T. Stevens-Ayers, M. E. Flowers, T. Cunningham, and L. Corey. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 101 (2):407-414, 2003.
26. Bolovan-Fritts C.A., E.S. Mocarski, J.A. Wiedeman. Peripheral blood CD14+ cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood.* Jan 1;93(1):394-398. 1999.
27. Bordigoni P., A. S. Carret, V. Venard, F. Witz, and A. Le Faou. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin.Infect.Dis.* 32 (9):1290-1297, 2001.
28. Borza M.and L. M. Hutt-Fletcher. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat.Med.* 8 (6):594-599, 2002.
29. Bretagne S., M. Vidaud, M. Kuentz, C. Cordonnier, T. Henni, G. Vinci, M. Goossens, and J. P. Vernant. Mixed blood chimerism in T cell-depleted bone marrow transplant recipients: evaluation using DNA polymorphisms. *Blood* 70 (5):1692-1695, 1987.
30. Caliendo M., J. Ingersoll, A. M. Fox-Canale, S. Pargman, T. Bythwood, M. K. Hayden, J. W. Bremer, and N. S. Lurain. Evaluation of real-time PCR laboratory-developed tests using analyte-specific reagents for cytomegalovirus quantification. *J.Clin.Microbiol.* 45 (6):1723-1727, 2007.
31. Callan M. F., C. Fazou, H. Yang, T. Rostron, K. Poon, C. Hatton, and A. J. McMichael. CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo. *J.Clin.Invest* 106 (10):1251-1261, 2000.
32. Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, Gerull S, Buser A, Bucher C, Halter J, Heim D, Tichelli A, Gratwohl A, Stern M. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* Mars 2010.
33. Cavazzana-Calvo M., D. Bensoussan, N. Jabado, E. Haddad, E. Yvon, M. Moskwa, Combes A. Tachet des, M. Buisson, P. Morand, J. M. Virion, F. Le Deist, and A. Fischer. 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. *Br.J.Haematol.* 103 (2):543-551, 1998.
34. Chakrabarti S., K. E. Collingham, C. D. Fegan, and D. W. Milligan. Fulminant adenovirus hepatitis following unrelated bone marrow transplantation: failure of intravenous ribavirin therapy. *Bone Marrow Transplant.* 23 (11):1209-1211, 1999.
35. Chakrabarti S., K. E. Collingham, C. D. Fegan, D. Pillay, and D. W. Milligan. Adenovirus infections following haematopoietic cell transplantation: is there a role for adoptive immunotherapy? *Bone Marrow Transplant.* 26 (3):305-307, 2000.

36. Chakrabarti S., V. Mautner, H. Osman, K. E. Collingham, C. D. Fegan, P. E. Klapper, P. A. Moss, and D. W. Milligan. Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood* 100 (5):1619-1627, 2002.
37. Chakrabarti S., G. Hale, and H. Waldmann. Alemtuzumab (Campath-1H) in allogeneic stem cell transplantation: where do we go from here? *Transplant.Proc.* 36 (5):1225-1227, 2004.
38. Chao N. J., G. M. Schmidt, J. C. Niland, M. D. Amylon, A. C. Dagens, G. D. Long, A. P. Nademanee, R. S. Negrin, M. R. O'Donnell, P. M. Parker, and . Cyclosporine, methotrexate, and prednisone compared with cyclosporine and prednisone for prophylaxis of acute graft-versus-host disease. *N.Engl.J.Med.* 329 (17):1225-1230, 1993.
39. Chatziandreou, K. C. Gilmour, A. M. McNicol, M. Costabile, J. Sinclair, D. Cubitt, J. D. Campbell, C. Kinnon, W. Qasim, and H. B. Gaspar. Capture and generation of adenovirus specific T cells for adoptive immunotherapy. *Br.J.Haematol.* 136 (1):117-126, 2007.
40. Chatziandreou, K. C. Gilmour, A. M. McNicol, M. Costabile, J. Sinclair, D. Cubitt, J. D. Campbell, C. Kinnon, W. Qasim, and H. B. Gaspar. Capture and generation of adenovirus specific T cells for adoptive immunotherapy. *Br.J.Haematol.* 136 (1):117-126, 2007.
41. Childs R., C. Sanchez, H. Engler, J. Preuss, S. Rosenfeld, C. Dunbar, F. van Rhee, M. Plante, S. Phang, and A. J. Barrett. High incidence of adeno- and polyomavirus-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow allotransplantation for hematological malignancy following T cell depletion and cyclosporine. *Bone Marrow Transplant.* 22 (9):889-893, 1998.
42. Chou S., L. C. Wechel, and G. I. Marousek. Cytomegalovirus UL97 kinase mutations that confer maribavir resistance. *J.Infect.Dis.* 196 (1):91-94, 2007.
43. Clave E., M. Busson, C. Douay, de Latour Peffault, J. Berrou, C. Rabian, M. Carmagnat, V. Rocha, D. Charron, G. Socie, and A. Toubert. Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 113 (25):6477-6484, 2009.
44. Clave, F. Agbalika, V. Bajzik, de Latour Peffault, M. Trillard, C. Rabian, C. Scieux, A. Devergie, G. Socie, P. Ribaud, L. Ades, C. Ferry, E. Gluckman, D. Charron, H. Esperou, A. Toubert, and H. Moins-Teisserenc. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation in allogeneic stem-cell transplantation: relationship between viral load, EBV-specific T-cell reconstitution and rituximab therapy. *Transplantation* 77 (1):76-84, 2004.
45. Cobbold M., N. Khan, B. Pourgheysari, S. Tauro, D. McDonald, H. Osman, M. Assenmacher, L. Billingham, C. Steward, C. Crawley, E. Olavarria, J. Goldman, R. Chakraverty, P. Mahendra, C. Craddock, and P. A. Moss. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J.Exp.Med.* 202 (3):379-386, 2005.

46. Cohen J. I. Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease associated with acquired immunodeficiency. *Medicine (Baltimore)* 70 (2):137-160, 1991.
47. Cohen J. I. Epstein-Barr virus infection. *N.Engl.J.Med.* 343 (7):481-492, 2000.
48. Cohen J. L., A. Trenado, D. Vasey, D. Klatzmann, and B. L. Salomon. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J.Exp.Med.* 196 (3):401-406, 2002.
49. Cohen J. M., N. Cooper, S. Chakrabarti, K. Thomson, S. Samarasinghe, D. Cubitt, C. Lloyd, A. Woolfrey, P. Veys, and P. J. Amrolia. EBV-related disease following haematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning. *Leuk.Lymphoma* 48 (2):256-269, 2007.
50. Comoli P., M. Labirio, S. Basso, F. Baldanti, P. Grossi, M. Furione, M. Vigano, R. Fiocchi, G. Rossi, F. Ginevri, B. Gridelli, A. Moretta, D. Montagna, F. Locatelli, G. Gerna, and R. Maccario. Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood* 99 (7):2592-2598, 2002.
51. Comoli P., R. Maccario, F. Locatelli, U. Valente, S. Basso, A. Garaventa, P. Toma, G. Botti, G. Melioli, F. Baldanti, A. Nocera, F. Perfumo, and F. Ginevri. Treatment of EBV-related post-renal transplant lymphoproliferative disease with a tailored regimen including EBV-specific T cells. *Am.J.Transplant.* 5 (6):1415-1422, 2005.
52. Comoli P., S. Basso, M. Zecca, D. Pagliara, F. Baldanti, M. E. Bernardo, W. Barberi, A. Moretta, M. Labirio, M. Paulli, M. Furione, R. Maccario, and F. Locatelli. Preemptive therapy of EBV-related lymphoproliferative disease after pediatric haploidentical stem cell transplantation. *Am.J.Transplant.* 7 (6):1648-1655, 2007.
53. Comoli P., S. Basso, M. Labirio, F. Baldanti, R. Maccario, and F. Locatelli. T cell therapy of Epstein-Barr virus and adenovirus infections after hemopoietic stem cell transplant. *Blood Cells Mol.Dis.* 40 (1):68-70, 2008.
54. Crawford H., K. F. Macsween, C. D. Higgins, R. Thomas, K. McAulay, H. Williams, N. Harrison, S. Reid, M. Conacher, J. Douglas, and A. J. Swerdlow. A cohort study among university students: identification of risk factors for Epstein-Barr virus seroconversion and infectious mononucleosis. *Clin.Infect.Dis.* 43 (3):276-282, 2006.
55. Cruz C. R., P. J. Hanley, H. Liu, V. Torrano, Y. F. Lin, J. A. Arce, S. Gottschalk, B. Savoldo, G. Dotti, C. U. Louis, A. M. Leen, A. P. Gee, C. M. Rooney, M. K. Brenner, C. M. Bollard, and H. E. Heslop. Adverse events following infusion of T cells for adoptive immunotherapy: a 10-year experience. *Cytotherapy.*, 2010.
56. Cutler, S. Giri, S. Jeyapalan, D. Paniagua, A. Viswanathan, and J. H. Antin. Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J.Clin.Oncol.* 19 (16):3685-3691, 2001.
57. Cwynarski K., J. Ainsworth, M. Cobbold, S. Wagner, P. Mahendra, J. Apperley, J. Goldman, C. Craddock, and P. A. Moss. Direct visualization of cytomegalovirus-

- specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 97 (5):1232-1240, 2001.
58. Darville JM, Ley BE, Roome AP, Foot AB. Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in a bone marrow transplant population. *Bone Marrow Transplant.* 1998 Sep;22(6):587-9.
 59. Dazzi, R. M. Szydlo, N. C. Cross, C. Craddock, J. Kaeda, E. Kanfer, K. Cwynarski, E. Olavarria, A. Yong, J. F. Apperley, and J. M. Goldman. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 96 (8):2712-2716, 2000.
 60. De Bueger M., A. Bakker, J. J. Van Rood, F. Van der Woude and E. Goulmy. "Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens." *J Immunol.* 149(5): 1788-1794. 1992.
 61. de Pagter PJ, Schuurman R, Visscher H, de Vos M, Bierings M, van Loon AM, Uiterwaal CS, van Baarle D, Sanders EA, Boelens J. Human herpes virus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008 Jul;14(7):831-9.
 62. Dean R. M. and M. R. Bishop. Graft-versus-host disease: emerging concepts in prevention and therapy. *Curr.Hematol.Rep.* 2 (4):287-294, 2003.
 63. Deback, A. M. Fillet, N. Dhedin, B. Barrou, S. Varnous, F. Najjioullah, F. Bricaire, and H. Agut. Monitoring of human cytomegalovirus infection in immunosuppressed patients using real-time PCR on whole blood. *J.Clin.Virol.* 40 (3):173-179, 2007.
 64. Debur MC, Vidal LR, Stroparo E, Nogueira MB, Almeida SM, Takahashi GA, Rotta I, Pereira LA, Silveira CS, Bonfim CM, Raboni SM. Human metapneumovirus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2010 Apr;12(2):173-9. Epub 2009 Oct 29.
 65. Den Haan J. M., N. E. Sherman, E. Blokland, E. Huczko, F. Koning, J. W. Drijfhout, J. Skipper, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, V. H. Engelhard and et al. "Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen." *Science.* 268 (5216): 1476-1480. 1995.
 66. Dermime S., D. Mavroudis, Y. Z. Jiang, N. Hensel, J. Molldrem and A. J. Barrett. "Immune escape from a graft-versus-leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemias following allogeneic bone marrow transplantation." *Bone Marrow Transplant* 19 (10): 989-999. 1997.
 67. Dhédin N., J.P. Vernant. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques : réalisation et complications. *EMC Hématologie.* Doi : 10.1016/S1155-1984(10)51289-5. 2010.
 68. Donohue J., M. Homge, and N. A. Kernan. Characterization of cells emerging at the time of graft failure after bone marrow transplantation from an unrelated marrow donor. *Blood* 82 (3):1023-1029, 1993.

69. Douek C., R. A. Vescio, M. R. Betts, J. M. Brenchley, B. J. Hill, L. Zhang, J. R. Berenson, R. H. Collins, and R. A. Koup. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 355 (9218):1875-1881, 2000.
70. Drew W. L., R. C. Miner, G. I. Marousek, and S. Chou. Maribavir sensitivity of cytomegalovirus isolates resistant to ganciclovir, cidofovir or foscarnet. *J.Clin.Virol.* 37 (2):124-127, 2006.
71. Echavarria M., M. Forman, M. J. van Tol, J. M. Vossen, P. Charache, and A. C. Kroes. Prediction of severe disseminated adenovirus infection by serum PCR. *Lancet* 358 (9279):384-385, 2001.
72. Echavarria M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin.Microbiol.Rev.* 21 (4):704-715, 2008.
73. Einsele, E. Roosnek, N. Rufer, C. Sinzger, S. Riegler, J. Loffler, U. Grigoleit, A. Moris, H. G. Rammensee, L. Kanz, A. Kleihauer, F. Frank, G. Jahn, and H. Hebart. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99 (11):3916-3922, 2002.
74. Einsele, G. Rauser, U. Grigoleit, H. Hebart, C. Sinzger, S. Riegler, and G. Jahn. Induction of CMV-specific T-cell lines using Ag-presenting cells pulsed with CMV protein or peptide. *Cytotherapy.* 4 (1):49-54, 2002.
75. Emery V. C., M. C. Atkins, E. F. Bowen, D. A. Clark, M. A. Johnson, I. M. Kidd, J. E. McLaughlin, A. N. Phillips, P. M. Strappe, and P. D. Griffiths. Interactions between beta-herpesviruses and human immunodeficiency virus in vivo: evidence for increased human immunodeficiency viral load in the presence of human herpesvirus 6. *J.Med.Virol.* 57 (3):278-282, 1999.
76. Emery V. C., C. A. Sabin, A. V. Cope, D. Gor, A. F. Hassan-Walker, and P. D. Griffiths. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 355 (9220):2032-2036, 2000.
77. Engelhard, C. Cordonnier, P. J. Shaw, T. Parkalli, C. Guenther, R. Martino, A. W. Dekker, H. G. Prentice, A. Gustavsson, W. Nurnberger, and P. Ljungman. Early and late invasive pneumococcal infection following stem cell transplantation: a European Bone Marrow Transplantation survey. *Br.J.Haematol.* 117 (2):444-450, 2002.
78. Epstein M. A. and B. G. Achong. Recent progress in Epstein-Barr virus research. *Annu.Rev.Microbiol.* 31:421-445, 1977.
79. Erice. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin.Microbiol.Rev.* 12 (2): 286-297, 1999.
80. Fafi-Kremer S., P. Morand, J. P. Brion, P. Pavese, M. Baccard, R. Germi, O. Genoulaz, S. Nicod, M. Jolivet, R. W. Ruigrok, J. P. Stahl, and J. M. Seigneurin. Long-term shedding of infectious epstein-barr virus after infectious mononucleosis. *J.Infect.Dis.* 191 (6):985-989, 2005.

81. Faucher F., B. Abraham, M. Segondy, O. Jonquet, J. Reynes, and F. Janbon. [Acquired cytomegalovirus infections in immunocompetent adults: 116 cases]. *Presse Med.* 27 (35):1774-1779, 1998.
82. Fefer. Graft-vs.tumor responses. Thomas' hematopoietic cell transplantation 3rd ed. F. S. Blume KG, Appelbaum FR. Editors, *Blackwell Publishing* 369-379. 2004.
83. Ferrara L. and H. J. Deeg. Graft-versus-host disease. *N.Engl.J.Med.* 324 (10):667-674, 1991.
84. Feuchtinger T., P. Lang, K. Hamprecht, M. Schumm, J. Greil, G. Jahn, D. Niethammer, and H. Einsele. Isolation and expansion of human adenovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells according to IFN-gamma secretion for adjuvant immunotherapy. *Exp.Hematol.* 32 (3):282-289, 2004.
85. Feuchtinger T., J. Lucke, K. Hamprecht, C. Richard, R. Handgretinger, M. Schumm, J. Greil, T. Bock, D. Niethammer, and P. Lang. Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br.J.Haematol.* 128 (4):503-509, 2005.
86. Feuchtinger T., S. Matthes-Martin, C. Richard, T. Lion, M. Fuhrer, K. Hamprecht, R. Handgretinger, C. Peters, F. R. Schuster, R. Beck, M. Schumm, R. Lotfi, G. Jahn, and P. Lang. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br.J.Haematol.* 134 (1):64-76, 2006.
87. Feuchtinger T., P. Lang, and R. Handgretinger. Adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk.Lymphoma* 48 (2):244-255, 2007.
88. Feuchtinger T., C. Richard, S. Joachim, M. H. Scheible, M. Schumm, K. Hamprecht, D. Martin, G. Jahn, R. Handgretinger, and P. Lang. Clinical grade generation of hexon-specific T cells for adoptive T-cell transfer as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *J.Immunother.* 31 (2):199-206, 2008.
89. Fischer, F. Le Deist, S. Hacein-Bey-Abina, I. Andre-Schmutz, Gde S. Basile, J. P. de Villartay, and M. Cavazzana-Calvo. Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. *Immunol.Rev.* 203:98-109, 2005.
90. Fishman J.A., R.H. Rubin. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med.* Jun 11;338(24):1741-1751. Review.1998.
91. Flamand, J. Gosselin, I. Stefanescu, D. Ablashi, and J. Menezes. Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood* 85 (5):1263-1271, 1995.
92. Flomenberg P., J. Babbitt, W. R. Drobyski, R. C. Ash, D. R. Carrigan, G. V. Sedmak, T. McAuliffe, B. Camitta, M. M. Horowitz, N. Bunin, and . Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J.Infect.Dis.* 169 (4):775-781, 1994.

93. Freymouth. Adenoviridae. In: *Traité de virologie médicale*, edited by estem. Paris: De Boeck, p.247-266. 2003.
94. Fujimoto T., T. Okafuji, T. Okafuji, M. Ito, S. Nukuzuma, M. Chikahira, and O. Nishio. Evaluation of a bedside immunochromatographic test for detection of adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation, PCR, and real-time PCR. *J.Clin.Microbiol.* 42 (12):5489-5492, 2004.
95. Fujita Y., A. M. Leen, J. Sun, Y. Nakazawa, E. Yvon, H. E. Heslop, M. K. Brenner, and C. M. Rooney. Exploiting cytokine secretion to rapidly produce multivirus-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J.Immunother.* 31 (7):665-674, 2008.
96. Gahery-Segard, F. Farace, D. Godfrin, J. Gaston, R. Lengagne, T. Tursz, P. Boulanger, and J. G. Guillet. Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: antifiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity. *J.Virol.* 72 (3):2388-2397, 1998.
97. Gale R. P., M. M. Horowitz, R. C. Ash, R. E. Champlin, J. M. Goldman, A. A. Rimm, O. Ringden, J. A. Stone, and M. M. Bortin. Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann.Intern.Med.* 120 (8):646-652, 1994.
98. Gamadia E., E. B. Remmerswaal, J. F. Weel, F. Bemelman, R. A. van Lier, and I. J. ten Berge. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood* 101 (7):2686-2692, 2003.
99. Gandhi K., J. T. Tellam, and R. Khanna. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. *Br.J.Haematol.* 125 (3):267-281, 2004.
100. Garnett T., C. I. Pao, and L. R. Gooding. Detection and quantitation of subgroup C adenovirus DNA in human tissue samples by real-time PCR. *Methods Mol.Med.* 130:193-204, 2007.
101. George B., N. Pati, N. Gilroy, M. Ratnamohan, G. Huang, I. Kerridge, M. Hertzberg, D. Gottlieb, and K. Bradstock. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl.Infect.Dis.*, 2010.
102. Guérin V., J.H. Dalle, B. Pédrón, K. Yakouben, D. Bensoussan, D.J. Cordeiro, L. Peltier, M. Ouachée-Chardin, A. Baruchel, G. Sterkers. Correlation between host-cellular immune responses and adenovirus-associated complications in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. 2010. (sous presse).
103. Ginsberg S. and G. A. Prince. The molecular basis of adenovirus pathogenesis. *Infect.Agents Dis.* 3 (1):1-8, 1994.
104. Gleaves, J. Militoni, and R. L. Ashley. An enzyme immunoassay for the direct detection of adenovirus in clinical specimens. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* 17 (1):57-59, 1993.

105. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974 Oct;18(4):295-304.
106. Goker, I. C. Haznedaroglu, and N. J. Chao. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp.Hematol*. 29 (3):259-277, 2001.
107. Goodrum F., M. Reeves, J. Sinclair, K. High, T. Shenk. Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote a latent infection in vitro. *Blood*;110:937-945. 2007.
108. Gottschalk S., C. Y. Ng, M. Perez, C. A. Smith, C. Sample, M. K. Brenner, H. E. Heslop, and C. M. Rooney. An Epstein-Barr virus deletion mutant associated with fatal lymphoproliferative disease unresponsive to therapy with virus-specific CTLs. *Blood* 97 (4):835-843, 2001.
109. Gottschalk S., H. E. Heslop, and C. M. Rooney. Adoptive immunotherapy for EBV-associated malignancies. *Leuk.Lymphoma* 46 (1):1-10, 2005.
110. Gouarin S., P. Palmer, D. Cointe, S. Rogez, A. Vabret, F. Rozenberg, F. Denis, F. Freymuth, P. Lebon, and L. Grangeot-Keros. Congenital HCMV infection: a collaborative and comparative study of virus detection in amniotic fluid by culture and by PCR. *J.Clin.Virol*. 21 (1):47-55, 2001.
111. Gouarin S., A. Vabret, C. Scieux, F. Agbalika, J. Cherot, C. Mengelle, C. Deback, J. Petitjean, J. Dina, and F. Freymuth. Multicentric evaluation of a new commercial cytomegalovirus real-time PCR quantitation assay. *J.Virol.Methods* 146 (1-2):147-154, 2007.
112. Goulmy, R. Schipper, J. Pool, E. Blokland, J. H. Falkenburg, J. Vossen, A. Gratwohl, G. B. Vogelsang, H. C. van Houwelingen, and J. J. van Rood. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N.Engl.J.Med*. 334 (5):281-285, 1996.
113. Gratama W., J. W. van Esser, C. H. Lamers, C. Tournay, B. Lowenberg, R. L. Bolhuis, and J. J. Cornelissen. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood* 98 (5):1358-1364, 2001.
114. Gratama W. and J. J. Cornelissen. Diagnostic potential of tetramer-based monitoring of cytomegalovirus-specific CD8+ T lymphocytes in allogeneic stem cell transplantation. *Clin.Immunol*. 106 (1):29-35, 2003.
115. J. C. Grivel, F. Santoro, S. Chen, G. Faga, M. S. Malnati, Y. Ito, L. Margolis, and P. Lusso. Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *J.Virol*. 77 (15):8280-8289, 2003.
116. Gustafsson, V. Levitsky, J. Z. Zou, T. Frisan, T. Dalianis, P. Ljungman, O. Ringden, J. Winiarski, I. Ernberg, and M. G. Masucci. Epstein-Barr virus (EBV) load in bone marrow transplant recipients at risk to develop posttransplant lymphoproliferative

- disease: prophylactic infusion of EBV-specific cytotoxic T cells. *Blood* 95 (3):807-814, 2000.
117. Hakim T., R. Cepeda, S. Kaimei, C. L. Mackall, N. McAtee, J. Zujewski, K. Cowan, and R. E. Gress. Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. *Blood* 90 (9):3789-3798, 1997.
 118. Hakim T. and R. E. Gress. Immunosenescence: immune deficits in the elderly and therapeutic strategies to enhance immune competence. *Expert.Rev.Clin.Immunol.* 1 (3):443-458, 2005.
 119. Hale, H. E. Heslop, R. A. Krance, M. A. Brenner, D. Jayawardene, D. K. Srivastava, and C. C. Patrick. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 23 (3):277-282, 1999.
 120. Handgretinger R., P. Lang, M. Schumm, M. Pfeiffer, S. Gottschling, B. Demirdelen, P. Bader, S. Kuci, T. Klingebiel, and D. Niethammer. Immunological aspects of haploidentical stem cell transplantation in children. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 938:340-357, 2001.
 121. Hanley P. J., C. R. Cruz, B. Savoldo, A. M. Leen, M. Stanojevic, M. Khalil, W. Decker, J. J. Mollmeyer, H. Liu, A. P. Gee, C. M. Rooney, H. E. Heslop, G. Dotti, M. K. Brenner, E. J. Shpall, and C. M. Bollard. Functionally active virus-specific T-cells that target CMV, adenovirus and EBV can be expanded from naive T-cell populations in cord blood and will target a range of viral epitopes. *Blood*, 2009.
 122. Haque T., G. M. Wilkie, C. Taylor, P. L. Amlot, P. Murad, A. Iley, D. Dombagoda, K. M. Britton, A. J. Swerdlow, and D. H. Crawford. Treatment of Epstein-Barr-virus-positive post-transplantation lymphoproliferative disease with partly HLA-matched allogeneic cytotoxic T cells. *Lancet* 360 (9331):436-442, 2002.
 123. Haque T., G. M. Wilkie, M. M. Jones, C. D. Higgins, G. Urquhart, P. Wingate, D. Burns, K. McAulay, M. Turner, C. Bellamy, P. L. Amlot, D. Kelly, A. MacGilchrist, M. K. Gandhi, A. J. Swerdlow, and D. H. Crawford. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 110 (4):1123-1131, 2007.
 124. Harkensee C, Vasdev N, Gennery AR, Willetts IE, Taylor C. Prevention and management of BK-virus associated haemorrhagic cystitis in children following haematopoietic stem cell transplantation--a systematic review and evidence-based guidance for clinical management. *Br J Haematol.* 2008 Sep;142(5):717-31. Epub 2008 Jun 6.
 125. Hauri-Hohl M. M., M. P. Keller, J. Gill, K. Hafen, E. Pachlatko, T. Boulay, A. Peter, G. A. Hollander, and W. Krenger. Donor T-cell alloreactivity against host thymic epithelium limits T-cell development after bone marrow transplantation. *Blood* 109 (9):4080-4088, 2007.
 126. Haynes B. F., M. L. Markert, G. D. Sempowski, D. D. Patel, and L. P. Hale. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu.Rev.Immunol.* 18:529-560, 2000.

127. Hebart H., P. Wuchter, J. Loeffler, B. Gscheidle, K. Hamprecht, C. Sinzger, G. Jahn, K. Dietz, L. Kanz, and H. Einsele. Evaluation of the Murex CMV DNA Hybrid Capture assay (version 2.0) for early diagnosis of cytomegalovirus infection in recipients of an allogeneic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant.* 28 (2):213-218, 2001.
128. Heemskerk, L. A. Veltrop-Duits, T. van Vreeswijk, M. M. ten Dam, S. Heidt, R. E. Toes, M. J. van Tol, and M. W. Schilham. Extensive cross-reactivity of CD4+ adenovirus-specific T cells: implications for immunotherapy and gene therapy. *J.Virol.* 77 (11):6562-6566, 2003.
129. Heemskerk, A. C. Lankester, T. van Vreeswijk, M. F. Beersma, E. C. Claas, L. A. Veltrop-Duits, A. C. Kroes, J. M. Vossen, M. W. Schilham, and M. J. van Tol. Immune reconstitution and clearance of human adenovirus viremia in pediatric stem-cell recipients. *J.Infect.Dis.* 191 (4):520-530, 2005.
130. Henle W. and G. Henle. The relation between the Epstein-Barr virus and infectious mononucleosis, Burkitt's lymphoma and cancer of the postnasal space. *East Afr.Med.J.* 46 (7):402-406, 1969.
131. Hercend T., T. Takvorian, A. Nowill, R. Tantravahi, P. Moingeon, K. C. Anderson, C. Murray, C. Bohuon, A. Ythier, and J. Ritz. Characterization of natural killer cells with antileukemia activity following allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 67 (3):722-728, 1986.
132. Heslop E., M. K. Brenner, and C. M. Rooney. Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 331 (10):679-680, 1994.
133. Heslop E., C. Y. Ng, C. Li, C. A. Smith, S. K. Loftin, R. A. Krance, M. K. Brenner, and C. M. Rooney. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat.Med.* 2 (5):551-555, 1996.
134. Heslop H. E., K. S. Slobod, M. A. Pule, G. A. Hale, A. Rousseau, C. A. Smith, C. M. Bollard, H. Liu, M. F. Wu, R. J. Rochester, P. J. Amrolia, J. L. Hurwitz, M. K. Brenner, and C. M. Rooney. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 115 (5):925-935, 2010.
135. Hislop D., N. E. Annels, N. H. Gudgeon, A. M. Leese, and A. B. Rickinson. Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection. *J.Exp.Med.* 195 (7):893-905, 2002.
136. Hislop D., G. S. Taylor, D. Sauce, and A. B. Rickinson. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu.Rev.Immunol.* 25:587-617, 2007.
137. Hislop D., M. E. Rensing, D. van Leeuwen, V. A. Pudney, D. Horst, D. Koppers-Lalic, N. P. Croft, J. J. Neefjes, A. B. Rickinson, and E. J. Wiertz. A CD8+ T cell immune evasion protein specific to Epstein-Barr virus and its close relatives in Old World primates. *J.Exp.Med.* 204 (8):1863-1873, 2007.

138. Hjalgrim H., J. Askling, K. Rostgaard, S. Hamilton-Dutoit, M. Frisch, J. S. Zhang, M. Madsen, N. Rosdahl, H. B. Konradsen, H. H. Storm, and M. Melbye. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N.Engl.J.Med.* 349 (14):1324-1332, 2003.
139. Ho V.T., R.J. Soiffer. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* Dec 1;98(12):3192-3204. Review. 2001
140. Hoffman, A. J. Shah, L. A. Ross, and N. Kapoor. Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 7 (7):388-394, 2001.
141. Hong S. S., N. A. Habib, L. Franqueville, S. Jensen, and P. A. Boulanger. Identification of adenovirus (ad) penton base neutralizing epitopes by use of sera from patients who had received conditionally replicative ad (add1520) for treatment of liver tumors. *J.Virol.* 77 (19):10366-10375, 2003.
142. Howard S., G. L. Phillips II, D. E. Reece, R. K. Munn, J. Henslee-Downey, M. Pittard, M. Barker, and C. Pomeroy. Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin.Infect.Dis.* 29 (6):1494-1501, 1999.
143. Hromas R., C. Clark, C. Blanke, G. Tricot, K. Cornetta, A. Hedderman, and E. R. Broun. Failure of ribavirin to clear adenovirus infections in T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 14 (4):663-664, 1994.
144. Hromas R., K. Cornetta, E. Srour, C. Blanke, and E. R. Broun. Donor leukocyte infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections after T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood* 84 (5):1689-1690, 1994.
145. Huang Y. T. and B. M. Turchek. Mink lung cells and mixed mink lung and A549 cells for rapid detection of influenza virus and other respiratory viruses. *J.Clin.Microbiol.* 38 (1):422-423, 2000.
146. Hummel and M. M. Abecassis. A model for reactivation of CMV from latency. *J.Clin.Virol.* 25 Suppl 2:S123-S136, 2002.
147. Imashuku S., T. Goto, T. Matsumura, M. Naya, M. Yamori, M. Hojo, S. Hibi, and S. Todo. Unsuccessful CTL transfusion in a case of post-BMT Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorder (EBV-LPD). *Bone Marrow Transplant.* 20 (4):337-340, 1997.
148. Inoue R., T. Matsuoka, N. Kondo, Y. Nishimura, and S. Matsushita. Identification of Dermatophagoides farinae-2-derived peptides and class II HLA molecules recognized by T cells from atopic individuals. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 114 (4):354-360, 1997.
149. Jeulin H. Prise en charge virologique du risqué infectieux a adénovirus chez les patients allogreffés de cellules souches hématopoïétiques. Université Henri Poincaré. 2007.
150. Jeulin H., A. Salmon, P. Bordigoni, V. Venard. Usefulness of real - time PCR assay in stool for the diagnosis of adenovirus infection in hematopoietic stem cell recipients. 2010. (soumis).

151. Jones S., B. Harrach, R. D. Ganac, M. M. Gozum, W. P. Dela Cruz, B. Riedel, C. Pan, E. L. Delwart, and D. P. Schnurr. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J.Virol.* 81 (11):5978-5984, 2007.
152. Kalpoe S., P. L. van der Heiden, R. M. Barge, S. Houtzager, A. C. Lankester, M. J. van Tol, and A. C. Kroes. Assessment of disseminated adenovirus infections using quantitative plasma PCR in adult allogeneic stem cell transplant recipients receiving reduced intensity or myeloablative conditioning. *Eur.J.Haematol.* 78 (4):314-321, 2007.
153. Kamimura N., Ueda, Y. Sawa, S. Hachida, T. Atsumi, T. Nakagawa, S. Sawa, G. H. Jin, H. Suzuki, K. Ishihara, M. Murakami, and T. Hirano. Evidence of a novel IL-2/15R beta-targeted cytokine involved in homeostatic proliferation of memory CD8⁺ T cells. *J.Immunol.* 173 (10):6041-6049, 2004.
154. Kampmann, D. Cubitt, T. Walls, P. Naik, M. Depala, S. Samarasinghe, D. Robson, A. Hassan, K. Rao, H. Gaspar, G. Davies, A. Jones, C. Cale, K. Gilmour, M. Real, M. Foo, N. Bennett-Rees, A. Hewitt, P. Amrolia, and P. Veys. Improved outcome for children with disseminated adenoviral infection following allogeneic stem cell transplantation. *Br.J.Haematol.* 130 (4):595-603, 2005.
155. Kanegane H., K. Nomura, T. Miyawaki, and G. Tosato. Biological aspects of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes in chronic active EBV infection and associated malignancies. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 44 (3):239-249, 2002.
156. Kedl R. M., W. A. Rees, D. A. Hildeman, B. Schaefer, T. Mitchell, J. Kappler, and P. Marrack. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J.Exp.Med.* 192 (8):1105-1113, 2000.
157. Kelly, A. Bell, and A. Rickinson. Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat.Med.* 8 (10):1098-1104, 2002.
158. Khatri V. P., R. A. Baiocchi, R. Peng, A. R. Oberkircher, J. M. Dolce, P. M. Ward, G. P. Herzig, and M. A. Caligiuri. Endogenous CD8⁺ T cell expansion during regression of monoclonal EBV-associated posttransplant lymphoproliferative disorder. *J.Immunol.* 163 (1):500-506, 1999.
159. Kiecker, M. Streitz, B. Ay, G. Cherepnev, H. D. Volk, R. Volkmer-Engert, and F. Kern. Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides--what kind of peptide for which purpose? *Hum.Immunol.* 65 (5):523-536, 2004.
160. Kimura, Y. Hoshino, H. Kanegane, I. Tsuge, T. Okamura, K. Kawa, and T. Morishima. Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood* 98 (2):280-286, 2001.
161. King, A. Ilic, K. Koelsch, and N. Sarvetnick. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* 117 (2):265-277, 2004.
162. Klenerman P., V. Cerundolo, and P. R. Dunbar. Tracking T cells with tetramers: new tales from new tools. *Nat.Rev.Immunol.* 2 (4):263-272, 2002.

163. Koh P., D. A. Rizzieri, and N. J. Chao. Allogeneic hematopoietic stem cell transplant using mismatched/haploidentical donors. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 13 (11):1249-1267, 2007.
164. Koehne G., K. M. Smith, T. L. Ferguson, R. Y. Williams, G. Heller, E. G. Pamer, B. Dupont, and R. J. O'Reilly. Quantitation, selection, and functional characterization of Epstein-Barr virus-specific and alloreactive T cells detected by intracellular interferon-gamma production and growth of cytotoxic precursors. *Blood* 99 (5):1730-1740, 2002.
165. Konoplev S., R. E. Champlin, S. Giralt, N. T. Ueno, I. Khouri, I. Raad, K. Rolston, K. Jacobson, J. Tarrand, M. Luna, Q. Nguyen, and E. Whimbey. Cytomegalovirus pneumonia in adult autologous blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 27 (8):877-881, 2001.
166. Krenger W. and G. A. Hollander. The thymus in GVHD pathophysiology. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 21 (2):119-128, 2008.
167. Kroes C., E. P. de Klerk, A. C. Lankester, C. Malipaard, C. S. de Brouwer, E. C. Claas, Jol-van der Zijde EC, and M. J. van Tol. Sequential emergence of multiple adenovirus serotypes after pediatric stem cell transplantation. *J.Clin.Virol.* 38 (4):341-347, 2007.
168. M. Kronenberg and L. Gapin. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat.Rev.Immunol.* 2 (8):557-568, 2002.
169. Ku C., M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler, and P. Marrack. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288 (5466):675-678, 2000.
170. Kuehnle, M. H. Huls, Z. Liu, M. Semmelmann, R. A. Krance, M. K. Brenner, C. M. Rooney, and H. E. Heslop. CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hemopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 95 (4):1502-1505, 2000.
171. Kurth, T. Spieker, J. Wustrow, G. J. Strickler, L. M. Hansmann, K. Rajewsky, and R. Kuppers. EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity.* 13 (4):485-495, 2000.
172. La Rosa M., R. E. Champlin, N. Mirza, J. Gajewski, S. Giralt, K. V. Rolston, I. Raad, K. Jacobson, D. Kontoyiannis, L. Elting, and E. Whimbey. Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. *Clin.Infect.Dis.* 32 (6):871-876, 2001.
173. Lacey S. F., G. Gallez-Hawkins, M. Crooks, J. Martinez, D. Senitzer, S. J. Forman, R. Spielberger, J. A. Zaia, and D. J. Diamond. Characterization of cytotoxic function of CMV-pp65-specific CD8+ T-lymphocytes identified by HLA tetramers in recipients and donors of stem-cell transplants. *Transplantation* 74 (5):722-732, 2002.
174. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Lancet.* May 10;371 (9624):1579-86. 2008.

175. Leen M., U. Sili, B. Savoldo, A. M. Jewell, P. A. Piedra, M. K. Brenner, and C. M. Rooney. Fiber-modified adenoviruses generate subgroup cross-reactive, adenovirus-specific cytotoxic T lymphocytes for therapeutic applications. *Blood* 103 (3):1011-1019, 2004.
176. Leen M., U. Sili, E. F. Vanin, A. M. Jewell, W. Xie, D. Vignali, P. A. Piedra, M. K. Brenner, and C. M. Rooney. Conserved CTL epitopes on the adenovirus hexon protein expand subgroup cross-reactive and subgroup-specific CD8⁺ T cells. *Blood* 104 (8):2432-2440, 2004.
177. Leen M., G. D. Myers, C. M. Bollard, M. H. Huls, U. Sili, A. P. Gee, H. E. Heslop, and C. M. Rooney. T-cell immunotherapy for adenoviral infections of stem-cell transplant recipients. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1062:104-115, 2005.
178. Leen M. and C. M. Rooney. Adenovirus as an emerging pathogen in immunocompromised patients. *Br.J.Haematol.* 128 (2):135-144, 2005.
179. Leen M., G. D. Myers, U. Sili, M. H. Huls, H. Weiss, K. S. Leung, G. Carrum, R. A. Krance, C. C. Chang, J. J. Molldrem, A. P. Gee, M. K. Brenner, H. E. Heslop, C. M. Rooney, and C. M. Bollard. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat.Med.* 12 (10):1160-1166, 2006.
180. Leen M., C. M. Bollard, G. D. Myers, and C. M. Rooney. Adenoviral infections in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 12 (3):243-251, 2006.
181. Leen M., G. D. Myers, U. Sili, M. H. Huls, H. Weiss, K. S. Leung, G. Carrum, R. A. Krance, C. C. Chang, J. J. Molldrem, A. P. Gee, M. K. Brenner, H. E. Heslop, C. M. Rooney, and C. M. Bollard. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat.Med.* 12 (10):1160-1166, 2006.
182. Leen M. and H. E. Heslop. Cytotoxic T lymphocytes as immune-therapy in haematological practice. *Br.J.Haematol.* 143 (2):169-179, 2008.
183. Leen M., A. Christin, G. D. Myers, H. Liu, C. R. Cruz, P. J. Hanley, A. A. Kennedy-Nasser, K. S. Leung, A. P. Gee, R. A. Krance, M. K. Brenner, H. E. Heslop, C. M. Rooney, and C. M. Bollard. Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 114 (19):4283-4292, 2009.
184. Leen A. M., T. Tripic, and C. M. Rooney. Challenges of T cell therapies for virus-associated diseases after hematopoietic stem cell transplantation. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 10 (3):337-351, 2010.
185. Legrand F, Berrebi D, Houhou N, Freymuth F, Faye A, Duval M, Mougnot JF, Peuchmaur M, Vilmer E. Early diagnosis of adenovirus infection and treatment with cidofovir after bone marrow transplantation in children. *Bone Marrow Transplant.* Mar;27(6):621-6. 2001.

186. Leruez-Ville, V. Minard, F. Lacaille, A. Buzyn, E. Abachin, S. Blanche, F. Freymuth, and C. Rouzioux. Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clin.Infect.Dis.* 38 (1):45-52, 2004.
187. Levitskaya, M. Coram, V. Levitsky, S. Imreh, P. M. Steigerwald-Mullen, G. Klein, M. G. Kurilla, and M. G. Masucci. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375 (6533):685-688, 1995.
188. Levitskaya J, Sharipo A, Leonchiks A, Ciechanover A, Masucci MG. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 Nov 11;94(23):12616-21.
189. Lewalle P., A. Triffet, A. Delforge, P. Crombez, D. Selleslag, H. De Muynck, D. Bron, and P. Martiat. Donor lymphocyte infusions in adult haploidentical transplant: a dose finding study. *Bone Marrow Transplant.* 31 (1):39-44, 2003.
190. Lewin S. R., G. Heller, L. Zhang, E. Rodrigues, E. Skulsky, M. R. van den Brink, T. N. Small, N. A. Kernan, R. J. O'Reilly, D. D. Ho, and J. W. Young. Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood* 100 (6):2235-2242, 2002.
191. Lilleri, C. Fornara, A. Chiesa, D. Caldera, E. P. Alessandrino, and G. Gerna. Human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica* 93 (2):248-256, 2008.
192. Lilleri, G. Gerna, C. Fornara, A. Chiesa, G. Comolli, M. Zecca, and F. Locatelli. Human cytomegalovirus-specific T cell reconstitution in young patients receiving T cell-depleted, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J.Infect.Dis.* 199 (6):829-836, 2009.
193. Lion T., R. Baumgartinger, F. Watzinger, S. Matthes-Martin, M. Suda, S. Preuner, B. Futterknecht, A. Lawitschka, C. Peters, U. Potschger, and H. Gadner. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood* 102 (3):1114-1120, 2003.
194. Liu H. and B. P. Leung. CD4+CD25+ regulatory T cells in health and disease. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 33 (5-6):519-524, 2006.
195. Ljungman P., C. A. Gleaves, and J. D. Meyers. Respiratory virus infection in immunocompromised patients. *Bone Marrow Transplant.* 4 (1):35-40, 1989.
196. Loberiza R., Jr., D. S. Serna, M. M. Horowitz, and J. D. Rizzo. Transplant center characteristics and clinical outcomes after hematopoietic stem cell transplantation: what do we know? *Bone Marrow Transplant.* 31 (6):417-421, 2003.
197. Lum L. G. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* 69 (2):369-380, 1987.

198. Mackall L. and R. E. Gress. Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol.Rev.* 157:61-72, 1997.
199. Mackall L., D. Stein, T. A. Fleisher, M. R. Brown, F. T. Hakim, C. V. Bare, S. F. Leitman, E. J. Read, C. S. Carter, L. H. Wexler, and R. E. Gress. Prolonged CD4 depletion after sequential autologous peripheral blood progenitor cell infusions in children and young adults. *Blood* 96 (2):754-762, 2000.
200. Mackinnon S., K. Thomson, S. Verfuether, K. Peggs, and M. Lowdell. Adoptive cellular therapy for cytomegalovirus infection following allogeneic stem cell transplantation using virus-specific T cells. *Blood Cells Mol.Dis.* 40 (1):63-67, 2008.
201. Maecker H. T., H. S. Dunn, M. A. Suni, E. Khatamzas, C. J. Pitcher, T. Bunde, N. Persaud, W. Trigona, T. M. Fu, E. Sinclair, B. M. Brecht, J. M. McCune, V. C. Maino, F. Kern, and L. J. Picker. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 255 (1-2):27-40, 2001.
202. Mahr J. A. and L. R. Gooding. Immune evasion by adenoviruses. *Immunol.Rev.* 168:121-130, 1999.
203. Maraninchi, E. Gluckman, D. Blaise, D. Guyotat, B. Rio, J. L. Pico, V. Leblond, M. Michallet, F. Dreyfus, N. Ifrah, and . Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet* 2 (8552):175-178, 1987.
204. Marie-Cardine A., F. Divay, I. Dutot, A. Green, A. Perdrix, O. Boyer, N. Contentin, H. Tilly, F. Tron, J. P. Vannier, and S. Jacquot. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin.Immunol.* 127 (1):14-25, 2008.
205. Martin P. J., P. A. Carpenter, J. E. Sanders, and M. E. Flowers. Diagnosis and clinical management of chronic graft-versus-host disease. *Int.J.Hematol.* 79 (3):221-228, 2004.
206. Masjosthusmann, K. Ehlert, B.R. Eing, J. Roth, G. Koehler, H. Juergens, M. Fruehwald, A.H. Groll. Delay in B-lymphocyte recovery and function following rituximab for EBV-associated lymphoproliferative disease early post-allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* May;43(9):679-84. Epub 2008 Nov 24. Review. 2009.
207. Mautner J., D. Pich, F. Nimmerjahn, S. Milosevic, D. Adhikary, H. Christoph, K. Witter, G. W. Bornkamm, W. Hammersachmidt, and U. Behrends. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 evades direct immune recognition by CD4+ T helper cells. *Eur.J.Immunol.* 34 (9):2500-2509, 2004.
208. McSharry P., H. G. Burgert, D. P. Owen, R. J. Stanton, V. Prod'homme, M. Sester, K. Koebernick, V. Groh, T. Spies, S. Cox, A. M. Little, E. C. Wang, P. Tomasec, and G. W. Wilkinson. Adenovirus E3/19K promotes evasion of NK cell recognition by intracellular sequestration of the NKG2D ligands major histocompatibility complex class I chain-related proteins A and B. *J.Virol.* 82 (9):4585-4594, 2008.
209. Meij P., J. W. van Esser, H. G. Niesters, D. van Baarle, F. Miedema, N. Blake, A. B. Rickinson, I. Leiner, E. Pamer, B. Lowenberg, J. J. Cornelissen, and J. W. Gratama.

- Impaired recovery of Epstein-Barr virus (EBV)--specific CD8+ T lymphocytes after partially T-depleted allogeneic stem cell transplantation may identify patients at very high risk for progressive EBV reactivation and lymphoproliferative disease. *Blood* 101 (11):4290-4297, 2003.
210. Mendes V., G. Benard, C. B. Pereira, E. G. Kallas, A. J. Duarte, C. S. Pannuti, F. L. Dulley, and C. M. Machado. Different kinetics in anti-cytomegalovirus immunity reconstitution evaluated by lymphocyte proliferation and IFN-gamma production in allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *Acta Haematol.* 107 (4):187-194, 2002.
 211. Merlo A., R. Turrini, S. Bobisse, R. Zamarchi, R. Alaggio, R. Dolcetti, J. Mautner, P. Zanovello, A. Amadori, and A. Rosato. Virus-specific cytotoxic CD4+ T cells for the treatment of EBV-related tumors. *J.Immunol.* 184 (10):5895-5902, 2010.
 212. Michallet, N. Dhedin, and A. S. Michallet. [Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for hematological malignancies]. *Bull.Cancer* 88 (9):908-926, 2001.
 213. Micklethwaite K., A. Hansen, A. Foster, E. Snape, V. Antonenas, M. Sartor, P. Shaw, K. Bradstock, and D. Gottlieb. Ex vivo expansion and prophylactic infusion of CMV-pp65 peptide-specific cytotoxic T-lymphocytes following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 13 (6):707-714, 2007.
 214. Micklethwaite K. P., L. Clancy, U. Sandher, A. M. Hansen, E. Blyth, V. Antonenas, M. M. Sartor, K. F. Bradstock, and D. J. Gottlieb. Prophylactic infusion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes stimulated with Ad5f35pp65 gene-modified dendritic cells after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood* 112 (10):3974-3981, 2008.
 215. Middeldorp J. M., A. A. Brink, A. J. van den Brule, and C. J. Meijer. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 45 (1):1-36, 2003.
 216. Miller W., P. Flynn, J. McCullough, H. H. Balfour, Jr., A. Goldman, R. Haake, P. McGlave, N. Ramsay, and J. Kersey. Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation: an association with acute graft-v-host disease. *Blood* 67 (4):1162-1167, 1986.
 217. Mistchenko S., R. A. Diez, A. L. Mariani, J. Robaldo, A. F. Maffey, G. Bayley-Bustamante, and S. Grinstein. Cytokines in adenoviral disease in children: association of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha levels with clinical outcome. *J.Pediatr.* 124 (5 Pt 1):714-720, 1994.
 218. Mohty. [Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation]. *Rev.Prat.* 58 (19):2111-2122, 2008.
 219. Molina L., C. Chabannon, F. Viret, A. Moine, J. Leger, F. Nicolini, D. Hollard, and J. J. Sotto. Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized allogeneic peripheral blood stem cells for rescue graft failure after allogeneic bone marrow transplantation in two patients with acute myeloblastic leukemia in first complete remission. *Blood* 85 (6):1678-1679, 1995.

220. Molinier-Frenkel V., H. Gahery-Segard, M. Mehtali, C. Le Boulaire, S. Ribault, P. Boulanger, T. Tursz, J. G. Guillet, and F. Farace. Immune response to recombinant adenovirus in humans: capsid components from viral input are targets for vector-specific cytotoxic T lymphocytes. *J.Virol.* 74 (16):7678-7682, 2000.
221. Molinier-Frenkel V., R. Lengagne, F. Gaden, S. S. Hong, J. Choppin, H. Gahery-Segard, P. Boulanger, and J. G. Guillet. Adenovirus hexon protein is a potent adjuvant for activation of a cellular immune response. *J.Virol.* 76 (1):127-135, 2002.
222. Morfin, S. Dupuis-Girod, S. Mundweiler, D. Falcon, D. Carrington, P. Sedlacek, M. Bierings, P. Cetkovsky, A. C. Kroes, M. J. van Tol, and D. Thouvenot. In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. *Antivir.Ther.* 10 (2):225-229, 2005.
223. Morris S. and G. R. Hill. Advances in the understanding of acute graft-versus-host disease. *Br.J.Haematol.* 137 (1):3-19, 2007.
224. Myers D., C. M. Bollard, M. F. Wu, H. Weiss, C. M. Rooney, H. E. Heslop, and A. M. Leen. Reconstitution of adenovirus-specific cell-mediated immunity in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 39 (11):677-686, 2007.
225. Nagafuji K., K. Aoki, H. Henzan, K. Kato, T. Miyamoto, T. Eto, Y. Nagatoshi, T. Ohba, K. Obama, H. Gondo, and M. Harada. Cidofovir for treating adenoviral hemorrhagic cystitis in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 34 (10):909-914, 2004.
226. Nanbo A. and K. Takada. The role of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) in oncogenesis. *Rev.Med.Virol.* 12 (5):321-326, 2002.
227. Nash R. A., R. Etzioni, R. Storb, T. Furlong, T. Gooley, C. Anasetti, F. R. Appelbaum, K. Doney, P. Martin, J. Slattery, and . Tacrolimus (FK506) alone or in combination with methotrexate or methylprednisolone for the prevention of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from HLA-matched siblings: a single-center study. *Blood* 85 (12):3746-3753, 1995.
228. Neofytos D., A. Ojha, B. Mookerjee, J. Wagner, J. Filicko, A. Ferber, S. Dessain, D. Grosso, J. Brunner, N. Flomenberg, and P. Flomenberg. Treatment of adenovirus disease in stem cell transplant recipients with cidofovir. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 13 (1):74-81, 2007.
229. Neven, S. Leroy, H. Decaluwe, F. Le Deist, C. Picard, D. Moshous, N. Mahlaoui, M. Debre, J. L. Casanova, L. Dal Cortivo, Y. Madec, S. Hacein-Bey-Abina, Basile G. de Saint, J. P. de Villartay, S. Blanche, M. Cavazzana-Calvo, and A. Fischer. Long-term outcome after hematopoietic stem cell transplantation of a single-center cohort of 90 patients with severe combined immunodeficiency. *Blood* 113 (17):4114-4124, 2009.
230. Nguyen V. H., R. Zeiser, and R. S. Negrin. Role of naturally arising regulatory T cells in hematopoietic cell transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 12 (10):995-1009, 2006.

231. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. Parainfluenza virus infections after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, response to antiviral therapy, and effect on transplant outcome. *Blood*. 2001 Aug 1;98(3):573-8.
232. Nichols W. G., L. Corey, T. Gooley, C. Davis, and M. Boeckh. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J.Infect.Dis.* 185 (3):273-282, 2002.
233. Nickel P, Bold G, Presber F, Biti D, Babel N, Kreutzer S, Pratschke J, Schönemann C, Kern F, Volk HD, Reinke P. High levels of CMV-IE-1-specific memory T cells are associated with less alloimmunity and improved renal allograft function. *Transpl Immunol.* Mar;20(4):238-42. 2009.
234. Niedobitek, A. Agathangelou, H. Herbst, L. Whitehead, D. H. Wright, and L. S. Young. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J.Pathol.* 182 (2):151-159, 1997.
235. Nikiforow S., K. Bottomly, G. Miller, and C. Munz. Cytolytic CD4(+)-T-cell clones reactive to EBNA1 inhibit Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation. *J.Virol.* 77 (22):12088-12104, 2003.
236. O'Reilly R. J., T. N. Small, E. Papadopoulos, K. Lucas, J. Lacerda, and L. Koulova. Biology and adoptive cell therapy of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in recipients of marrow allografts. *Immunol.Rev.* 157:195-216, 1997.
237. O'Reilly R. J., E. Doubrovina, D. Trivedi, A. Hasan, W. Kollen, and G. Koehne. Adoptive transfer of antigen-specific T-cells of donor type for immunotherapy of viral infections following allogeneic hematopoietic cell transplants. *Immunol.Res.* 38 (1-3):237-250, 2007.
238. Ocheni S., N. Kroeger, T. Zabelina, I. Sobottka, F. Ayuk, C. Wolschke, A. Muth, H. Lellek, L. Petersen, R. Erttmann, H. Kabisch, A. R. Zander, and U. Bacher. EBV reactivation and post transplant lymphoproliferative disorders following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 42 (3):181-186, 2008.
239. Olive M., L. Eisenlohr, N. Flomenberg, S. Hsu, and P. Flomenberg. The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4+ T-cell epitope. *Hum.Gene Ther.* 13 (10):1167-1178, 2002.
240. Osarogiagbon R. U., T. E. Defor, M. A. Weisdorf, A. Erice, and D. J. Weisdorf. CMV antigenemia following bone marrow transplantation: risk factors and outcomes. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 6 (3):280-288, 2000.
241. Ozdemir, L. S. St John, G. Gillespie, S. Rowland-Jones, R. E. Champlin, J. J. Molldrem, and K. V. Komanduri. Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8+ T cells. *Blood* 100 (10):3690-3697, 2002.
242. Pantaleo G. and A. Harari. Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat.Rev.Immunol.* 6 (5):417-423, 2006.

243. Papadopoulos B., M. Ladanyi, D. Emanuel, S. Mackinnon, F. Boulad, M. H. Carabasi, H. Castro-Malaspina, B. H. Childs, A. P. Gillio, T. N. Small, and . Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N.Engl.J.Med.* 330 (17):1185-1191, 1994.
244. Pappworth Y., E. C. Wang, and M. Rowe. The switch from latent to productive infection in epstein-barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing. *J.Virol.* 81 (2):474-482, 2007.
245. Parkman R., G. Cohen, S. L. Carter, K. I. Weinberg, B. Masinsin, E. Guinan, J. Kurtzberg, J. E. Wagner, and N. A. Kernan. Successful immune reconstitution decreases leukemic relapse and improves survival in recipients of unrelated cord blood transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 12 (9):919-927, 2006.
246. Peggs K., S. Verfuert, and S. Mackinnon. Induction of cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses using dendritic cells pulsed with CMV antigen: a novel culture system free of live CMV virions. *Blood* 97 (4):994-1000, 2001.
247. Peggs K. S., S. Verfuert, A. Pizzey, N. Khan, M. Guiver, P. A. Moss, and S. Mackinnon. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* 362 (9393):1375-1377, 2003.
248. Peggs K. S., S. Verfuert, A. Pizzey, N. Khan, P. Moss, A. H. Goldstone, K. Yong, and S. Mackinnon. Reconstitution of T-cell repertoire after autologous stem cell transplantation: influence of CD34 selection and cytomegalovirus infection. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 9 (3):198-205, 2003.
249. Portis T., P. Dyck, and R. Longnecker. Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 102 (12):4166-4178, 2003.
250. Pourgheysari, K. P. Piper, A. McLarnon, J. Arrazi, R. Bruton, F. Clark, M. Cook, P. Mahendra, C. Craddock, and P. A. Moss. Early reconstitution of effector memory CD4+ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 43 (11):853-861, 2009.
251. Raphaël M., F. Baran-Marszak, C. Besson. Elsevier Masson SAS. 2005.
252. Rapp, M. Messerle, B. Buhler, M. Tannheimer, G. M. Keil, and U. H. Koszinowski. Identification of the murine cytomegalovirus glycoprotein B gene and its expression by recombinant vaccinia virus. *J.Virol.* 66 (7):4399-4406, 1992.
253. Rauser, H. Einsele, C. Sinzger, D. Wernet, G. Kuntz, M. Assenmacher, J. D. Campbell, and M. S. Topp. Rapid generation of combined CMV-specific CD4+ and CD8+ T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood* 103 (9):3565-3572, 2004.
254. Razonable R. R., C. V. Paya, and T. F. Smith. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J.Clin.Microbiol.* 40 (3):746-752, 2002.

255. Reddy. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematol.Oncol.* 21 (4):149-161, 2003.
256. Rensing ME, Horst D, Griffin BD, Tellam J, Zuo J, Khanna R, Rowe M, Wiertz EJ. Epstein-Barr virus evasion of CD8(+) and CD4(+) T cell immunity via concerted actions of multiple gene products. *Semin Cancer Biol.* 2008 Dec;18(6):397-408. Epub 2008 Oct 25.
257. Rickinson B. Epstein-Barr virus. *Virus Res.* 82 (1-2):109-113, 2002.
258. Rickinson B. and M. A. Epstein. Sensitivity of the transforming and replicative functions of Epstein-Barr virus to inhibition by phosphonoacetate. *J.Gen.Virol.* 40 (2):409-420, 1978.
259. Rickinson B., S. P. Lee, and N. M. Steven. Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. *Curr.Opin.Immunol.* 8 (4):492-497, Review, 1996.
260. Rickinson A.B. and E. Kieff. Epstein-Barr virus. J.C. Nicolas et M.C. Meyohas. Virus Epstein-Barr. *Traité de virologie médicale.Edition ESTEM:* 213-236. 2003.
261. Riddell S. R. and P. D. Greenberg. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J.Immunol.Methods* 128 (2):189-201, 1990.
262. Roelvink P.W., A. Lizonova, J. G. Lee, Y. Li, J. M. Bergelson, R. W. Finberg, D. E. Brough, I. Kovesdi, and T. J. Wickham. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J.Virol.* 72 (10):7909-7915, 1998.
263. Rooney M., S. K. Loftin, M. S. Holladay, M. K. Brenner, R. A. Krance, and H. E. Heslop. Early identification of Epstein-Barr virus-associated post-transplantation lymphoproliferative disease. *Br.J.Haematol.* 89 (1):98-103, 1995.
264. Rooney M., C. A. Smith, C. Y. Ng, S. K. Loftin, J. W. Sixbey, Y. Gan, D. K. Srivastava, L. C. Bowman, R. A. Krance, M. K. Brenner, and H. E. Heslop. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92 (5):1549-1555, 1998.
265. Rooney M., H. E. Heslop, and M. K. Brenner. EBV specific CTL: a model for immune therapy. *Vox Sang.* 74 Suppl 2:497-498, 1998.
266. Rooney M., C. A. Smith, C. Y. Ng, S. K. Loftin, J. W. Sixbey, Y. Gan, D. K. Srivastava, L. C. Bowman, R. A. Krance, M. K. Brenner, and H. E. Heslop. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92 (5):1549-1555, 1998.
267. Routes M., S. Ryan, K. Morris, R. Takaki, A. Cerwenka, and L. L. Lanier. Adenovirus serotype 5 E1A sensitizes tumor cells to NKG2D-dependent NK cell lysis and tumor rejection. *J.Exp.Med.* 202 (11):1477-1482, 2005.
268. Runde V., S. Ross, R. Trenchel, E. Lagemann, O. Basu, K. Renzing-Kohler, U. W. Schaefer, M. Roggendorf, and E. Holler. Adenoviral infection after allogeneic stem cell

- transplantation (SCT): report on 130 patients from a single SCT unit involved in a prospective multi center surveillance study. *Bone Marrow Transplant.* 28 (1):51-57, 2001.
269. Russell W. C. Update on adenovirus and its vectors. *J.Gen.Virol.* 81 (Pt 11):2573-2604, 2000.
 270. Ruutu T., L. Volin, T. Parkkali, E. Juvonen, and E. Elonen. Cyclosporine, methotrexate, and methylprednisolone compared with cyclosporine and methotrexate for the prevention of graft-versus-host disease in bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donor: a prospective randomized study. *Blood* 96 (7):2391-2398, 2000.
 271. Ruzek C., B. F. Kavanagh, A. Scaria, S. M. Richards, and R. D. Garman. Adenoviral vectors stimulate murine natural killer cell responses and demonstrate antitumor activities in the absence of transgene expression. *Mol.Ther.* 5 (2):115-124, 2002.
 272. Sakaguchi S. Regulatory T cells. *Springer Semin.Immunopathol.* 28 (1):1-2, 2006.
 273. Sakaguchi S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, and T. Nomura. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol.Rev.* 212:8-27, 2006.
 274. Sandherr M, Einsele H, Hebart H, Kahl C, Kern W, Kiehl M, Massenkeil G, Penack O, Schiel X, Schuettrumpf S, Ullmann AJ, Cornely OA; Infectious Diseases Working Party, German Society for Hematology and Oncology. Antiviral prophylaxis in patients with haematological malignancies and solid tumours: Guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society for Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Oncol.* 2006 Jul;17(7):1051-9. Epub 2006 Jan 12.
 275. Schwering A., Brauninger, U. Klein, B. Jungnickel, M. Tinguely, V. Diehl, M. L. Hansmann, R. Dalla-Favera, K. Rajewsky, and R. Kuppers. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 101 (4):1505-1512, 2003.
 276. Seggewiss R. and H. Einsele. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 115 (19):3861-3868, 2010.
 277. Segondy M. CytomégaloVirus Humain. Elsevier Masson SAS. 2009.
 278. Sester, U. Sester, Salvador S. Alarcon, G. Heine, S. Lipfert, M. Girndt, B. Gartner, and H. Kohler. Age-related decrease in adenovirus-specific T cell responses. *J.Infect.Dis.* 185 (10):1379-1387, 2002.
 279. Shannon-Lowe D., B. Neuhierl, G. Baldwin, A. B. Rickinson, and H. J. Delecluse. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103 (18):7065-7070, 2006.
 280. Shen S., Y. Ding, C. E. Tadokoro, D. Olivares-Villagomez, M. Camps-Ramirez, M. A. Curotto de Lafaille, and J. J. Lafaille. Control of homeostatic proliferation by regulatory T cells. *J.Clin.Invest* 115 (12):3517-3526, 2005.

281. Sinclair, Q. X. Tan, M. Sharp, V. Girling, C. Poon, M. V. Natta, D. A. Jabs, M. Inokuma, H. T. Maecker, B. Brecht, and M. A. Jacobson. Protective immunity to cytomegalovirus (CMV) retinitis in AIDS is associated with CMV-specific T cells that express interferon- gamma and interleukin-2 and have a CD8⁺ cell early maturational phenotype. *J.Infect.Dis.* 194 (11):1537-1546, 2006.
282. Sinclair. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol* ; 41:180-185. 2008.
283. Sinzger, A. Grefte, B. Plachter, A. S. Gouw, T. H. The, and G. Jahn. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J.Gen.Virol.* 76 (Pt 4):741-750, 1995.
284. Small T. N., C. A. Keever, S. Weiner-Fedus, G. Heller, R. J. O'Reilly, and N. Flomenberg. B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood* 76 (8):1647-1656, 1990.
285. Smith G., A. Cassany, L. Gerace, R. Ralston, and G. R. Nemerow. Neutralizing antibody blocks adenovirus infection by arresting microtubule-dependent cytoplasmic transport. *J.Virol.* 82 (13):6492-6500, 2008.
286. Soderberg-Naucler, K.N. Fish, J.A. Nelson. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell*;91:119-126. 1997.
287. Solomon S. R., S. Mielke, B. N. Savani, A. Montero, L. Wisch, R. Childs, N. Hensel, J. Schindler, V. Ghetie, S. F. Leitman, T. Mai, C. S. Carter, R. Kurlander, E. J. Read, E. S. Vitetta, and A. J. Barrett. 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* 106 (3):1123-1129, 2005.
288. Stagno S., J. E. Volanakis, D. W. Reynolds, R. Stroud, and C. A. Alford. Immune complexes in congenital and natal cytomegalovirus infections of man. *J.Clin.Invest* 60 (4):838-845, 1977.
289. Stagno S., R. F. Pass, G. Cloud, W. J. Britt, R. E. Henderson, P. D. Walton, D. A. Veren, F. Page, and C. A. Alford. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* 256 (14):1904-1908, 1986.
290. Stallwood Y., K. D. Fisher, P. H. Gallimore, and V. Mautner. Neutralisation of adenovirus infectivity by ascitic fluid from ovarian cancer patients. *Gene Ther.* 7 (8):637-643, 2000.
291. Steer B., J. Szer, J. Sasadeusz, J. P. Matthews, J. A. Beresford, and A. Grigg. Varicella-zoster infection after allogeneic bone marrow transplantation: incidence, risk factors and prevention with low-dose aciclovir and ganciclovir. *Bone Marrow Transplant.* 25 (6):657-664, 2000.

292. Steven M., N. E. Annels, A. Kumar, A. M. Leese, M. G. Kurilla, and A. B. Rickinson. Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J.Exp.Med.* 185 (9):1605-1617, 1997.
293. Storb, H. J. Deeg, J. Whitehead, F. Appelbaum, P. Beatty, W. Bensinger, C. D. Buckner, R. Clift, K. Doney, V. Farewell, and . Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N.Engl.J.Med.* 314 (12):729-735, 1986.
294. Storek J., S. Ferrara, N. Ku, J. V. Giorgi, R. E. Champlin, and A. Saxon. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant.* 12 (4):387-398, 1993.
295. Sun C., M. A. Williams, and M. J. Bevan. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat.Immunol.* 5 (9):927-933, 2004.
296. Sun, R. L. Burton, and K. G. Lucas. Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures. *Blood* 99 (9):3302-3309, 2002.
297. Sun, R. Burton, V. Reddy, and K. G. Lucas. Safety of allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for patients with refractory EBV-related lymphoma. *Br.J.Haematol.* 118 (3):799-808, 2002.
298. Takemoto Y., H. Takatsuka, H. Wada, A. Mori, K. Saheki, M. Okada, S. Tamura, Y. Fujimori, T. Okamoto, E. Kakishita, and A. Kanamaru. Evaluation of CMV/human herpes virus-6 positivity in bronchoalveolar lavage fluids as early detection of acute GVHD following BMT: evidence of a significant relationship. *Bone Marrow Transplant.* 26 (1):77-81, 2000.
299. Tang, M. Olive, R. Pulmanusahakul, M. Schnell, N. Flomenberg, L. Eisenlohr, and P. Flomenberg. Human CD8+ cytotoxic T cell responses to adenovirus capsid proteins. *Virology* 350 (2):312-322, 2006.
300. Tomasec, E. C. Wang, V. Groh, T. Spies, B. P. McSharry, R. J. Aicheler, R. J. Stanton, and G. W. Wilkinson. Adenovirus vector delivery stimulates natural killer cell recognition. *J.Gen.Virol.* 88 (Pt 4):1103-1108, 2007.
301. Toubert A. and D. Charron. Immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: gaining experience without losing naivety. *Hum.Immunol.* 62 (5):500-503, 2001.
302. Touitou, H. Arbach, C. Cochet, J. Feuillard, A. Martin, M. Raphael, and I. Joab. Heterogeneous Epstein-Barr virus latent gene expression in AIDS-associated lymphomas and in type I Burkitt's lymphoma cell lines. *J.Gen.Virol.* 84 (Pt 4):949-957, 2003.
303. Tramsen, U. Koehl, T. Tonn, J. P. Latge, F. R. Schuster, A. Borkhardt, L. Uharek, R. Quaritsch, O. Beck, E. Seifried, T. Klingebiel, and T. Lehrnbecher. Clinical-scale generation of human anti-Aspergillus T cells for adoptive immunotherapy. *Bone Marrow Transplant.* 43 (1):13-19, 2009.

304. Trenado, S. Fisson, E. Braunberger, D. Klatzmann, B. L. Salomon, and J. L. Cohen. Ex vivo selection of recipient-type alloantigen-specific CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells for the control of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 77 (1 Suppl):S32-S34, 2004.
305. Uchida J., T. Yasui, Y. Takaoka-Shichijo, M. Muraoka, W. Kulwichit, N. Raab-Traub, and H. Kikutani. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286 (5438):300-303, 1999.
306. van Esser J. W., Holt B. van der, E. Meijer, H. G. Niesters, R. Trenscheel, S. F. Thijsen, A. M. van Loon, F. Frassoni, A. Bacigalupo, U. W. Schaefer, A. D. Osterhaus, J. W. Gratama, B. Lowenberg, L. F. Verdonck, and J. J. Cornelissen. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation (SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell--depleted SCT. *Blood* 98 (4):972-978, 2001.
307. van Esser J. W., H. G. Niesters, Holt B. van der, E. Meijer, A. D. Osterhaus, J. W. Gratama, L. F. Verdonck, B. Lowenberg, and J. J. Cornelissen. Prevention of Epstein-Barr virus-lymphoproliferative disease by molecular monitoring and preemptive rituximab in high-risk patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 99 (12):4364-4369, 2002.
308. van Tol J., E. C. Claas, B. Heemskerk, L. A. Veltrop-Duits, C. S. de Brouwer, T. van Vreeswijk, C. C. Sombroek, A. C. Kroes, M. F. Beersma, E. P. de Klerk, R. M. Egeler, A. C. Lankester, and M. W. Schilham. Adenovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation: diagnosis, treatment and immunity. *Bone Marrow Transplant.* 35 Suppl 1:S73-S76, 2005.
309. van Tol J., A. C. Kroes, J. Schinkel, W. Dinkelaar, E. C. Claas, Jol-van der Zijde CM, and J. M. Vossen. Adenovirus infection in paediatric stem cell transplant recipients: increased risk in young children with a delayed immune recovery. *Bone Marrow Transplant.* 36 (1):39-50, 2005.
310. Venard V., A. Carret, D. Corsaro, P. Bordigoni, and A. Le Faou. Genotyping of adenoviruses isolated in an outbreak in a bone marrow transplant unit shows that diverse strains are involved. *J.Hosp.Infect.* 44 (1):71-74, 2000.
311. Via S., J. D. Shanley, B. R. Weatherly, P. Lang, and G. M. Shearer. Altered threshold for the induction of graft-versus-host immunodeficiency following murine cytomegalovirus infection. Host and donor contributions. *Transplantation* 46 (2):298-302, 1988.
312. Vinzio S., B. Lioure, F. Grunenberger, J. L. Schlienger, and B. Goichot. [Auto-immune-like disease post-bone marrow transplantation]. *Rev.Med.Interne* 25 (7):514-523, 2004.
313. Walls T., A. G. Shankar, and D. Shingadia. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect.Dis.* 3 (2):79-86, 2003.
314. Walsh M.P., A. Chintakuntlawar, C. M. Robinson, I. Madisch, B. Harrach, N. R. Hudson, D. Schnurr, A. Heim, J. Chodosh, D. Seto, and M. S. Jones. Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel

- human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. *PLoS.One.* 4 (6):e5635, 2009.
315. Walter, P. D. Greenberg, M. J. Gilbert, R. J. Finch, K. S. Watanabe, E. D. Thomas, and S. R. Riddell. 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 (16):1038-1044, 1995.
 316. Wang, K. Yao, Q. Z. Yin, F. Zhou, C. L. Ding, G. Y. Peng, J. Xu, Y. Chen, D. J. Feng, C. L. Ma, and W. R. Xu. Human herpesvirus-6-specific interleukin 10-producing CD4+ T cells suppress the CD4+ T-cell response in infected individuals. *Microbiol.Immunol.* 50 (10):787-803, 2006.
 317. Wang L. R., L. J. Dong, M. J. Zhang, and D. P. Lu. Correlations of human herpesvirus 6B and CMV infection with acute GVHD in recipients of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 42 (10):673-677, 2008.
 318. Wasserman, C. S. August, and S. A. Plotkin. Viral infections in pediatric bone marrow transplant patients. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 7 (2):109-115, 1988.
 319. Weiden L., K. M. Sullivan, N. Flournoy, R. Storb, and E. D. Thomas. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N.Engl.J.Med.* 304 (25):1529-1533, 1981.
 320. Weinberg K., B. R. Blazar, J. E. Wagner, E. Agura, B. J. Hill, M. Smogorzewska, R. A. Koup, M. R. Betts, R. H. Collins, and D. C. Douek. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 97 (5):1458-1466, 2001.
 321. Weisdorf P.L., R. Hakke, B. Blazar, W. Miller, P. McGlave, N. Ramsay, J. Kersey, and A. Filipovich. Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. *Transplantation* 51 (6):1197-1203, 1991.
 322. Welton R., L. E. Gralinski, and K. R. Spindler. Mouse adenovirus type 1 infection of natural killer cell-deficient mice. *Virology* 373 (1):163-170, 2008.
 323. Wilkie M., C. Taylor, M. M. Jones, D. M. Burns, M. Turner, D. Kilpatrick, P. L. Amlot, D. H. Crawford, and T. Haque. Establishment and characterization of a bank of cytotoxic T lymphocytes for immunotherapy of epstein-barr virus-associated diseases. *J.Immunother.* 27 (4):309-316, 2004.
 324. Williams K. M., F. T. Hakim, and R. E. Gress. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin.Immunol.* 19 (5):318-330, 2007.
 325. Woodberry, T. J. Suscovich, L. M. Henry, J. K. Davis, N. Frahm, B. D. Walker, D. T. Scadden, F. Wang, and C. Brander. Differential targeting and shifts in the immunodominance of Epstein-Barr virus--specific CD8 and CD4 T cell responses during acute and persistent infection. *J.Infect.Dis.* 192 (9):1513-1524, 2005.
 326. Wrzesinski, C. M. Paulos, L. Gattinoni, D. C. Palmer, A. Kaiser, Z. Yu, S. A. Rosenberg, and N. P. Restifo. Hematopoietic stem cells promote the expansion and function of adoptively transferred antitumor CD8 T cells. *J.Clin.Invest* 117 (2):492-501, 2007.

327. Young S. and A. B. Rickinson. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat.Rev.Cancer* 4 (10):757-768, 2004.
328. Yusuf, G. A. Hale, J. Carr, Z. Gu, E. Benaim, P. Woodard, K. A. Kasow, E. M. Horwitz, W. Leung, D. K. Srivastava, R. Handgretinger, and R. T. Hayden. Cidofovir for the treatment of adenoviral infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Transplantation* 81 (10):1398-1404, 2006.
329. Zaia, J. G. Sissons, S. Riddell, D. J. Diamond, M. R. Wills, A. J. Carmichael, M. P. Weekes, M. Gandhi, C. La Rosa, M. Villacres, S. Lacey, S. Markel, and J. Sun. Status of Cytomegalovirus Prevention and Treatment in 2000. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*:339-355, 2000.

ANNEXES

Article 3:

Natural-killer cell amplification for adoptive leukaemia relapse immunotherapy: Comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression

DECOT V, VOILLARD L, LATGER-CANNARD V, AÏSSI-ROTHÉ L, PERRIER P, STOLTZ JF, BENSOUSSAN D.

Exp Hematol. 2010 May; 38:351-62.

L'objectif de cette étude est d'isoler et d'amplifier des cellules Natural Killer (NK) en utilisant des conditions de culture adaptées pour permettre à long terme la réinjection à des patients en rechute après allogreffe de CSH, réalisée afin de traiter une hémopathie maligne. Ces injections de cellules NK seront proposées après validation de la technique de sélection et d'amplification, en alternative à la réinjection de lymphocytes du donneur, couramment utilisée dans cette indication mais présentant l'inconvénient de déclencher ou d'amplifier la réaction du greffon contre l'hôte.

Nous avons réalisé des cultures de cellules NK isolées à partir de sang périphérique par sélection immunomagnétique (technique basée sur la déplétion en cellules CD3+ et CD19+) et comparé différentes cytokines pour l'amplification. Les cellules isolées ont été amplifiées pendant 13 jours en présence d'IL7, IL2 et IL15 à différentes doses (2, 10 et 50 ng/ml). Un phénotypage portant sur l'expression du CD56, des récepteurs NKG2D, KIR2DL1 et KIR 2DL2 a été réalisé pour suivre l'amplification des cellules NK tout au long de la culture. Un contrôle de cytotoxicité envers les cellules cibles K562 et les blastes PHA HLA différents a été réalisé en début et en fin de culture (technique basée sur l'utilisation du chrome 51).

Les résultats ont montré qu'une dose de 10 ng/ml d'IL2 ou de 50 ng/ml d'IL15 permet de multiplier le nombre de cellules NK par 22 et 19 respectivement. L'expression des récepteurs NKG2D, KIR2DL1 et KIR 2DL2 a été respectivement multipliée par 5, 4 et 4,7 en présence de 10 ng/ml d'IL2. En présence de 50 ng/ml d'IL15, elle a été multipliée par 4,6, 3,3 et 2,9

pour les 3 récepteurs étudiés. La cytotoxicité des cellules NK obtenue en fin de culture est plus importante que celle mesurée en début de culture (multipliée par 5 en présence de 10 ng/ml d'IL2 et multipliée par 9 avec 50 ng/ml d'IL15 au rapport 1,25:1), démontrant que les cellules ont conservé leur fonctionnalité. Aucune amplification n'a été observée en fin de culture en présence d'IL7 quelque soit la concentration utilisée.

Cette étude a permis de sélectionner la concentration optimale de 50 ng/ml d'IL15 pour l'amplification des cellules NK.

Au cours de ma thèse j'ai acquis une très bonne connaissance du test de cytotoxicité, ce qui m'a permis de participer à cette étude.



ELSEVIER

Experimental Hematology 2010; ■: ■-■

Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: Comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression

Véronique Decot^{a,b}, Laure Voillard^a, Véronique Latger-Cannard^c,
Lamia Aissi-Rothé^{a,b}, Pascale Perrier^d, Jean Francois Stoltz^{a,b}, and Daniele Bensoussan^{a,b}

^aUnité de Thérapie Cellulaire et Tissus, CHU Nancy, Nancy, France; ^bNancy Université, UHP-UMR CNRS 7561, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, Nancy, France; ^cService d'Hématologie Biologique, CHU de Nancy, Nancy, France; ^dService d'Histocompatibilité, CHU Nancy, Nancy, France

(Received 8 July 2009; revised 18 December 2009; accepted 9 February 2010)

Objective. Natural killer (NK) cells are a lymphocyte subset that, in a hematopoietic stem cell transplantation setting, mediates a graft-vs-leukemia effect without any graft-vs-host disease. We aimed to evaluate an isolation method that can be used with Good Manufacturing Practices—grade reagents and to compare three cytokines for expansion in order to design future clinical protocols based on donor NK-cell infusions to cure relapse after allograft.

Materials and Methods. NK cells were enriched using a CD3/CD19 depletion method and expanded for 13 days in the presence of 2, 10, and 50 ng/mL interleukin (IL)-2, IL-15, or IL-7. NK-cell cytotoxicity was evaluated after isolation and culture. Expression of NKG2D, KIR2DL2, and KIR2DL1 was monitored during expansion.

Results. Highly T- and B-cell—depleted NK cells were obtained and enriched 2.6-fold. The optimal cytokine concentration for expansion was 10 ng/mL for IL-2 or 50 ng/mL for IL-15. NK-cell cytotoxicity was significantly improved after an overnight incubation with 10 or 50 ng/mL IL-2 or with 2, 10, or 50 ng/mL IL-15, and after 13 days with 50 ng/mL IL-15. The use of a combination of IL-2 and IL-15 showed no additional benefit and negative results were obtained with IL-7. The three NK cell receptors were significantly upregulated after culture, mainly with IL-2 or IL-15.

Conclusion. In our study, 10 ng/mL IL-2 or 50 ng/mL IL-15 were the optimal concentrations for expansion and were equivalent in significantly enhancing cytotoxicity and modifying NK-cell receptor expression patterns. © 2010 ISEH - Society for Hematology and Stem Cells. Published by Elsevier Inc.

Allogeneic stem cell transplantation is a well-recognized strategy for treatment of hematological malignancies. Patients are treated by intensive chemotherapy and/or irradiation, which destroy malignant cells. A stem cell allograft results in development of normal hematopoiesis and reconstitution of an active donor-derived immune system within the recipient. When directed against residual tumor cells, this alloreactivity can provide immunologic control or disease eradication. This beneficial graft-vs-leukemia (GvL) effect was first observed in a murine model of hematopoietic stem cell transplantation [1]. The GvL effect was next confirmed by the efficacy of donor lymphocyte injection,

first observed in patients with relapsed chronic myelogenous leukemia after allograft and showing a high rate of complete remission after treatment [2]. However, this alloreactivity is not restricted to tumor cells, because when directed against healthy recipient tissues, it is responsible for the clinical symptoms of graft-vs-host disease (GvHD), the main complication of allogeneic stem cell transplantation. In order to reduce the mortality or morbidity caused by GvHD, methods to increase GvL while suppressing GvHD are required. The different approaches under investigation in humans include use of minor histocompatibility antigen—specific cytotoxic T-lymphocytes infusion [3,4], vaccination of the donor or recipient with minor histocompatibility antigen peptides, modified donor lymphocyte injection, or adoptive transfer of NK cells.

Offprint requests to: Véronique Decot, Ph.D., Cell Therapy and Tissue Unit, CHU Nancy, allée du Morvan, 54511 Vandoeuvre les Nancy, France; E-mail: v.decot@chu-nancy.fr

NK cells are bone marrow–derived lymphocytes that recognize and kill virally infected cells and transformed malignant cells [5,6]. During allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, NK cells have been implicated in the suppression of GvHD, the promotion of bone marrow engraftment, and mediation of a GvL effect [7]. It has been shown that NK cells are regulated by the balance between activating and inhibitory signals. Receptors mediating inhibitory signals are called inhibitory killer immunoglobulin (Ig)-like receptors (KIR), many of which are known to recognize human leukocyte antigen (HLA) class I molecules. In transplantations between HLA-nonidentical donors and recipients, recipient target cells lacking the appropriate HLA class I ligand are recognized by donor NK-cell inhibitory KIR [8]. Upon interaction with target cells, NK cells lower their activation threshold, particularly if target cells express additional activating NK receptor ligands. Once activated, NK cells are then able to kill recipient leukemic cells. Other studies suggested that this can also occur in HLA-identical sibling transplantation [9,10]. These antileukemic effects lead to lower rates of relapse, graft failure, or GvHD and to a higher overall survival in patients with myeloid leukemia. Taken together, all these effects mediated by NK cells indicate their possible use for adoptive immunotherapeutic strategies [11].

To provide a greater number of NK cells for future adoptive immunotherapy, we described in this study a method useful for clinical-scale isolation of highly T-cell–depleted NK cells and compared three cytokines, interleukin (IL)-2, IL-15, and IL-7, for NK-cell expansion. Currently, IL-2, IL-15, and IL-7 can stimulate cellular activation, proliferation, or survival by binding to multimeric receptors that share the common γ -chain and are expressed on NK cells [12,13]. Furthermore, some reports have shown that these cytokines are involved in NK differentiation. Our results showed that a CD3/CD19 depletion is effective to obtain highly T- and B-cell–depleted NK cells. In our test, NK-cell expansion was observed in the presence of IL-2 or IL-15 only. NK-cell cytotoxicity was significantly enhanced after culture in presence of IL-15. The NK-cell receptor expression pattern was significantly modified after culture, suggesting that cytokine signaling plays a critical role in NK-cell receptor acquisition.

Materials and methods

Peripheral blood samples (250 mL) were obtained from eight healthy donors who gave informed consent for blood collection and biological studies. Each experiment was performed in triplicate on three different blood samples.

NK-cell enrichment

Peripheral blood mononuclear cells were obtained by sedimentation on a mononuclear cell separation medium (PAA Laboratories, Etobicoke, Canada). Peripheral blood mononuclear cells recovered from the interface were washed twice with 199 medium

(15 minutes, 600g) and were resuspended in magnetic-activated cell sorting buffer and were counted using a hemocytometer. The cell suspension was incubated with anti-CD3 and anti-CD19 magnetic particles for 15 minutes at 4°C using 20 μ L for 10^7 cells. At the end of the incubation, cells were washed once and passed through a LD magnetic-activated cell sorting separation column (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Unbound cells containing NK cells were washed out with five aliquots of 2 mL separation buffer. The positive fraction containing T and B cells was eluted with the separation buffer after removing the column from the magnetic field. T and B cells were used as feeder cells after 30 Gy irradiation.

Expansion of NK cells

Isolated NK cells (5×10^4 /mL) were suspended in X-vivo-15 media (Lonza, Walkersville, MD, USA) in presence of irradiated feeder cells (5×10^6 /mL), 10% fetal bovine serum (Gibco-Invitrogen, Paisley, UK), 2 mM glutamine (Eurobio, Courtaboeuf, France), 1 μ g/mL streptomycin, 1 U/mL penicillin, 0.025 μ g/mL amphotericin B, and 2 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL carrier-free IL-2 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) or Good Manufacturing Practices (GMP)–like IL-15 or IL-7 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) at 37°C, 5% CO₂. The cytokine was added to the culture every day, the medium was changed every 2 to 4 days, and the concentration of the cells adjusted to 1×10^6 /mL.

Total cell numbers were assessed by staining cells with Trypan blue dye (Sigma, St Louis, MO, USA) on days 2, 6, 9, and 13. The absolute count of each population was determined by using the following formula: Absolute count = % of specific subsets determined by flow cytometry \times total number of cells.

Cytotoxicity assay

Cytolytic activity of NK cells was tested in a 4-hour ⁵¹Chromium (⁵¹Cr) release assay after each separation and after 13 days of culture in presence of each cytokine. The K562 cell line (major histocompatibility complex class I–negative erythroleukemia cell line) or phytohemagglutinin (PHA) blasts were used as target. The K562 cell line was cultured in RPMI-1640 medium 20% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 1 μ g/mL streptomycin, 1 U/mL penicillin, 0.025 μ g/mL amphotericin B at 37°C, 5% CO₂. Briefly, the blasts were cultured in presence of 5 μ g/mL PHA. After 3 days, 100 μ g/mL IL-2 was added to the culture medium. The cells were used as target in a cytotoxicity assay after 5 days of culture.

Target cells were incubated with ⁵¹Cr for 1 hour at 37°C (50 μ Ci/ 10^6 cells) and then washed twice with complete medium. Target cells were placed in 96-well round-bottom plates with 1.10^4 cells per well. Effector cells were incubated 20 hours at 37°C with 2 ng/mL, 10 ng/mL, and 50 ng/mL cytokine or without cytokine. Effector cells were added after incubation to target cells at ratios 20:1, 10:1, 5:1, 2.5:1 in triplicate. After 4 hours incubation at 37°C, 5% CO₂, plates were centrifuged (200g, 5 minutes) and 30 μ L supernatant removed from each well and counted in a γ -counter (Top Count, Perkin Elmer, Ontario, Canada). The percentage of ⁵¹Cr release was calculated according to the following formula:

$$\begin{aligned} \% \text{ of specific lysis} &= (\text{experimental release} \\ &\quad - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} \\ &\quad - \text{spontaneous release}) \times 100. \end{aligned}$$

Experimental release is the mean cpm release in the presence of effector cells, spontaneous release is the mean cpm spontaneously released by target cells incubated with medium alone and maximum release is the cpm release of 100 μ L target cells lysed with 0.1% Triton \times 100.

HLA typing

To observe NK-cell alloreactivity, a mismatch in HLA haplotype should be observed between effector and target cells. Therefore, HLA typing was performed on effector and target cells to determine their HLA-C allele group. An NK-cell cytotoxicity should be observed if the effector expressed an HLA-C allele group different from the target HLA-C allele group.

A low-resolution HLA-C typing HLA typing was performed using polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide Luminex (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA) and a high resolution HLA-C typing was added when necessary using polymerase chain reaction sequence-specific primers amplification kits (Olerup SSP; Genovision, Saltsjöbaden, Sweden).

Flow cytometry

Samples for flow cytometric analysis were taken before and after separation and every 2 to 4 days during the cell culture. All incubations were performed at room temperature for 15 minutes with cells resuspended in phosphate-buffered saline containing 0.5% human serum albumin with 10 μ L antibodies and cells were washed twice with phosphate-buffered saline after staining. Cells (5×10^5) were stained with anti-CD3 fluorescein isothiocyanates (FITC), anti-CD19 FITC, anti-CD14 FITC, CD16-phycoerythrin (all from Beckman Coulter, Roissy, France), and CD56-allophycocyanin (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) to monitor the percentage of T cells, B cells, monocytes, and NK cells. Phycoerythrin-conjugated anti-NKG2D, anti-KIR 2DL1/DS1, anti-KIR 2DL2/2DL3, IgG1, and Ig2a isotype control were obtained from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). The viability dye 7-aminoactinomycin D was added to the samples 15 minutes before acquisition to determine NK-cell viability.

Samples were analyzed using FACScalibur (Becton Dickinson) and CellQuest analysis software (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ, USA), setting appropriate forward scatter/side scatter gate around the 7-aminoactinomycin D-negative mononuclear cell population. From the lymphocyte population, NK cells were gated as CD16⁺/CD56⁺. Mean fluorescence intensity values for NKG2D, KIR 2DL1, and KIR 2DL2 were determined on the CD16⁺/CD56⁺ population after separation and every 2 to 4 days of culture.

Cytofluorimetric analyses were also used for detection of apoptosis and cell death of the feeder cells before irradiation, after irradiation, and after 3 days in culture. The cells (1×10^5) were incubated 15 minutes at room temperature in the dark with 5 μ L Annexin-V FITC and 5 μ L with propidium iodide (PI; Becton Dickinson) in the binding buffer (0.1 M HEPES/NaOH, 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂). The cells that are viable are Annexin-V FITC-negative and PI-negative, cells that are in early apoptosis are Annexin-V FITC-positive and PI-negative and cells that are in late apoptosis or already dead are both Annexin-V FITC-positive and PI-positive.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Student's paired *t* test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Purity and recovery of NK cells

A total of 12 immunomagnetic separations were performed. The characteristics of these are shown in Figure 1A. Starting with a mean number of 249×10^6 mononuclear cells with $8.09\% \pm 3.2\%$ NK cells, a mean number of $94.6 \times 10^6 \pm 22.6$ cells with $20.94\% \pm 11.4\%$ NK cells was obtained after T- and B-cell depletion, with a mean recovery of NK cells of $80.3\% \pm 18.26\%$. The contaminating population after depletion was mainly monocytes, which were enriched from $14\% \pm 3.7\%$ before depletion to $26.38\% \pm 11.1\%$ after separation. The T- and B-cell percentages after depletion were $0.37\% \pm 0.6\%$ and $0.09\% \pm 0.2\%$, respectively. Representative data of the CD3/CD19 depletion method are shown in Figure 1B.

Expansion of NK cells

We first tested the effect of irradiation on feeder cells. As shown in Figure 2A, 30% of irradiated feeder cells were apoptotic immediately after irradiation. After 3 days of culture, 30% of feeder cells were necrotic and 6% were apoptotic. To determine which cytokine allowed expansion of NK cells, the effect of three doses of IL-2, IL-15, and IL-7 on NK-cell proliferation was compared.

For IL-2, the cell number started to increase from day 6, with the maximum proliferation of NK cells observed at day 13. The maximum proliferation was obtained with 10 ng/mL IL-2 as an average of 23.04 ± 9.3 -fold increase in cell number was observed (Fig. 2B). The difference between 10 and 50 ng/mL IL-2 was not found significant. Therefore, the dose of 10 ng/mL was chosen to perform the following experiments.

No proliferation of feeder cells was observed during 13 days of culture, as shown by the complete decrease of the T/NK-, B/NK-, and monocyte/NK-cell ratios among the 13 days of culture.

The NK cells cultured with IL-15 showed the same expansion profile as observed with IL-2. However, a marked difference was observed as compared to IL-2 as a maximal NK cell proliferation was obtained with 50 ng/mL IL-15, showing a 21.34 ± 9.6 -fold increase. The difference between 10 and 50 ng/mL IL-15 was found to be significant ($p = 0.03$). With the highest concentration of IL-15, a complete decrease of the T/NK-, B/NK- and monocyte/NK-cell ratios among the 13 days of culture could also be observed (Fig. 2C).

As shown in Figure 2D, no proliferation of NK cells could be observed in the presence of IL-7 at day 13. A slight increase in the number of cells was observed between day 0 and day 2 (mean fold increase between the three doses: 4.07 ± 0.3). Afterward, NK-cell count decreased during the last 11 days of culture, leading to an increase in the different ratios (Fig. 2D, right).

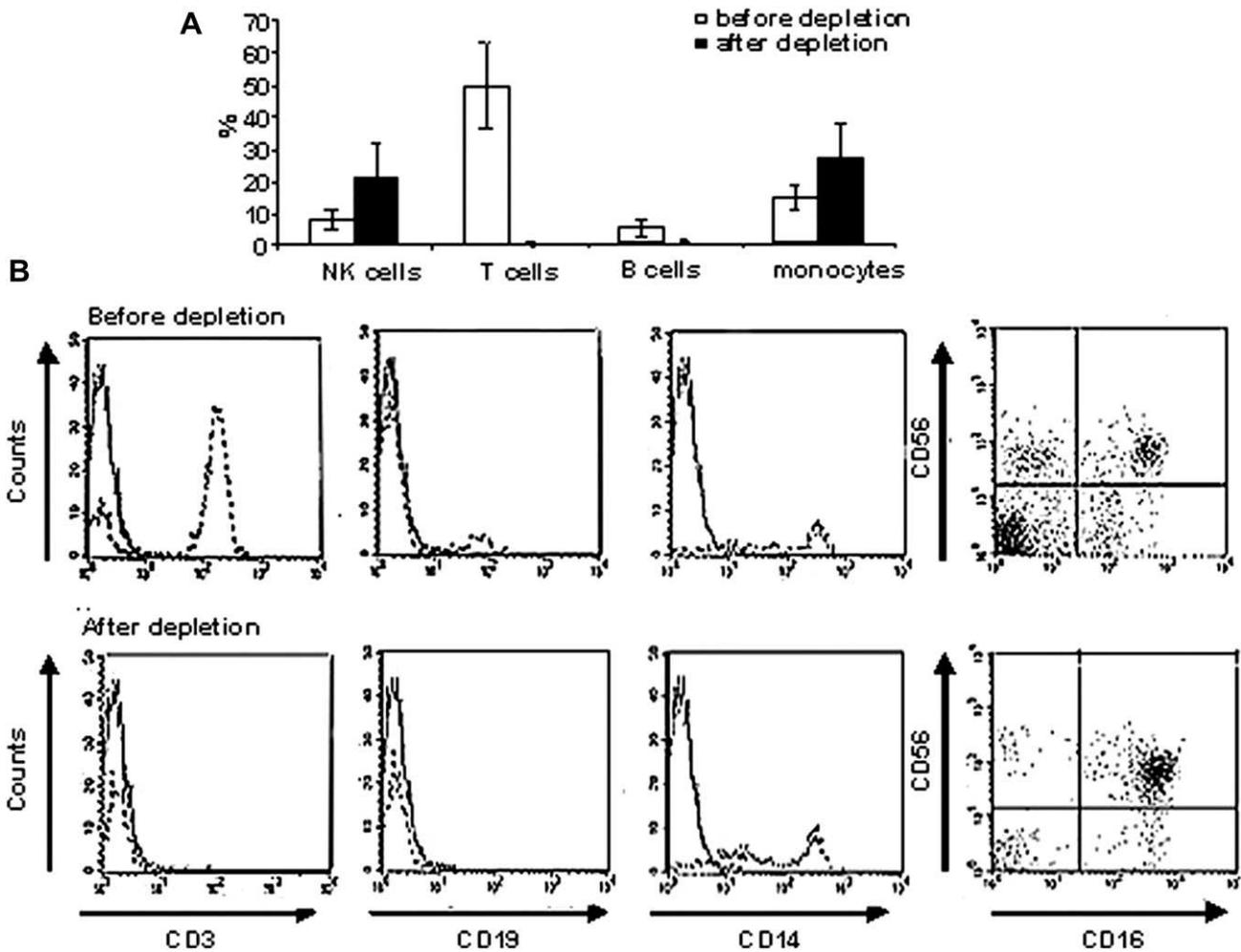


Figure 1. (A) Percentage of natural killer (NK) cells, T cells, B cells, and monocytes measured by flow cytometry before (open bars) and after CD3/CD19 depletion (filled bars). (B) Representative fluorescein-activated cell sorting analysis of a blood sample before and after CD3/CD19 depletion.

We next compared, on the same starting material, the dose of each cytokine leading to the highest number of NK cells after culture. The dose of 10 ng/mL IL-2 was compared to 50 ng/mL IL-15 alone or in combination (Fig. 2E). The increase in cell number was observed from day 6, with the maximum proliferation of NK cells taking place between day 9 and day 13. No feeder cells, B cells, T cells, or monocytes were present at the end of the culture period (Fig. 2E, right). With regard to the NK-cell population, a fold increase of 28.5 ± 8.5 (IL-2), 25 ± 11.8 (IL-15), and 19.1 ± 5 (IL-2 + IL-15) was obtained. Parallel analysis of NK cells cultured in the presence of either IL-2 vs IL-15, IL-2 vs IL-2+IL-15, or IL-15 vs IL-2 + IL-15 revealed no significant differences on cell proliferation ($p = 0.37$; $p = 0.053$; $p = 0.18$, respectively).

NK-cell cytotoxicity

We first evaluated the cytotoxicity of freshly isolated NK cells against K562 cells after an overnight incubation with or without the three concentrations of each cytokine.

In the presence of IL-2, the lysis percentage was increased, ranging from $44\% \pm 6\%$ (2 ng/mL) to $57\% \pm 7\%$ (50 ng/mL) as compared to the basal cytotoxicity of $39\% \pm 6\%$ at 20:1 effector-to-target ratio. The difference was statistically significant between basal cytotoxicity and 10 ng/mL IL-2 ($p = 0.031$) or 50 ng/mL IL-2 ($p = 0.028$) (Fig. 3A, day 1).

For the experiments performed with IL-15, the difference between basal and IL-15-stimulated cell cytotoxicity was statistically significant for each concentration of the cytokine used ($p = 0.039$; $p = 0.029$; $p = 0.029$) (Fig. 3B, day 1). However, the results showed that the concentrations of cytokine used were equivalent at the 20:1 ratio ($p = 0.14$, NS for 2 ng/mL vs 10 ng/mL; $p = 0.29$, NS for 2 ng/mL vs 50 ng/mL; $p = 0.17$ NS, for 10 ng/mL vs 50 ng/mL).

Overnight incubation with the three concentrations of IL-7 showed no improvement in cytotoxicity. No difference was observed between basal cytotoxicity ($51\% \pm 9\%$), and the low ($50\% \pm 9\%$), medium ($50\% \pm 8\%$), or high

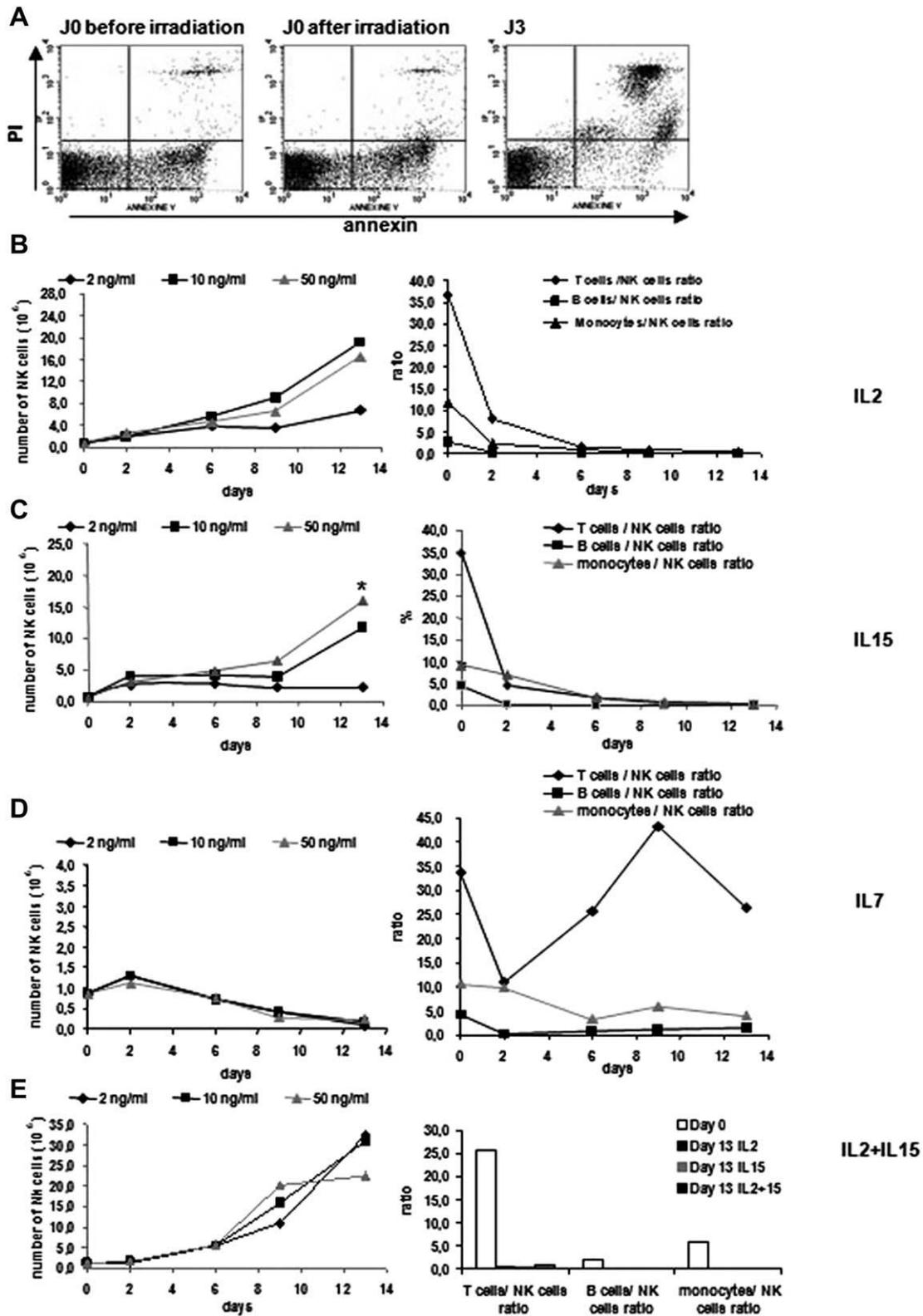


Figure 2. (A) Apoptosis and necrosis of feeder cells before irradiation, after irradiation, and after 3 days. (B) Expansion of natural killer (NK) cells monitored during 13 days of culture in presence of three concentrations of interleukin (IL)-2. Right: Evolution of the T-cell/NK-cell ratio, B-cell/NK-cell ratio, monocytes/NK-cell ratio during culture with 10 ng/mL IL-2. (C) Expansion of NK cells monitored during 13 days of culture in presence of three concentrations of IL-15. Right: Evolution of the T-cell/NK-cell ratio, B-cell/NK-cell ratio, monocytes/NK-cell ratio during culture with 50 ng/mL IL-15. (D) Expansion of NK cells monitored during 13 days of culture in presence of three concentrations of IL-7. Right: evolution of the T-cell/NK-cell ratio, B-cell/NK-cell ratio, monocytes/NK-cell ratio during culture with 50 ng/mL IL-15. (E) Expansion of NK cells in presence of 10 ng/mL IL-2 and/or 50 ng/mL IL-15. Right: Evolution of the T-cell/NK-cell ratio, B-cell/NK-cell ratio, monocytes/NK-cell ratio between day 0 and day 13 in presence of 10 ng/mL IL-2 and/or 50 ng/mL IL-15.

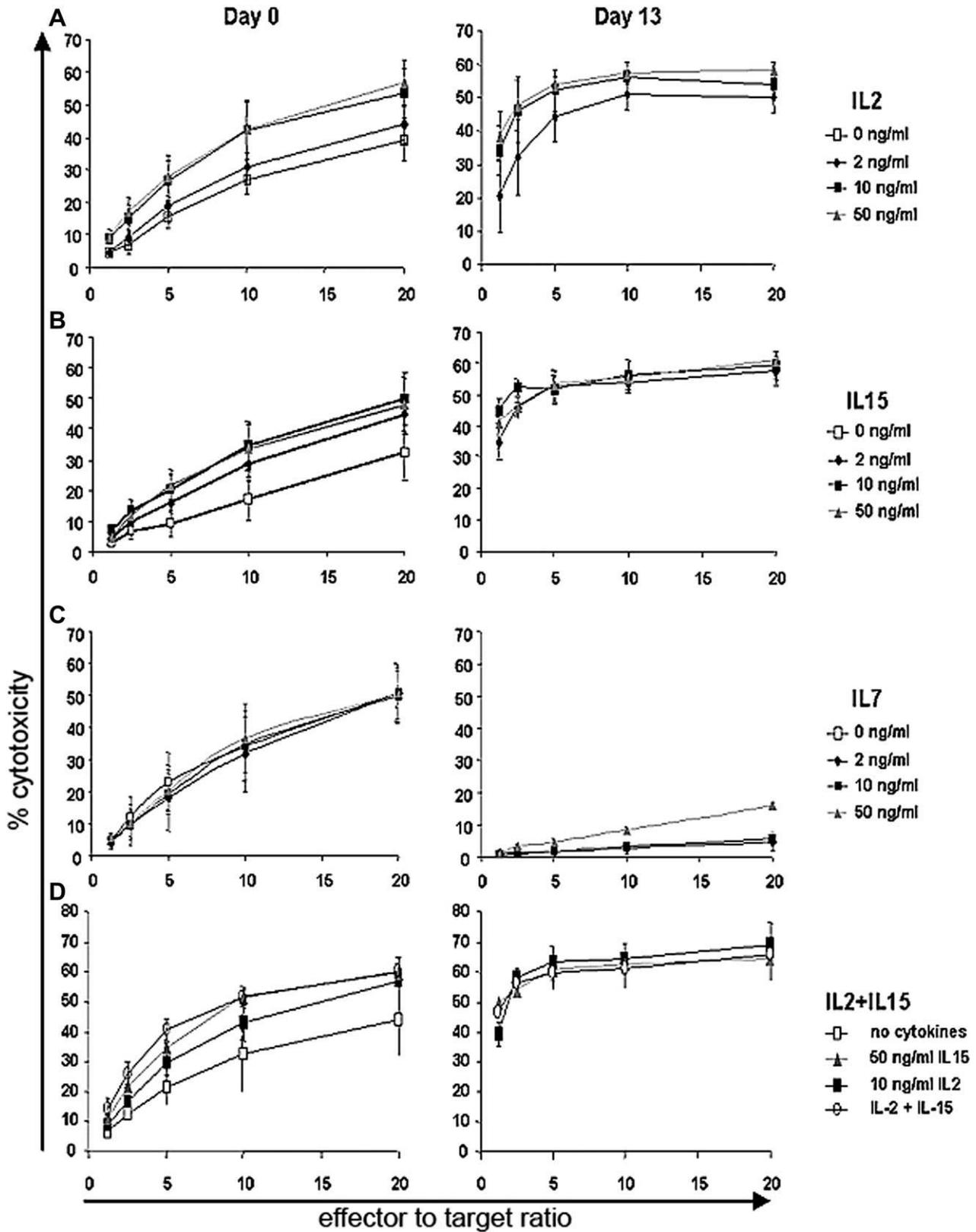


Figure 3. (A) to (C). Percentage of natural killer (NK)-cell cytotoxicity after isolation (day 0) and after culture (day 13) in presence of 2, 10, or 50 ng/mL interleukin (IL)-2, IL-15, or IL-7. (D) Comparison of the effect of 10 ng/mL IL-2 and/or 50 ng/mL IL-15 on NK cell cytotoxicity.

concentration of IL-7 ($51\% \pm 8\%$) at the 20:1 ratio. The same results were observed for the other ratios (Fig. 3C, day 1).

The cytotoxicity against K562 cells was markedly elevated using effector cells from day 13 cultured with IL-2 or IL-15, but not with IL-7 as compared to NK cells after isolation (Fig. 3 A, B, C; day 13). However, the increase in cytotoxicity reached significance only for cells cultured 13 days with IL-15 as compared to cells stimulated overnight after isolation and for each concentration of IL-15 ($p = 0.034$; $p = 0.002$; $p = 0.007$).

We then tested the combination of 10 ng/mL IL-2 and 50 ng/mL IL-15 on NK cell cytotoxicity and compared it to each cytokine alone. After overnight incubation, mean lytic activity observed was $57\% \pm 1\%$, $60\% \pm 3\%$, and $60\% \pm 5\%$ in presence of IL-2, IL-15, and IL-2 + IL-15, respectively, with no significant difference between each culture condition. After 13 days of cytokine stimulation, mean NK-cell cytotoxicity observed was $69\% \pm 7\%$, $65\% \pm 8\%$, and $66\% \pm 9\%$ for IL-2, IL-15, and the combination, respectively. A minor difference was observed between each condition, but this trend did not reach statistical significance ($p = 0.15$ NS for IL-2 vs IL-15; $p = 0.13$ NS for IL-2 vs IL-2 + IL-15; $p = 0.25$ NS for IL-15 vs IL-2 + IL-15).

To provide evidence of cytotoxicity against allogeneic targets, cytotoxicity experiments were performed with NK cells that were frozen after amplification with 10 ng/mL IL-2, 50 ng/mL IL-15, or both. NK cells expressing HLA-Cw6/Cw16 belonging to group 1 and 2 HLA-C allele were thawed, washed with culture medium, and incubated overnight with 10 ng/mL IL-2, 50 ng/mL IL-15, or both. For the cytotoxicity assay, they were incubated in presence of PHA blasts expressing HLA-C 1601/C1402 belonging to group 1 HLA-C allele. After overnight incubation, the cytotoxicity observed was 14%, 12%, and 6% at the 20:1 ratio in presence of IL-2, IL-15, and IL-2 + IL-15, respectively (Fig. 4A). These results may be explained first by the use of

thawed NK cells, which may be less cytotoxic than freshly isolated and amplified NK cells, and second by the use of a target presenting a partial mismatch in HLA-C allele. We confirmed the latter hypothesis by performing a cytotoxicity experiment with NK cells and targets belonging to the same HLA-C allele group. NK cells expressing HLA-Cw06/Cw16 belonging to group 1 and 2 HLA-C allele were incubated with PHA blasts expressing HLA-Cw06/Cw12 belonging to groups 1 and 2 HLA-C alleles. The cytotoxicity observed was 5.5%, 0%, and 0% at the 20:1 ratio in presence of IL-2, IL-15, and IL-2 + IL-15, respectively (Fig. 4B).

Phenotypic analysis

To phenotypically characterize NK cells in the final expansion product compared to NK cells in the starting material, and to determine the influence of the cytokine concentration on receptor expression, a detailed flow cytometric analysis was performed at each change of cell culture medium. For each receptor analyzed, i.e., NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2, mean fluorescent intensity values on receptor-positive subsets of NK cells were taken into account from day 0 to day 13.

For the cells cultured with IL-2, a peak of the three receptors monitored was observed at day 9 (Fig. 5A left, center, right). The expression of the three receptors was significantly increased at day 13, whatever the concentration of IL-2 used (Table 1).

The NK cells cultured in presence of IL-15 showed an upregulation of the three receptors. The maximal expression of NKG2D and KIR2DL2 was seen at day 9 on cells cultured with a medium or high concentration and at day 13 with a low concentration (Fig. 5B, left, right). For KIR2DL1, the expression of the receptor was the highest at the end of the culture time, but was significantly increased in the presence of 50 ng/mL IL-15 only (Fig. 5B, center and Table 1).

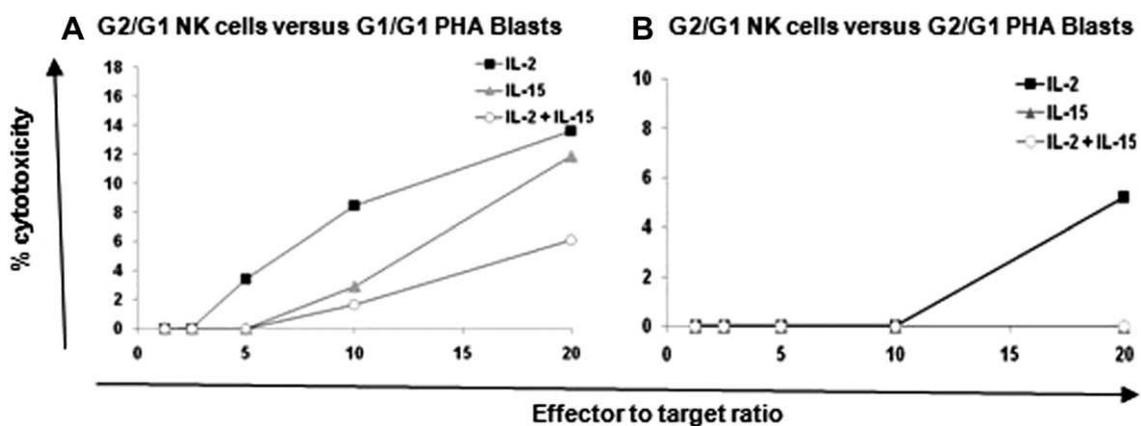


Figure 4. (A) Percentage of human leukocyte antigen (HLA)-C group (G) 1/G2 natural killer (NK) cell cytotoxicity in presence of 10 ng/mL interleukin (IL)-2 and/or 50 ng/mL IL-15 against HLA-C G1/G1 phytohemagglutinin (PHA) blasts. (B) Percentage of HLA-C G1/G2 NK cell cytotoxicity in presence of 10 ng/mL IL-2 and/or 50 ng/mL IL-15 against HLA-C G1/G2 PHA blasts.

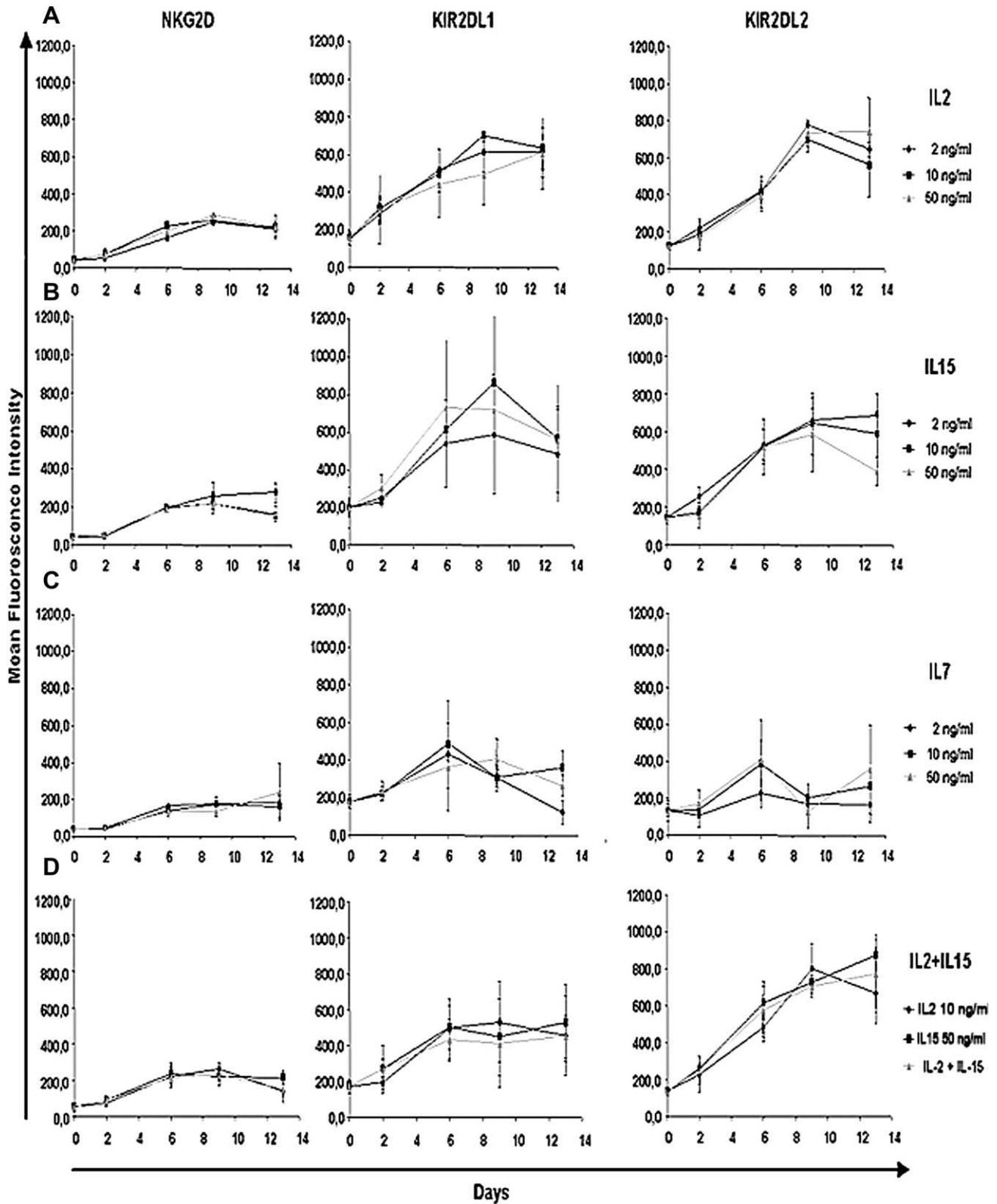


Figure 5. (A) to (C). Changes in the NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 receptor expression patterns after culture with 2, 10, 50 ng/mL interleukin (IL)-2, IL-15 or IL-7. (D) Natural killer (NK) cell phenotype after culture with 10 ng/mL IL-2 and/or 50 ng/mL IL-15.

Table 1. Modification of natural killer cell receptor expression pattern after 13 days of culture in presence of interleukin-2, -15, or -7

Receptors	Day 13/day 0 MFI ratio	SD	p Value
NKG2D			day 13 vs day 0
IL-2 2 ng/mL	5.2	2.4	p = 0.030
IL-2 10 ng/mL	5.2	1.8	p = 0.017
IL-2 50 ng/mL	5	0.9	p = 0.022
KIR2DL1			day 13 vs day 0
IL-2 2 ng/mL	4	0.2	p = 0.014
IL-2 10 ng/mL	4.1	0.1	p = 0.024
IL-2 50 ng/mL	4	0.7	p = 0.029
KIR2DL2			day 13 vs day 0
IL-2 2 ng/mL	5.5	1.3	p = 0.005
IL-2 10 ng/mL	4.7	0.4	p = 0.005
IL-2 50 ng/mL	6.3	1.3	p = 0.009
NKG2D			day 13 vs day 0
IL-15 2 ng/mL	6.7	0.2	p = 0.007
IL-15 10 ng/mL	4	0.9	p = 0.005
IL-15 50 ng/mL	4.6	1.9	p = 0.049
KIR2DL1			day 13 vs day 0
IL-15 2 ng/mL	2.5	0.2	NS
IL-15 10 ng/mL	3	0.9	NS
IL-15 50 ng/mL	3.3	0.7	p = 0.005
KIR2DL2			day 13 vs day 0
IL-15 2 ng/mL	5.1	1.8	p = 0.02
IL-15 10 ng/mL	4.4	1.8	p = 0.03
IL-15 50 ng/mL	2.9	1.1	p = 0.04
NKG2D			day 13 vs day 0
IL-7 2 ng/mL	4.6	0.9	p = 0.03
IL-7 10 ng/mL	4	1.1	p = 0.047
IL-7 50 ng/mL	5.7	3.7	NS
KIR2DL1			day 13 vs day 0
IL-7 2 ng/mL	0.8	1.1	NS
IL-7 10 ng/mL	2	0.7	NS
IL-7 50 ng/mL	1.6	0.9	NS
KIR2DL2			day 13 vs day 0
IL-7 2 ng/mL	1.4	0.7	NS
IL-7 10 ng/mL	3.2	3.4	NS
IL-7 50 ng/mL	5.7	8.2	NS
NKG2D			
IL-2 10 ng/mL	4.2	1.9	IL-2 vs IL-15 NS
IL-15 50 ng/mL	5.6	2	IL-15 vs IL-2 + 15 NS
IL-2 + 15	3.7	1.8	IL-2 vs IL-2 + IL-15 NS
KIR2DL1			
IL-2 10 ng/mL	4.8	0.8	IL-2 vs IL-15 NS
IL-15 50 ng/mL	6.5	1.7	IL-15 vs IL-2 + 15 NS
IL-2 + 15	5.9	1.8	IL-2 vs IL-2 + IL-15 NS
KIR2DL2			
IL-2 10 ng/mL	3	1	IL-2 vs IL-15 NS
IL-15 50 ng/mL	3.6	1	IL-15 vs IL-2 + 15 NS
IL-2 + 15	3.2	1.8	IL-2 vs IL-2 + IL-15 NS

IL = interleukin; KIR = killer immunoglobulin (Ig)-like receptors; MFI = mean fluorescent intensity; NS = nonsignificant.

Cells cultured with IL-7 showed a significant increase in NKG2D expression in the presence of the low or medium concentration used (Fig. 5C, left). No significant modification of the expression of KIR2DL2 and KIR2DL1 was observed in the presence of IL-7 at the end of the culture (Fig. 5C, center and right, Table 1).

We next compared the expression of the three receptors on cells cultured with IL-2 and/or IL-15 and observed an upregulation of each receptor, but no significant difference

between each culture condition (Table 1). Thus, for NKG2D, the receptor expression reached a peak at day 6 in the presence of IL-15 alone or in combination, and at day 9 in presence of IL-2 alone (Fig. 5D left) (Fig. 5D, center). For KIR2DL2, the highest upregulation of the receptor was seen at day 13 in presence of IL-15 or in presence of the combination (Fig. 5D right). In presence of IL-2 alone, the highest expression of the receptor was observed earlier at day 9. From KIR2DL1, the expression of the

receptor reached a plateau from day 6 to day 13, whatever the cytokine used for expansion (Fig. 5D, center).

Taken together, these results showed that the three receptors studied were significantly upregulated after 13 days of culture with IL-2 or IL-15 as compared to the basal expression of the three receptors. The comparison of the three concentrations tested showed no significant difference between them. When compared on the same starting material, no significant difference in receptor expression was observed between the cells cultured with 10 ng/mL IL-2, 50 ng/mL IL-15 or with the combination.

Discussion

Convincing evidence has been provided by a large number of studies showing the possible use of immune cells for adoptive immunotherapies. Such therapeutic strategies were first developed by the use of donor lymphocyte infusion to treat leukemic relapses and rapidly followed by the use of targeted lymphocyte subpopulations, such as lymphokine-activated killers combined with a high-dose IL-2 as described in the pioneering work of Rosenberg et al. [14]. One of the main hurdles involved in developing adoptive transfer of immune cells is to define GMP-compliant methods to isolate defined subsets that guarantee the safety of the injection to patients [15].

In this study, we focused our interest on NK cells, a particular lymphocyte subset that was shown to mediate GvL effects after allogeneic stem cell transplantation [16]. Our aim was to develop a method for NK-cell isolation and expansion that can be used with GMP-compliant reagents. We described an immunomagnetic technique based on CD3- and CD19-positive cell depletion and showed that this method provided efficient T- and B-cell depletion. Currently, T-cell depletion is a *sine qua non* condition to avoid development of a GvH disease in the event of NK-cell injection to patients, and B-cell depletion is important to avoid Epstein Barr Virus reactivation, leading to lymphoproliferative disease in immunosuppressed patients [17]. Furthermore, this method has three additional advantages. First, the isolated NK cells have neither beads nor antibodies used for selection on their surface in comparison with another NK-selection method based on CD3-positive cell depletion followed by CD56-positive cell enrichment [18]. Second, monocytes are conserved and, in the event of an immediate infusion of the selected product to allografted patients, these cells are able to accelerate immune reconstitution. Third, this method can be undertaken on the negative fraction obtained after CD34-positive selection of allograft, usually performed to isolate stem cells from an haploidentical donor and avoiding the need for additional leukapheresis to isolate donor NK cells. Another important point to take to consider is that CD3 and CD19 clinical-grade reagents already exist and are used in clinical trials to enrich CD34-positive cells [19].

We next wanted to set culture conditions to expand NK cells to provide greater numbers of cells to be used for adoptive therapy. To this aim, three doses of three GMP-like cytokines (manufactured with animal component-free process), IL-2, IL-15, and IL-7 were compared and the parameters analyzed were NK-cell expansion after the culture period, phenotype, and cytotoxicity before and after culture. Our results showed that maximal expansion of effector cells was obtained in presence of 10 ng/mL IL-2 or 50 ng/mL IL-15, but the expansion failed in the presence of IL-7. In another set of experiments performed on the same starting material, IL-2- and/or IL-15-induced proliferation was compared. No significant difference was observed on NK-cell expansion after culture with the two cytokines, alone or in combination. In this culture model, feeder cells and cytokines were necessary to obtain NK-cell amplification because no expansion was observed in the presence of cytokines alone or feeder cells alone (data not shown), and cells were cultivated not more than 13 days to avoid replicative senescence. Many protocols for NK-cell amplification exist [20], however, standardization is still missing and only a very few of these protocols produce expansion under GMP conditions. Indeed, the cytokine chosen and dose used are very different between studies. Koehl et al., who developed *ex vivo* expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children, used an enrichment protocol based on CD3 depletion and CD56 enrichment followed by 2 to 3 weeks of culture with 1,000 IU/mL IL-2, which is 250 times more than the concentration of 10 ng/mL (equivalent to 40 IU/mL) used in our study [21]. The protocol used by Koehl et al. was developed without feeder cells and led to a median fivefold expansion of NK cells. In another study published by Alici et al. [22], autologous NK cells were expanded without an enrichment step. Thus, peripheral blood mononuclear cells were cultured in the presence of an anti-CD3 antibody and 500 IU/mL IL-2 during 20 days. Using this GMP-compliant protocol, they obtained a very high rate of proliferation, as the total cell population had expanded 511-fold and NK cells had expanded 1,625-fold.

If expansion protocols are required, especially for future clinical trials based on multiple NK-cell injections, culture conditions should be taken into account, as NK cells obtained after culture with cytokines are different from the starting material. In this study, we first observed that NK-cell cytotoxicity after overnight incubation with the cytokines was significantly increased with 10 or 50 ng/mL IL-2 and with 2, 10, or 50 ng/mL IL-15, but reached significance after culture only with IL-15. The cytotoxicity was not increased after overnight incubation with IL-7. When compared on the same starting material, the use of the two cytokines in combination showed no additional benefit. We next investigated whether the use of cytokines modified NK-cell phenotype and followed the expression

of an activating receptor NKG2D and two inhibiting receptors KIR2DL1 (HLA-Cw4 ligand) and KIR2DL2 (HLA-Cw3 ligand) during the culture period. Our results showed that the cytokine chosen for expansion modified NK-cell receptor expression pattern as compared to the starting material. Thus, a fivefold increase in NKG2D expression was observed and this effect was not dependent on the concentration of IL-2. The cells cultured with IL-15 also showed an upregulation of the activating receptor ranging from fourfold in the presence of 10 ng/mL to 6.7-fold with 2 ng/mL IL-15. IL-15 is known to have a major role in NK-cell homeostasis [23,24]. In our study, we showed that IL-15 increased NK-cell cytotoxicity after an overnight incubation or after 13 days of culture. NK-cell immunophenotyping showed a concomitant increase in the expression of the activating receptor NKG2D, which is involved in mediating NK cytotoxicity. Another study confirmed these results, and reported, as we did, an upregulation of NK-cell activating receptors after incubation with IL-15, which can overcome the negative effects of the inhibitory NK-cell receptors [25]. Another hypothesis could be an upregulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand, which was observed by Lum et al. [26]. They showed that IL-15 induced upregulation of TRAIL receptor, and an increase in NK-cell cytotoxicity against HIV-infected cells. All these results suggest that IL-15 has a beneficial effect on NK-cell cytotoxicity, and that this cytokine is a powerful adjuvant that can be used to increase NK-mediated antitumor or antiviral effects.

A similar phenomenon was observed for the two inhibiting receptors, but our results showed that the highest concentration of cytokine used was not always necessary to obtain the highest upregulation of the receptors. When compared on the same starting material, 10 ng/mL IL-2 and 50 ng/mL IL-15 were equivalent, as these concentrations similarly upregulated the three receptors. In another study, Alici et al. [22] phenotyped NK cells before and after 20 days of expansion and also described a change in NK-cell receptor expression pattern following culture. An increase of the expression of NKG2D and KIR 2DL3, but a decrease in KIR2DL1 expression was observed. This difference may be due to the fact that NK cells were phenotyped 1 week later than in our study, and that KIR2DL1 expression may decrease during this period. The upregulation of NKG2D on IL-2- or IL-15-activated cells may have a clinical consequence, as NKG2D recognized MICA or B, two proteins that are upregulated on malignant transformation. Unfortunately, these ligands are missing on leukemia cells, but a recent study showed that they can be induced on acute myeloid leukemia cells after treatment with all-trans-retinoic acid, thus offering new therapeutic perspectives [27]. Furthermore, some studies have reported that NKG2D engagement is able to override any simultaneously generated inhibitory signals mediated by KIR receptors [28].

In summary, we showed that CD3/CD19 depletion is effective to obtain highly T- and B-cell-depleted NK-cell-enriched product. In our test, 10 ng/mL IL-2 or 50 ng/mL IL-15 were the optimal concentrations for NK-cell expansion and were equivalent to significantly enhance NK-cell cytotoxicity after culture. Furthermore, we observed after culture a modification in NK-cell receptor expression pattern with upregulation of the activating receptor NKG2D, but also of the inhibiting receptors KIR2DL1 and KIR2DL2. This work will be followed by evaluating NK-cell cytotoxicity on leukemic blasts isolated from patients who relapse after hematopoietic stem cell transplantation.

Acknowledgments

Funding received for this work from Meuse AntiCancer League (Ligue contre le cancer de la Meuse) (Bar Le Duc, France).

Conflict of Interest Disclosure

No financial interest/relationships with financial interest relating to the topic of this article have been declared.

References

1. Barnes DW, Loutit JF. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II. *Br J Haematol.* 1957;3:241–252.
2. Fefer A. Graft-vs-tumor responses. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, eds. *Hematopoietic Cell Transplantation*. 3rd ed. Oxford, UK: Blackwell publishing Ltd; 2004. p. 369–379.
3. Bonnet D, Warren EH, Greenberg PD, Dick JE, Riddell SR. CD8(+) minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:8639–8644.
4. Hambach L, Spierings E, Goulmy E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: minor histocompatibility antigens. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20:171–187.
5. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:189–220.
6. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol.* 1989;47:187–376.
7. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002;295:2097–2100.
8. Velardi A. Role of KIRs and KIR ligands in hematopoietic transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2008;20:581–587.
9. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood.* 2005;105:4878–4884.
10. Verheyden S, Schots R, Duquet W, Demanet C. A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2005;19:1446–1451.
11. Lang P, Pfeiffer M, Handgretinger R, et al. Clinical scale isolation of T cell-depleted CD56+ donor lymphocytes in children. *Bone Marrow Transplant.* 2002;29:497–502.
12. Bamford RN, Grant AJ, Burton JD, et al. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally

- designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:4940–4944.
13. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, et al. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J*. 1994;13:2822–2830.
 14. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med*. 1985;313:1485–1492.
 15. McKenna DH Jr, Sumstad D, Bostrom N, et al. Good manufacturing practices production of natural killer cells for immunotherapy: a six-year single-institution experience. *Transfusion*. 2007;47:520–528.
 16. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 2002;100:1935–1947.
 17. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, et al. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: A multi-institutional study. *Blood*. 1999;94:2208–2216.
 18. Passweg JR, Stern M, Koehl U, Uharek L, Tichelli A. Use of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:637–643.
 19. Bethge WA, Faul C, Bornhauser M, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: An update. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;40:13–19.
 20. Berg M, Lundqvist A, McCoy P Jr, et al. Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy*. 2009;11:341–355.
 21. Koehl U, Esser R, Zimmermann S, et al. Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children. *Klin Padiatr*. 2005;217:345–350.
 22. Alici E, Sutlu T, Bjorkstrand B, et al. Autologous antitumor activity by NK cells expanded from myeloma patients using GMP-compliant components. *Blood*. 2008;111:3155–3162.
 23. Carson WE, Fehniger TA, Haldar S, et al. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest*. 1997;99:937–943.
 24. Cooper MA, Bush JE, Fehniger TA, et al. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood*. 2002;100:3633–3638.
 25. Szczepanski MJ, Szajnik M, Welsh A, Foon KA, Whiteside TL, Boydadzis M. Interleukin-15 enhances natural killer cell cytotoxicity in patients with acute myeloid leukemia by upregulating the activating NK cell receptors. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59:73–79.
 26. Lum JJ, Schnepfle DJ, Nie Z, et al. Differential effects of interleukin-7 and interleukin-15 on NK cell anti-human immunodeficiency virus activity. *J Virol*. 2004;78:6033–6042.
 27. Poggi A, Catellani S, Garuti A, Pierrì I, Gobbi M, Zocchi MR. Effective in vivo induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukaemias by all-trans-retinoic acid or sodium valproate. *Leukemia*. 2009;23: 641–648.
 28. Cerwenka A, Lanier LL. NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens*. 2003;61:335–343.

RECONSTITUTION IMMUNITAIRE ET IMMUNOTHERAPIE ADOPTIVE ANTI-VIRALES APRES ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est un traitement efficace des Hémopathies malignes. Cependant, les complications des allogreffes parmi lesquelles les infections virales sont associées parfois à une morbidité et une mortalité importantes. Ces infections surviennent en l'absence de reconstitution immunitaire. Un monitoring régulier de la charge virale des principaux agents infectieux impliqués est réalisé mais amène parfois à la mise en œuvre abusive de traitements anti-viraux qui ne sont pas dénués de toxicité.

Dans ce travail, nous proposons d'associer à ce monitoring un suivi régulier de la reconstitution immunitaire spécifique afin de cibler parmi les patients présentant une réactivation ceux qui nécessitent un traitement curatif de ceux qui pourront maîtriser l'infection par leur système immunitaire. Nous illustrons ce propos avec le virus d'Epstein Barr (EBV) et avons en cours une étude sur l'Adénovirus (ADV).

Dans certains cas parfaitement ciblés, les traitements anti-viraux s'avèrent inefficaces. C'est pourquoi dans ce travail, nous présentons la mise au point d'une technique de grade clinique de production de lymphocytes T cytotoxiques anti-ADV (CTL anti-ADV) en condition GMP (Good Manufacturing Practice), grâce au système CliniMACS et au Cytokine Capture System de Miltenyi, afin de proposer une immunothérapie adoptive.

Nous décrivons par la suite trois expériences cliniques de traitement compassionnel d'une infection ADV post-allogreffe de CSH.

Enfin, nous présentons les résultats préliminaires de la production de CTL bispécifique anti-ADV et CMV.

Mots clés : Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Infections virales. Reconstitution immunitaire. Immunothérapie adoptive. Production de grade clinique de lymphocytes T cytotoxiques anti-Adénovirus.

Mots-clés – Rameau : Greffe de cellules souches hématopoïétiques. Thérapie cellulaire. Infections virales.

ANTI-IVIRAL IMMUNE RECONSTITUTION AND ADOPTIVE IMMUNOTHERAPY AFTER HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION:

Hematopoietic stem cells Transplantation (HSCT) is a well recognized strategy for treatment of haematological malignancies. However, HSCT complications among which the viral infections are associated with high morbidity and mortality. These infections arise in the absence of immune reconstitution. Monitoring of viral reactivations after allogeneic HSCT is necessary, to identify patients at risk of viral infections, but not sufficient, as patients may be abusively treated.

In this work we propose to combine viral DNA load assessment with specific immune monitoring to target patients who need to be treated. We report a retrospective study investigating EBV infection and EBV-specific immune recovery using the functional IFN γ Elispot assay in 40 allogeneic HSCT patients. We initiated a similar study with ADV which is pending.

However, although patients are correctly targeted, anti-viral treatment is sometimes not effective. We present a study on the development of a complete clinical grade generation of Human anti-Adenovirus cytotoxic T cells in GMP (Good Manufacturing Practice) conditions, thanks to the system CliniMACS and the Cytokine Capture System, to propose an adoptive immunotherapy to the recipient.

We describe afterwards three clinical experiments of treatment of an ADV infection after HSCT.

Finally, we present the preliminary results of the anti-ADV and -CMV bi-specific CTL production.

Key words: Hematopoietic stem cell transplantation. Viral infections. Immune reconstitution. Adoptive immunotherapy. Clinical grade generation of human anti-Adenovirus cytotoxic T cells.

Key words – Rameau: Hematopoietic stem cell transplantation. Cell therapy. Viral infections.