

Université de Montréal

**Étude du rôle des lymphocytes T chez les receveurs pédiatriques de greffe de sang de cordon ombilical.**

par

Natacha Mérindol

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de doctorat (Ph.D)  
en microbiologie et immunologie

Novembre 2011

© Natacha Mérindol, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude du rôle des lymphocytes T chez les receveurs pédiatriques de greffe de sang de cordon ombilical.**

présentée par :

Natacha Mérindol

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

**Réjean Lapointe, président-rapporteur**

**Hugo Soudeyns, directeur de recherche**

**Nathalie Labrecque, membre du jury**

**Pedro Romero, examinateur externe**

**Jean-François Gauchat, représentant du doyen de la FES**

## RÉSUMÉ

---

La transplantation de sang de cordon ombilical (TSCO) est utilisée pour traiter les enfants atteints de maladies hématologiques en l'absence de donneurs apparentés compatibles. Elle est associée avec des risques plus élevés d'échec de greffe et d'infections opportunistes dans les premiers mois qui suivent la transplantation en comparaison avec une greffe de moelle osseuse. Par contre, la TSCO comporte un risque plus faible de maladie du greffon contre l'hôte et une incidence comparable de rechute de leucémie. Ces quatre complications impliquent directement les lymphocytes T. Dans le but de mieux comprendre le schéma particulier des évènements qui suivent la TSCO et d'améliorer le pronostic des patients, nous avons étudié le potentiel fonctionnel, la persistance et la reconstitution antivirale des lymphocytes T au sein d'un groupe d'enfants transplantés de sang de cordon ombilical (SCO). Étant donné que le SCO contient une majorité de lymphocytes T naïfs, nous avons étudié les lymphocytes T spécifiques au HLA-A2:Melan-A<sub>26-35</sub> A27L; seul répertoire naïf et abondant caractérisé chez l'homme. Nous avons observé que les lymphocytes T du SCO se différencient en populations effectrices, s'oligoclonalisent, produisent de l'IFN- $\gamma$  et lysent spécifiquement leur cible suite à la stimulation. Néanmoins, ces cellules produisent moins d'IFN- $\gamma$  et sont moins bifonctionnelles que leurs homologues issus du sang périphérique d'adultes. Chez les patients, les lymphocytes T du SCO s'épuisent après la TSCO : ils s'oligoclonalisent dramatiquement, sont principalement en différenciation terminale, et une importante fréquence exprime PD-1 (« programmed death-1 ») dans les 3 à 6 premiers mois post-greffe. Très peu de patients sont capables de développer des réponses antivirales durant cette période et la fréquence de lymphocytes T qui expriment PD-1 semble aussi avoir un impact sur le risque subséquent de faire une rechute de leucémie. La deuxième vague de lymphocytes T émergeant à 6 mois post-TSCO mène à une population fonctionnelle et diversifiée. En conclusion, la fonctionnalité des lymphocytes T présents dans les 3 à 6 premiers mois post-TSCO doit être rétablie pour améliorer les risques d'infections opportunistes et de rechute de leucémie.

**Mots clés :** Greffe de sang de cordon ombilical, leucémie, lymphocytes T, Melan-A, PD-1.

## ABSTRACT

---

Umbilical cord blood (UCB) is increasingly used as a source of hematopoietic progenitor cells to treat a variety of disorders in children. UCB transplantation (UCBT) is associated with a reduced incidence of graft-versus-host disease, a robust graft-versus-leukemia effect, more frequent graft failures and a higher incidence of opportunistic infections (OI) compared to bone marrow transplantation; four processes in which donor-derived T lymphocytes are known to be predominantly involved. UCB T cells are mostly naïve. To examine the differential functionality of UCB T cells, CD8<sup>+</sup> T cells specific for the melanoma-associated HLA-A2-restricted Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide were isolated from UCB and UCBT recipients, as it represents an abundant preimmune repertoire in human. Following *in vitro* stimulation, UCB T cells proliferated, oligoclonalized, acquired cell surface markers reflective of effector/memory differentiation, expressed cytolytic activity and produced IFN- $\gamma$ . While functional properties of UCB T cells resembled their counterparts in adult peripheral blood, they were more likely to reach terminal differentiation following stimulation, produced less IFN- $\gamma$  and were less frequently bifunctional (IFN- $\gamma$  and cytotoxicity). Following UCBT, T cells became exhausted: they oligoclonalized dramatically, exhibited a terminal differentiation phenotype and a high frequency also expressed PD-1 ("programmed death 1") in the first 3-6 months post-UCBT. Moreover, very few patients developed an antiviral response during this period. Finally, the frequency of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was significantly higher in subjects who subsequently experienced leukemic relapse. A second wave of T cells emerging at 6 months post-UCBT was observed and characterized by an increase in the repertoire diversity till 1 year, the development of a naïve population with polyfunctional potential and the progressive reconstitution of antiviral responses. This study reports on the biological properties of UCB-derived CD8<sup>+</sup> T cells and provides a rationale for the characteristics of UCBT in terms of immune reconstitution and OI. These results also suggest that the first wave of CD8<sup>+</sup> T cells in the first 3-6 months post-UCBT should be targeted in priority to improve both OI and leukemic relapse risks.

**Keywords:** Umbilical cord blood transplantation, leukemia, T lymphocytes, Melan-A, PD-1.

## TABLE DES MATIÈRES

---

<b>Chapitre 1 : Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>I- Fonction des lymphocytes T chez les individus immunocompétents ....</b>	<b>2</b>
<b>I. 1. Mise en contexte .....</b>	<b>2</b>
I. 1. 1. Les molécules du CMH.....	3
I. 1. 2. Le TCR et la diversité.....	6
<b>I. 2. Génération des lymphocytes T chez les individus sains .....</b>	<b>8</b>
I. 2. 1. La sélection $\beta$ .....	9
I. 2. 2. Sélection positive et reconnaissance du CMH.....	10
I. 2. 3. Sélection négative et tolérance centrale.....	10
<b>I. 3. Estimé de la diversité générée .....</b>	<b>13</b>
<b>I. 4. Réactivité croisée et alloréactivité .....</b>	<b>15</b>
<b>I. 5. La réponse des lymphocytes T.....</b>	<b>16</b>
I. 5. 1. Phénotype des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	16
I. 5. 2. La fonction .....	19
I. 5. 3. L'épuisement des lymphocytes T .....	20
<b>II- La transplantation de cellules souches hématopoïétiques .....</b>	<b>22</b>
<b>II. 1. Greffe et conditionnement.....</b>	<b>22</b>
<b>II. 2. L'allogreffe.....</b>	<b>24</b>
<b>II. 3. La transplantation de sang de cordon ombilical (TSCO) .....</b>	<b>25</b>
II. 3. 1. Avantages et inconvénients .....	26

<b>III- Propriétés des lymphocytes T du sang de cordon ombilical.....</b>	<b>29</b>
<b>III. 1. Fonctionnalité des lymphocytes T du SCO .....</b>	<b>29</b>
III. 1. 1. Répertoire préimmun ou immaturité? .....	29
III. 1. 2. Réponse in vivo.....	32
III. 1. 3. Réponse alloréactive .....	33
<b>IV- Rôles de lymphocytes T dans les complications suite à la TSCO .....</b>	<b>34</b>
<b>IV. 1. Prise et l'échec de la greffe.....</b>	<b>34</b>
<b>IV. 2. Reconstitution immunitaire .....</b>	<b>37</b>
IV. 2. 1. Première vague de lymphocytes T CD8+ .....	38
IV. 2. 2. Deuxième vague de lymphocytes T CD8+ .....	40
<b>IV. 2. le contrôle des infections .....</b>	<b>42</b>
IV. 3. 1. Les infections à CMV .....	43
IV. 3. 2. Les infections à VZV .....	45
IV. 3. 3 Immunité antivirale post-TSCO.....	47
<b>IV. 4. La GvHD.....</b>	<b>49</b>
<b>IV. 5. La rechute de leucémie et le GvL.....</b>	<b>52</b>
<b>V- Problématique .....</b>	<b>55</b>
<b>V. 1. Modèle d'étude : les lymphocytes T spécifiques à Melan-A .....</b>	<b>55</b>
<b>VI- Objectifs .....</b>	<b>59</b>
<b>VII- Hypothèses .....</b>	<b>60</b>
<b>Chapitre 2 .....</b>	<b>61</b>

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>63</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>64</b>
<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>66</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>70</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>78</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS.....</b>	<b>84</b>
<b>DISCLOSURES .....</b>	<b>84</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>84</b>
<b>LEGENDS TO FIGURES .....</b>	<b>93</b>
<b>FIGURES .....</b>	<b>99</b>
<b>Chapitre 3.....</b>	<b>108</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>110</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>111</b>
<b>PATIENTS, MATERIALS, AND METHODS .....</b>	<b>113</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>117</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>123</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS.....</b>	<b>128</b>
<b>AUTHOR CONTRIBUTIONS .....</b>	<b>128</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>128</b>

<b>FIGURE LEGENDS .....</b>	<b>135</b>
<b>SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS.....</b>	<b>138</b>
<b>FIGURES .....</b>	<b>142</b>
<b>Chapitre 4.....</b>	<b>154</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>157</b>
<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>160</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>164</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>172</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS.....</b>	<b>177</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>178</b>
<b>FIGURE LEGENDS .....</b>	<b>188</b>
<b>Chapitre 5 : Discussion .....</b>	<b>195</b>
<b>I- L'expansion des lymphocytes T du SCO .....</b>	<b>196</b>
<b>I. 1. Des caractéristiques fonctionnelles particulières .....</b>	<b>196</b>
I. 1. 1. Rationalisation .....	198
I. 1. 2. Fonctionnalité en disparité HLA.....	199
<b>I. 2. Une population épuisée .....</b>	<b>200</b>
I. 2. 1. Interprétation.....	202



<b>I. 3. Anergie, apoptose ou sénescence?</b> .....	<b>205</b>
<b>I. 4. Les facteurs de risque de rechute</b> .....	<b>207</b>
I. 4. 1. Mécanismes possibles.....	210
<b>II- Deuxième vague de reconstitution</b> .....	<b>211</b>
<b>III- Comment protéger des infections opportunistes et des rechutes?</b>	<b>214</b>
<b>IV- Conclusion et perspectives</b> .....	<b>218</b>
<b>Références</b> .....	<b>222</b>
<b>Annexe</b> .....	<b>247</b>

## LISTE DES FIGURES

---

### *Chapitre 1*

<b>Figure 1.1.</b> Recombinaison de la chaîne $\beta$ et structure du TCR. ....	8
<b>Figure 1.2.</b> Reconstitution thymique : sélection positive et sélection négative .....	13
<b>Figure 1.3.</b> Expression de différentes molécules en fonction de l'état de différenciation .....	18
<b>Figure 1.4.</b> Transplantation de cellules souches hématopoïétiques.....	23
<b>Figure 1.5.</b> Phases de reconstitution et risques infectieux suivant la transplantation de sang de cordon ombilical.....	37
<b>Figure 1.6.</b> Reconstitution du compartiment lymphocytaire suivant la transplantation de SCO .....	39
<b>Figure 1.7.</b> Bases moléculaires et cellulaires des GvHD aigüe et chronique.....	51
<b>Figure 1.8.</b> Prévention de la rechute de leucémie suivant une transplantation de sang de cordon ombilical.....	54
<b>Figure 9.</b> Comparaison entre les répertoires de lymphocytes T spécifiques à Melan-A et spécifiques au virus de l'influenza.....	59

### *Chapitre 2*

<b>Figure 2.1.</b> A2/Melan-A <sup>+</sup> T cells are detectable in umbilical cord blood and adult blood samples.....	99
--	----

**Figure 2.2.** The repertoire of freshly isolated A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells is diversified in HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> umbilical cord blood samples..... 100

**Figure 2.3.** A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells derived from umbilical cord blood proliferate following stimulation with cognate peptide.. ..... 101

**Figure 2.4.** Oligoclonalization of the A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell subset following cognate peptide stimulation in umbilical cord blood samples..... 102

**Figure 2.5.** Phenotypic analysis of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells following stimulation with cognate peptide or polyclonal activation..... 103

**Figure 2.6.** Functional analysis of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells following stimulation with cognate peptide or polyclonal activation..... 104

**Figure 2.7.** Polyfunctional characteristics of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell microcultures derived from umbilical cord blood or adult blood following polyclonal activation. .... 105

***Chapitre 3***

**Figure 3.1.** Reconstitution of A2/Melan-A<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells following UCBT..... 142

**Figure 3.2.** Evolution of the T cell receptor  $\beta$  chain repertoire in A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells ..... 143

**Figure 3.3.** Phenotypic reconstitution of total CD8<sup>+</sup> T cells and A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells following UCBT. .... 144

<b>Figure 3.4.</b> Polyfunctionality profile and cytolytic activity of A2/Melan-A <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T cells following UCBT.....	145
<b>Figure 3.5.</b> Frequencies of PD-1 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> and PD-1 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T cells following UCBT.....	146
<b>Figure 3.6.</b> Association between PD-1 expression and leukemic relapse. .....	146
<b>Fig. 3.S1.</b> Gating strategy. ....	147
<b>Fig. 3.S2.</b> Analysis of the TCR β chain repertoire in A2/Melan-A <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T cells following UCBT.....	148
<b>Fig. 3.S3.</b> Phenotypic reconstitution of total CD8 <sup>+</sup> T cells and A2/Melan-A <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T cells following UCBT.....	149
<b>Fig. 3.S4.</b> Representative dot plots and gating strategy for intracellular staining.....	150
<b>Fig. 3.S5.</b> PD-1 expression in CD8 <sup>+</sup> and CD4 <sup>+</sup> T cells following UCBT.....	151
<b>Fig. 3.S6.</b> Phenotypic profiles of total CD8 <sup>+</sup> T cells in relapsers and non-relapsers following UCBT.....	152

## ***Chapitre 4***

<b>Figure 4.1.</b> CD8 <sup>+</sup> and CD4 <sup>+</sup> T lymphocytes reconstitution.....	192
<b>Figure 4.2.</b> CMV-specific T cell reconstitution.....	192

**Figure 4.3.** Six different cases of CMV-specific IFN- $\gamma$  production (line in black) and CD3<sup>+</sup> T cell (line in red) reconstitution ..... 193

**Figure 4.4.** VZV-specific T cell reconstitution..... 194

**Figure 4.5.** Ten representative cases of VZV-specific immunity reconstitution. .... 194

***Chapitre 5***

**Figure 5.1.** Modèle de reconstitution des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> suivant la transplantation de sang de cordon ombilical ..... 211

## LISTE DES TABLEAUX

---

### *Chapitre 1*

**Tableau 1.1.** Avantages et inconvénients de la TSCO comparativement à la TMO..... 28

**Tableau 1.2.** Propriétés des cellules T du sang de cordon ombilical comparativement à leurs homologues du sang périphérique adulte..... 33

### *Chapitre 2*

**Table 2.1.** Umbilical cord blood samples characteristics..... 106

### *Chapitre 3*

**Table 3.1.** Clinical characteristics of transplanted patients..... 141

### *Chapitre 4*

**Table 4.1.** Patients characteristics ..... 185

**Table 4.2.** Association between IFN- $\gamma$  response (SFU) against CMV or VZV with CD3, CD4 and CD8 absolute counts and naïve T cells frequency ..... 186

**Table 4.3.** Comparison between VZV-specific IFN $\gamma$  and IgG production..... 187

<b>Table 4.S1.</b> CMV-specific cell-mediated immune responses, DNAemia and serological status in study subjects.....	190
<b>Table 4.S2.</b> VZV-specific cell-mediated immune responses, incidence of zoster, prophylaxis, and serological status in study subjects.....	191

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

AgmH	antigène mineur d'histocompatibilité
ATG	anti-thymocyte globulin
BCIP/NBT	<i>5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl Phosphate et Nitro Blue Tetrazolium Chloride</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CEp	cellule épithéliale
CM	centrale mémoire
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMH-p	complexe CMH-peptide
CMV	cytomegalovirus
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CSH	cellule souche hématopoïétique
CTLA-4	<i>cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DC	<i>dendritic cells</i>
DMSO	diméthylsulfoxyde
DN	thymocyte double négatif CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>
DP	thymocyte double positif CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
EBV	Epstein-Barr virus
EH	expansion homéostatique
ELISpot	<i>enzyme-linked immunosorbent spot</i>
EM	effecteur mémoire
EMRA	effecteur en différenciation terminale
gp	glycoprotéine
GvHD	<i>graft-versus-host disease</i>
GvL	<i>graft-versus-leukemia</i>
HHV	<i>human herpes virus</i>



HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HSV-1/-2	<i>herpes simplex virus type 1/type 2</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN- $\gamma$	<i>interféron-gamma</i>
Ig	<i>immunoglobuline</i>
IL	<i>interleukine</i>
IO	<i>infections opportunistes</i>
LAG-3	<i>lymphocyte-activation gene 3 (CD223)</i>
LAL	<i>leucémie aigüe lymphoblastique</i>
LANL	<i>leucémie aigüe non-lymphoblastique</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function associated antigen 1</i>
LT	<i>lymphocyte T</i>
PBMC	<i>peripheral-blood mononuclear cell</i>
PD-1	<i>programmed death 1</i>
PD-L	<i>programmed death 1 ligand</i>
Pfu	<i>Plaque-forming unit</i>
Melan-A	<i>melanocyte antigen</i>
MART-1	<i>melanoma antigen recognized by T-cells</i>
MIC	<i>MHC class I chain-related gene</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory proteins</i>
MO	<i>moelle osseuse</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NIMA	<i>non-inherited maternal antigen</i>
NMDP	<i>national marrow donor program</i>
NK	<i>natural killer</i>
NPH	<i>névralgies post-herpétiques</i>
SA	<i>sang périphérique adulte</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>

SCO	sang de cordon ombilical
TCSH	transplantation de cellules souches hématopoïétiques
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF	<i>tumour growth factor</i>
T <sub>H</sub>	<i>T helper</i> (lymphocyte T auxiliaire)
TC	T CD8 <sup>+</sup>
TIM3	<i>T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3</i>
TMO	transplantation de moelle osseuse
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TREC	<i>T-cell receptor excision circle</i>
Treg	T régulatrice
TSCO	transplantation de sang de cordon ombilical
VHC	virus de l'hépatite C
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VZV	varicella-zoster virus

## REMERCIEMENTS

---

Pour commencer, je tiens à remercier mon directeur de stages, de maîtrise et de thèse, Dr Hugo Soudeyns, qui m'a énormément appris durant ces 7 ans et m'a toujours encouragée à poursuivre mes projets. Dr Soudeyns m'a aussi donné la liberté de tester les hypothèses que j'émettais, me permettant de développer mon intérêt pour la recherche, et surtout pour la découverte. J'ai beaucoup apprécié la diversité, la qualité et l'originalité de ses projets.

Je souhaite remercier les membres du jury de mon comité de thèse de sacrifier une partie de leur temps précieux pour décortiquer ces 300 pages. En particulier, je voudrais remercier Dr Nathalie Labrecque pour son aide et ses conseils lors de mon comité aviseur de fin de doctorat. Je voudrais remercier Dr Réjean Lapointe aussi de nous avoir prêté son lecteur de plaques ELISpot. Je voudrais remercier pour ces conseils, Dr Claude Perreault qui a pris le temps de suivre mon évolution et mes projets depuis mon premier comité aviseur. Finalement, je voudrais remercier Dr Pedro Romero de me faire le grand honneur de lire ma thèse, et pour son travail, parce que ses articles ont souvent été à la base de mes réflexions et de mes connaissances sur le répertoire de lymphocytes T spécifiques à Melan-A et sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en général.

Je voudrais remercier tous les membres passés et présents du laboratoire, en particulier Martine Caty, Doris G. Ransy, Dr B. Sandra Akouamba, Anne-Julie Grenier, Insaf Salem, Dr Armelle Le Campion, Réginald Rénoüs, Mathieu Quesnel-Vallières, Stéphanie Lamarche, Ariane Larouche, Amélie Pagliuzza, Fallah Chit et Élyse Jolette de m'avoir fait évoluer dans un environnement enrichissant et joyeux et pour tous leurs conseils.

Je voudrais remercier Martine Caty pour toute son aide depuis 7 ans. Martine est le pilier du laboratoire, et est toujours prête à aider tout le monde. Je voudrais mentionner

spécialement Doris G. Ransy pour son soutien permanent et son amitié dans cette épreuve que nous avons vécu ensemble. Je voudrais aussi la remercier pour son apport intellectuel et son aide technique dans mes projets de doctorat. Je tiens également à souligner la participation d'Anne-Julie Grenier et d'Insaf Salem dans certains projets de mon doctorat.

Je remercie sincèrement Elodie Rance dans le laboratoire du Dr Carolina Alfieri, d'avoir pris le temps de me montrer des techniques que je ne connaissais pas et aussi de lire une bonne partie de ma thèse pour me donner ses commentaires très judicieux. Je la remercie également pour son amitié et son soutien.

Je remercie tous les membres du GRETISC (groupe de recherche en transplantation et immunologie du sang de cordon) pour leur passion, leur intérêt et leurs conseils lors de nos réunions. Particulièrement, Dr Françoise Le Deist qui était sur mes comités aviseurs et de mon examen pré-doctorale, et avec qui nous collaborons. Ses conseils m'ont été précieux pour mes projets, mes articles et aussi pour rédiger les demandes de bourse post-doctorales. Je remercie le Dr Michel Duval, qui a toujours répondu présent à mes nombreuses questions. Je le remercie aussi pour son esprit d'ouverture et de collaboration qui donnent de la valeur humaine à nos projets. Je remercie aussi Dr Martin Champagne pour son aide et ses conseils. Je remercie Dr Philippe Ovetchkine pour tout son temps et toute son aide concernant les traitements antiviraux des patients. Je remercie Dr Eli Haddad et Arnaud Duval pour leur esprit de collaboration, et aussi de pousser la réflexion lors des réunions du GRETISC et de nos conversations. Je remercie Dr Carolina Alfieri d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions sur le schéma du suivi des patients et du traitement contre le CMV.

Je remercie Samira Mezziani pour les innombrables fois que je l'ai appelé à l'aide pour avoir des données sur les patients. Merci pour son aide, son temps précieux. Merci à Rose-Marie Brito pour les tris cellulaires sur le BD FACS ARIA et aussi pour sa collaboration.

Je voudrais remercier Émily Charrier du laboratoire du Dr Michel Duval. Nous avons tellement travaillé ensemble que j'ai l'impression que nous étions dans le même laboratoire. Merci pour tous ces bons moments lors de nos week-ends passés à rédiger notre ambitieuse revue. Merci d'avoir toujours cherché un moyen de m'aider quand il me manquait des échantillons. Je remercie aussi Paulo Cordeiro et Dr Sabine Herblot pour leur collaboration et leur aide dans la rédaction des articles.

Au sein du département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal, je voudrais remercier Dr Jacques Thibodeau d'avoir pris le temps de présider mon examen pré-doctoral. Je remercie Serge Sénéchal pour ses nombreuses années de tri avec le FACS Vantage SE. Pour sa patience devant mon ignorance au début de ma maîtrise, et surtout pour tous ces conseils en cytométrie tout le long de mon parcours. Je voudrais aussi remercier Dr Marc Drolet qui m'a permis de faire mon premier stage en laboratoire et m'a donné la piqure de la recherche.

Je voudrais remercier Sylvain Gimmig qui m'a énormément appris en cytométrie lorsqu'il travaillait au CHUM Saint-Luc. Je remercie Laurence Lejeune et Annie Gosselin pour leurs services sur l'ARIA II du CHUM Saint-Luc.

Je remercie Dr Casian Yee et Dr Phil Greenberg au Fred Hutchinson Cancer Research Center à Seattle de nous avoir généreusement envoyé la lignée 221.A2 qui m'a servi tout au long de mon doctorat.

Finally, I would like to thank the people without whom I would not exist: my parents Béatrice and Olivier Mérindol for their support and help. They supported me in all my tests and pushed me forward. I would also like to thank my sisters Julie and Isabelle and my brother Guillaume for their support. I would like to thank my « belle-famille », Pierre-Yves Châtillon, Louise Vaillancourt, Isabelle Châtillon, and all the Châtillon and Vaillancourt that I had the chance to know, for having been my second family and having brought me so many good moments during these two last years of the course. The impression of the first version of this thesis was made in picturesque conditions in a small printing shop in Provence that only had a press, a paper cutter and an old perforator that was rusty and out of order, no US letter paper anymore... I must therefore thank the 5 blocks of my first version to Dr Mark Angle and Dr Claude-Édouard Châtillon, who, like cicadas, took the time to perforate 8 pages for 8 pages, the 1500 pages smiling.

I thank Claude-Édouard Châtillon for having been my biggest psychological support but also for his intellectual contribution; for having taken the time to read me many times to give me comments and suggestions that have always allowed me to improve.

## CONTRIBUTIONS

---

Article I (Chapitre 2) publié dans *Journal of Immunology* en juin 2010 (doi: 10.4049/jimmunol.090261): Umbilical cord blood T cells respond against the Melan-A/MART-1 tumor antigen and exhibit reduced alloreactivity as compared with adult blood-derived T cells. Merindol N, Grenier AJ, Caty M, Charrier E, Duval A, Duval M, Champagne MA, Soudeyns H.

Dans ce premier article, j'ai entrepris, en accord avec mon directeur de thèse Hugo Soudeyns, d'étudier les unités de sang de cordon HLA-A2<sup>-</sup> en plus des unités HLA-A2<sup>+</sup> prévues. J'ai effectué les décongélations des échantillons, toutes les expériences de marquage FACS, de tris par cytométrie en flux, de culture cellulaire, de test de cytotoxicité, et d'amplification de la chaîne  $\beta$  du récepteur des cellules T, ainsi que 80% des tests d'ELISPots, sous la supervision de Dr Soudeyns. J'ai aussi effectué toutes les analyses et écrit l'article. Il a par la suite été corrigé par mon directeur de thèse qui avait désigné l'étude. Les coauteurs ont aussi contribué à l'écriture de l'article.

Article II (Chapitre 3) publié dans *Blood* en octobre 2011 (doi: 10.1182/blood-2011-04-349241) CD8<sup>+</sup> T cell reconstitution in recipients of umbilical cord blood transplant and characteristics associated with leukemic relapse. Merindol N, Champagne MA, Duval M, Soudeyns H. Dans ce deuxième article, en accord avec mon directeur de thèse, j'ai émis l'hypothèse de l'épuisement et décidé de regarder l'expression de PD-1 chez les patients greffés de sang de cordon ombilical. J'ai effectué toutes les expériences. J'ai aussi récolté les données des patients, analysé toutes les données et écrit l'article en collaboration avec mon directeur de thèse.

Article III (Chapitre 4) : Reconstitution of protective immune responses against CMV and VZV does not require disease development in pediatric recipients of umbilical cord blood transplantation. Natacha Merindol, Insaf Salem Fourati, Rose-Marie Brito, Anne-Julie Grenier, Emily Charrier, Paulo Cordeiro, Martine Caty, Samira Mezziani, Brigitte Malette, Michel Duval, Carolina Alfieri, Philippe Ovetchkine, Françoise Le Deist, and Hugo Soudeyns. Ce troisième article n'est pas encore soumis et recevra probablement d'autres corrections des coauteurs. J'ai entrepris d'étudier la réponse anti-CMV en observant que les infections à CMV, comme celles causées par VZV, étaient fréquentes et dangereuses suivant la transplantation de sang de cordon ombilical. J'ai effectué le phénotypage des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> pour tous les patients, 80% des ELISpots pour CMV et 50% de ceux sur VZV. J'ai récolté les données des patients et effectué toutes les analyses. J'ai aussi écrit cet article, toujours conjointement avec Dr Soudeyns.

Article IV (Annexe) est une revue de la littérature publiée dans *Journal of Leukocyte Biology* en juillet 2011 (doi: 10.1189/jlb.0111007) Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation. Natacha Merindol, Emily Charrier, Michel Duval, Hugo Soudeyns. Cette revue a été écrite conjointement avec Dr Charrier. Nous avons aussi dessiné les figures. Cette revue a été également corrigée et écrite par Dr Soudeyns et révisée par Dr Michel Duval.



# **Chapitre 1 : Introduction**

# I- FONCTION DES LYMPHOCYTES T CHEZ LES INDIVIDUS IMMUNOCOMPÉTENTS

## I. 1. MISE EN CONTEXTE

Il y a 5 millions d'années, alors qu'un ancêtre des vertébrés à mâchoires divergeait des poissons agnathes, il acquit la capacité de présenter des antigènes via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et de réarranger de manière somatique ses récepteurs antigéniques en utilisant les gènes activateurs de recombinaison (RAG, « recombinaison activating genes ») (Litman et al., 1999). Au cours du temps, le système immunitaire des vertébrés a évolué en un réseau extrêmement coordonné de cellules spécialisées dans la présentation antigénique, la production d'anticorps et la cytotoxicité. Aujourd'hui, le contrôle des pathogènes persistants chez l'homme dépend de l'immunité à médiation cellulaire à travers les lymphocytes T, et humorale à travers la production d'anticorps par les lymphocytes B. L'effet anti-pathogène des lymphocytes T passe par la production de cytokines, l'induction de l'apoptose et la cytolysse des cellules infectées. Les cellules T ont deux avantages principaux : une spécificité antigénique unique conférée par des récepteurs antigéniques T (TCR, « T cell receptor ») singuliers à chaque cellule, et une mémoire immunitaire qui protège l'hôte contre les infections récurrentes.

Les lymphocytes T se divisent en trois groupes en fonction de leur rôle : les lymphocytes T auxiliaires, les régulateurs et les cytotoxiques. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires ou « helper » (Th) sont séparés en 3 classes : a) les cellules Th1, productrices d'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et d'IL-2 qui stimulent l'immunité à médiation cellulaire ciblant les pathogènes intracellulaires; b) les Th2, productrices d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13, importantes pour aider les lymphocytes B à combattre les pathogènes extracellulaires; c) les Th17, productrices d'IL-17, d'IL-6, d'IL-1 et d'IL-23, qui ont un rôle pro-inflammatoire et potentiellement auto-

immunitaire; et d) les cellules T auxiliaires folliculaires (Tfh) sont des cellules spécialisées importantes pour la formation des centres germinatifs et pour l'aide aux lymphocytes B (Crotty, 2011). Les cellules T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> régulatrices (Treg) sont quant à elles productrices d'IL-10 et de TGF- $\beta$ , des cytokines qui ont un effet anti-inflammatoire, elles sont aussi capables de tuer directement les lymphocytes T activés dans certaines circonstances. Les cellules Treg sont dites « naturelles », sous-type stable produit par le thymus, ou « acquises », sous-type moins stable dérivé de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> en périphérie suite à l'exposition à leur antigène (Bluestone et al., 2003). Finalement, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques produisent de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  (« tumor necrosis factor- $\alpha$  »), de l'IL-2, du MIP-1 $\alpha$  (« macrophage inflammatory protein »), des granzymes A, B et K, et de la perforine. Ils expriment aussi le ligand de Fas (Fas-L), appartenant à la famille du TNF à leur surface. Ces cellules peuvent lyser spécifiquement les cellules transformées ou infectées par des virus. La présence de tous ces sous-types de cellules T est essentielle pour obtenir un équilibre entre l'immunité antivirale, anti-tumorale et la tolérance au soi. Elles reconnaissent leurs cibles grâce à leurs TCR qui se lient de façon spécifique à des antigènes peptidiques présentés dans la niche des molécules CMH.

### *I. 1. 1. LES MOLÉCULES DU CMH*

Les molécules encodées par les gènes du CMH sont une des fondations de la discrimination entre le soi et le non-soi chez les vertébrés. Ces protéines sont aussi la barrière principale des transplantations allogéniques. Leur fonction est de présenter les antigènes aux cellules du système immunitaire. Pour remplir cette fonction, le CMH a évolué en un complexe multigénique de gènes polymorphes (>400 allèles ont été répertoriés pour certains) situés

sur le chromosome 6 chez l'homme. La combinaison des allèles du CMH sur un chromosome d'un individu est appelé haplotype. Ils sont regroupés sous le nom de HLA (« human leucocyte antigens »). La majorité des individus est hétérozygote pour les loci du CMH qui se séparent en deux classes. Le CMH de classe I et le CMH de classe II encodent des récepteurs hétérodimériques avec des architectures similaires et sont composés de deux chaînes de polypeptides liées de manière non covalente (Bjorkman et al., 1987a; Bjorkman et al., 1987b; Falk et al., 1991).

Le CMH de classe I se divisent en Ia et Ib. Le CMH Ib inclut les molécules dites non-classiques (HLA-E, -F, -G, -H) qui portent un polymorphisme limité et dont l'expression est souvent restreinte à certains tissus (Sullivan et al, 2006). Nous nous intéresserons ici plutôt au CMH Ia qui contient les molécules classiques du CMH (HLA-A, -B et -C), ubiquitaires et très polymorphiques (York et Rock, 1996). Les deux allèles de chaque locus sont exprimés de manière codominante. Ainsi, un individu peut exprimer jusqu'à 6 différentes molécules de classe Ia. Elles présentent les antigènes peptidiques aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Pamer et Cresswell, 1998). Ces antigènes de 8-9 acides aminés sont générés par le protéasome à partir des protéines intracellulaires (Madden et al., 1991; Yewdell et Bennink, 2001) et transportés au réticulum endoplasmique par les transporteurs associés au traitement des antigènes (TAP, « transporter associated with antigen processing ») (Lankat-Buttgereit et Tampe, 2002). Les antigènes du milieu extracellulaire internalisés par endocytose ou phagocytose par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), en particulier les cellules dendritiques (DC, « dendritic cells »), peuvent aussi être traités par le protéasome et présentés par les molécules de classe I selon un mécanisme appelé présentation croisée (Amigorena et Savina, 2010; Houde et al., 2003).

La présentation antigénique aux cellules T CD4<sup>+</sup> dépend des molécules de classe II. Elles sont des hétérodimères de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , toutes deux encodées par le CMH (Kumanovics et al., 2003). Les molécules de classe II (HLA-DR, -DP, -DQ) sont exprimées constitutivement par les CPA (DC, macrophages, cellules B et l'épithélium thymique). Elles présentent des peptides de 13-17 acides aminés dérivés des antigènes internalisés par macropinocytose, phagocytose et internalisation de l'espace extracellulaire à travers des récepteurs. Les molécules de classe II présentent également des antigènes dérivés du milieu intracellulaire par autophagie (Paludan et al., 2005; Zhou et al., 2005). Le chargement du peptide dans la niche des molécules de classe II est régulé par des molécules non classiques de classe II : DM et DO (Alfonso et Karlsson, 2000).

Pour les deux types de CMH, le site de liaison au peptide est un sillon composé d'un plancher de feuillet  $\beta$  à 7 brins et délimité par deux longues hélices (Madden et al., 1991; York et Rock, 1996). Un groupe de résidus polymorphiques à l'intérieur et autour du sillon de liaison fournit les variations requises dans la forme et dans les propriétés chimiques qui comptent pour les motifs de liaison spécifiques de peptides identifiés pour chaque allèle du CMH (Sadegh-Nasseri et al., 2010). Les extrémités du sillon de liaison du CMH I sont fermées. Les CMH I lient des peptides de longueurs de 8 à 9 résidus dans une conformation étendue avec les *termini* et les résidus ancrés enterrés dans les poches de spécificité qui diffèrent entre les allèles (Madden et al., 1991). Ce mode de liaison laisse les chaînes latérales du peptide pointant vers le haut pour des interactions directes avec le TCR. Des peptides de 10 acides aminés peuvent se lier soit par extension au C-terminal, soit par bourgeonnement hors du sillon de liaison après fixation conventionnelle des extrémités, amenant une surface additionnelle de reconnaissance par le TCR (Collins et al., 1994;

Madden et al., 1993). Le sillon de liaison du CMH II est ouvert et permet la liaison de peptides plus longs (Yaneva et al., 2010).

### *I. 1. 2. LE TCR ET LA DIVERSITÉ*

Comme l'organisme ne peut pas prédire les antigènes dérivés des pathogènes qu'il rencontrera, le système immunitaire dépend de la génération et du maintien d'un répertoire diversifié de TCR.

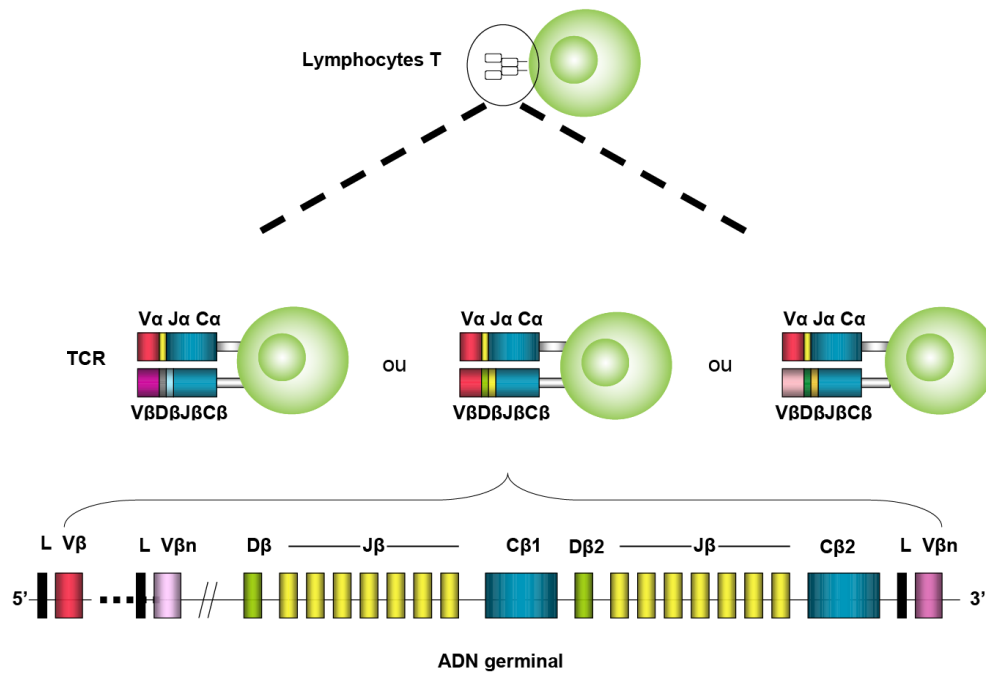
Les lymphocytes T présents en périphérie d'un individu sain sont une collection polyclonale de cellules très spécifiques. Ils sont capables de reconnaître un nombre d'antigènes immensément grand (Pantelouris, 1968). Leur TCR sont des hétérodimères exprimés à la surface cellulaire composés de deux chaînes ( $\alpha$  et  $\beta$  ou  $\gamma$  et  $\delta$ ) liées par un pont disulfure (Claverie et al., 1989; Davis et Bjorkman, 1988). Les TCR partagent une organisation de domaine et un mode de liaison similaires aux fragments Fab des immunoglobulines (Ig). Chaque chaîne du TCR est constituée d'un domaine variable et un domaine constant de type Ig, suivis d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique. Le TCR est formé par un réarrangement aléatoire et séquentiel de segments non contigus de gènes variables (V), de diversité (D), de jonction (J) et de la région constante (C) pour les chaînes  $\beta$  et  $\delta$ , suivi du réarrangement des segments V, J et C pour les chaînes  $\alpha$  et  $\gamma$  (Figure 1.1) au sein du thymus. Cette recombinaison arbitrée par la recombinaison RAG mène à l'excision des segments de gènes se situant entre les deux jonctions. Ces segments d'ADN coupés sont par la suite circularisés et sont appelés cercles d'excision du récepteur de cellules T (TREC, « T cell receptor excision circle »). Un TREC est produit pour chaque chaîne réarrangée. À la jonction entre les segments de gènes, une diversité supplémentaire est produite grâce à

l'ajout de nucléotides non encodés de manière germinale par la polymérase ADN TdT (« terminal deoxynucleotidyl transferase »). La diversité du TCR est donc générée par 1) les jonctions imprécises des segments coupés, 2) l'addition de nucléotides supplémentaires par la machinerie de réparation de l'ADN, et 3) la combinaison des différents segments.

Les TCR  $\alpha\beta$  produits lient les complexes CMH-peptide (CMH-p) à travers 3 régions hypervariables, appelées régions déterminantes de complémentarité (CDR « complementarity-determining regions », incluant CDR1, CDR2 et CDR3), présentes sur les domaines variables (Chothia et al., 1988; Davis et Bjorkman, 1988). La boucle de la CDR3 est particulièrement polymorphique et contient les jonctions entre les segments et la variabilité non-germinale. Elle joue un rôle dominant dans la reconnaissance du peptide.

Le biais d'affinité du TCR pour le CMH est sujet à de nombreux débats. Il serait dû, entre autre, aux corécepteurs CD4 ou CD8 associés à Lck, qui est nécessaire pour induire le signal de survie. Des travaux récents démontrent aussi que les domaines CDR1 et CDR2 (conservés car issus de la région V qui est encodée de manière germinale) de tous les segments V des TCR sont capables de se lier aux molécules du CMH (Huseby et al., 2005). Il y aurait donc une spécificité génétique inhérente des TCR pour le CMH.

L'éducation et la sélection des cellules T envers les CMH ont lieu dans différentes régions du thymus grâce à des interactions avec des cellules d'origines hématopoïétique et stromale. Deux processus, la sélection positive et la sélection négative, modélisent la diversité du répertoire des TCR portés par les cellules non auto-réactives relâchées en périphérie.



**Figure 1.1** : Recombinaison de la chaîne  $\beta$  et structure schématisée du TCR. Le TCR est unique parce qu'il est formé par des réarrangements aléatoires des segments de gènes V, D et J pour la chaîne  $\beta$  suivis de V et J pour la chaîne  $\alpha$  conduits par la recombinaison RAG au sein du thymus. Un degré additionnel de diversité est ajouté par la polymérase TdT qui ajoute des nucléotides non codés de manière germinale à la jonction des segments de gènes.

## I. 2. GÉNÉRATION DES LYMPHOCYTES T CHEZ LES INDIVIDUS SAINS

Les cellules T sont générées par millions chaque jour à partir de progéniteurs T dérivés des cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui migrent périodiquement par le sang jusqu'au thymus à travers la jonction cortico-médullaire. Bien que de nombreux types de progéniteurs puissent générer des cellules T dans des conditions expérimentales, les résultats les plus récents favorisent un modèle dans lequel les colonisateurs thymiques physiologiques sont des cellules non engagées qui possèdent encore un potentiel myéloïde (Schlenner et al., 2010; Schlenner et Rodewald, 2010; Wada et al., 2008). Ils n'expriment ni



CD4, ni CD8 et sont appelés double-négatif (DN). Leur développement requiert des signaux des cellules stromales non-hématopoïétiques incluant des cellules épithéliales thymiques et des fibroblastes du mésenchyme. Leur différenciation est caractérisée par l'expression coordonnée et séquentielle de différentes protéines à la surface des thymocytes, incluant CD4, CD8, CD44 et CD25. Les ETP résident d'abord dans le cortex pour évoluer au stade DN1 (CD44<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup>) et DN2 (CD44<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>) puis atteignent la zone subcapsulaire durant leur progression en DN3 (CD44<sup>-</sup>/CD25<sup>+</sup>). C'est à ce stade que les thymocytes subissent le réarrangement des chaînes  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\beta$  du TCR (Taghon et Rothenberg, 2008).

### *I. 2. 1. LA SÉLECTION $\beta$*

Au stade DN3, à cause des délétions et additions de nucléotides par les recombinaisons déclenchées par RAG, la majorité des réarrangements de la chaîne  $\beta$  sont non-productifs. Lors d'un réarrangement productif d'une chaîne  $\beta$ , son association avec le complexe CD3 et la chaîne invariante du pré-TCR $\alpha$  permet de transmettre les signaux requis pour progresser vers l'étape suivante. En combinaison avec les signaux qui impliquent Notch1 et CXCR4, ils induisent la survie du thymocyte et enclenchent l'engagement vers la lignée  $\alpha\beta$ , l'expression des corécepteurs CD4 et CD8 et le réarrangement du locus TCR  $\alpha$  (Janas et al., 2010; Maillard et al., 2006; Starr et al., 2003). Les double-positifs (DP) CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> sont les premiers à exprimer des TCR  $\alpha\beta$  hétérodimériques à leur surface (Del Blanco et al., 2009). Par la suite, les thymocytes subissent une sélection positive et une sélection négative selon une séquence qui n'est pas encore tout à fait établie (Figure 1.2).

### I. 2. 2. *SÉLECTION POSITIVE ET RECONNAISSANCE DU CMH*

Le thymus a la capacité unique de développer des lymphocytes T tolérants au soi exprimant un vaste répertoire de TCR. C'est à travers leur spécificité antigénique dictée par leur récepteur que les lymphocytes T seront sélectionnés. Lorsqu'un précurseur DP exprime un TCR restreint au CMH de classe I ou II, il produit un signal qui entraîne la répression du gène RAG, la survie à long terme, la migration vers la medulla et la différenciation en cellule T mature (Wilkinson et al., 1995) (Figure 1.2). Parmi les cellules T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> qui produisent un TCR, seulement celles avec un TCR capable de se lier avec une affinité faible au complexe CMH-peptide (CMH-p) du soi (1-100 $\mu$ M) sur les cellules épithéliales corticales radio-résistantes du thymus reçoivent un signal de survie et passent la sélection positive (Starr et al., 2003). Le locus du TCR $\alpha$  est en réarrangement continu tant que la sélection positive n'est pas complète. En théorie, l'exclusion allélique fait en sorte qu'une seule chaîne  $\alpha$  productive par TCR puisse être produite. Les cellules qui ne reçoivent pas de signal de survie mourront par négligence. Ces processus permettent uniquement aux cellules avec un TCR fonctionnel de passer ce poste de contrôle. Cette petite fraction de cellules inhibera l'expression d'un de ces corécepteurs pour devenir CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. La reconnaissance de faible affinité d'un complexe du soi CMHI :peptide résulte en la perte du CD4 et la rétention d'un CD8, et similairement la reconnaissance du soi CMHII :peptide mène à la formation de cellules T CD4<sup>+</sup> (Singer et al., 2008).

### I. 2. 3. *SÉLECTION NÉGATIVE ET TOLÉRANCE CENTRALE*

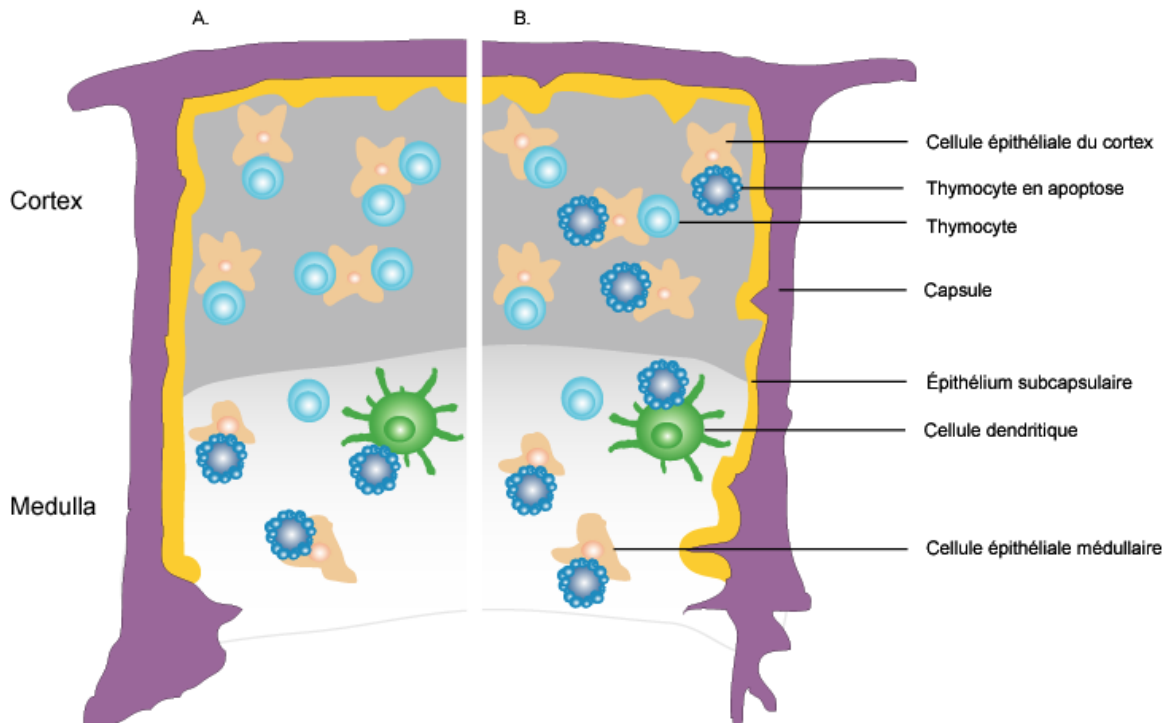
Alors que la sélection positive a pour but de sélectionner les lymphocytes T exprimant des TCR fonctionnels, la sélection négative modélise le répertoire préimmun en éliminant les

lymphocytes T auto-réactifs (Hogquist et al., 2005; Surh et Sprent, 1994). Le facteur de transcription AIRE (« auto-immune regulator ») induit l'expression ectopique des antigènes restreints aux tissus et organes par les cellules épithéliales thymiques de la medulla pour supprimer les cellules auto-réactives (Anderson et al., 2002; Huseby et al., 2005; Martins et al., 2008; Venanzi et al., 2008). Le syndrome polyglandulaire auto-immun de type I (APS-1; « type 1 autoimmune polyglandular syndrome »), aussi nommé APECED (auto-immunité multi-organe, « autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy ») est associé à des mutations dans le gène codant pour AIRE (Nagamine et al., 1997). Grâce à ce facteur de transcription, la sélection négative est un procédé très efficace qui élimine la majorité des lymphocytes T auto-réactifs, ce mécanisme est aussi appelé tolérance centrale.

Au cours de cette étape cruciale, 95% des thymocytes exprimant un TCR de haute affinité pour les CMH-p du soi sont éliminés par apoptose (Scollay et al., 1980). Il est généralement admis que c'est l'affinité du TCR pour le complexe CMH-p qui détermine si le thymocyte subira la sélection positive ou négative, bien que de nombreuses questions persistent sur la manière dont le TCR règle cette situation. De nombreux thymocytes CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> seraient éliminés à cause de la spécificité inhérente des TCR pour le CMH et les seules cellules qui survivent seraient celles avec des TCR qui contiennent des CDR3 interférant (de manière optimale mais pas excessive) avec la liaison CMH-CDR1/CDR2 (Jenkins et al., 2010; Marrack et al., 2008). Il a longtemps été suggéré que la sélection négative avait lieu à la suite de la sélection positive (Figure 1.2.A.). Cependant, certaines études ont démontré qu'il n'y avait pas d'obligation séquentielle: la sélection négative peut arriver avant ou après la sélection positive (Figure 1.2B.) (Baldwin et al., 1999; Ohashi et al., 1990; Spain et Berg, 1992). Il est probable que la majorité des thymocytes subit la sélection négative dans la medulla ou dans la jonction cortico-médullaire à cause de la présence importante des CPA qui expriment une

variété d'antigènes du soi dans cette zone. Cependant, il n'est pas certain que les thymocytes restreints au CMH de classe I doivent subir la sélection négative préférentiellement dans la medulla (Palmer, 2003).

Les cellules T qui survivent à la sélection thymique sortent du thymus et circulent dans le système sanguin et lymphatique. Elles constituent le répertoire préimmun jusqu'à l'activation par leur antigène. Même si la tolérance centrale est absolument nécessaire, elle n'est pas infaillible. Certaines cellules auto-réactives parviennent à s'échapper du thymus et circulent en périphérie. Ces cellules sont une menace importante contre différents organes puisque leur activation peut résulter en des maladies auto-immunitaires. D'autres mécanismes, regroupés sous le terme de tolérance périphérique, ont été mis en place par le système immunitaire pour prévenir l'activation de ces cellules. Entre autres, la présence des cellules Treg, la production d'IL-10, de TGF- $\beta$ , et l'expression de certaines molécules régulatrices à la surface des lymphocytes T activés permettent de contrôler l'activation de ces cellules auto-immunes.



**Figure 1.2:** Reconstitution thymique, sélection positive et sélection négative. A. sélection séquentielle. Les cellules épithéliales du cortex sont les CPA qui arbitrent la sélection positive alors que la medulla contient les cellules épithéliales et les cellules dendritiques, CPA efficaces pour la délection négative. Pour cette raison la sélection positive a lieu dans le cortex alors que la délétion des thymocytes réactifs au soi a lieu principalement dans la medulla. B. Sélection non-séquentielle. Une hypothèse alternative propose qu'une partie de la sélection négative ait lieu au sein du cortex (Palmer, 2003).

### I. 3. ESTIMATION DE LA DIVERSITÉ GÉNÉRÉE

La taille et la diversité du répertoire de cellules T naïves sont cruciales dans le façonnage de la réponse immunitaire envers un antigène donné. Pour soutenir le répertoire, environ  $10^8$  cellules T pourraient être produites chaque jour (Goronzy et Weyand, 2005; Kimmig et al.,

2002). L'estimation théorique de la diversité est gigantesque : plus de  $10^{15}$  TCR pourraient être produits (Davis et Bjorkman, 1988). Il est considéré que la sélection thymique limite la diversité du répertoire généré de 3 à 100 fois (Bouneaud et al., 2000; Ignatowicz et al., 1996; Tourne et al., 1995; Zerrahn et al., 1997). La limite supérieure théorique de la diversité serait donc plutôt de  $10^{13}$  (Nikolich-Zugich et al., 2004). En fait, une souris contient  $1-2 \times 10^8$  cellules T et un humain jusqu'à  $10^{12}$  (Arstila et al., 1999). Il est reconnu qu'au moins certaines de ces cellules T expriment le même TCR à cause d'expansion homéostatique intrathymique ou post-thymique des cellules T naïves et des expansions conduites par l'antigène, donc le nombre de TCR est probablement inférieur à ce chiffre. Des estimations dérivées des techniques d'immunoscope prédisent que le répertoire de cellules T naïves humaines porte  $2.5 \times 10^7$  TCR différents et celui des cellules mémoires, 100 fois moins (Arstila et al., 1999). Ainsi, il y a plusieurs ordres de magnitude de différence entre la diversité théorique et la diversité réelle des individus. Cette réserve énorme de diversité mène à des différences dans les répertoires TCR exprimés chez des individus génétiquement identiques.

Ajouté à la diversité génétique, il est possible que certaines cellules T expriment deux TCR différents (avec deux différentes chaînes  $\alpha$  s'assemblant avec la même chaîne  $\beta$ , à cause de défauts dans le processus d'exclusion allélique au TCR- $\alpha$ ). La fréquence maximale de ces cellules pourraient atteindre 30% (Padovan et al., 1993; Petrie et al., 1993). Cependant, il est possible que la majorité des deuxièmes TCR de ces cellules ne fonctionnent pas correctement avec les molécules du CMH du soi et leur contribution à la diversité est discutable.

## I. 4. RÉACTIVITÉ CROISÉE ET ALLORÉACTIVITÉ

À la diversité des TCR produits, il faut aussi ajouter la diversité des antigènes qu'ils peuvent reconnaître. En effet, le nombre de TCR en périphérie ne reflètent pas le nombre d'antigènes reconnus. Un important degré de diversité est ajouté par la réactivité croisée : la capacité des TCR à reconnaître différents complexes CMH-p, tout en conservant une spécificité de reconnaissance suffisamment élevée pour que le répertoire puisse répondre au non-soi sans attaquer le soi (Mason, 1998; Regner, 2001; Zinkernagel, 2002). Certains proposent même que la réactivité croisée apporte autant de diversité à la reconnaissance antigénique que la diversité structurale du TCR (Mason, 1998). En réalité, l'apport de la réactivité croisée et ses limites dans la défense contre les pathogènes restent très mal compris.

La réactivité croisée des TCR est aussi observée dans un contexte de disparité HLA: un TCR réactif à un complexe CMH-p du non-soi (Melenhorst et al., 2011). Ce phénomène est appelée alloréactivité. Selon les études, 1 à 10% des lymphocytes T reconnaissent et répondent aux CMH du non-soi (Sherman et Chattopadhyay, 1993). D'un point de vue structural, l'alloréactivité ne semble pas se distinguer du modèle de reconnaissance des TCR syngéniques (Housset et Malissen, 2003; Rudolph et al., 2001). L'alloréactivité est la raison moléculaire des réactions de rejets et de la maladie du greffon contre l'hôte suivant les transplantations de cellules souches hématopoïétiques allogéniques en incompatibilité partielle au niveau des HLA. Les associations TCR/CMH-p sélectionnés dans le thymus sont de faible affinité (1-100 $\mu$ M), créant des opportunités pour la réactivité croisée en périphérie. La sélection thymique ne peut pas sélectionner des TCR d'affinité substantiellement plus haute ou plus basse sinon trop peu émergeraient pour combattre le répertoire antigénique des microorganismes en perpétuel changement. Ainsi, l'alloréactivité

des TCR semble être une conséquence naturelle de la nécessité de balayer rapidement le répertoire de complexe CMH-p sur la surface cellulaire (Sherman et Chattopadhyay, 1993).

## I. 5. LA RÉPONSE DES LYMPHOCYTES T

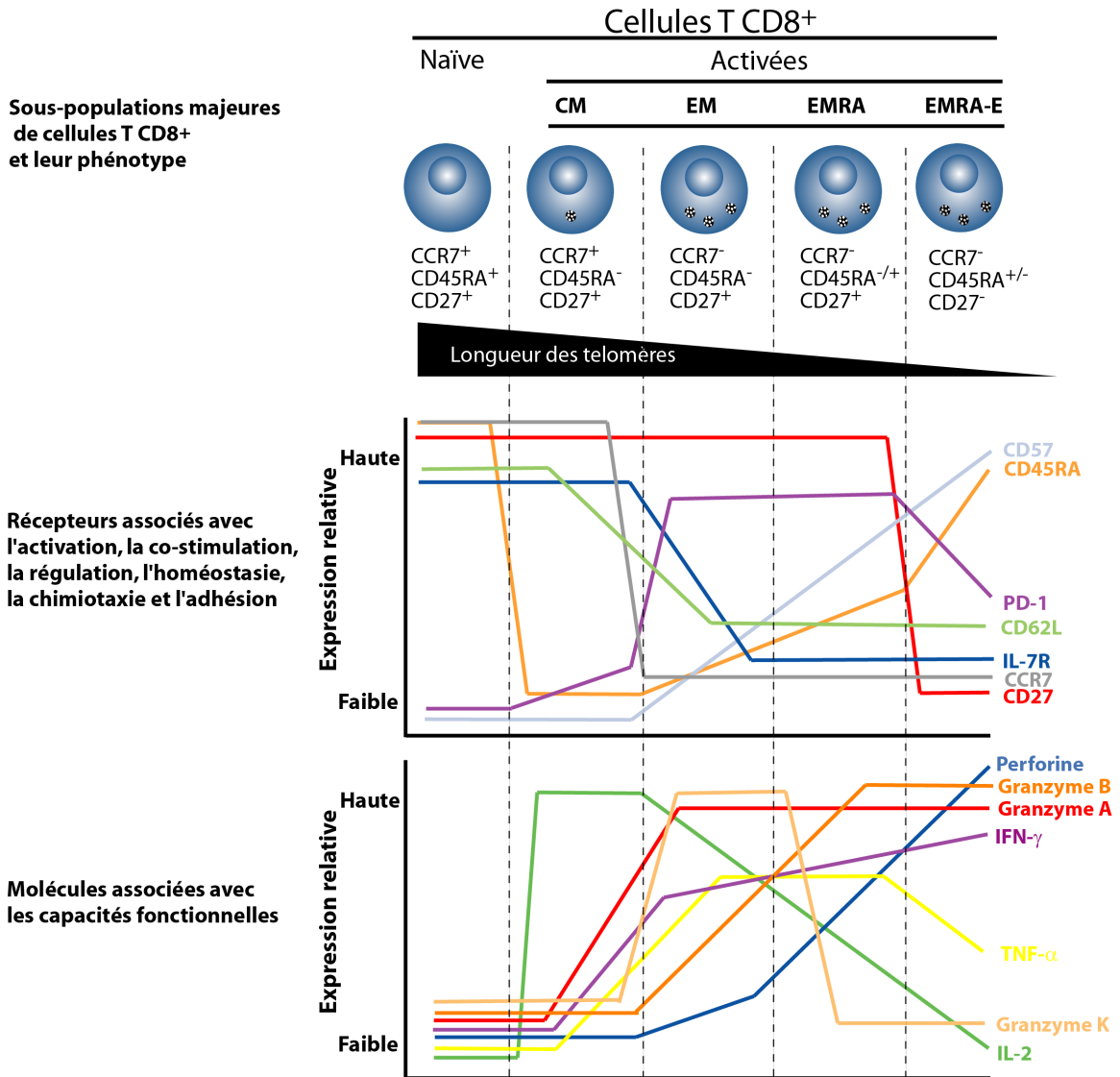
### *I. 5. 1. PHÉNOTYPE DES LYMPHOCYTES T CD8<sup>+</sup>*

Au degré de diversité porté par les TCR, s'ajoutent la diversité phénotypique et la diversité fonctionnelle des lymphocytes T. En effet, les lymphocytes T ont la capacité de se différencier en sous-populations distinctes regroupées en fonction de leur phénotype. En 2008, plusieurs experts de cytométrie se sont réunis pour établir un consensus phénotypique. Ils proposent la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en 4 populations : naïve, central-mémoire (CM), effecteur-mémoire (EM), effecteur terminaux (EMRA et EMRA-E) (Figure 1.3) (Appay et al., 2008). Les cellules T naïves, incluant le répertoire préimmun, sont définies par l'expression de CD45RA et des marqueurs de costimulation CD27 (de la famille du TNF) et CD28 (Dutton et al., 1998). Elles circulent continuellement du sang vers les organes lymphoïdes secondaires et des ganglions au sang via les vaisseaux lymphatiques grâce à l'expression additionnelle de CCR7 (récepteur de chimiokine) et de CD62L (molécule d'adhésion), jusqu'à rencontrer leur antigène présenté par une cellule dendritique mature dans un ganglion (Weinreich et Hogquist, 2008). Elles sont alors activées et se différencient en cellules CM (CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>), EM (CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>), EMRA (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>) ou EMRA-E (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>) (Romero et al., 2007; Sallusto et al., 1999) (Figure 1.3). Les cinq sous-groupes de lymphocytes T jouent des rôles différents dans le contrôle des pathogènes et des cancers. Ce système de



différenciation permet de fournir à la fois des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécialisés dans le contrôle immédiat de l'infection grâce à leurs fonctions effectrices puissantes (EMRA et EMRA-E), et des lymphocytes T persistants qui assureront la protection lors de nouvelles infections (les CM). Après une première infection, les lymphocytes T CM demeurent dans les organes lymphoïdes secondaires et servent de précurseurs aux lymphocytes T effecteurs CCR7<sup>-</sup> (EM et EMRA) en cas de réinfection, ces derniers demeurent en périphérie (Lanzavecchia et Sallusto, 2005; Sallusto et al., 1999).

Ainsi, le phénotype nous renseigne sur l'état de différenciation et d'activation des lymphocytes T. Néanmoins, il ne définit pas complètement le potentiel de réponse des lymphocytes T.



**Figure 1.3** : Expression de différentes molécules en fonction de l'état de différenciation. IL : interleukine, CCR7 : « *C-C chemokine receptor type 7* », IL-7R : récepteur de l'IL-7 (CD127), PD-1 : « *programmed death 1* » (CD279), IFN : Interferon, TNF : « *tumor necrosis factor* ». Figure adaptée de Appay *et al.*, 2008 avec la permission de l'auteur.

## *I. 5. 2. LA FONCTION*

L'expression différentielle des récepteurs de surface reflète les besoins distincts de ces sous populations en termes de stimulation et de survie, ainsi que des fonctions effectrices et un potentiel de migration (aux ganglions ou aux tissus périphériques) spécifiques. L'affinité du TCR pour son antigène semble avoir une influence sur la différenciation phénotypique et fonctionnelle (Gerlach et al., 2010; Schmid et al., 2010). Cependant, sa contribution exacte ainsi que celle d'autres événements indépendants ne sont pas claires.

De manière générale, une série de fonctions est utilisée pour caractériser les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> : la capacité proliférative, la production de cytokines et de chimiokines, et l'activité cytotoxique. Le dogme de la différenciation propose que plus un lymphocyte T est différencié, plus ses fonctions effectrices sont fortes, plus il a proliféré, moins il produit de l'IL-2 et moins ses télomères et sa durée de vie sont longs (Figure 1.3) (Appay et al., 2008). Traditionnellement, les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> peuvent être évaluées par l'expression des granzymes, de la perforine et de l'IFN- $\gamma$  ou bien par un test de cytolyse directe. La capacité proliférative est étudiée en mesurant les niveaux d'IL-2 ou en effectuant des tests de prolifération.

Ces dernières années, le concept de qualité de la réponse T a émergé et se définit comme l'ensemble des molécules produites simultanément par chaque cellule. Elle s'ajoute au phénotype et à la fréquence des lymphocytes T antigène-spécifiques pour définir une réponse T « parfaite ». Plus un lymphocyte T exprime de fonctions différentes simultanément (polyfonctionnalité), plus la qualité de la réponse est grande, et plus il est efficace (Darrach et al., 2007; Harari et al., 2004). L'étude de la combinaison IFN- $\gamma$  et IL-2 est la plus utilisée pour définir les populations T antigène-spécifiques polyfonctionnelles, bien

que la cytolysse soit l'arme la plus importante des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> *in vivo* (Pantaleo et Koup, 2004). Finalement, alors que seules les fonctions effectrices (IFN- $\gamma$  et activité cytotoxique) sont essentielles au pic de l'infection, la polyfonctionnalité est primordiale pour le maintien de la mémoire et le contrôle des infections chroniques (Harari et al., 2006).

### I. 5. 3. L'ÉPUISEMENT DES LYMPHOCYTES T

Au cours des dernières années, la notion d'épuisement clonal des lymphocytes T a émergée comme facteur clé de leur dysfonctionnement et de leur incapacité à contrôler des infections malgré des fréquences élevées d'effecteurs. Ces populations sont classiquement définies par l'expression de molécules de régulation, en particulier PD-1 (« programmed death-1 », CD279) de la famille du CD28/CTLA-4 (Figure 1.3). Le récepteur PD-1 a été découvert en 1992 en tant que gène surexprimé dans un hybridome de cellules T subissant la mort cellulaire (Ishida et al., 1992). Le rôle primordial de cette molécule fut révélé par la susceptibilité accrue à l'autoimmunité des souris *Pdcd1*<sup>-/-</sup> en 1999 (Nishimura et al., 1999; Nishimura et al., 2001). Chez l'homme, l'expression de PD-1 est augmentée à la surface des lymphocytes T activés de manière chronique (exemples des infections du virus de l'hépatite C (VHC) et du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et de la leucémie myéloïde chronique) (Day et al., 2006; Mumprecht et al., 2009). Suite à la liaison avec son ligand PD-L1 (B7-H1, CD274) ou PD-L2 (B7-DC; CD273), PD-1 prévient la réponse effectrice (particulièrement au niveau de la production de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-2), inhibe les facteurs de transcription GATA-3, Tbet et Eomes, et finalement perturbe la signalisation du TCR (Keir et al., 2008; Nurieva et al., 2006). L'expression de PD-1 est aussi associée à des défauts de prolifération, de survie (inhibition de Bcl-xL) et à une sensibilité accrue à l'apoptose (Blackburn et al., 2008; Day et al., 2006; Petrovas et al., 2006). Les mécanismes

reliés à la délétion clonale des lymphocytes T épuisés commencent seulement à être expliqués. Chez la souris, il a été démontré que les lymphocytes T épuisés expriment plus faiblement la chaîne  $\beta$  du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15 et le CD127 (récepteur de l'IL-7). Ils répondent faiblement à l'IL-7 et à l'IL-15 qui sont des cytokines clé de survie et de prolifération des cellules T naïves et mémoires (Bosco et al., 2005; Purton et al., 2007; Schluns et al., 2000; Tan et al., 2001; Tan et al., 2002). Chez l'homme, les lymphocytes T expriment de faibles niveaux de CD127 lors d'infections chroniques. Ces cellules, en plus d'inhiber Bcl-xL et d'être fortement susceptibles à l'apoptose, recevraient donc moins de signaux de survie. Ultiment, l'épuisement clonal a comme conséquence une baisse de diversité et la disparition progressive des cellules T stimulées chroniquement. De plus, l'absence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> aggrave le phénotype d'exhaustion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Virgin et al., 2009; Wherry, 2011).

En plus de PD-1, il existe de nombreux récepteurs de surface inhibiteurs qui corégulent l'épuisement des cellules T. Les cellules T spécifiques aux virus lors des infections persistantes expriment également LAG-3, 2B4, CD160, TIM3 et CTLA-4 (« cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 »). LAG-3 est une molécule inhibitrice homologue à CD4 qui se lie au CMH de classe II. CTLA-4 est une molécule coinhibitrice très étudiée qui rivalise avec CD28 (molécule de costimulation) pour se lier à B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86). Le TGF- $\beta$  a aussi été lié à l'épuisement et la dysfonction de la cellule T dans le cas des infections au VIH et au VHC, bien que les mécanismes n'aient pas encore été résolus (Alatrakchi et al., 2007; Garba et al., 2002).

L'épuisement est une caractéristique à part entière et s'ajoute aux phénotypes naïf, CM, EM et EMRA pour définir le potentiel d'une population de lymphocytes T. L'expression de PD-1

sur les lymphocytes T activés est essentielle pour contrôler les réponses immunitaires invasives mais peut aussi nuire à l'efficacité des réponses contre les infections persistantes.

## II- LA TRANSPLANTATION DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES

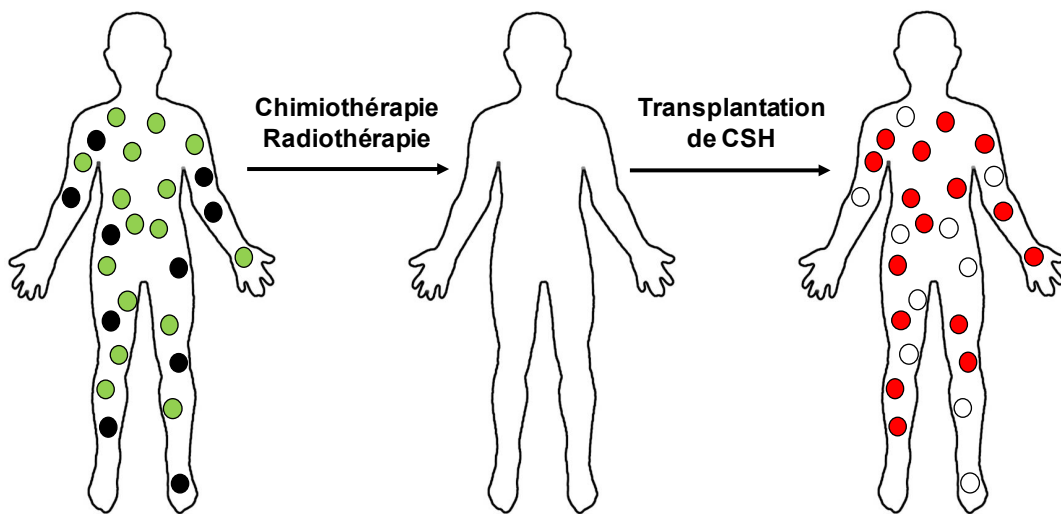
### II. 1. GREFFE ET CONDITIONNEMENT

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH) est utilisée pour traiter de nombreuses maladies hématologiques malignes et non malignes telles que les aplasies médullaires congénitales ou acquises, des anomalies innées du métabolisme, ainsi que des hémoglobinopathies et déficits immunitaires congénitaux (Barker et Wagner, 2003). Elle permet de remplacer le système hématopoïétique et immunitaire déficient ou malin (Figure 1.4).

Avant d'effectuer une TCSH, il faut conditionner le receveur pour éliminer les cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse (MO), supprimer les cellules tumorales et les cellules du système immunitaire (Figure 1.4). Ce processus permet de réduire au maximum la maladie résiduelle, de faire de la place dans les niches de la MO, de prévenir le rejet par les cellules immunitaires du receveur et de favoriser la prise de la greffe. Il existe deux types de conditionnement : le myéloablatif, fortement immunosuppresseur, et le non-myéloablatif, d'intensité réduite. Le choix du type de conditionnement dépendra du type de la maladie (maligne: souvent myéloablatif) et de l'âge du patient (>50 ans : souvent conditionnement réduit) (Laport et al., 2008; Sorror et al., 2005). Traditionnellement, les régimes myéloablatifs incluent de fortes doses de radiothérapie (1200 Grey fractionnés en 8 doses) ou du busulfan, ainsi que de la cyclophosphamide; alors que les régimes d'intensité

réduite incluent de faible dose de radiothérapie ou de la fludarabine. L'utilisation de la globuline anti-thymocyte (ATG, « anti-thymocyte globulin ») contribue à la déplétion des lymphocytes T du receveur.

La greffe en elle-même consiste en une transfusion de CSH, qui migreront jusqu'à la MO grâce à des gradients de chimiokines telles que CXCL-12 (ou SDF-1, «stromal cell derived-factor 1»). Certaines de ces cellules se différencieront pour reconstituer les systèmes hématopoïétique et immunitaire (Copelan, 2006) (Figure 1.4).



**Figure 1.4.** Transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les cercles noirs et les cercles verts représentent les CSH et les lymphocytes T du receveur, présents avant la greffe. Les cercles blancs et les cercles rouges représentent les CSH et les lymphocytes T du donneur présents chez le receveur après la greffe.

## II. 2. L'ALLOGREFFE

Les CSH peuvent provenir du patient lui-même (autogreffe) ou d'un individu sain (allogreffe). L'autogreffe est couramment utilisée chez les patients pédiatriques ayant une tumeur solide, telle un neuroblastome, et qui ont subi une chimiothérapie lourde ayant endommagé sévèrement leur système immunitaire (Grupp et al., 2000; Matthay et al., 1999). Dans le cas d'une allogreffe, communément utilisée pour les maladies hématologiques, le donneur peut être apparenté (membre de la famille) ou non-apparenté. Traditionnellement, le sang périphérique et la MO étaient les deux sources de cellules progénitrices utilisées en TCSH. Les CSH du sang périphérique sont prélevées par cytophérèse après mobilisation par un facteur de croissance hématopoïétique, le G-CSF (« granulocyte-colony stimulating factor ») (Bensinger et al., 1995). La MO est prélevée sous anesthésie générale au niveau des crêtes iliaques postérieures (Bosi et Bartolozzi, 2010; Buckner et al., 1984; Lipton, 2003).

La possibilité de transplanter un patient est déterminée par sa compatibilité avec le donneur, définie comme le partage de la majorité voire la totalité (haploidentiques) des gènes encodant les molécules du CMH sur le locus HLA. Malheureusement, seulement 30% des patients ont un donneur apparenté compatible. Pour les 70% restants, la recherche du greffon doit reposer sur le registre mondial des donneurs, ce qui peut prendre plus de 4 mois (Barker et Wagner, 2003). Durant cette période, la progression de la maladie et la toxicité du traitement peuvent mener à une détérioration du pronostic. Il était donc nécessaire de développer des traitements alternatifs.



## II. 3. LA TRANSPLANTATION DE SANG DE CORDON OMBILICAL (TSCO)

Longuement considéré comme un déchet biologique, le SCO est reconnu pour sa richesse en CSH depuis plus de 35 ans. En 1974, Knudtzon *et al.* ont rapporté que des cellules formant des colonies granulocytaires pouvaient se développer *in vitro* à partir du SCO (Knudtzon, 1974). Plusieurs années plus tard, Broxmeyer *et al.* ont établi qu'un SCO contenait un nombre suffisamment important de CSH pour être transplantable (Broxmeyer et al., 1989). La première TSCO était une allogreffe apparentée, complétée par le Dr Éliane Gluckman et son équipe en 1988 à l'hôpital Saint-Louis de Paris chez un enfant atteint d'une anémie de Fanconi, maladie génétique rare classifiée parmi les insuffisances médullaires héréditaires (Gluckman et al., 1989).

Le SCO, et le sang placentaire (50 mL à 250 mL) sont recueillis après section du cordon suite à l'accouchement. Le sang peut être collecté alors que le placenta est encore dans l'utérus (*in utero*) ou après que le placenta ait été expulsé de l'utérus (*ex utero*) par prélèvement à travers la veine ombilicale. Le SCO est ensuite analysé pour déterminer la quantité de CSH, vérifier l'absence d'agents infectieux et génotyper pour connaître son HLA. Par la suite, le sang est traité pour éliminer en partie la fraction érythrocytaire, puis congelé en banques d'azote liquide. Les données cliniques concernant les greffons de SCO sont disponibles sur le registre mondial des donneurs (<http://www.marrows.org/>). Plus de 20 000 TSCO ont été rapportées dans le monde depuis 1989 et plus de 600 000 unités de SCO sont présentement conservées dans plus de 100 banques publiques et privées de SCO (Gluckman, 2011). En 2010, 1150 TSCO ont été supervisées par le «National Marrow Donor Program» (NMDP), représentant 22% du nombre total de transplantations coordonnées par cet organisme et une augmentation de 9% par rapport à 2009 (<http://www.marrows.org/>). Les TSCO sont généralement non-apparentées parce que les échantillons de SCO sont conservés de

manière anonyme dans les banques publiques et que cette procédure est associée à une faible incidence de la GvHD, telle que discutée plus bas. Elles sont effectuées chez les patients pédiatriques lorsqu'un donneur compatible n'est pas disponible au sein de leur famille.

## II. 3. 1. AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS

La TSCO comporte plusieurs avantages comparativement à une transplantation de MO (TMO) (Tableau I). Son principal bénéfice est la faible incidence de la maladie du greffon contre l'hôte (« graft-versus-host disease », (GvHD)) comparativement à la TMO. La GvHD survient lorsque les lymphocytes T du donneur (greffon) reconnaissent et sont activés par les molécules du CMH exprimés par les tissus de l'hôte, entraînant une production subséquente de cytokines qui génèrent des réactions inflammatoires au niveau de la peau, du tractus gastro-intestinal et/ou du foie et dont la gravité peut varier (Przepiorka et al., 1995). Cette maladie est donc directement reliée au degré de disparité donneur-receveur au niveau du CMH. La possibilité de transplanter des SCO avec des compatibilités HLA moins élevées entre donneur et receveur permet d'aller chercher un plus grand nombre de donneurs. En conséquence, des unités de SCO éligibles peuvent être trouvées pour la quasi-totalité des sujets qui n'ont pas accès à un donneur de MO apparentée compatible.

D'autres avantages de la TSCO comprennent également un risque quasi-nul de transmission d'infections virales du donneur au receveur, le sang de cordon n'étant que rarement contaminé par des virus latents (Gluckman et al., 1997; Rubinstein et al., 1998); l'amélioration de l'équilibre ethnique grâce à la conservation en banque des SCO plutôt que de dépendre de donneurs volontaires; et le délai plus court entre la décision de greffer et la

transplantation (Rubinstein et al., 1993; Wagner et al., 2006). De plus, les risques pour le donneur sont inexistant.

La TSCO comporte néanmoins certains inconvénients (Tableau I). Premièrement, une unité de SCO contient 1 à 2  $\log_{10}$  de moins de cellules nucléées qu'une unité de MO et le nombre de progéniteurs hématopoïétiques est limité (Barker et Wagner, 2003). Pour cette raison, l'incidence de non-prise de greffe est plus importante (10-15% vs 2%) et la TSCO était initialement restreinte aux patients pédiatriques (<40-50 kg). Deuxièmement, la reconstitution myéloïde est plus lente et la prise de la greffe retardée comparativement à une TMO (26 vs 18 jours pour la détection des neutrophiles en périphérie et 44 vs 24 pour la détection des plaquettes en périphérie pour la TSCO vs la TMO) (Dalle et al., 2004; Rocha et al., 2000; Rubinstein et al., 1998; Thomson et al., 2000; Wagner et al., 1996). Troisièmement, les infections opportunistes (IO) sont une cause majeure de morbidité et mortalité (50% des patients) et leur incidence est particulièrement élevée dans les 100 premiers jours suivant la TSCO (Barker et al., 2005a; Rocha et Gluckman, 2006; Rocha et al., 2000; Rubinstein et al., 1998). Finalement, l'incidence de la rechute de leucémie (au moins 20% à 2 ans post-TSCO) et de la GvHD (au moins 20% de GvHD chronique et aigüe) ont un impact significatif sur la survie des jeunes greffés, même si ces complications demeurent moins fréquentes qu'après une TMO (Eapen et al., 2007; Kurtzberg et al., 2008; Rocha et al., 2001).

**Tableau 1.I. Avantages et inconvénients de la TSCO comparativement à la TMO.**

Adapté de (Merindol et al., 2011b).

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
Organisation pratique des greffons	Nombre limité de CSH
Absence de risque pour le donneur	Incidence élevée d'échec de greffe
Équilibre ethnique amélioré	Prise de greffe retardée
Permet une plus grande disparité HLA	Reconstitution myéloïde plus lente
Incidence de GvHD plus faible	Donneur n'est plus disponible si nécessaire
Peu ou pas de contamination virale du greffon	Taux élevé de la morbidité reliée aux infections dans les 3-6 mois post-TSCO

Un important défi est de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ces complications. Il importe de surmonter ces limitations en développant de nouvelles stratégies immunothérapeutiques pour améliorer la prise de la greffe, diminuer l'incidence des IO et de la rechute de leucémie, sans pour autant accroître la fréquence et la sévérité de la GvHD. Les IO, en particulier les infections virales, sont normalement contrôlées par les lymphocytes T. Ces derniers jouent également un rôle fonctionnel dans la prise de greffe, l'effet greffon contre leucémie (GvL) et la GvHD. Il est donc primordial de mieux connaître leur rôle afin d'améliorer les résultats de cette procédure et la survie des receveurs de TSCO.

## III- PROPRIÉTÉS DES LYMPHOCYTES T DU SANG DE CORDON OMBILICAL

### III. 1. FONCTIONNALITÉ DES LYMPHOCYTES T DU SCO

Tel que décrit plus tôt, les patients sont immunosupprimés pour permettre la prise de la greffe et la reconstitution immunitaire peut prendre plusieurs mois. Dans le contexte de la TMO, les lymphocytes T jouent un rôle essentiel dans la protection contre les pathogènes et les tumeurs (Reusser et al., 1991). Le SCO contient de nombreux lymphocytes T qui, en théorie, peuvent fournir temporairement un certain degré de protection immunitaire au patient. Cependant, il existe de nombreuses différences entre les lymphocytes T dérivés du SCO et ceux dérivés de la MO et du sang périphérique de l'adulte (SA), aussi bien au niveau de la composition des populations présentes que de leurs propriétés.

D'abord, le ratio des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> est plus élevé dans le SCO que dans la moelle osseuse (MO) (3 versus 1.4) (Theilgaard-Monch et al., 2001). Le SCO contient très peu de cellules T  $\gamma\delta$  (Morita et al., 1994). Le sang fœtal et le SCO contiennent aussi plus de lymphocytes T régulateurs (Mold et al., 2008) (Takahata et al., 2004). Les cellules T du SCO sont en majorité des émigrants récents du thymus de phénotype naïf. 67-80% des lymphocytes T du SCO expriment CD31<sup>+</sup> ou contiennent des TRECs par rapport à 50% des lymphocytes T d'un jeune adulte (Table 2) (Douek et al., 1998; Junge et al., 2007; Szabolcs et al., 2003). En somme, le SCO contient essentiellement des lymphocytes T préimmuns.

#### III. 1. 1. RÉPERTOIRE PRÉIMMUN OU IMMATURITÉ?

Le répertoire des lymphocytes T du SCO contient une grande diversité de TCR et une population polyclonale (Darrah et al., 2007; Garderet et al., 1998). Néanmoins, leur état pré-

immun les rend moins rapides et moins efficaces à répondre à un antigène que des lymphocytes T ayant déjà eu une expérience antigénique, tels que les cellules T CM présentes chez l'adulte.

En plus de leur caractère préimmun, les premières études ont suggéré que les cellules T du SCO avaient une fonctionnalité réduite et altérée (Harris et al., 1992; Nonoyama et al., 1995). Il a même été postulé que les cellules T du SCO étaient fonctionnellement « immatures » et incapables de monter une réponse antivirale ou anti-tumorale efficace (Krogstad et al., 1992; Meyers et al., 1980; Sharp et al., 1992; Wilson et al., 1992). Plusieurs études ont proposé que la réactivité diminuée des lymphocytes T du SCO était due à leur faible niveau d'activation, la faible fréquence de lymphocytes T mémoires, ou à des différences intrinsèques entre des lymphocytes T naïfs du cordon et ceux de l'adulte.

L'équipe de Joseph M. McCune a récemment démontré que les cellules T CD4<sup>+</sup> fœtales et adultes différaient au niveau fonctionnel, et qu'elles émergeaient de différentes populations de CSH ou de CSH présentes à des stades distincts de développement (Mold et al., 2010). Comme chez les espèces murines et aviaires, il y aurait deux vagues de production hématopoïétique au cours de la vie : la première provenant des CSH fœtales, initialement installées dans le foie, et la deuxième provenant des CSH de la MO. Ces deux vagues mènent à la production de lignées lymphocytaires à différents stades de développement. La population lymphocytaire fœtale porterait des propriétés fonctionnelles de type tolérogène. Les auteurs proposent que la première vague de lymphocytes formés au stade fœtal soit encore présente à la naissance, en plus de la deuxième vague de lymphocytes aux propriétés de type « adulte ». La confirmation de la présence abondante de ces cellules fœtales aux propriétés tolérogènes dans le SCO expliquerait effectivement une différence fonctionnelle importante entre les lymphocytes T du SCO et ceux de la MO.

Kloosterboer *et al.* ont démontré qu'après 1-3 jours de stimulation avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, le SCO contenait un nombre similaire de cellules T activées et en prolifération que le SA, mais un niveau d'activation plus bas, comme s'ils se différenciaient en un état fonctionnel intermédiaire (Kloosterboer *et al.*, 2006). D'autres études ont démontré que, comparativement au SA, plus de cellules T du SCO progressaient à travers le cycle cellulaire et entraient en apoptose, corrélant avec un niveau plus élevé d'expression de télomérase (Tableau 2) (Chalmers *et al.*, 1998; Kadereit *et al.*, 2003; Kaminski *et al.*, 2003; Risdon *et al.*, 1994b). De plus, NFAT<sub>c2</sub>, un facteur de transcription critique impliqué dans la régulation positive des cytokines et qui amplifie les réponses des cellules T, est exprimé à des niveaux plus bas dans les cellules T du SCO par rapport aux cellules T du SA (Kadereit *et al.*, 2003; Kaminski *et al.*, 2003; Weitzel *et al.*, 2009). Par ailleurs, les cellules T du SCO produisent moins d'IL-2, d'IL-4, d'IL-10, et d'IFN- $\gamma$ , et expriment des niveaux plus faibles de granzyme et de perforine (Berthou *et al.*, 1995; Kloosterboer *et al.*, 2006). La majorité de ces molécules sont caractéristiques de la réponse pro-inflammatoire T<sub>H1</sub>. Puisque les cellules T du SCO produisent également plus d'IL-13 en réponse à la stimulation, il a été proposé que leur phénotype était biaisé vers des réponses anti-inflammatoires ou allergiques de type T<sub>H2</sub> (Ribeiro-do-Couto *et al.*, 2001)(Tableau 2).

Les premières études ont donc suggéré que les cellules T du SCO avaient un faible pouvoir antiviral et anti-tumoral. L'explication étant que le biais T<sub>H2</sub> ou Treg était causé *in utero* par les facteurs placentaires (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , prostaglandin E2) impliqués dans le maintien de la grossesse (Burchett *et al.*, 1992; Mold *et al.*, 2010).

### III. 1. 2. RÉPONSE IN VIVO

Des données récentes indiquent que certains SCO contiennent des cellules T CD4<sup>+</sup> de type T<sub>H</sub>1 et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ayant une expérience antigénique, incluant certaines cellules spécifiques pour les antigènes mineurs d'histocompatibilité (AgmH) maternels (Mommaas et al., 2005). Il a été également démontré que les infections virales intra-utérines telles que celles causées par le cytomégalovirus (CMV), peuvent générer des réponses Th1 chez les nouveaux-nés (Marchant et Goldman, 2005; Tu et al., 2004). De plus, les enfants nés de mères infectées par *Plasmodium falciparum* ou par le VIH comptent des lymphocytes T activés fonctionnels dans leur SCO (Malhotra et al., 2008).

Dans le contexte d'une TSCO, l'apparition de la GvHD aigue (dans les 100 premiers jours post-greffe) chez certains patients démontre que les lymphocytes T du cordon sont capables de monter des réponses effectrices. Paradoxalement, l'incidence faible de cette complication et la morbidité élevée reliée aux IO pendant cette même période amène à se questionner quant à leur potentiel fonctionnel. Le phénotype naïf des lymphocytes T du SCO contribuent certainement à cette réactivité réduite par rapport aux lymphocytes T activés présents dans la MO ou le SA.



**Tableau 1.II.** Propriétés des cellules T du sang de cordon ombilical comparativement à leurs homologues du sang périphérique adulte. Adapté de (Merindol et al., 2011b).

Nombre et fréquence	Fréquence similaire de lymphocytes T totaux, haute expression de CD3.
Phénotype	Naïf : CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup>
Prolifération/apoptose	Entre en apoptose plus rapidement Expression élevée de télomérase
Production de cytokine	Biais de type T <sub>H</sub> 2/T <sub>C</sub> 2 et Treg Expression inférieure d'IL-2, IL-4, IL-10 et d'IFN- $\gamma$ Expression supérieure d'IL-13
Potentiel cytotoxique	Problème d'expression de granzyme et perforine Faible expression de NFATc2

### III. 1. 3. RÉPONSE ALLORÉACTIVE

La TSCO a souvent lieu dans un contexte de disparité HLA. Il est ainsi important de prendre en considération la reconnaissance par les lymphocytes T issus du greffon des antigènes présentés par les CMH non appariés du receveur. Selon les études, 1 à 10% de lymphocytes T sont alloréactifs, ils reconnaissent et répondent aux CMH du non-soi (Sherman et Chattopadhyay, 1993). Melenhorst et al. ont même mesuré que 86% des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> du SCO seraient activés (mesuré par l'expression du marqueur CD38) par une interaction avec des cellules cibles en disparité HLA (Melenhorst et al., 2011). Malheureusement, le type de réponse induite n'a pas été investiguée.

Leung *et al.*, ont démontré que, suivant la stimulation allogénique, les lymphocytes T du SCO qui atteignent un état de différenciation plus élevé que les lymphocytes T d'adultes,

produisent moins d'IFN- $\gamma$ . Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, en particulier, acquièrent un profil Th2 (Leung et al., 1999). Risdon *et al.*, ont observé qu'en culture mixte, les lymphocytes T du SCO avaient une capacité proliférative similaire mais une capacité cytotoxique inférieure à celles des lymphocytes T d'adultes (Risdon et al., 1994a). De plus, Harris *et al.*, ont établi par dilution limite que les cellules T du SCO était 10-1000 fois moins alloréactives, en terme de cytotoxicité et de capacité proliférative que des lymphocytes T d'adultes (Harris et al., 1994). Cependant, Falkenburg *et al.* ont démontré que le SCO contenait une fréquence similaire de précurseurs T cytotoxiques contre les antigènes mineurs non-héréditaires maternels et paternels, démontrant un potentiel alloréactif cytotoxique complet envers ces antigènes (Falkenburg et al., 1996). Ainsi, il est certain que le SCO contient des lymphocytes T alloréactifs. Néanmoins, le débat persiste quant à leur capacité fonctionnelle à combattre des infections virales et des cellules tumorales dans un contexte de compatibilité comme de disparité HLA. Leur rôle chez le receveur de TSCO reste à établir.

## IV- RÔLES DE LYMPHOCYTES T DANS LES COMPLICATIONS SUITE À LA TSCO

### IV. 1. PRISE ET L'ÉCHEC DE LA GREFFE

La condition *sine qua non* au succès d'une greffe est la « prise » des CSH ou leur relocalisation et leur implantation dans la MO du receveur. Il est estimé que la relocalisation des CSH dans la MO et la production de neutrophiles prend de 2-4 semaines alors que la détection de plaquettes peut prendre 1-2 mois suivant une TSCO (Figure 1.5) (Gluckman et al., 1997). L'échec initial d'une greffe peut résulter d'une absence de prise et/ou d'une perte des cellules subséquemment à la prise (rejet par les lymphocytes T du receveur).

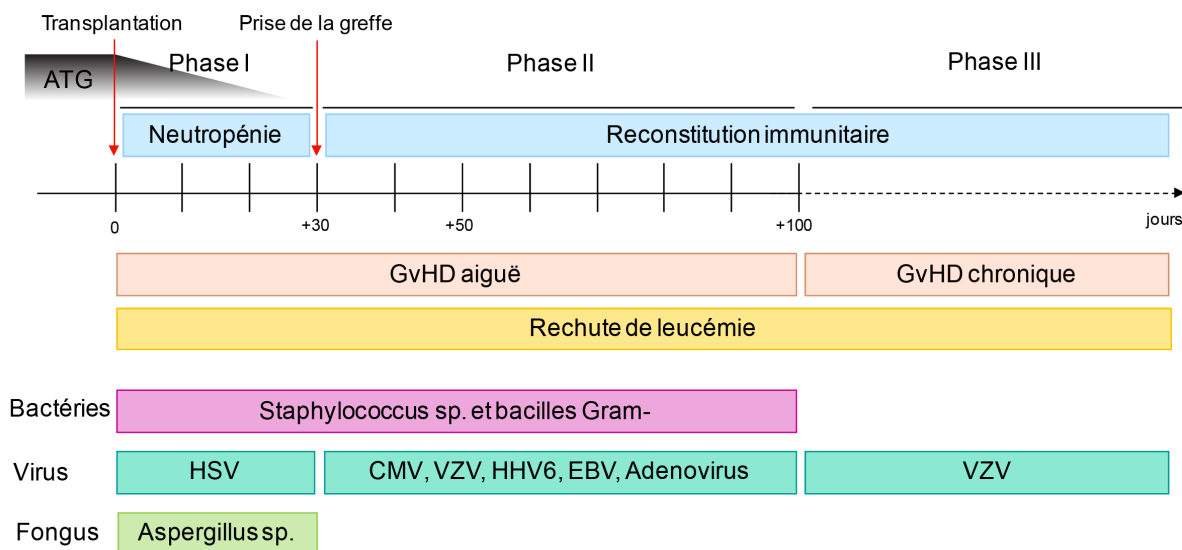
Le rejet est un processus actif impliquant les lymphocytes T et éventuellement les cellules NK du receveur, qui mène à l'élimination des cellules du donneur suite à leur reconnaissance en tant que non-soi (reconnaissance du HLA et/ou des AgmH). Les lymphocytes T du receveur sont ainsi responsables de la non-prise des CSH du donneur (Marijt et al., 1995; Mattsson et al., 2008; Voogt et al., 1990), d'où l'importance de les éliminer lors du conditionnement (Duval et al., 2002). Les HLA-A et HLA-B jouent un rôle central dans la reconnaissance antigénique des cellules T CD8<sup>+</sup> (Carrington et O'Brien, 2003) et leurs allèles sont typiquement choisis pour être compatibles entre donneur et receveur.

Un échec de prise de la greffe peut être une conséquence directe d'une faible dose cellulaire, incluant les lymphocytes (Gluckman et al., 1997; Rubinstein et al., 1998). Comme la majorité des TSCO implique une dose 10 fois moindre de CSH qu'une TMO, la prise de la greffe (reconstitution des neutrophiles et des plaquettes) est retardée et l'échec est comparativement fréquent (10-15% suivant la TSCO vs 1-2% suivant la TMO) (Eapen et al., 2007; Rocha et al., 2001).

D'un autre côté, les lymphocytes du greffon ont un impact positif sur la prise de la greffe. Ainsi, la dose totale de cellules nucléées et le compte de cellules CD45<sup>+</sup> sont prédictifs de la cinétique de sortie de la lignée myéloïde suivant la TSCO (Rubinstein et al., 1998). Les doses de cellules CD3<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans le greffon sont corrélées positivement avec la prise de la greffe chez les receveurs de TSCO (Terakura et al., 2007; van Heeckeren et al., 2007). Lors des transplantations de deux unités de SCO à un même patient, il a été démontré que l'unité qui parvenait à s'implanter dans la moelle osseuse était celle contenant des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> alloréactifs contre l'autre unité (Gutman et al., 2010). Les lymphocytes T du donneur contribuent à la prévention du rejet de greffe en détruisant les effecteurs immunologiques

résiduels chez le receveur, amenant à l'établissement d'un chimérisme complet qui facilite la réussite de la reconstitution immunitaire (Jiang et al., 2002). Les cellules T facilitent aussi la prise de la greffe au niveau et au-delà des CSH. Cet effet pourrait impliquer des cytokines dérivées des lymphocytes T, des contacts cellules-cellules, ou la stimulation de la différenciation des CSH (Charak et al., 1995; Hexner et al., 2007; Jiang et al., 2002; Martin, 1990). Van Rood et al. ont aussi démontré que la prise de la greffe pouvait être accélérée en appariant les antigènes maternels mineurs non-hérités (« non-inherited maternal HLA antigens », (NIMA)) entre le donneur et le receveur (van Rood et al., 2009). Cette étude suggère que les cellules T du SCO gardent la mémoire des antigènes de leur mère et sont activées suivant leur réexposition chez le receveur, bien que les mécanismes impliqués n'aient pas été examinés en profondeur. Par ailleurs, la fonction des cellules T dépend de leur spécificité antigénique et peut aussi être délétère. Muller *et al.* ont rapporté que des lymphocytes T matures spécifiques à un AgmH et présents dans l'inoculum du greffon retardent la prise des CSH (Müller et al., 2010). Cependant, il est peu probable que ce processus ait lieu suivant la TSCO du fait que la grande majorité des lymphocytes T du SCO ont un phénotype naïf.

À noter que lorsque la dose cellulaire est augmentée en transplantant deux unités de SCO partiellement compatibles, une amélioration significative de la prise de la greffe est observée chez les enfants plus âgés et les adultes (Ballen et al., 2007; Barker et al., 2005b; Brunstein et al., 2007a; Brunstein et al., 2007b; Xu et al., 2001). Ces résultats signifient que l'incapacité partielle des lymphocytes T du SCO à promouvoir la prise de la greffe, pourrait être une simple conséquence de la trop faible dose transférée au patient.



**Figure 1.5.** Phases de reconstitution et risques infectieux suivant la transplantation de sang de cordon ombilical (Merindol et al., 2011b).

#### IV. 2. RECONSTITUTION IMMUNITAIRE

Suite à la prise de la greffe, la rapidité de la reconstitution immunitaire, et en particulier la reconstitution lymphocytaire, influencera le pronostic des patients transplantés (Ishaqi et al., 2008; Kim et al., 2004; Kumar et al., 2003; Le Blanc et al., 2009; Pavletic et al., 1998). Celle-ci sera modulée par les régimes de conditionnement et de prévention du GvHD reçus par le patient, en particulier l'ATG semble être capable de persister plusieurs semaines après son administration et pourrait éliminer une grande partie des lymphocytes T du greffon transférés chez le patient (Waller et al., 2003). Chez les enfants, la reconstitution lymphoïde post-TSCO ressemble dans l'ensemble, à celle qui suit une TMO (Locatelli et al., 1996; Moretta et al., 2001; Niehues et al., 2001) et elle est influencée positivement par la dose de cellules CD45<sup>+</sup> contenue dans le greffon (Barlogis et al., 2011). Les cellules NK atteignent des niveaux normaux dès 1 mois post-greffe alors que les cellules B reconstituent

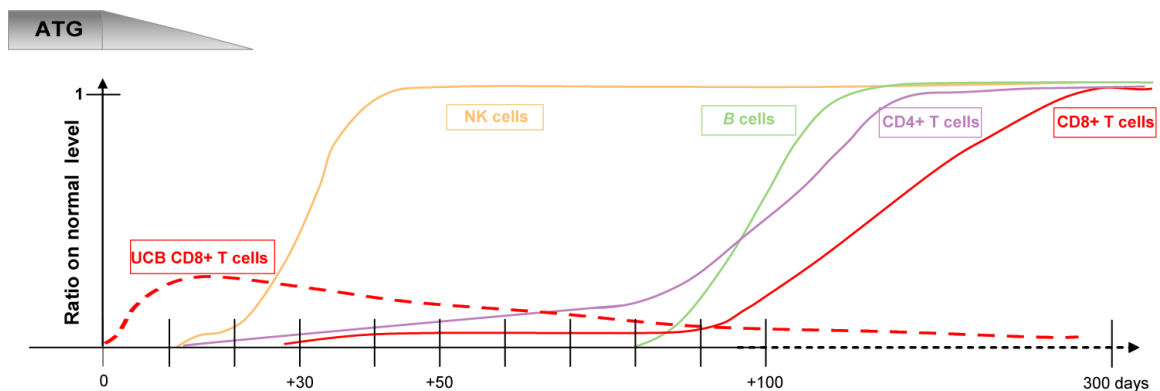
vers 3 mois post-greffe, adoptant une cinétique plus rapide que celle observée suivant une TMO (Figure 1.6) (Merindol et al., 2011b; Renard et al., 2011). De manière similaire, les cellules T CD4<sup>+</sup> apparaissent à des niveaux normaux dans les 6-9 premiers mois post-greffe. La différence la plus importante entre les reconstitutions lymphoïdes post-TSCO et post-TMO se situe au niveau des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. En effet, leur reconstitution est sérieusement retardée et leur nombre reste faible dans les 6-9 premiers mois qui suivent une TSCO (9 mois pour la TSCO *versus* 3 mois pour la TMO pour atteindre 250 cellules T CD8<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>) (Renard et al., 2011).

#### IV. 2. 1. PREMIÈRE VAGUE DE LYMPHOCYTES T CD8<sup>+</sup>

Chez le receveur lymphodéplété de MO, la majorité des lymphocytes T qui émergent pendant les premiers 100 jours post-transplantation sont dérivés de l'expansion homéostatique (EH) des lymphocytes T du greffon (Figure 1.6) (Reusser et al., 1991). Compte tenu de l'état d'immunosuppression, caractérisé par la quasi-absence des lymphocytes T durant les premiers mois qui suivent la greffe, ainsi que du caractère préimmun des lymphocytes T du SCO (Garderet et al., 1998), l'existence de cette première vague de lymphocytes T n'a pas été démontré suite à la TSCO. Cependant, la présence de réponses antivirales précoces chez les receveurs de TSCO la laisse entrevoir (Cohen et al., 2006). L'EH qui se produit lors de lymphopénie, dépend d'interactions de faible affinité avec les complexes CMH-p du soi, en présence de grandes quantités d'IL-7 (non consommée en l'absence de lymphocytes T chez le receveur) (Bourgeois et Stockinger, 2006). La diversité des lymphocytes T issus de l'EH chez le patient dépend directement de la diversité du répertoire d'origine. À long terme, l'EH génère un répertoire de lymphocytes T à la diversité limitée par délétion clonale ou oligoclonalisation à cause des reconnaissances antigéniques

et de la compétition pour les facteurs de croissance (Douek et al., 2000; Ge et al., 2001; Hakim et al., 1997; Krenger et al., 2011; Merindol et al., 2011b; Roux et al., 2000; Williams et al., 2007).

Chez l'adulte, l'EH des lymphocytes T du SCO mène à la différenciation des lymphocytes T naïfs en EMRA (Komanduri et al., 2007). Ces lymphocytes T démontrent une activité cytotoxique significative mais une susceptibilité plus grande à l'apoptose. Ils semblent également incapables de produire de l'IL-2 (Kim et al., 2009). Ils diffèrent des lymphocytes T de phénotype « memory-like » (CD45RO<sup>+</sup> ou CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>) observé suivant la TMO chez l'adulte et l'enfant (Eyrich et al., 2003; Ferrari et al., 2006; Gorla et al., 1993; Mackall et al., 1996). Aucune étude n'a étudié la différenciation et la fonctionnalité des lymphocytes T issus du SCO chez les receveurs pédiatriques. Toutefois, il est indéniable que des niveaux normaux de diversité clonale ne sont jamais atteints avant l'initiation de la thymopoïèse (Klein et al., 2001; Mackall et al., 1996).



**Figure 1.6.** Reconstitution du compartiment lymphocytaire suivant transplantation de SCO.

La reconstitution du compartiment lymphocytaire chez l'enfant transplanté de SCO ressemble beaucoup à celle qui suit une TMO. Les cellules NK apparaissent dès le premier mois qui suit la greffe et représentent alors 80% des lymphocytes présents en périphérie.

Les lymphocytes B atteignent des niveaux normaux dans les 3 premiers mois qui suivent la greffe. La différence la plus importante s'observe sur le retard de reconstitution des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> qui ne parviennent à des niveaux normaux qu'entre 9-12 mois suite à la TSCO comparativement à 3-6 mois suite à la TMO (Merindol *et al.*, 2011b).

#### IV. 2. 2. DEUXIÈME VAGUE DE LYMPHOCYTES T CD8<sup>+</sup>

Lorsqu'on s'éloigne de la fenêtre des 100 jours post-TSCO, les lymphocytes T naïfs émergent progressivement par thymopoïèse et repeuplent la périphérie (Figure 1.6). La production de cellules T *de novo* est un long processus qui est plus robuste chez les jeunes receveurs (Jimenez *et al.*, 2006). En plus du temps de différenciation dans la MO, les précurseurs lymphoïdes murins prennent au moins 2-3 semaines pour se rendre dans les différents compartiments thymiques et devenir des lymphocytes T matures (McCaughy *et al.*, 2007). Chez l'homme, le laps de temps précis n'a pas été calculé. Cependant, même dans les conditions les plus favorables, on peut supposer que la production de cellules T naïves à partir de CSH infusées prenne des semaines voire des mois, et que le niveau plateau de production thymique n'est atteint qu'après 1-2 ans suivant la transplantation. En fait, la thymopoïèse mesurée par la production de TREC commence à être détectable à partir de 100 jours chez la majorité des enfants transplantés de SCO (Talvensaari *et al.*, 2002; Weinberg *et al.*, 2001). Le délai pourrait être plus court chez certains patients (Talvensaari *et al.*, 2002). Le temps minimal n'est pas connu et dépendra vraisemblablement de la dose cellulaire transplanté, du régime de conditionnement et de l'âge du patient.

La reconstitution thymique est donc graduelle et le nombre de cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dérivées du thymus n'atteignent généralement pas des niveaux normaux avant 9-12 mois



post-TSCO, bien que des réponses prolifératives normales aux mitogènes soient atteintes à 6 mois (Thomson et al., 2000). La principale différence avec la cinétique de reconstitution observée post-TMO est le retard, d'environ 6 mois, de la réapparition des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> suivant une TSCO.

En l'absence de GvHD, cette voie amène à la restauration d'un répertoire diversifié de lymphocytes T, généralement en un an chez les receveurs pédiatriques (Finocchi et al., 2006; Goronzy et Weyand, 2005; Klein et al., 2001; Moretta et al., 2001; Niehues et al., 2001; Robin et al., 1999; Talvensaari et al., 2002). Talvensaari *et al.* ont même observé qu'une diversité plus grande du répertoire T était atteinte chez les receveurs de TSCO comparativement aux receveurs de TMO 2 ans après la transplantation (Talvensaari et al., 2002). Ceci pourrait être relié au fait que les progéniteurs lymphoïdes, myéloïdes et endothéliaux présents dans le SCO se différencient plus efficacement que leurs homologues de la MO, amenant à une thymopoïèse plus efficace et une amélioration qualitative du répertoire de cellules T (Canque et al., 2000; Crisa et al., 1999; Duval et al., 2002; Murohara et al., 2000; Robin et al., 1999).

Cependant, peu d'études ont évalué la reconstitution tardive et l'évolution de la diversité ≥ 1-2ans. Récemment, l'équipe d'A. John Barrett a suivi la reconstitution des lymphocytes T pendant 12 ans chez des sujets transplantés de MO appauvris en lymphocytes T. Ils démontrent qu'il pourrait y avoir des différences importantes au niveau de la production thymique et des populations lymphocytaires présentes à long terme entre les receveurs de greffe et leurs donneurs, des individus sains (Le et al., 2011).

#### IV. 2. LE CONTRÔLE DES INFECTIONS

Le déficit immunitaire qui suit la greffe de CSH rend les patients vulnérables aux complications infectieuses. En particulier, la TSCO est associée à un risque élevé d'IO qui contribuent à plus de 50% de la mortalité chez les enfants dans les 3 à 6 premiers mois post-greffe (Barker et al., 2005a; Rubinstein et al., 1998). Après cette période, la mortalité liée aux infections chez les receveurs de SCO équivaut à celle observée chez les receveurs de MO non apparentée (Barker et al., 2005a; Rubinstein et al., 1998). Ainsi, les interventions visant à réduire la mortalité et la morbidité associées aux IO ciblent principalement cette fenêtre de 100-200 jours (Tomblin et al., 2009).

On peut séparer la période de TSCO en trois phases, soit la phase I (pré-greffe; < 30 jours), la phase II (post-greffe; 30-100 jours) et la phase III (phase tardive; > 100 jours) (Figure 1.5). Durant la phase I (<30 jours), la neutropénie et les bris dans la barrière mucocutanée résultent en des risques substantiels d'infections bactériennes et fongiques, incluant celles causées par *Candida* et *Aspergillus* (Barker et al., 2005a; Hamza et al., 2004) (Figure 1.5). La réactivation du virus de l'*herpes simplex* (HSV) se produit également lors de la première phase. Durant la phase II, les infections sont principalement dues à une déficience au niveau de l'immunité à médiation cellulaire. On fait alors face à des infections virales causées, entre autres, par le cytomégalovirus (CMV) et le virus d'Epstein-Barr (EBV). Les receveurs de TSCO ont aussi un risque plus élevé de développer des infections adénovirales (Benjamin et al., 2002). D'autres pathogènes dominants retrouvés durant cette phase sont les *Aspergillus* et *Pneumocystis jiroveci*. Finalement, durant la phase III (>100 jours), les greffés de CSH sont très susceptibles au VZV, au CMV et aux bactéries encapsulées dont *Streptococcus pneumoniae*. Le risque de contracter ces infections est augmenté en présence de GvHD durant la phase II et la phase III. L'incidence des infections causées par les virus entériques

et respiratoires demeure élevée durant les trois phases de la greffe (Tomblyn et al., 2009). Les sections suivantes focalisent sur deux pathogènes viraux qui sont associés à une incidence élevée de mortalité et morbidité suite à la TSCO : le CMV et le VZV.

#### *IV. 3. 1. LES INFECTIONS À CMV*

Le CMV ou HHV-5 est un  $\beta$ -herpesvirus lymphotropique qui possède un génome de 230kb d'ADN double brins. Lors de l'infection, >200 protéines sont exprimées par CMV en trois phases qui se superposent (« immediate early » (IE), « early » et « late »). Les principales protéines impliquées dans la production de virion sont les protéines de l'enveloppe gB, gH, gM et gL, ainsi que les protéines de la matrice pp65, pp150, pp71 et pp28 (Landolfo et al., 2003). L'infection primaire à CMV est toujours suivie d'une infection prolongée et latente pendant laquelle le virus reste vivant mais « dormant » dans les cellules sans qu'il y ait de dommages détectables ni de symptômes cliniques. Le CMV persiste durant toute la vie sans causer de symptômes chez l'hôte immunocompétent. Environ 50-90% de la population est CMV-séropositive à l'âge adulte (Einsele et al., 1993). Les réservoirs cellulaires du CMV sont les leucocytes, (particulièrement les monocytes), ainsi que les cellules épithéliales des glandes salivaires et du col de l'utérus (Kondo et al., 1994; Scholz et al., 2003; Zhuravskaya et al., 1997). Le CMV infectieux peut être retrouvés dans les fluides corporels des personnes infectés et est détecté dans l'urine, la salive, le sang, les larmes, le sperme ou encore le lait maternel (Harari et al., 2004; Pass et al., 2009). Chez les individus sains, le CMV est contrôlé par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> qui ciblent en particulier des épitopes de la protéine pp65 et parfois d'IE-1 (Kern et al., 2000; Kondo et al., 2004; Landolfo et al., 2003).

Les manifestations cliniques de l'infection à CMV sont presque exclusivement restreintes aux hôtes immunocompromis et le danger le plus important se situe souvent au niveau de la réactivation du virus plutôt qu'au niveau d'infections *de novo*. Chez les patients atteints du SIDA, le CMV cause des rétinites ou des entérites (Einsele et al., 1993). Chez les greffés d'organes et de CSH, l'infection à CMV est caractérisée par de la fièvre, une leucopénie, une hépatosplénomégalie, une myalgie, des rétinites et des pneumonies interstitielles (Einsele et Hebart, 1999). Ces dernières sont mortelles dans 90% des cas. Dans certains cas rares, CMV cause également une maladie ressemblant à une mononucléose (Landolfo et al., 2003). Environ 20% (20-80%) des receveurs de TSCO vont souffrir des maladies à CMV associés à un pronostic défavorable dans les 6 premiers mois (Beck et al., 2010; Mikulska et al., 2011). Cette proportion pourrait être plus grande que suivant une TMO (64% d'incidence cumulative d'infection à CMV pour la TSCO vs 51% pour les TCSH allogéniques de sources alternatives,) (Beck et al., 2010; Mikulska et al., 2011). Près de 80% des patients séropositifs pour CMV avant la greffe réactiveront le virus dans les premiers mois suivant la transplantation (Takami et al., 2005; Tomonari et al., 2008; Uchida et al., 2008).

Le ganciclovir (analogue de guanosine) est très efficace pour éliminer la réplication du CMV et est couramment administré dans les protocoles de transplantation. Cependant, son usage est associé à une toxicité néphrologique et myéloïde importante qui exclut son utilisation en prophylaxie chez les receveurs pédiatriques de TSCO (Boeckh et al., 1996; Goodrich et al., 1993; Salzberger et al., 1997). Au service d'hémo-oncologie du CHU Sainte-Justine, la réactivation du virus est plutôt prise en charge de manière préemptive : pendant les 6 premiers mois post-greffe ou pendant la durée de l'immunosuppression, les patients CMV-séropositifs et -séronégatifs sont testés chaque semaine par PCR quantitative en temps réel ciblant l'ARN de la protéine pp65 (Malette, 2011, in preparation). Lorsque le test est positif,

( $\geq 3000$  copies/ml de serum), les patients sont traités au ganciclovir jusqu'à disparition de la virémie. Malheureusement, ce traitement reste toxique et la meilleure façon d'obtenir une protection efficace contre CMV demeure le développement des réponses à médiation cellulaire. La cinétique de la reconstitution immunitaire anti-CMV chez les receveurs de TSCO est encore mal définie mais les connaissances actuelles suggèrent qu'elle est retardée en comparaison avec une TMO.

#### *IV. 3. 2. LES INFECTIONS À VZV*

Le VZV, ou HHV-3, est un membre de la sous-famille des  $\alpha$ -herpesvirus. Il possède un génome d'ADN bicaténaire d'environ 125 kb comprenant  $\geq 70$  cadres ouverts de lecture dont les glycoprotéines gB, gC, gE (glycoprotéine majeure de l'enveloppe), gH et gL ainsi que les protéines précoces IE4, IE62 et IE63 qui forment l'enveloppe lipidique (Davison et Scott, 1986; Jones et al., 2006). Le VZV est l'agent étiologique de deux maladies cliniquement distinctes : la varicelle et le zona. La varicelle se développe lors de l'infection primaire et se manifeste par une éruption vésiculaire généralisée accompagnée de fièvre. Dans les pays tempérés sans programme de vaccination, la varicelle est associée à l'enfance et 90% des personnes seront infectées avant l'âge de 15 ans (Preblud, 1986). La varicelle peut se transmettre de deux façons, soit par les voies respiratoires ou par contact avec les lésions cutanées. Après l'infection primaire, le VZV établit une latence dans les tissus neuronaux. Sa réactivation dans les ganglions sensitifs postérieurs de la moelle épinière résulte en un zona. Cette pathologie est caractérisée par des éruptions cutanées douloureuses et localisées aux régions de la peau qui sont innervées par les cellules nerveuses infectées par le virus. Les complications les plus fréquentes associées au zona sont d'ordre neurologique. Il s'agit principalement de névralgies post-herpétiques (NPH) accompagnées de douleurs

violentes qui surviennent après la disparition des lésions et qui peuvent persister pendant des mois et même des années (Gilden et al., 2000). Parmi les autres complications neurologiques associées au zona, on retrouve les encéphalites aiguës et chroniques, le zona ophtalmique, la paralysie des nerfs crâniens et la paralysie périphérique dans la région du nerf atteint, incluant le syndrome de Ramsay-Hunt et la paralysie de Bell (Gilden et al., 2000). Les antiviraux peuvent réduire la sévérité et la durée de l'épisode de zona, mais ne peuvent malheureusement pas prévenir le zona et les NPH (Gnann, 2002; Kost et Straus, 1996).

Même si le zona touche davantage les personnes âgées, les enfants immunocompromis sont particulièrement à risque (Brunell, 1992). Il est établi que le contrôle de la dissémination et de la réapparition du virus est arbitré principalement par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Th1) (Asanuma et al., 2000) et possiblement par les T CD8<sup>+</sup> (Arvin, 1992; Frey et al., 2003; Jones et al., 2007). Le nombre de lymphocytes T VZV-spécifiques avec des capacités prolifératives a été estimé à environ 1 : 40 000 PBMC (Hayward et al., 1986). Ces derniers reconnaissent aussi bien les glycoprotéines virales que les protéines aux fonctions régulatrices ou structurales (Arvin et al., 1991).

Les infections à VZV sont parmi les infections virales les plus communes après une TCSH, avec un taux d'incidence variant de 25% à 68% (Koc et al., 2000). L'infection *de novo* ou la réactivation du VZV se produit chez plus de 60% des receveurs de TSCO, et a lieu plus fréquemment et plus tard que suivant une TMO (Tomonari et al., 2003; Vandenbosch et al., 2008). Les infections à VZV observées chez les greffés de CSH peuvent apparaître sous forme d'infection primaire (varicelle) mais plus souvent sous forme d'infection secondaire (zona). Chez les patients immunodéprimés, les lésions sont plus lentes à guérir et plus susceptibles d'être surinfectées. Les infections vont généralement demeurer confinées à la

peau bien que des disséminations viscérales puissent se produire, et sont associées à un taux élevé de morbidité et de mortalité (Locksley et al., 1985).

Afin de prévenir les infections à VZV chez les receveurs de TMO ou de TSCO, une prophylaxie antivirale d'une durée de 12 mois est administrée de façon systématique chez tous les enfants greffés depuis 2007. Les antiviraux couramment utilisés sont tous des analogues de la guanosine, soit l'acyclovir, le famciclovir et le valacyclovir (Boeckh et al., 2006; Tomblyn et al., 2009). La néphrotoxicité de ces molécules lorsqu'elles sont utilisées à long terme demeure un sujet controversé (Bianchetti et al., 1991; Boeckh et al., 2006; Brigden et al., 1982; Giustina et al., 1988; Htwe et al., 2008; Shinjoh et Takahashi, 2009). Cette approche prophylactique pose un autre problème : en prévenant la réactivation du virus, il se peut que la reconstitution immunitaire anti-VZV soit interrompue. Ainsi, la prophylaxie ne ferait que retarder l'apparition de la maladie (Distler et al., 2008). On peut cependant argumenter qu'en retardant la maladie jusqu'à un état d'immunocompétence, les risques de morbidité et de mortalité devraient être moindres

#### IV. 3. 3 IMMUNITÉ ANTIVIRALE POST-TSCO

Les cent jours de risque accru d'infections opportunistes correspondent approximativement au temps requis pour que les lymphocytes T générés *de novo* par thymopoïèse soient détectables chez les sujets transplantés. Les receveurs de TSCO avec une reconstitution rapide du compte de lymphocytes T ont un risque plus faible de développer des IO, supportant le rôle important des lymphocytes T dans le combat contre les infections (Burke et al., 2010; Hamza et al., 2004). De manière similaire à ce qui est observé suivant une TMO, les cellules T du cordon pourraient théoriquement fournir une protection contre les IO

pendant le temps requis afin que les cellules T post-thymiques émergent et commencent à remplir le répertoire périphérique. L'incidence plus élevée des IO suivant une TSCO comparativement à une TMO s'expliquerait d'abord par le fait que ces deux sources se distinguent au niveau de leur composition en lymphocytes T. La MO contient des cellules T mémoires spécifiques aux antigènes alors que les cellules T du SCO ont un phénotype naïf. Dans une analyse longitudinale des réponses anti-HSV, VZV et CMV chez les enfants atteints de maladies malignes sur un suivi de 4 ans post-TSCO, Cohen *et al.* ont rapporté que 43% des receveurs de TSCO développaient des réponses T spécifiques à au moins 1 de ces pathogènes pendant la période de 100-200 jours, et que la présence de ces réponses diminuait la probabilité de mortalité liée aux IO (Cohen et al., 2006). Ces résultats indiquent que les cellules T naïves transférées au receveur peuvent mener une réponse T antigène-spécifique avant la reconstitution thymique, au moins chez certains patients. Cependant, la protection apportée par ces cellules T n'est pas totalement efficace puisque plus de la moitié des receveurs ne sont pas protégés contre les dits virus. Les cellules NK et les cellules B sont restaurées très rapidement tout comme lors d'une TMO (Renard et al., 2011; Thomson et al., 2000; Vandebosch et al., 2008), suggérant qu'elles n'ont pas un rôle prédominant dans le contrôle des IO post-TSCO.

Malgré une dose cellulaire inférieure, le greffon contient des millions de lymphocytes T. Il est étonnant qu'ils ne puissent pas combattre les infections virales. La persistance, la cinétique de reconstitution et la fonctionnalité des lymphocytes T du SCO suivant la transplantation demeurent mal caractérisées.



#### IV. 4. LA GvHD

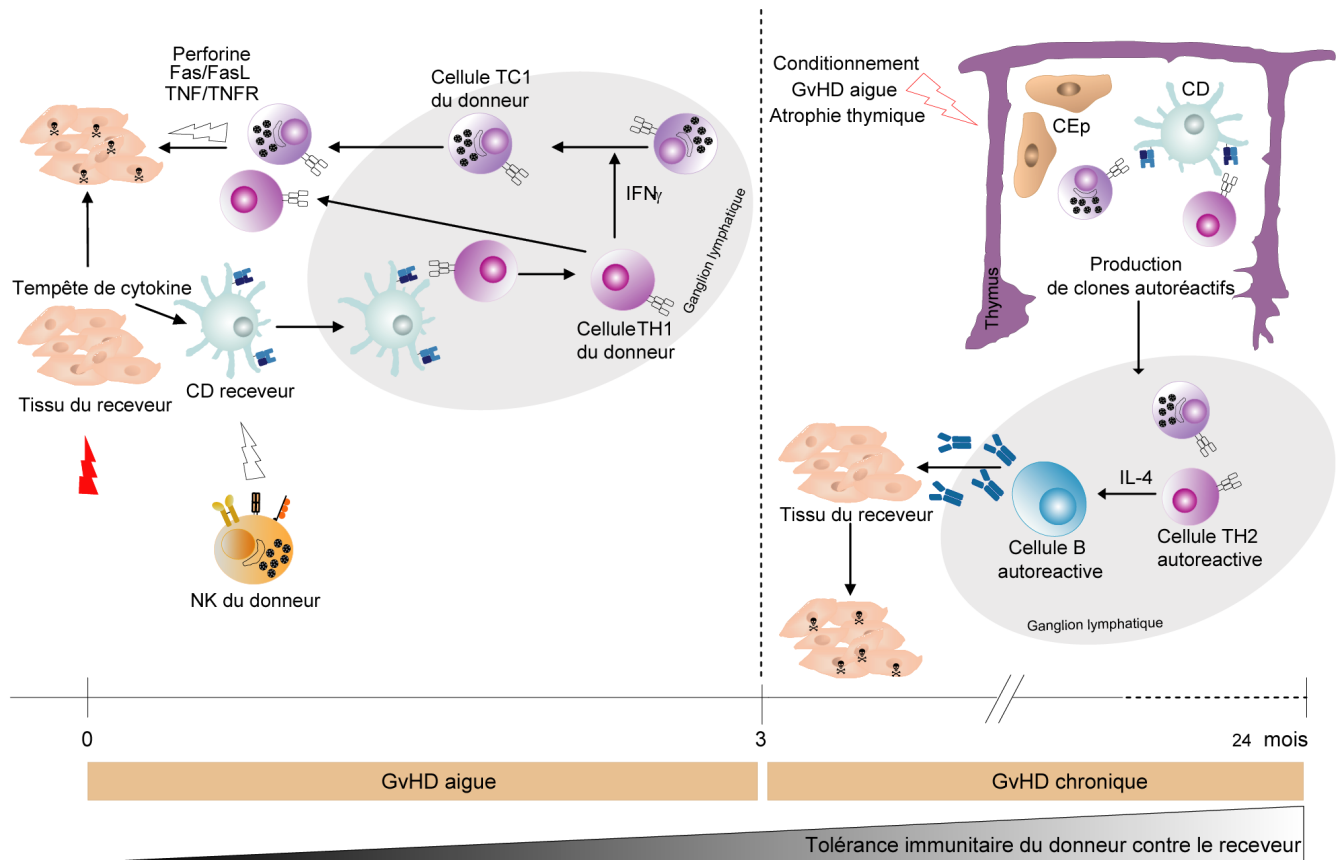
La GvHD est une complication très importante des greffes allogéniques non apparentées. La GvHD aigüe se développe en 3 phases: a) les tissus de l'hôte sont abîmés par l'inflammation résultant du conditionnement; b) les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du receveur, celles dérivées du donneur, et les cytokines pro-inflammatoires déclenchent l'activation des cellules T dérivées du donneur qui se différencient en cellules effectrices; et c) ces cellules deviennent cytotoxiques et ciblent les cellules de l'hôte (Figure 1.7) (Ferrara et al., 1996; Krenger et Ferrara, 1996; Shlomchik et al., 1999). La GvHD est une immunopathologie de type Th1/Tc1 si l'on se base sur la prédominance des dommages causés par les lymphocytes T cytotoxiques et sur l'augmentation de la production de cytokines de type Th1, incluant l'IL-2, l'IL-12, et l'IFN- $\gamma$  (Krenger et Ferrara, 1996). Tous les patients transplantés de SCO reçoivent une prophylaxie anti-GvHD, typiquement composée d'ATG, de cyclosporine A ou methotrexate, et de methylprednisolone. Bien qu'efficaces pour prévenir le GvHD, ces agents détériorent la reconstitution fonctionnelle des cellules T et peuvent avoir un impact sur la prise de la greffe, l'incidence des IO et la rechute de leucémie (Gratama et al., 1986; Haczku et al., 1994).

Dans les premiers 100 jours suivant la transplantation, l'incidence et la sévérité de la GvHD aigüe sont plus faibles chez les receveurs pédiatriques de TSCO comparativement aux receveurs de MO non apparentée, malgré un niveau parfois plus élevé de disparité HLA chez les receveurs de TSCO (MacMillan et al., 2009; Rocha et al., 2000; Wagner et al., 1996). Cette observation pourrait simplement être reliée à la dose de cellules nucléées ( $\sim 1 \log_{10}$  inférieure) utilisée suivant la TSCO. Elle pourrait aussi être expliquée par les propriétés fonctionnelles altérées des lymphocytes T du SCO. Tel qu'exposé précédemment, la majorité des lymphocytes T présents dans le cordon sont naïfs, ont peu d'activité cytotoxique basale,

une faible activité alloréactive et portent des propriétés fonctionnelles de type Th2 (Berthou et al., 1995; Harris et al., 1994; Kloosterboer et al., 2006; Leung et al., 1999; Mold et al., 2010). Les cellules T régulatrices présentes dans le SCO pourraient aussi contribuer à la suppression de l'alloréactivité (Cupedo et al., 2005; Godfrey et al., 2005; Mold et al., 2008). Ainsi, un phénotype et des fonctions biologiques différentes des lymphocytes T du SCO pourraient être compatibles avec une incidence réduite de la GvHD. Une autre hypothèse implique les cellules NK, très rapidement reconstituées suite à la TSCO. Ces cellules élimineraient les cellules présentatrices résiduelles du receveur et préviendraient ainsi l'activation des lymphocytes T du donneur (Ferrara et al., 1996; Ruggeri et al., 2002; Shlomchik et al., 1999).

La GvHD chronique, quant à elle est traditionnellement définie comme se développant suivant 100 jours post-transplantation et présente des symptômes caractéristiques de certaines maladies auto-immunitaires. La GvHD chronique affecte le plus souvent la peau, le foie, les yeux ou la bouche, mais peut aussi affecter beaucoup d'autres sites. Cette maladie, et les traitements qui lui sont associés, mènent à un état d'immunosuppression profonde. La mort causée par la GvHD chronique est souvent conséquence de complications infectieuses. Le traitement standard est une combinaison de cyclosporine et de prednisolone. La pathophysiologie de cette maladie est mal comprise. Elle est caractérisée par une atrophie thymique, une déplétion lymphocytaire et la production d'autoanticorps. Le conditionnement et la GvHD aiguë peuvent perturber la fonction thymique et déréguler le processus de sélection négative des clones T potentiellement auto-réactifs (Figure 1.7), amenant à un bris de l'homéostasie lymphocytaire et de la tolérance au soi. L'expansion et l'activation des cellules T autoréactives soutiennent ensuite l'activation de cellules B autoréactives et la production d'autoanticorps qui induiront des dommages ciblés aux

organes (Ho et Soiffer, 2001; Ochs et al., 1994; Svegliati et al., 2007). La GvHD chronique requiert l'aide des cellules Th2 alors que la GvHD aigüe est plutôt une maladie de type Th1 (Kansu, 2004). Les cellules T régulatrices, à travers la production de TGF- $\beta$  et d'IL-10 joueraient un rôle très important dans le contrôle de la GvHD chronique (Zorn et al., 2005).



**Figure 1.7:** Maladies du greffon contre l'hôte (« GvHD ») aigüe et chronique. La GvHD aigüe apparaît habituellement dans les 3 premiers mois qui suivent la greffe. Elle est caractérisée par l'activation de réponse de type Th1 des lymphocytes T issus du greffon par des cellules dendritiques résiduelles du receveur. Typiquement, la GvHD chronique se développe après trois mois post-TSCO et se produirait entre autre en conséquence de dommages au thymus causés par la GvHD aigüe ou du conditionnement. Elle est caractérisée par des réponses de

type Th2 de clones autoréactifs générés au sein du thymus qui activeraient la production d'autoanticorps par les cellules B autoréactives (Merindol et al., 2011b).

#### IV. 5. LA RECHUTE DE LEUCÉMIE ET LE GvL

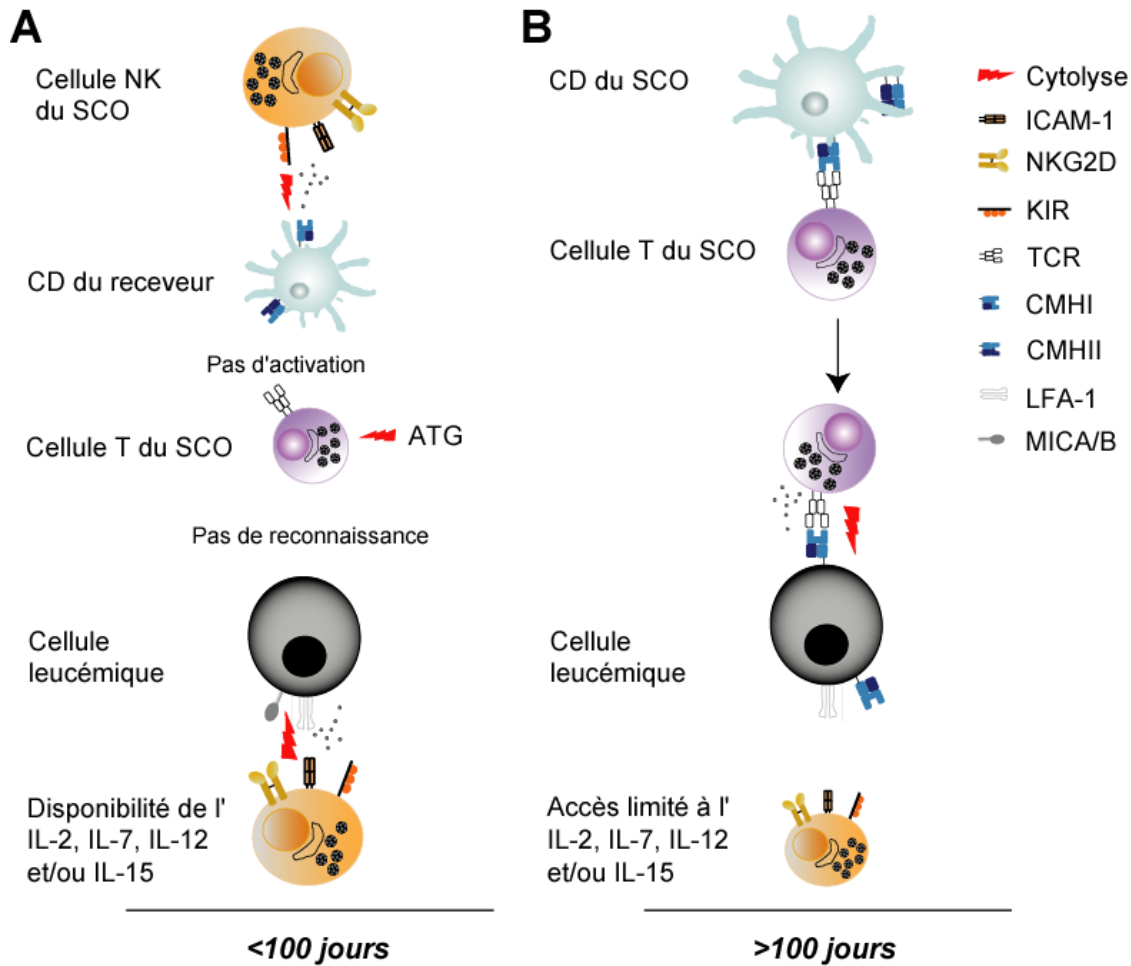
Compte tenu que les receveurs de TSCO reçoivent  $1 \log_{10}$  de cellules nucléées en moins que les receveurs de TMO, que la vaste majorité des lymphocytes T du SCO sont naïfs et que l'incidence de la GvHD est inférieure, on s'attendrait à ce que l'effet greffon contre leucémie (GvL) soit également inférieur. Pourtant, le risque de rechute de leucémie est égal sinon inférieur suivant une TSCO comparé à une TMO (Eapen et al., 2007; Michel et al., 2003; Rocha et al., 2001).

La première suggestion du rôle des lymphocytes T dans l'effet GvL post-transplantation allogéniques est venue de l'observation qu'un chimérisme complet des lymphocytes T du donneur était crucial pour prévenir la rechute de leucémie (Huisman et al., 2007; Keil et al., 2003). Autant les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> que les CD8<sup>+</sup> sont capables de déclencher une cytotoxicité Ag-spécifique dirigée contre les cellules leucémiques. Ils reconnaissent trois classes d'antigènes : a) AgmH (Falkenburg et al., 2002; Goulmy, 1997); b) les AgmH uniquement exprimés par les cellules de la lignée hématopoïétique; et c) les Ag spécifiques aux leucémies, tel que le Wilm's tumor-1 (WT-1), l'antigène préférentiellement exprimé par les mélanomes (PRAME - « Preferentially expressed antigens by melanoma»), ou des protéines de fusion (*e.g.* BCR-ABL) (Bergmann et al., 1997; Inoue et al., 1997; Inoue et al., 1994; Menssen et al., 1995).

Le SCO comprend une population diversifiée de lymphocytes T qui pourrait inclure des cellules T aux propriétés anti-tumorales (Mommaas et al., 2005) (Figure 1.8). Cependant, la

participation à l'effet GvL des lymphocytes T issus du greffon n'a pas encore été directement démontrée suivant la TSCO. L'appariement des NIMA (« non-inherited maternal antigen ») du donneur avec le receveur a été associé à une incidence réduite de rechute et de mortalité reliée à la TSCO, suggérant que les cellules T du SCO pourraient reconnaître et tuer les cellules leucémiques du receveur d'une manière HLA-restreinte (van Rood et al., 2009). Un des facteurs associés au risque de rechute après TSCO est un retard au niveau de la reconstitution des réponses lymphocytaires T antivirales (Parkman et al., 2006). Cohen *et al.* ont aussi rapporté que les patients démontrant une réponse proliférative des cellules T spécifiques aux virus *herpes* à n'importe quel moment pendant les 3 années de suivi post-TSCO avaient une incidence plus faible de rechute de leucémie et un taux global de survie plus élevé (Cohen et al., 2006).

La rechute de leucémie est une complication très importante suite à la TSCO : au moins 20% des enfants rechuteront, et ce, souvent après 6 mois post-transplantation alors que les lymphocytes T devraient théoriquement être en quantité suffisante pour exercer un effet anti-tumoral. Le développement des réponses anti-leucémiques est mal caractérisé suivant la TSCO, de même que la contribution au GvL des lymphocytes T issus du greffon et celle des lymphocytes T produits par thymopoïèse restent à définir (Figure 1.8). L'ensemble des études indique toutefois qu'une amélioration de la reconstitution des cellules T devrait mener à un meilleur résultat de la greffe en terme de rechute et de survie (Kern et al., 2000). Le développement de méthodes qui amplifient sélectivement, activent et utilisent les cellules T anti-tumorales dérivées du SCO en tant que composantes de régime d'immunothérapie adoptive est activement poursuivi (Clark et al., 2010; Davis et al., 2010; Joshi et al., 1998; Joshi et al., 2000; Mazur et al., 2008; Micklethwaite et al., 2010).



**Figure 1.8 :** Prévention de la rechute de leucémie suivant une transplantation de sang de cordon ombilical. Les cellules T et NK sont essentielles dans la prévention de la rechute de leucémie. Dans la partie A, l'ATG résiduel et la prophylaxie du GvHD empêchent la reconstitution des lymphocytes T durant les 100 premiers jours post-TSCO. Les cellules T ne peuvent pas compétitionner avec les cellules NK qui trouvent alors les cytokines nécessaires à leur prolifération et leur activation. Les cellules NK dérivées du donneur peuvent aussi tuer les cellules dendritiques du receveur, dérangeant encore un peu plus l'effet GvL qui pourrait être mené par les lymphocytes T. L'activité cytotoxique des cellules NK est optimisée dans un contexte de désappariement KIR-KIR ligand entre le donneur et le receveur ou quand les cellules leucémiques n'expriment pas le CMH-I mais expriment

MICA/MICB à leur surface. Dans la partie B, à partir de trois mois post-TSCO, les cellules T reconstituées compétitionnent avec les cellules NK pour leurs cytokines clés (*i.e.* IL-2, IL-7, IL-12, IL-15) et peuvent alors proliférer et être activées par les cellules tumorales exprimant le CMH-I pour mener à un effet GvL efficace. MICA/MICB : « MHC class I-related chain A, B » ; KIR: « killer immunoglobulin-like receptor »; ICAM-1: « inter-cellular adhesion molecule 1 »; DC: « dendritic cells »; MHC: « major histocompatibility complex »; LFA-1: « leukocyte function-associated antigen 1 »; SCO: sang de cordon ombilical; ATG: « anti-thymocyte globulin »; GvL: effet« graft-versus-leukemia » (Merindol et al., 2011b).

## V- PROBLÉMATIQUE

Le potentiel fonctionnel, la persistance et le rôle des lymphocytes T du SCO chez le receveur de greffe doivent être élucidés afin d'améliorer le résultat de la transplantation et minimiser toutes les complications. La majorité des travaux qui ont étudié les lymphocytes T dans le SCO et chez le receveur de greffe ont observé la population totale de PBMC ou de lymphocytes T, en utilisant des stimulations mitogéniques. Cependant, pour bien comprendre le potentiel, la dynamique de différenciation et de reconstitution des lymphocytes T du SCO, il est primordial d'étudier une population spécifique à un antigène et de mesurer des réponses antigéniques plutôt que mitogéniques.

### V. 1. MODÈLE D'ÉTUDE : LES LYMPHOCYTES T SPÉCIFIQUES À MELAN-A

Les lymphocytes T du SCO sont majoritairement préimmuns. La quasi-totalité des populations pré-immunes de lymphocytes T spécifiques à un même antigène sont

indétectables *ex vivo* avec un échantillonnage de quelques millions de PBMC, représentant moins d'une cellule sur 10 000 (Alanio et al., 2010). À ce jour, il existe un seul répertoire préimmun suffisamment abondant pour être détecté *ex vivo* chez l'homme par marquage avec des complexes CMH-p tétramériques (Altman et al., 1996): les lymphocytes T spécifiques au complexe HLA -A2:Melan-A<sub>26-35</sub>. Cette population a d'abord été identifiée lors de l'étude de la réponse T dirigée contre un antigène tumoral. En effet, l'immunogénicité du peptide (E)AAGIGILTV (26)27–35 (Coulie et al., 1994; Kawakami et al., 1994a) en a fait une cible attrayante pour développer des vaccins contre le mélanome. Ce peptide est dérivé du domaine transmembranaire de Melan-A/MART-1 (« melanoma antigen A » et « melanoma antigen recognized by T cells 1 »), une protéine de type III (Rimoldi et al., 2001), et est reconnu par les cellules T CD8<sup>+</sup> dans le contexte du HLA-A2\*0201 (Kawakami et al., 1994b; Romero et al., 1997). Ce peptide immunodominant a été légèrement modifié pour augmenter la stabilité du complexe CMH-p en remplaçant l'alanine à la position 27 par une leucine : ELAGIGILTV (Melan-A<sub>26-35</sub>A27L) (Valmori et al., 1998).

À l'aide du tétramère HLA-A2 :Melan-A<sub>26-35</sub>A27L, il a ensuite été démontré qu'on pouvait détecter des lymphocytes T spécifiques à Melan-A dans le sang périphérique d'individus sains (Pittet et al., 1999; Romero et al., 1998) (Figure 9). L'équipe de Pedro Romero a montré que des cellules T naïves capables de se lier à Melan-A<sub>26-35</sub>A27L complexé au HLA-A2 constituent environ 1/1000 des cellules T CD8<sup>+</sup> périphériques, représentant un total de 10<sup>8</sup> cellules par individu, ce qui s'approche de la taille moyenne d'un pool de cellules T CD8<sup>+</sup> mémoires spécifiques à un antigène (Figure 9). Zippelius *et al.* ont démontré que la prédominance relative de ce répertoire en périphérie était causée par une grande production de ces lymphocytes T par le thymus (1/2000 thymocytes CD8<sup>+</sup>) (Figure 9). Ces cellules subissent ensuite en moyenne 3 cycles de prolifération en périphérie (Zippelius et



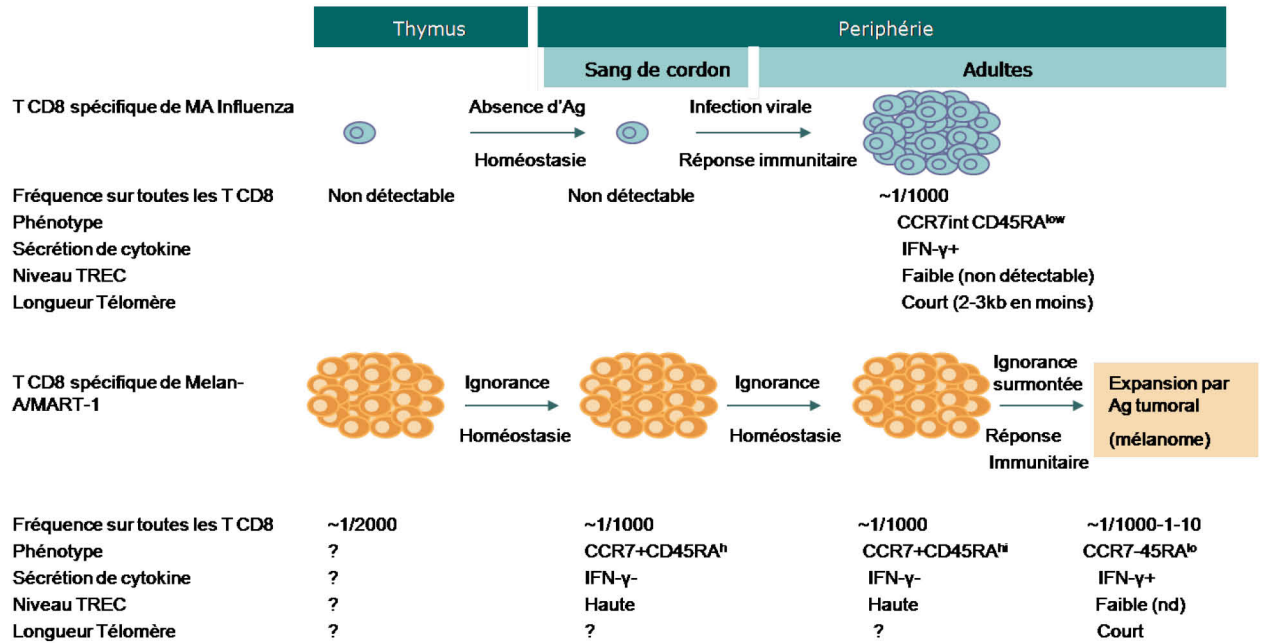
al., 2002). Le complexe HLA-A2-Melan-A<sub>26-35</sub> ne semble pas être présenté dans les ganglions lymphatiques qui drainent la peau car la population spécifique retient un phénotype naïf en périphérie (Pittet et al., 2002). Les ligands impliqués dans la sélection de ce répertoire n'ont pas été caractérisés et l'expression de l'ARN messager de la protéine Melan-A n'a pas été détectée au sein du thymus. Il est possible que ce répertoire soit sélectionné à partir de séquences peptidiques ayant une réactivité croisée.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer la production élevée de ce répertoire spécifique à un complexe CMH-p du soi. La grande taille de ce répertoire pourrait être reliée à un manque de présentation de ces CMH-p par les cellules présentatrices d'antigènes qui induisent la délétion clonale dans le thymus. Il est aussi possible que le complexe HLA-A2:Melan-A<sub>26-35</sub> représente une structure «dégénérée», facilement reconnue par différentes structures de TCR spécifiques à d'autres antigènes et aussi à Melan-A. L'équipe de Doherty a démontré que des peptides contenant des acides aminés en contact avec le TCR avec des chaînes latérales proéminentes stimulaient une population de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> avec une plus grande diversité du TCR que les peptides avec de petites chaînes latérales (Turner et al., 2005). La règle « une cellule = une spécificité » ne s'appliquerait pas à ce répertoire mais plutôt « une cellule = plusieurs spécificités » (Eisen, 2001). Le répertoire anti-Melan-A ne serait donc pas complètement préimmun (en tout cas envers d'autres antigènes) et composé d'une population mixte de lymphocytes T avec des réactivités croisées. En outre, le répertoire de lymphocytes T spécifique à HLA-A2:Melan-A serait également composé de lymphocytes T mémoires spécifiques d'un antigène de *Mycobacterium tuberculosis* chez certains individus sains (Voelter et al., 2008). Finalement, c'est peut-être par hasard que la conformation HLA-A2:Melan-A semble permettre la reconnaissance par de nombreux TCR différents, menant à la prédominance relative de ce répertoire. Le cristal du complexe

TCR/CMH ne montre d'ailleurs aucune particularité (Sliz et al., 2001). Il est aussi possible que ce répertoire antigénique naïf présent en abondance utilise des TCR qui sont produits plus fréquemment par recombinaison V(D)J que d'autres TCR (répertoire public). Ceci est possible car les segments D ont des séquences très similaires qui peuvent devenir identiques par l'addition ou la délétion aléatoire de nucléotides (Venturi et al., 2008). Ce phénomène est amplifié par la redondance du code génétique où plusieurs acides aminés sont codés par plus d'un codon. À ce sujet, il a été démontré que des lymphocytes T spécifiques à Melan-A chez différents patients portaient un TCR utilisant la région TRAV2 (Dutoit et al., 2002b; Sensi et al., 1995).

Il est à noter que des lymphocytes T naïfs spécifiques à HLA-A2:Melan-A<sub>26-35</sub>A27L sont également détectés en grande quantité chez les individus HLA-A2<sup>-</sup> (Dutoit et al., 2002a; Pittet et al., 2006). Le complexe HLA-A2:Melan-A étant reconnu par un grand nombre de TCR chez les individus HLA-A2, il n'est pas étonnant qu'il le soit aussi chez les individus non-HLA-A2, suggérant que ce n'est probablement pas au niveau de la sélection thymique que ce répertoire est favorisé, mais bien qu'il s'agit d'un complexe CMH-peptide facilement ou fréquemment reconnu par les TCR.

De part sa haute fréquence en périphérie et son abondance chez la majorité des individus, le répertoire de lymphocytes T spécifiques à HLA-A2:Melan-A constitue ainsi un outil unique pour détecter et étudier la fonctionnalité des lymphocytes T naïfs présents dans le sang de cordon ombilical et transférés au patient.



**Figure 9:** Comparaison entre les répertoires de lymphocytes T spécifiques à Melan-A et spécifiques au virus de l'influenza. Adaptée de Pittet et al., 2002.

## VI- OBJECTIFS

- 1) Caractériser la fonctionnalité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> du sang de cordon ombilical.
- 2) Documenter leur évolution, leur reconstitution et leur potentiel fonctionnel suite à la transplantation de sang de cordon ombilical.
- 3) Caractériser les réponses lymphocytaires T spécifiques à CMV et à VZV suivant la transplantation de sang de cordon ombilical.

## VII- HYPOTHÈSES

- 1) Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> du sang de cordon sont fonctionnels et non pas simplement immatures.
- 2) Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> du sang de cordon ombilical persistent temporairement chez le receveur et se différencient en populations effectrices. Le répertoire naïf et fonctionnel est restauré suite à l'initiation de la thymopoïèse.
- 3) Le développement de réponses lymphocytaires productrices d'IFN- $\gamma$  protège les receveurs pédiatriques de sang de cordon ombilical contre les infections CMV et VZV.

## **Chapitre 2**

# UMBILICAL CORD BLOOD T CELLS RESPOND AGAINST THE MELAN-A/MART-1 TUMOR ANTIGEN AND EXHIBIT REDUCED ALLOREACTIVITY AS COMPARED WITH ADULT BLOOD-DERIVED T CELLS

**Running title:** Functional Melan-A-specific T cells in cord blood.

Natacha Merindol<sup>\*†‡</sup>, Anne-Julie Grenier<sup>\*†‡</sup>, Martine Caty<sup>\*</sup>, Emily Charrier<sup>†§</sup>, Arnaud Duval<sup>†¶</sup>, Michel Duval<sup>†||#</sup>, Martin A. Champagne<sup>||#\*\*</sup>, and Hugo Soudeyns<sup>\*†‡#2</sup>.

<sup>\*</sup>Unité d'immunopathologie virale and <sup>†</sup>Groupe de recherche en transplantation et immunologie du sang de cordon (GRETISC), Centre de recherche du CHU Sainte-Justine;

<sup>‡</sup>Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal;

<sup>§</sup>Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Université de Montréal;

<sup>¶</sup>Laboratoire d'immunopathologie animale et humaine, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine; <sup>||</sup>Service d'hémo-oncologie, CHU Sainte-Justine; <sup>#</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. <sup>\*\*</sup>Present address: Héma-Québec, St-Laurent, Quebec H4R 2W7, Canada.

<sup>1</sup>Supported by grants from le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and Héma-Québec (Quebec, Canada).

<sup>2</sup>Address correspondence and reprint requests to Dr. Hugo Soudeyns, Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, 3175 côte Sainte-Catherine, room 6735, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada.

**Key words:** Human; T cells, cytotoxic; transplantation; tumor immunity.

[**Status:** published in Journal of Immunology: 2010 Jul 15; 185(2):856-66].

## **ABSTRACT**

Umbilical cord blood (UCB) is increasingly used as a source of hematopoietic progenitor cells to treat a variety of disorders. UCB transplant (UCBT) is associated with comparatively reduced incidence of graft versus host disease (GVHD), robust graft versus leukemia effect, and relatively high incidence of opportunistic infections (OI), three processes in which donor-derived T lymphocytes are known to be predominantly involved. To examine the differential functionality of UCB T cells, CD8<sup>+</sup> T cells specific for the melanoma-associated HLA-A2-restricted Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide were isolated from HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCB samples and HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> adult peripheral blood (AB) using A2/Melan-A tetramers. In UCB samples, A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were detected at a frequency of 0.04%, were more frequent in HLA-A2<sup>+</sup> UCB, were polyclonal, and mostly naïve. Consistent with antigen-driven expansion, the frequency of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was increased following stimulation with cognate peptide or polyclonal activation, they acquired cell surface markers reflective of effector/memory differentiation, their T cell receptor repertoire became oligoclonal, and they expressed cytolytic activity and produced IFN- $\gamma$ . While functional properties of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB resembled those of HLA-A2<sup>+</sup> AB, they were more likely to reach terminal differentiation following polyclonal stimulation and produced less IFN- $\gamma$  in response to cognate peptide. A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>-</sup> UCB were poorly cytolytic, produced little IFN- $\gamma$ , and were predominantly monofunctional or non-functional. These properties of UCB-derived CD8<sup>+</sup> T cells could contribute to the reduced incidence of GVHD and heightened incidence of OI observed following UCBT.

## INTRODUCTION

Following hematopoietic stem cell (HSC) transplant, donor-derived T lymphocytes play a key role in the pathogenesis of graft versus host disease (GVHD) (1). In addition, until immune reconstitution is achieved, protective antiviral and anti-tumoral immune responses in the host largely depend on the activity of post-thymic T cells that are infused with the HSC grafts (1,2). Unrelated umbilical cord blood (UCB) is increasingly being used as a source of cells for patients in need of HSC transplant (3). In comparison to other HSC sources such as bone marrow or peripheral blood, UCB transplant (UCBT) is characterized by a lower incidence and severity of GVHD, a robust graft versus leukemia effect, but a relatively high incidence of opportunistic infections (OI) that represent the most important cause of mortality in graft recipients during the first 6 months post-transplant (4,5). These differences in clinical outcome raise important questions regarding the phenotype and functional properties of UCB-derived T lymphocytes. On the one hand, as compared with T cells isolated from adults, UCB T cells have long been considered « immature » based on their reduced capacity for  $T_H1/T_C1$  cytokine production and diminished cytolytic activity (6-9). On the other hand, neonatal T cells can mediate alloreactivity (10) and mount efficient antiviral immune responses against CMV, influenza virus, and HIV-1, indicating that they can exhibit functional properties in some settings (11,12). Indeed, to this day, there is a paucity of data on the differential functionality of preimmune antigen-specific  $CD8^+$  T cells in UCB as compared with adult peripheral blood (AB).

$CD8^+$  T cells that recognize the Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide presented in the context of HLA-A2 can be isolated from peripheral blood and UCB (13). These cells are thought to represent the only preimmune T cell repertoire that can be studied in humans (14). Interestingly,



A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells can be reproducibly isolated from blood samples derived from HLA-A2<sup>-</sup> subjects, providing an opportunity to compare T cell responses directed against HLA-identical and HLA-disparate targets (15). Here, approaches based on peptide-MHC tetramers were used to characterize the phenotype and immunologic properties of Melan-A-specific CD8<sup>+</sup> T cells derived from HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCB in order to address lingering questions concerning the functional capabilities of UCB-derived T cells and to gain insight into the role they play in cell-mediated immune responses in the graft recipient following UCBT. Results revealed that UCB-derived A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were clonally diversified. Following polyclonal activation or stimulation with cognate peptide, these cells underwent oligoclonal expansion, exhibited cytolytic activity, produced IFN- $\gamma$ , and acquired cell surface markers reflective of effector/memory differentiation. At the functional level, A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB exhibited properties that were similar to those observed in HLA-A2<sup>+</sup> AB but were more likely to achieve terminal differentiation following polyclonal activation and produced significantly less IFN- $\gamma$  on a per clone basis. In contrast, A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>-</sup> UCB were comparatively less cytolytic, produced less IFN- $\gamma$ , and were more likely to be monofunctional or non-functional.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Procurement of UCB and AB samples**

This study was approved by the Institutional Review Board of CHU Sainte-Justine, Montreal. Full informed consent was obtained from all study participants. Samples of UCB mononuclear cells (UCBMC; n = 26) were obtained from the Cord Blood Research Bank maintained by GRETISC, CHU Sainte-Justine, Montreal. AB samples (n = 14) were obtained from healthy adult volunteers. UCBMCs and PBMCs were isolated on Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Sweden) and cryopreserved in 90% v/v FBS (Invitrogen, Burlington, Canada) supplemented with 10% v/v DMSO. HLA typing was performed using the line probe assay (Innogenetics, Gent, Belgium) (Supplemental Table 2.1).

### **Generation of T cell microcultures**

Frozen UCBMC were thawed and cultured for 24 h in RPMI 1640 supplemented with 20% v/v FBS. Cells were seeded at 1,000 cells/well in 96-well round-bottom plates and were co-cultured with  $8 \times 10^4$  irradiated (300 Gy) 221.A2 cells (EBV-transformed B lymphoblastoid cell line expressing HLA-A2\*0201; kindly provided by Cassian Yee, University of Washington, Seattle, WA) (16) pulsed with the HLA-A2-restricted modified Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide (ELAGIGILTV) (Peptide Synthesis Core Facility, CHUL, Quebec, Canada). T cell microcultures were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% v/v FBS, 50 UI/ml recombinant human IL-2 (Hoffmann-La Roche, Mississauga, Canada), and 10 ng/ml recombinant human IL-7 (R&D Systems,

Minneapolis, MN). Medium was replenished biweekly. Effector cells were re-stimulated weekly for 3 weeks with irradiated, peptide-pulsed 221.A2 cells.

### **Immunophenotyping, peptide-MHC tetramer staining and cell sorting**

Multiparameter fluorescence activated cell sorting was performed on thawed UCBMC. A minimum of  $1 \times 10^5$  CD8<sup>+</sup> T cells were analyzed. To detect Melan-A-specific T cells in UCBMC, T cell microcultures, and expanded T cell clones, biotinylated HLA-A2 monomers were refolded around Melan-A<sub>26-35</sub> A27L or CMVpp65 (NLVPMVATV) peptides (CANVAC, Montreal, Canada) and were tetramerized using PE-conjugated Extravidin (Sigma, St. Louis, MO) or allophycocyanin (APC)-conjugated streptavidin (BD Biosciences, San Diego, CA). The following mAbs were used: Alexa 700-conjugated anti-CD3 (UCHT1), Pacific Blue-conjugated anti-CD8 (RPA-T8), PE-Cy7-conjugated anti-CCR7 (3D12), PE-conjugated or APC-conjugated anti-CD27 (M-T271), and FITC-conjugated anti-CD45RA (HI100) (BD Biosciences). UCBMC, *in vitro*-generated T cell microcultures, or expanded T cell clones were incubated for 15 min at 37°C with 0.3 µg peptide-MHC tetramers/ $1 \times 10^6$  cells. MAbs for cell-surface staining were then added and cells were incubated for 30 min at room temperature. Tetramer-specific CD8<sup>+</sup> cells were sorted at low pressure in 100% v/v FBS, using a FACSaria flow cytometer equipped with FACSDiva software (BD Biosciences). Compensation was performed with single fluorochromes and CompBeads™ (BD Biosciences). Logical gates were set using fluorescence-minus-one controls. Lymphocytes were gated according to forward/side scatter. Melan-A specific T cells were gated based on expression of CD3 and CD8 (17). Analysis of cell-surface markers was performed using FCS Express Version 3 software (De Novo Software, Los Angeles, CA).

### **Expansion of sorted T cells**

Tetramer-sorted T cells from UCB or AB were directly seeded at 1-3 cells/well in 96-well round-bottom plates and were co-cultured with  $8 \times 10^4$  irradiated (300 Gy) 221.A2 cells/well in RPMI 1640 supplemented with 50% v/v FBS, 50 UI/ml rhIL-2, and 1  $\mu\text{g/ml}$  PHA (Sigma). After 48 h, medium was replaced with RPMI 1640 supplemented with 20% v/v FBS, 50 UI/ml IL-2, 1  $\mu\text{g/ml}$  PHA, and 10 ng/ml IL-7 (16). Medium was changed every 2-3 days and  $2 \times 10^4$  irradiated 221.A2 cells/well were added once a week for 3 weeks.

### **Cytotoxicity testing**

Cytolytic activity of T cell microcultures and expanded T cells was measured using a conventional 4 h  $^{51}\text{Cr}$  release assay (18).  $^{51}\text{Cr}$ -labeled targets were 221.A2 cells pulsed with cognate Melan-A<sub>26-35</sub> A27L or control hepatitis C virus NS3-1406 peptide (KLVALGINAV). Effector: target ratio was 10:1 ( $2 \times 10^3$  target cells/well).

### **ELISPOT**

IFN- $\gamma$  secretion by T cell microcultures and expanded T cells was measured using ELISPOT (19). Briefly, the wells of a polyvinylidene difluoride-backed microtiter plate (Millipore, Bedford, MA) were coated with anti-human IFN- $\gamma$  capture Ab (clone NIB42, BD Biosciences) overnight at 4°C and were then incubated for 2 h at 37°C in RPMI 1640 medium supplemented with 10% v/v FBS. T cell microcultures or expanded T cell clones (see above) were seeded at  $1 \times 10^4$  cells/well on Ab-coated plates and were incubated for 2 h. Irradiated

221.A2 cells ( $5 \times 10^4$  cells/well) pulsed with appropriate peptides (Melan-A<sub>26-35</sub> A27L or NS3-1406) were then added. As a positive control, effector cells were incubated with 0.5  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD3 (Sanquin, Amsterdam, Netherlands). Following 22 h of incubation, plates were washed extensively and were incubated with biotinylated IFN- $\gamma$  detection mAb (clone 4S.B3; BD Biosciences) and alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (Bio-Rad, Hercules, CA). Plates were washed and incubated with BCIP/NBT-plus substrate solution (Bio-Rad). Spots were counted on an Immunospot 3A Analyser (CTL Technology Ltd., Shaker Heights, OH).

### **Amplification and sequencing of TCR $\beta$ chain transcripts**

Total mRNA was extracted from pellets of tetramer-sorted cells (150-1,500 cells) using the Picopure system (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The TCR  $\beta$  chain variable region (TRBV) mRNA, including complementarity-determining region 3 (CDR3), was reverse transcribed and corresponding cDNA was amplified by PCR (40 cycles) using universal primers, as described previously (20). PCR products were subcloned into the TOPO TA cloning vector (Invitrogen) and sequenced (CHUL, Quebec, Canada). Identification of TRBV and TRBJ segments and determination of CDR3 length and amino-acid sequences was performed using IMGT/V-QUEST and confirmed manually (21).

### **Statistical analysis**

Normality of the distribution of sample data was assessed using the D'Agostino and Pearson normality omnibus test. Statistical significance in between-groups comparisons was

assessed using the Mann-Whitney *U* test. The Chi-square test was used to examine categorical data. Spearman correlation and linear regression analysis were used to test correlations between groups. *p* values < 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## RESULTS

### **Melan-A-specific T cells are detectable in umbilical cord blood.**

The presence of Melan-A-specific CD8<sup>+</sup> T cells was estimated in UCB (HLA-A2<sup>+</sup>, n=12; HLA-A2<sup>-</sup>, n=14) and AB (HLA-A2<sup>+</sup>, n=5; HLA-A2<sup>-</sup>, n=9) using Melan-A<sub>26-35</sub> A27L-HLA-A2 tetramers (A2/Melan-A). A2/Melan-A-specific T cells were detected in 19 of 26 (73.1%) UCBMC samples tested, with a median frequency of 0.04%. Of these, 10 of 12 (83.3%) HLA-A2<sup>+</sup> UCBMC samples were A2/Melan-A<sup>+</sup>, and the median frequency of A2/Melan-A<sup>+</sup> cells was 0.07% of CD8<sup>+</sup> T cells. Nine of 14 (64.3%) of HLA-A2<sup>-</sup> UCBMC samples were also A2/Melan-A<sup>+</sup>, and the median frequency of A2/Melan-A<sup>+</sup> cells was 0.04% of CD8<sup>+</sup> T cells. Of 15 AB samples tested, 4 of 5 (80.0%) HLA-A2<sup>+</sup> AB samples were A2/Melan-A<sup>+</sup>, with a median frequency of 0.06%. In comparison, 4 of 9 (44.4%) HLA-A2<sup>-</sup> AB samples were A2/Melan-A<sup>+</sup>, with a median frequency of A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells of 0.00%. The median frequency of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was higher in HLA-A2<sup>+</sup> UCB and HLA-A2<sup>+</sup> AB samples than in HLA-A2<sup>-</sup> UCB and HLA-A2<sup>-</sup> AB samples, respectively, but the difference was statistically significant in the case of AB only (*p*=0.0580 and *p*= 0.0415, respectively) (Figure 2.1A).

### **Melan-A-specific T cells from umbilical cord blood express a naïve phenotype.**

To gain insight into the differentiation pattern and proliferative history of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from UCB, cell-surface expression of CD45RA, CCR7 and CD27 was examined, allowing the stratification of CD8<sup>+</sup> T cells into 6 distinct subpopulations: a) naïve (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>); b) central memory (CM) (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>); c) effector memory (EM) (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>), which includes EM<sub>1-2</sub> (CD27<sup>+</sup>) and EM<sub>3-4</sub> (CD27<sup>-</sup>); and d) effectors (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>), which includes EMRA (CD27<sup>+</sup>) and terminally-differentiated EMRA-E (CD27<sup>-</sup>) (22). A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell populations from HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCB comprised a large majority of cells expressing a naïve phenotype (96.6 ± 13.7%, and 95.8 ± 11.7%, respectively) (Figure 2.1C). While most A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> AB were naïve (61.9 ± 23.1%, and 77.6 ± 18.1%, respectively), they also comprised effectors (26.8 ± 29.6%, and 8.14 ± 12.2%, respectively) that could be further subdivided into EMRA (8.60 ± 8.40%, and 4.54 ± 8.16%, respectively) and EMRA-E (18.2 ± 21.2%, and 3.60 ± 4.04%, respectively) (Figure 2.1B and 2.1C). Thus, freshly isolated Melan-A-specific CD8<sup>+</sup> T cells from UCB are less differentiated than their AB counterparts.

### **The Melan-A specific CD8<sup>+</sup> T cell repertoire in UCB is polyclonal and highly diversified.**

To study the diversity and dynamics of the Melan-A-specific CD8<sup>+</sup> T cell compartment, the repertoire of TCR β chain genes expressed by sorted A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was examined using PCR amplification, cloning, and sequencing in absence of *in vitro* stimulation. This analysis revealed that the clonal diversity of freshly isolated A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was significantly lower in HLA-A2<sup>+</sup> than in HLA-A2<sup>-</sup> UCB samples ( $p = 0.0143$ )

(Figure 2.2A). Clonal diversity was also examined in terms of TRBV gene usage, TRBJ gene usage, and CDR3 length, which represent 3 important structural determinants of antigen recognition by the TCR (23). Though the profiles were similar, TRBV and TRBJ gene usage was broader in A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells isolated from HLA-A2<sup>-</sup> UCB samples, as compared with those derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB samples (Figure 2.2B). In both HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCB samples, the distribution of CDR3 lengths in A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was quasi-Gaussian ( $p = 0.5680$ ), consistent with a pre-immune repertoire (Figure 2.2B) (24,25).

### **Oligoclonal expansion of UCB-derived A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells.**

The capacity of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells derived from HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCB to proliferate in response to stimulation with cognate peptide was then assessed. Unsorted UCBMC samples were seeded at 1,000 cells/well and cultured for two weeks with IL-2, IL-7, Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide, and irradiated 221.A2 cells. 96 microcultures per UCB sample were pooled and characterized by flow cytometry. The proportion of A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells in CD8<sup>+</sup> T cells was significantly increased in HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCB samples ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0003$ , respectively) following stimulation with Melan-A<sub>26-35</sub> A27L (Figure 2.3A). The overall proportion of CD8<sup>+</sup> T cells was also significantly increased ( $p < 0.0001$ ) (Figure 2.3B). Similar levels of expansion were observed in AB samples (data not shown). In addition, the frequency of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells following *in vitro* peptide stimulation was significantly correlated with the proportion of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in freshly isolated cell samples ( $p < 0.0001$ ) (Figure 2.3C).



Next, the diversity of the Melan-A-specific T cell repertoire was examined following stimulation with cognate peptide. Tetramer-sorted A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells derived from peptide-stimulated UCB microcultures showed significantly lower levels of clonal diversity as compared with freshly isolated A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells ( $p = 0.0325$ ; HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> samples analyzed together) (Figure 2.4A). In contrast to what was observed in freshly isolated cells (Figure 2.2), clonal diversity was lower in UCB-derived A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells isolated from HLA-A2<sup>-</sup> donors, as compared to HLA-A2<sup>+</sup> donors, though not significantly so ( $p = 0.125$ ) (Figure 2.4B). TRBV3-1, TRBV5-6 and TRBV9 accounted for 81.0% of total TRBV usage in sequences derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB samples, while TRBV11-2 accounted for 64.0% of TRBV usage in sequences derived from HLA-A2<sup>-</sup> UCB samples (Figure 2.4C). TCR usage in terms of CDR3 length distribution was narrower after culture, both in T cell microcultures derived from HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCB samples (Figure 2.2B and Figure 2.4C). These results demonstrate that A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells can undergo oligoclonal expansion following stimulation with cognate peptide, irrespective of whether they were derived from HLA-A2<sup>+</sup> or HLA-A2<sup>-</sup> UCB.

### **Differentiation and antigen-specific cytotoxic activity of UCB-derived Melan-A-specific T cells.**

As A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells underwent oligoclonal expansion following stimulation with cognate peptide, it was important to assess whether this proliferation was accompanied by phenotypic and/or functional differentiation. To address this issue, 3 sets of experiments were performed. First, total UCBMC (1,000 cells per well) were plated on irradiated feeder cells and stimulated with the Melan-A<sub>26-35</sub>A27L peptide, IL-2 and IL-7 for 2 weeks. In HLA-

A2<sup>+</sup> UCB samples, a mean of  $49.9 \pm 14.0\%$  of peptide-stimulated A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells retained a naïve phenotype. Others mainly differentiated into EMRA ( $35.1 \pm 12.1\%$ ) and EMRA-E ( $8.05 \pm 6.56\%$ ) (Figure 2.5A). Similarly, in HLA-A2<sup>-</sup> UCB samples, a mean of  $53.5 \pm 3.35\%$  of peptide-stimulated A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells remained naïve, while others differentiated into EMRA ( $37.2 \pm 1.13\%$ ) and EMRA-E ( $6.30 \pm 1.6\%$ ) (Figure 2.5A).

In separate experiments, sorted A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells derived from HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCBMC and AB samples were expanded in the presence of IL-2, IL-7 and PHA to avoid biasing the T cell repertoire (26). After 14 days,  $16.3 \pm 23.5\%$  of expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> cells from HLA-A2<sup>+</sup> UCB samples retained a naïve phenotype,  $1.82 \pm 2.48\%$  differentiated into CM,  $7.85 \pm 8.53\%$  into EM<sub>1-2</sub>,  $22.4 \pm 22.3\%$  into EM<sub>3-4</sub>,  $20.8 \pm 25.9\%$  into EMRA, and  $30.8 \pm 13.7\%$  into EMRA-E (Figure 2.5B). In contrast,  $26.5 \pm 28.1\%$  of expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> cells from HLA-A2<sup>+</sup> AB remained naïve,  $1.23 \pm 0.56\%$  became CM,  $17.8 \pm 13.2\%$  became EM<sub>1-2</sub>,  $10.7 \pm 19.5\%$  became EM<sub>3-4</sub>,  $26.0 \pm 39.7\%$  became EMRA, but only  $3.16 \pm 2.73\%$  differentiated into EMRA-E (Figure 2.5C). Similarly,  $28.4 \pm 32.5\%$  of expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> cells from HLA-A2<sup>-</sup> UCB samples differentiated into EMRA-E, whereas only  $8.80 \pm 10.6\%$  of expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> cells from HLA-A2<sup>-</sup> AB achieved terminal differentiation (Figures 2.5B and 2.5C). Control stainings with CMVpp65-HLA-A2 tetramers were uniformly negative (data not shown). Taken together, these results indicate that: a) stimulation with cognate peptide or polyclonal stimulation with PHA leads to the differentiation of Melan-A-specific T cells derived from HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCB into various memory and effector subtypes; and b) following PHA stimulation, a larger proportion of Melan-A-specific UCB-derived T cells express a terminally-differentiated phenotype than AB-derived T cells.

Unsorted UCBMC and unsorted PBMC from AB stimulated with Melan-A<sub>26-35</sub> A27L were then tested for cytolytic activity. Cytolytic microcultures were detected in all HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup>UCB and AB samples tested. The median frequency of T cell microcultures expressing cytolytic activity was equivalent between HLA-A2<sup>+</sup> UCBMC and HLA-A2<sup>+</sup> AB ( $p = 0.1868$ ), but was lower in HLA-A2<sup>-</sup> UCBMC in comparison with HLA-A2<sup>-</sup> AB and HLA-A2<sup>+</sup> UCBMC ( $p = 0.0242$  and  $p = 0.0058$ , respectively) (Figure 2.6A). Furthermore, the median percent specific cytotoxicity was higher in T cell microcultures derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCBMC than in corresponding microcultures derived from HLA-A2<sup>+</sup> AB ( $p = 0.0092$ ), and similar between HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCB-derived microcultures and between HLA-A2<sup>-</sup> UCB- and AB-derived microcultures ( $p = 0.0923$  and  $p = 0.3134$ , respectively) (Figure 2.6B). Cytolytic activity was also measured in tetramer-sorted A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones following PHA-driven expansion: again the median frequency of cytolytic T cell clones was equivalent between HLA-A2<sup>+</sup> UCB- and HLA-A2<sup>+</sup> AB-derived microcultures, and was lower in HLA-A2<sup>-</sup> samples as compared to HLA-A2<sup>-</sup> AB samples ( $p = 0.0028$ ). Of note, the median frequency of cytolytic T cell clones was higher in HLA-A2<sup>+</sup> UCB samples as compared with HLA-A2<sup>-</sup> UCB, but this difference did not reach statistical significance ( $p = 0.1112$ ) (Figure 2.6C). Likewise, median specific cytolytic activity was similar between HLA-A2<sup>+</sup> UCB samples and HLA-A2<sup>+</sup> AB samples ( $p = 0.2956$ ) and lower in A2/Melan-A<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>-</sup> UCB donors as compared with clones derived from HLA-A2<sup>-</sup> AB ( $p = 0.0094$ ) (Figure 2.6D). These results indicate that the cytolytic activity of HLA-A2<sup>+</sup> UCB-derived Melan-A-specific T cells is equivalent to that of AB-derived T cells, whereas the cytolytic activity of Melan-A-specific T cells derived from HLA-A2<sup>-</sup> UCB is comparatively impaired.

### **Melan-A-specific UCB-derived T cells can specifically secrete IFN- $\gamma$ .**

To further characterize the functionality of A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells from UCBMC, production of IFN- $\gamma$  by expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones was examined using ELISPOT. A median of 76.7 %, 33.3%, 87.5%, and 55.0% of HLA-A2<sup>+</sup> UCBMC, HLA-A2<sup>-</sup> UCBMC, HLA-A2<sup>+</sup> AB, and HLA-A2<sup>-</sup> AB-derived T cell clones, respectively, were able to produce above-threshold levels of IFN- $\gamma$  in the presence of 221.A2 cells sensitized with Melan-A<sub>26-35</sub> A27L, as compared with unpulsed targets or targets sensitized with control peptide NS3-1406. The frequency of expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones that produced IFN- $\gamma$  was equivalent between HLA-A2<sup>+</sup> UCB and HLA-A2<sup>+</sup> AB samples ( $p = 0.0727$ ), and was significantly lower when they were derived from HLA-A2<sup>-</sup> UCB as compared to HLA-A2<sup>+</sup> UCB ( $p = 0.0122$ ) but not to HLA-A2<sup>-</sup> AB ( $p = 0.0741$ ) (Figure 2.6E). Interestingly, differences in numbers of IFN- $\gamma$ -producing cells on a per clone basis were also observed among the four groups: expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCB comprised significantly less cells that produced IFN- $\gamma$  in response to cognate peptide than HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> AB-derived T cell clones ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0687$ , respectively) (Figure 2.6F). In summary, these data indicate that: a) polyclonal stimulation leads to the differentiation of UCB-derived and AB-derived Melan-A-specific T cells into IFN- $\gamma$  producing cells; b) the frequency of Melan-A-specific T cells that produce IFN- $\gamma$  is higher in AB and HLA-A2<sup>+</sup> UCB than in HLA-A2<sup>-</sup> UCB; and c) expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from AB are more potent IFN- $\gamma$  producers than those derived from UCB.

### **Expanded A2/Melan-A+ CD8+ T cells exhibit polyfunctional characteristics.**

Polyfunctionality of CD8<sup>+</sup> T cells is an important characteristic of cell-mediated immune responses (23). Overall, secretion of IFN- $\gamma$  by expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells sorted from HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCBMC samples was positively correlated with their cytolytic activity ( $p < 0.0001$ ) (Figure 2.7A). In order to examine this association, expanded T cells derived from HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCBMC and AB were scored according to the presence of cytolytic activity (CTL) and IFN- $\gamma$  production, *i.e.* CTL-IFN- $\gamma$  (0 functions), CTL+IFN- $\gamma$ /CTL-IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (monofunctional), or CTL+IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (bifunctional). This analysis revealed that 57.2% of expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB were monofunctional, 48.8% of expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>-</sup> UCB neither produced IFN- $\gamma$  nor exhibited cytolytic activity, 52.9% of expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>+</sup> AB were bifunctional, and 45.8% of expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>-</sup> AB were monofunctional (Figure 2.7B). Overall, the polyfunctionality profile expressed by HLA-A2<sup>+</sup> UCB T cells significantly differed from that expressed by HLA-A2<sup>-</sup> UCB T cells and HLA-A2<sup>+</sup> AB T cells ( $p < 0.0001$  in both cases). In contrast, the polyfunctionality profiles displayed by HLA-A2<sup>-</sup> UCB T cells did not significantly deviate from that of HLA-A2<sup>-</sup> AB T cells ( $p = 0.8220$ ). These data demonstrate that a proportion of Melan-A-specific T cells derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB exhibit bifunctional properties following polyclonal expansion, though this proportion is lower than that observed in HLA-A2<sup>+</sup> AB-derived Melan-A-specific T cells. Furthermore, when evaluation was made on a per sample basis, expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were less likely to be non-functional and more likely to be monofunctional when they were derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB as compared with HLA-A2<sup>-</sup> UCB ( $p = 0.0082$  and  $p = 0.0115$ , respectively). However, on a per sample basis, the likelihood of expanded A2/Melan-A<sup>+</sup>

CD8<sup>+</sup> T cells to be bifunctional was not significantly different whether they were derived from HLA-A2<sup>+</sup> or HLA-A2<sup>-</sup> UCB (Figure 2.7C).

## **DISCUSSION**

In this report, the functionality of UCB-derived antigen-specific and alloreactive T cells was studied to revisit the so-called immaturity of this T cell subset and provide a rationale for the reduced incidence of GVHD and higher incidence of OI following UCBT. Using peptide-MHC tetramers, Melan-A-specific CD8<sup>+</sup> T cells were detected in HLA-A2<sup>+</sup> UCB at a frequency noninferior to that observed in HLA-A2<sup>+</sup> AB. Consistent with these observations, A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were also detected in HLA-A2<sup>-</sup> UCB, but their frequency was lower than that observed in HLA-A2<sup>+</sup> UCB.

Unlike what was observed in AB, most A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from UCB expressed cell-surface markers indicative of a preimmune, naïve phenotype, and displayed a diversified and polyclonal TCR  $\beta$  chain repertoire. Their presence at a relatively high frequency suggests that they may have already encountered cognate antigen. Hence, A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T lymphocytes isolated from HLA-A2<sup>+</sup> UCB may not constitute a truly preimmune repertoire but instead represent immature/transitional T cells, *i.e.* cells that have not been fully activated but are not antigen-inexperienced (27).

T cells from UCB were previously shown to exhibit impaired proliferative capacity (6-8,28-30). In sharp contrast, results presented herein demonstrate for the first time that the A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell subsets isolated from HLA-A2<sup>+</sup> UCB are able to expand significantly following stimulation with cognate peptide. Expanded T cell populations became oligoclonal and exhibited biased TRBV and TRBJ gene usage, as well as a restricted distribution of CDR3 length. These markers of antigen-driven T cell expansion were observed in multiple studies of functional T cell responses to pathogens and tumours (20,24,31). Following UCB stimulation with cognate peptide, ~50% of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells acquired an EM or EMRA phenotype and a minority became terminally differentiated. In contrast, expansion of UCB-derived A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones with PHA led a larger proportion to differentiate into EMRA-E as compared with AB, in which only few T cell clones became fully-differentiated EMRA-E. This was observed in both HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCB and AB samples. This indicates that CD8<sup>+</sup> T cells from UCB can differentiate following polyclonal stimulation. Moreover, they attain terminal differentiation faster and/or more directly than AB-derived CD8<sup>+</sup> T cells, irrespective of the starting proportion of naïve T cells in AB. Similar observations were previously reported with UCB-derived CD4<sup>+</sup> T cells (32). Alternatively, these observations could be explained by a) differing cellular subtype compositions of starting T cell populations in UCB versus AB; b) different numbers of cycles of proliferation in UCB versus AB-derived A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells (33); and/or c) differing rates of apoptosis in UCB versus AB-derived A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells (34). It is worth mentioning that T lymphocytes were cultured in the presence of IL-7, which promotes the survival of neonatal T cells (35). In theory, this peculiar property of UCB-derived CD8<sup>+</sup> T cells could contribute to the reduced incidence and severity of GVHD observed following UCBT as compared with transplants that used other HSC sources (4,5).

UCB T cells were traditionally described as non-functional, immature, and susceptible to apoptosis (6,8,34). It was proposed that naïve UCB T lymphocytes became biased towards  $T_H2$  *in utero* by placenta-derived factors (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , prostaglandin E2) that are thought to be involved in the maintenance of pregnancy (36). The relative cytolytic inefficacy of UCB T cells was associated with reduced expression of granzymes and perforin (28,37). Costimulation mediated via NKG2D and Toll-like receptors was recently shown to be involved in the functional responsiveness of UCB-derived CD8<sup>+</sup> T cells (38,39). In the present study, the frequency of T cell microcultures derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB that exhibited cytolytic activity in response to cognate peptide was similar to that observed in HLA-A2<sup>+</sup> AB. In fact, they performed significantly better than AB on a per microculture basis following stimulation with cognate peptide. This similarity was upheld when expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones were examined, as cytolytic activity displayed by HLA-A2<sup>+</sup> UCB-derived T cells was non-inferior to that displayed by HLA-A2<sup>+</sup> AB-derived clones.

The frequency of expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells that produced above-threshold levels of IFN- $\gamma$  in response to Melan-A<sub>26-35</sub> A27L was similar in HLA-A2<sup>+</sup> AB and HLA-A2<sup>+</sup> UCB. In addition, there were comparatively more expanded HLA-A2<sup>+</sup> AB-derived A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells that produced IFN- $\gamma$  in response to cognate peptide than HLA-A2<sup>+</sup> UCB-derived A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells on a per clone basis, indicating that AB-derived T cells are more robust producers of IFN- $\gamma$ , a pivotal antiviral cytokine (40), than their UCB-derived counterparts. Aberrant production of the  $T_H2$  cytokine IL-13 and reduced levels of NFAT-1 in UCB T cells was shown to be associated with low levels of IFN- $\gamma$  production (41,42). Close



examination of cytolytic activity and IFN- $\gamma$  production revealed that HLA-A2<sup>+</sup> UCB T cells were more likely to be monofunctional and HLA-A2<sup>+</sup> AB T cells more likely to be bifunctional, underscoring the notion that UCB-derived T cells exhibit attenuated, perhaps suboptimal responses to cognate antigen. These differences could be linked to maturational stage (differential granzyme and/or perforin expression) or differential sensitivity to antigen, which can vary by orders of magnitude in T cells that recognize identical peptide-MHC complexes (43,44). In antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses, functional avidity for antigen is intimately associated with polyfunctionality (44,46). As donor-derived CD8<sup>+</sup> T cells play a key role in antiviral and antitumoral immunity in HSC transplant recipients (1,2), reduced polyfunctionality of UCB-derived CTL might contribute to the higher incidence of OI, in particular varicella zoster virus infection, that was reported in children following UCBT relative to recipients of bone marrow transplants (5). Functional impairment should also be taken into consideration when attempting to mobilize virus-specific CTL from UCB for use in the prevention and/or treatment of viral diseases following UCBT (47).

Even though the restricting MHC allele is not present in the donor, A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells can be reproducibly isolated from HLA-A2<sup>-</sup> blood samples, where they are thought to represent an endogenous alloreactive Melan-A-specific repertoire (15). In freshly isolated cells, clonal diversity was higher in A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from HLA-A2<sup>-</sup> UCB as compared with HLA-A2<sup>+</sup> UCB. As A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells cannot be negatively selected by Melan-A:HLA-A2 peptide-MHC class I complexes during thymopoiesis in HLA-A2<sup>-</sup> subjects, highly reactive clones cannot be depleted, leading to a broad and diversified allorestricted T cell repertoire (48,49). In sharp contrast, the clonal diversity of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells following peptide stimulation was lower in microcultures derived from HLA-A2<sup>-</sup> UCB as

compared with those derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB. To explain this finding, we hypothesize that there were fewer individual T cell clones in HLA-A2<sup>-</sup> UCB that were capable of proliferation in response to peptide stimulation. Alternatively, since high-affinity A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>-</sup> UCB did not undergo negative selection against cognate peptide in the context of HLA-A2, these cells could have received comparatively stronger proliferative signals following stimulation, leading to reduced peptide-specific repertoire diversity.

Differentiation profiles exhibited by A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> or HLA-A2<sup>-</sup> UCB were identical irrespective of whether stimulation with cognate peptide or PHA was used, indicating that allorecognition and cognate peptide stimulation lead to similar patterns of naïve-effector-memory differentiation. However, a lower relative proportion of UCB-derived HLA-A2<sup>-</sup> T cells exhibited cytolytic activity directed against targets sensitized with peptide. This difference held true whether T cells were stimulated with cognate peptide or PHA. Reduced frequencies were not due to nonspecific staining with the A2/Melan-A<sub>26-35</sub> A27L tetramer, as tetramer positivity was confirmed in proliferating T cells post-stimulation (data not shown). Non-functional A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells have been previously described (15). While differential expression of cytotoxic granule components was not examined in the present study, it is well-established that differences in effector functions are reflected by the expression of distinct combinations of intracellular molecules associated with cell-mediated cytolytic activity (50-52). Indeed, the multifunctionality profile expressed by A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>-</sup> UCB markedly differed from that expressed by T cells from HLA-A2<sup>+</sup> UCB: the former were more likely to be non-functional, whereas the latter were more likely to be mono- or bifunctional. This difference

is unrelated to differentiation, since A2/Melan-A<sup>+</sup> cells from HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCB display quasi-identical naïve-effector-memory population structures. As functional avidity is closely associated with cytolytic activity, rapid proliferation of high avidity A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>-</sup> UCB could have led to clonal exhaustion, consistent with the reduced frequency of cytolytic T cells that was observed following peptide stimulation or polyclonal activation. Alternatively, It is possible that tetramer staining by itself led to clonal deletion of high-affinity A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>-</sup> UCB, as highly antigen-sensitive CTL can be killed by A2/Melan-A tetramers (53,54). These two models are compatible with the lower levels of clonal diversity that were observed in expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells isolated from HLA-A2<sup>-</sup> UCB following stimulation with cognate peptide. Taken together, these results underscore fundamental differences between A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCB in terms of antigenic specificity, activation threshold and function.

In summary, functional properties of UCB-derived antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells that were documented for the first time in the present study (differentiation geared towards EMRA-E, reduced frequency of cytolytic and IFN- $\gamma$ -producing T cell clones, differential polyfunctionality profiles) provide new insights into UCB immunobiology and offer a rationale for the higher incidence of OI and comparatively low rates of acute and chronic GVHD observed following UCBT, particularly in the face of HLA mismatch (55,56). As components of post-transplant immunotherapeutic regimens, UCB-derived CD8<sup>+</sup> T cells could potentially be used to alleviate unfavourable outcomes associated with UCBT, including failure of engraftment, leukemic relapse, GVHD, and OI.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank Dr. Nicole F. Bernard for performing HLA typing, Dr. Réjean Lapointe for use of the CTL Immunospot Analyzer, Sylvain Gimmig for flow cytometric analysis, Silvie Valois for invaluable technical assistance, and Dr. Françoise Le Deist and Dr. Armelle Le Champion for critical reading of the manuscript. N.M. was the recipient of doctoral scholarships from the Cole Foundation, Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine, and FRSQ. E.C. was supported by the Cole Foundation. A.J.G. was the recipient of a master's scholarship from FRSQ.

## **DISCLOSURES**

The authors do not have a commercial or other association that might pose a conflict of interest.

## **REFERENCES**

1. Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1996. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 207-232.
2. Zhang, C., J. Lou, N. Li, I. Todorov, C. L. Lin, Y. A. Cao, C. H. Contag, F. Kandeel, S. Forman, and D. Zeng. 2007. Donor CD8<sup>+</sup> T cells mediate graft-versus-leukemia

- activity without clinical signs of graft-versus-host disease in recipients conditioned with anti-CD3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 178: 838-850.
3. Tse, W., K. D. Bunting, and M. J. Laughlin. 2008. New insights into cord blood stem cell transplantation. *Curr. Op. Hematol.* 15: 274-284.
  4. Szabolcs, P., and D. Niedzwiecki. 2007. Immune reconstitution after unrelated cord blood transplantation. *Cytotherapy* 9: 111-122.
  5. Vandenbosch, K., P. Ovetckine, M. A. Champagne, E. Haddad, L. Alexandrov, and M. Duval. 2008. Varicella-zoster virus disease is more frequent after cord blood than after bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14: 867-871.
  6. Harris, D. T., M. J. Schumacher, J. Locascio, F. J. Besencon, G. B. Olson, D. DeLuca, L. Shenker, J. Bard, and E. A. Boyse. 1992. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 10006-10010.
  7. Chalmers, I. M., G. Janossy, M. Contreras, and C. Navarrete. 1998. Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes. *Blood* 92: 11-18.
  8. Risdon, G., J. Gaddy, F. B. Stehman, and H. E. Broxmeyer. 1994. Proliferative and cytotoxic responses of human cord blood T lymphocytes following allogeneic stimulation. *Cell. Immunol.* 154: 4-24.
  9. Nitsche, A., M. Zhang, T. Clauss, W. Siegert, K. Brune, and A. Pahl. 2007. Cytokine profiles of cord and adult blood leukocytes: differences in expression are due to differences in expression and activation of transcription factors. *BMC Immunol.* 8: 18.

10. Gutman, J. A., C. J. Turtle, T. J. Manley, S. Heimfeld, I. D. Bernstein, S. R. Riddell, and C. Delaney. 2009. Single unit dominance following double unit umbilical cord blood transplantation coincides with a specific CD8<sup>+</sup> T cell response against the non-engrafted unit. *Blood* [Epub ahead of print].
11. Marchant, A., V. Appay, M. Van Der Sande, N. Dulphy, C. Liesnard, M. Kidd, S. Kaye, O. Ojuola, G. M. Gillespie, A. L. Vargas Cuero, V. Cerundolo, M. Callan, K. P. McAdam, S. L. Rowland-Jones, C. Donner, A. J. McMichael, and H. Whittle. 2003. Mature CD8(+) T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J. Clin. Invest.* 111: 1747-1755.
12. Rastogi, D., C. Wang, X. Mao, C. Lendor, P. B. Rothman, and R. L. Miller. 2007. Antigen-specific immune responses to influenza vaccine in utero. *J. Clin. Invest.* 117: 1637-1646.
13. Valmori, D., N. Gervois, D. Rimoldi, J. F. Fonteneau, A. Bonelo, D. Liénard, L. Rivoltini, F. Jotereau, J. C. Cerottini, and P. Romero. 1998. Diversity of the fine specificity displayed by HLA-A\*0201-restricted CTL specific for the immunodominant Melan-A/MART-1 antigenic peptide. *J. Immunol.* 161: 6956-6962.
14. Romero, P., D. Valmori, M. J. Pittet, A. Zippelius, D. Rimoldi, F. Lévy, V. Dutoit, M. Ayyoub, V. Rubio-Godoy, O. Michielin, P. Guillaume, P. Batard, I. F. Luescher, F. Lejeune, D. Liénard, N. Rufer, P. Y. Dietrich, D. E. Speiser, and J. C. Cerottini. 2002. Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol. Rev.* 188: 81-96.
15. Pittet, M. J., A. Gati, F. A. Le Gal, G. Bioley, P. Guillaume, M. de Smedt, J. Plum, D. E. Speiser, J. C. Cerottini, P. Y. Dietrich, P. Romero, and A. Zippelius. 2006. Ex vivo

- characterization of allo-MHC-restricted T cells specific for a single MHC-peptide complex. *J. Immunol.* 176: 2330-2336.
16. Yee, C., P. A. Savage, P. P. Lee, M. M. Davis, and P. D. Greenberg. 1999. Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers. *J. Immunol.* 162: 2227-2234.
  17. Lissina, A., K. Ladell, A. Skowera, M. Clement, E. Edwards, R. Seggewiss, H. A. van den Berg, E. Gostick, K. Gallagher, E. Jones, J. J. Melenhorst, A. J. Godkin, M. Peakman, D. A. Price, A. K. Sewell, and L. Wooldridge. 2009. Protein kinase inhibitors substantially improve the physical detection of T-cells with peptide-MHC tetramers. *J. Immunol. Methods* 340: 11-24.
  18. Brunner, K. T., J. Mael, J. C. Cerottini, and B. Chapuis. 1968. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 14: 181-196.
  19. Sun, Y., E. Iglesias, A. Samri, G. Kamkamidze, T. Decoville, G. Carcelain, B. and B. Autran. 2003. A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells. *J. Immunol. Methods* 272: 23-34.
  20. Soudeyns, H., P. Champagne, C. L. Holloway, G. U. Silvestri, N. Ringuette, J. Samson, N. Lapointe, and R. P. Sékaly. 2000. Transient T cell receptor beta-chain variable region-specific expansions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells during the early phase of pediatric human immunodeficiency virus infection: characterization of expanded cell populations by T cell receptor phenotyping. *J. Infect. Dis.* 181: 107-120.

21. Brochet, X., M. P. Lefranc, and V. Giudicelli. 2008. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 36: W503-W508.
22. Romero, P., A. Zippelius, I. Kurth, M. J. Pittet, C. Touvrey, E. M. Iancu, P. Corthesy, E. Devereux, D. E. Speiser, and N. Rufer. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Immunol.* 178: 4112-4119.
23. Precopio, M. L., M. R. Betts, J. Parrino, D. A. Price, E. Gostick, D. R. Ambrozak, T. E. Asher, D. C. Douek, A. Harari, G. Pantaleo, R. Bailer, B. S. Graham, M. Roederer, and R. A. Koup. 2007. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J. Exp. Med.* 204: 405-1416.
24. Rock, E. P., P. R. Sibbald, M. M. Davis, and Y. H. Chien. 1994. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J. Exp. Med.* 179: 323-328.
25. Allan, S. E., A. N. Alstad, N. Merindol, N. K. Crellin, M. Amendola, R. Bacchetta, L. Naldini, M. G. Roncarolo, H. Soudeyns, and M. Levings. 2008. Generation of potent and stable human CD4<sup>+</sup> T regulatory cells by activation-independent expression of FOXP3. *Mol. Ther.* 16: 194-202.
26. Currier, J. R., H. Deulofeut, K. S. Barron, P. J. Kehn, and M. A. Robinson. 1996. Mitogens, superantigens, and nominal antigens elicit distinctive patterns of TCRB CDR3 diversity. *Hum. Immunol.* 48: 39-51.
27. Hamann, D., P. A. Baars, M. H. Rep, B. Hooibrink, S. R. Kerkhof-Garde, M. R. Klein, and R. A. van Lier. 1997. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 186: 1407-1418.



28. Berthou, C., S. Legros-Maïda, A. Soulié, A. Wargnier, J. Guillet, C. Rabian, E. Gluckman, and M. Sasportes. 1995. Cord blood T lymphocytes lack constitutive perforin expression in contrast to adult peripheral blood T lymphocytes. *Blood* 85: 1540-1546.
29. Moretta, A., F. Locatelli, G. Mingrat, G. Rondini, D. Montagna, P. Comoli, S. Gandossini, E. Montini, M. Labirio, and R. Maccario. 1999. Characterisation of CTL directed towards non-inherited maternal alloantigens in human cord blood. *Bone Marrow Transplant* 24: 1161-1166.
30. Porcu, P., J. Gaddy, and H. E. Broxmeyer. 1998. Alloantigen-induced unresponsiveness in cord blood T lymphocytes is associated with defective activation of Ras. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95: 4538-4543.
31. McHeyzer-Williams, M. G., and M. M. Davis. 1995. Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo. *Science* 268: 106-111.
32. Early, E., and D. J. Reen. 1999. Rapid conversion of naive to effector T cell function counteracts diminished primary human newborn T cell responses. *Clin. Exp. Immunol.* 116: 527-533.
33. Szabolcs, P., K. D. Park, M. Reese, L. Marti, G. Broadwater, and J. Kurtzberg. 2003. Coexistent naïve phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood. *Exp. Hematol.* 31: 708-714.
34. Aggarwal, S., A. Gupta, S. Nagata, and S. Gupta. 1997. Programmed cell death (apoptosis) in cord blood lymphocytes. *J. Clin. Immunol.* 17: 63-73.

35. Hassan, J., and D. J. Reen. 2001. Human recent thymic emigrants--identification, expansion, and survival characteristics. *J. Immunol.* 167: 1970-1976.
36. Goodwin, V. J., T. A. Sato, M. D. Mitchell, and J. A. Keelan. 1998. Anti-inflammatory effects of interleukin-4, interleukin-10, and transforming growth factor-beta on human placental cells in vitro. *Am. J. Reprod. Immunol.* 40:319-325.
37. Mazur, M. A., C. C. Davis, and P. Szabolcs. 2008. Ex vivo expansion and Th1/Tc1 maturation of umbilical cord blood T cells by CD3/CD28 costimulation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14: 1190-1196.
38. Kim, Y. J., M. K. Han, and H. E. Broxmeyer. 2008. 4-1BB regulates NKG2D costimulation in human cord blood CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 111: 1378-1386.
39. McCarron, M., and D. J. Reen. 2009. Activated human neonatal CD8<sup>+</sup> T cells are subject to immunomodulation by direct TLR2 or TLR5 stimulation. *J. Immunol.* 182: 55-62.
40. Zhang, S. Y., S. Boisson-Dupuis, A. Chapgier, K. Yang, J. Bustamante, A. Puel, C. Picard, L. Abel, E. Jouanguy, and J. L. Casanova. 2008. Inborn errors of interferon (IFN)-mediated immunity in humans: insights into the respective roles of IFN-alpha/beta, IFN-gamma, and IFN-lambda in host defense. *Immunol. Rev.* 226: 29-40.
41. Ribeiro-do-Couto, L. M., L. C. Boeije, J. S. Kroon, B. Hooibrink, B. S. Breur-Vriesendorp, L. A. Aarden, and C. J. Boog. 2001. High IL-13 production by human neonatal T cells: neonate immune system regulator? *Eur. J. Immunol.* 31: 3394-3402.

42. Weitzel, R. P., M. L. Lesniewski, P. Haviernik, S. Kadereit, P. Leahy, N. J. Greco, and M. J. Laughlin. 2009. microRNA 184 regulates expression of NFAT1 in umbilical cord blood CD4<sup>+</sup> T cells. *Blood* 113: 6648-6657.
43. Alexander-Miller, M. A. 2000. Differential expansion and survival of high and low avidity cytotoxic T cell populations during the immune response to a viral infection. *Cell. Immunol.* 201: 58-62.
44. Alexander-Miller, M. A, G. R. Leggatt, and J. A. Berzofsky. 1996. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93: 4102-4107.
45. Price, D. A., J. M. Brenchley, L. E. Ruff, M. R. Betts, B. J. Hill, M. Roederer, R. A. Koup, S. A. Migueles, E. Gostick, L. Wooldridge, A. K. Sewell, M. Connors, and D. C. Douek. 2005. Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8<sup>+</sup> T cell populations specific for persistent DNA viruses. *J. Exp. Med.* 202: 1349-1361.
46. Almeida, J. R., D. A. Price, L. Papagno, Z. A. Arkoub, D. Sauce, E. Bornstein, T. E. Asher, A. Samri, A. Schnuriger, I. Theodorou, D. Costagliola, C. Rouzioux, H. Agut, A. G. Marcelin, D. Douek, B. Autran, and V. Appay. 2007. Superior control of HIV-1 replication by CD8<sup>+</sup> T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J. Exp. Med.* 204: 2473-2485.
47. Hanley, P. J., C. R. Cruz, B. Savoldo, A. M. Leen, M. Stanojevic, M. Khalil, W. Decker, J. J. Mollrem, H. Liu, A. P. Gee, C. M. Rooney, H. E. Heslop, G. Dotti, M. K. Brenner, E. J. Shpall, and C. M. Bollard. 2009. 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* 114: 1958-1967.

48. Obst, R., C. Munz, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. 1998. Allo- and self-restricted cytotoxic T lymphocytes against a peptide library: evidence for a functionally diverse allorestricted T cell repertoire. *Eur. J. Immunol.* 28: 2432-2443.
49. Munz, C., R. Obst, W. Osen, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. 1999. Alloreactivity as a source of high avidity peptide-specific human CTL. *J. Immunol.* 162: 25-34.
50. Bratke, K., M. Kuepper, B. Bade, J. C. Virchow Jr., and W. Luttmann. 2005. Differential expression of human granzymes A, B, and K in natural killer cells and during CD8<sup>+</sup> T cell differentiation in peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* 35: 2608-2616.
51. Takata, H., and M. Takiguchi. 2006. Three memory subsets of human CD8<sup>+</sup> T cells differently expressing three cytolytic effector molecules. *J. Immunol.* 177: 4330-4340.
52. Harari, A., V. Dutoit, C. Celleraï, P. A. Bart, R. A. Du Pasquier, and G. Pantaleo. 2006. Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol. Rev.* 211: 236-254.
53. Cebeaucuer, M., P. Guillaume, P. Hozák, S. Mark, H. Everett, P. Schneider, and I. F. Luescher. 2005. Soluble MHC-peptide complexes induce rapid death of CD8<sup>+</sup> CTL. *J. Immunol.* 174: 809-6819.
54. Xu, X. N., M. A. Purbhoo, N. Chen, J. Mongkolsapaya, J. H. Cox, U. C. Meier, S. Tafuro, P. R. Dunbar, A. K. Sewell, C. S. Hourigan, V. Appay, V. Cerundolo, S. R. Burrows, A. J. McMichael, and G. R. Screaton. 2001. A novel approach to antigen-specific deletion of CTL with minimal cellular activation using alpha3 domain mutants of MHC class I/peptide complex. *Immunity* 14: 591-602.

55. Brunstein, C. G., K. S. Baker, and J. E. Wagner. 2007. Umbilical cord blood transplantation for myeloid malignancies. *Curr. Opin. Hematol.* 14: 162-169.
56. Arora, M., S. Nagaraj, J. E. Wagner, J. N. Barker, C. G. Brunstein, L. J. Burns, T. E. Defor, M. L. McMillan, J. S. Miller, and D. J. Weisdorf. 2007. Chronic graft-versus-host disease (cGVHD) following unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation (HSCT): higher response rate in recipients of unrelated donor (URD) umbilical cord blood (UCB). *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13: 1145-1152.

## LEGENDS TO FIGURES

**Figure 2.1. A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells are detectable in umbilical cord blood and adult blood samples.** Multiparameter flow cytometric analysis was performed as described under Materials and Methods. Samples were defined as tetramer positive when: a) A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells represented more than 0.01% of CD8<sup>+</sup> T cells, as this frequency corresponded to maximum background of negative controls; and b) mean fluorescence intensity (MFI) between tetramer positive and negative populations was  $> 1 \log_{10}$ . A. Frequency of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells detected in HLA-A2<sup>+</sup> or HLA-A2<sup>-</sup> UCB and HLA-A2<sup>+</sup> or HLA-A2<sup>-</sup> AB samples using Melan-A<sub>26-35</sub> A27L-HLA-A2 tetramers. Error bars represent the range of values. Boxes represent median and interquartile range. B. Representative dot plots of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from UCB and AB. Percentages reflect the frequency of A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells in the CD8<sup>+</sup> T cell population. C. Differentiation profiles of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> or HLA-A2<sup>-</sup> UCB and AB.

**Figure 2.2. The repertoire of freshly isolated A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells is diversified in HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> umbilical cord blood samples.** A. Clonal diversity was computed as the total number of different TCR  $\beta$  chain clonotypes detected, divided by the total number of sequences generated in a given UCB sample. B. The TCR  $\beta$  chain was amplified from cDNA derived from A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells isolated from HLA-A2<sup>+</sup> (n = 4) and HLA-A2<sup>-</sup> (n = 4) UCB samples, as described under Materials and Methods. TRBV usage, TRBJ usage and CDR3 length were determined using IMGT/V-QUEST (21). Gaussian distribution of CDR3 length is consistent with a pre-immune T cell repertoire.

**Figure 2.3. A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells derived from umbilical cord blood proliferate following stimulation with cognate peptide.** A. Expansion of the A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell subset as a proportion of total CD8<sup>+</sup> T cells in (i) HLA-A2<sup>+</sup> or (ii) HLA-A2<sup>-</sup> UCB samples following 14 days of stimulation with the Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide. B. Expansion of the total CD8<sup>+</sup> T cell subset following 14 days of stimulation with the Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide. C. Linear relationship between the frequency of freshly isolated A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells and following 14 days of stimulation with the Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide.

**Figure 2.4. Oligoclonalization of the A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell subset following cognate peptide stimulation in umbilical cord blood samples.** A. Clonal diversity, computed as the total number of different TCR  $\beta$  chain clonotypes detected, divided by the total number of sequences generated in a given UCB sample, was significantly reduced following 14 days of stimulation with the Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide as compared to that observed in freshly isolated cells. B. Clonal diversity was lower in A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells derived from HLA-

A2<sup>-</sup> UCB samples, as compared with HLA-A2<sup>+</sup> UCB. C. The TCR  $\beta$  chain was amplified from cDNA derived from A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells isolated from HLA-A2<sup>+</sup> (n = 5) and HLA-A2<sup>-</sup> (n = 3) UCB samples, as described under Materials and Methods. TRBV usage, TRBJ usage and CDR3 length were determined using IMGT/V-QUEST (21). Biased usage of TRBV and TRBJ genes and tightening of the CDR3 length profile is consistent with oligoclonalization of the TCR  $\beta$  chain repertoire and antigen-driven T cell expansion.

**Figure 2.5. Phenotypic analysis of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells following stimulation with cognate peptide or polyclonal activation.** T cell microcultures were generated by limiting dilution of HLA-A2<sup>+</sup> and HLA-A2<sup>-</sup> UCB and AB-derived T cells. A. Unsorted UCBMC were seeded (1000 cells/well) onto allogeneic feeder cells and incubated in the presence of Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide, IL-2, and IL-7, as described under Materials and Methods. After 2 weeks in culture, wells were pooled and 1 x 10<sup>6</sup> live cells were gated based on forward and side scatter. Cell-surface phenotype of A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells was determined on pooled microcultures using flow cytometry. Naïve, central memory (CM), effector memory (EM<sub>1-2</sub>, EM<sub>3-4</sub>), effector (EMRA-pE<sub>1</sub> and EMRA-pE<sub>2</sub>), and terminally differentiated effector (EMRA-E) phenotypes were defined based on cell surface expression of CD45RA, CCR7, and CD27, as described (22). B. UCBMC sorted using Melan-A<sub>26-35</sub> A27L-HLA-A2 tetramers were seeded (1-3 cells/well) onto allogeneic feeder cells and incubated in the presence of PHA, IL-2, and IL-7, as described under Materials and Methods. After 2 weeks in culture, 1 x 10<sup>5</sup> live cells were gated based on forward and side scatter for each microculture that was analyzed (23 microcultures for 11 UCB samples). Cell surface phenotype was analyzed as above. C. AB-derived T cells sorted using Melan-A<sub>26-35</sub> A27L-HLA-A2 tetramers were seeded (1-3 cells/well) onto allogeneic feeder cells and incubated in the presence of PHA, IL-2, and IL-7.

After 2 weeks in culture,  $1 \times 10^5$  live cells were gated based on forward and side scatter for each microculture that was analyzed. Cell surface phenotype was analyzed as above. n represents the number of UCB or AB samples that were used in the generation of T cell microcultures.

**Figure 2.6. Functional analysis of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells following stimulation with cognate peptide or polyclonal activation.** Cytolytic activity and IFN- $\gamma$  production were measured as described under Materials and Methods. Percent specific cytotoxicity was computed as  $[(\text{sample release} - \text{spontaneous release}) \times 100 / (\text{maximal release} - \text{spontaneous release})]$ . For spontaneous release, targets were plated without T cells. For maximum release, targets were plated with 10% v/v Triton-X100. Samples were considered positive when specific cytotoxicity measured in presence of cognate peptide was > 10% and > 2 standard deviations (SD) above cytotoxicity measured in absence of peptide. IFN- $\gamma$  production was expressed as spot forming units (SFU). Cells incubated with complete medium alone were used as negative controls. Samples were considered positive when SFU measured in presence of cognate peptide were > 20 and > 2 SD above SFU measured in absence of cognate peptide. Upper cut-off was 400 SFU per well. All tests were performed in duplicates. A. Relative frequencies of CD8<sup>+</sup> T cell microcultures derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB (n=10), HLA-A2<sup>-</sup> UCB (n=8), HLA-A2<sup>+</sup> AB (n=4), and HLA-A2<sup>-</sup> AB (n=4) that exhibited Melan-A-specific cytolytic activity following a 2 week stimulation with Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide in the presence of IL-2 and IL-7, as described under Materials and Methods. B. Corresponding specific cytolytic activity exhibited by 547 T cell microcultures derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB samples (n=10), 166 T cell microcultures derived from HLA-A2<sup>-</sup> UCB samples (n=8), 104 T cell microcultures derived from HLA-A2<sup>+</sup> AB samples (n=4), and 185 T cell



microcultures derived from HLA-A2<sup>-</sup> AB samples (n=4) following stimulation with Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide on a per microculture basis. C. Relative frequencies of expanded tetramer-sorted A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB (n=9), HLA-A2<sup>-</sup> UCB (n=9), HLA-A2<sup>+</sup> AB (n=4), and HLA-A2<sup>-</sup> AB (n=4) that exhibited Melan-A-specific cytolytic activity following a 2 week polyclonal stimulation with PHA in the presence of IL-2 and IL-7, as described under Materials and Methods. D. Corresponding specific cytolytic activity exhibited by 40 A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB samples (n=9), 27 A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>-</sup> UCB samples (n=9), 22 A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>+</sup> AB samples (n=4), and 14 A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>-</sup> AB samples (n=4) following polyclonal stimulation with PHA on a per clone basis. E. Relative frequencies of expanded tetramer-sorted A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB (n=9), HLA-A2<sup>-</sup> UCB (n=9), HLA-A2<sup>+</sup> AB (n=3), and HLA-A2<sup>-</sup> AB (n=4) that produced above-threshold levels of IFN- $\gamma$  following polyclonal stimulation with PHA. F. Corresponding frequencies of cells producing IFN- $\gamma$  following polyclonal stimulation with PHA on a per clone basis in 139 expanded A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB samples (n=9), 42 A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>-</sup> UCB samples (n=9), 33 A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>+</sup> AB samples (n=3), and 14 A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell clones derived from HLA-A2<sup>-</sup> AB samples (n=4). Error bars represent the range of values. Boxes represent median and interquartile range.

**Figure 2.7. Polyfunctional characteristics of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell microcultures derived from umbilical cord blood or adult blood following polyclonal activation.** T cell microcultures were generated by limiting dilution of UCB and AB-derived T cells sorted

using Melan-A<sub>26-35</sub> A27L-HLA-A2 tetramers. Cytolytic activity and IFN- $\gamma$  production were measured as described under Materials and methods. A. Correlation between percent specific lysis and frequency of IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells on a per microculture basis. B. Relative frequencies of CD8<sup>+</sup> T cell microcultures derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB, HLA-A2<sup>-</sup> UCB, HLA-A2<sup>+</sup> AB, and HLA-A2<sup>-</sup> AB that exhibited antigen-specific cytolytic activity directed against targets sensitized with the Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide and/or produced IFN- $\gamma$  in response to the Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide following polyclonal stimulation with PHA. Panel B depicts a compilation of all T cell clones derived in the study. C. Relative frequencies of CD8<sup>+</sup> T cell microcultures derived from HLA-A2<sup>+</sup> UCB or HLA-A2<sup>-</sup> UCB that exhibited (i) 0 functions, (ii) 1 function (cytolytic activity *or* IFN- $\gamma$  production in response to the Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide), or (iii) 2 functions (cytolytic activity *and* IFN- $\gamma$  production in response to the Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide). Data are presented on a per sample basis. Error bars represent the range of values. Boxes represent median and interquartile range. SFU: Spot-forming units.

# FIGURES

Figure 2.1.

Merindol *et al.*, Figure 1.

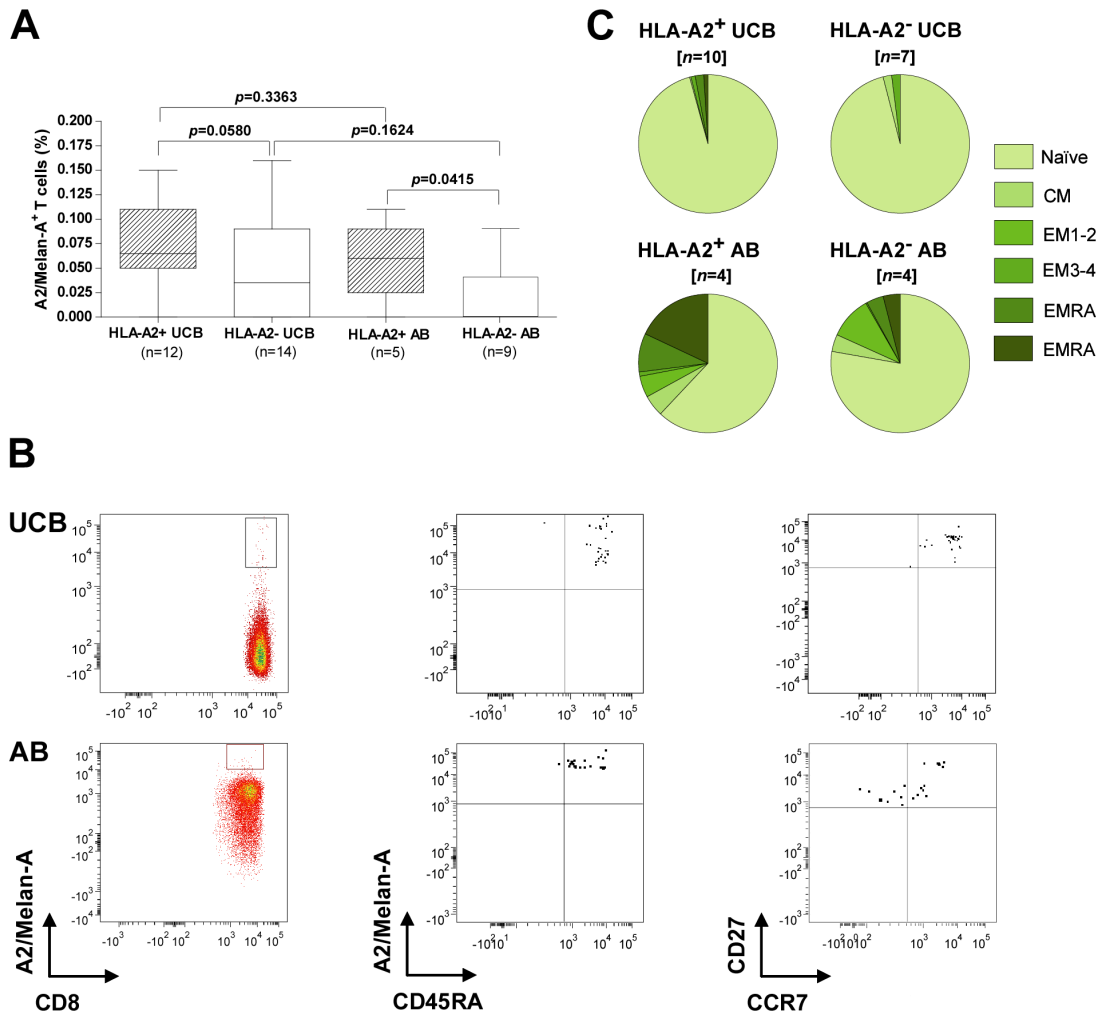


Figure 2.2.

Merindol *et al.*, Figure 2.

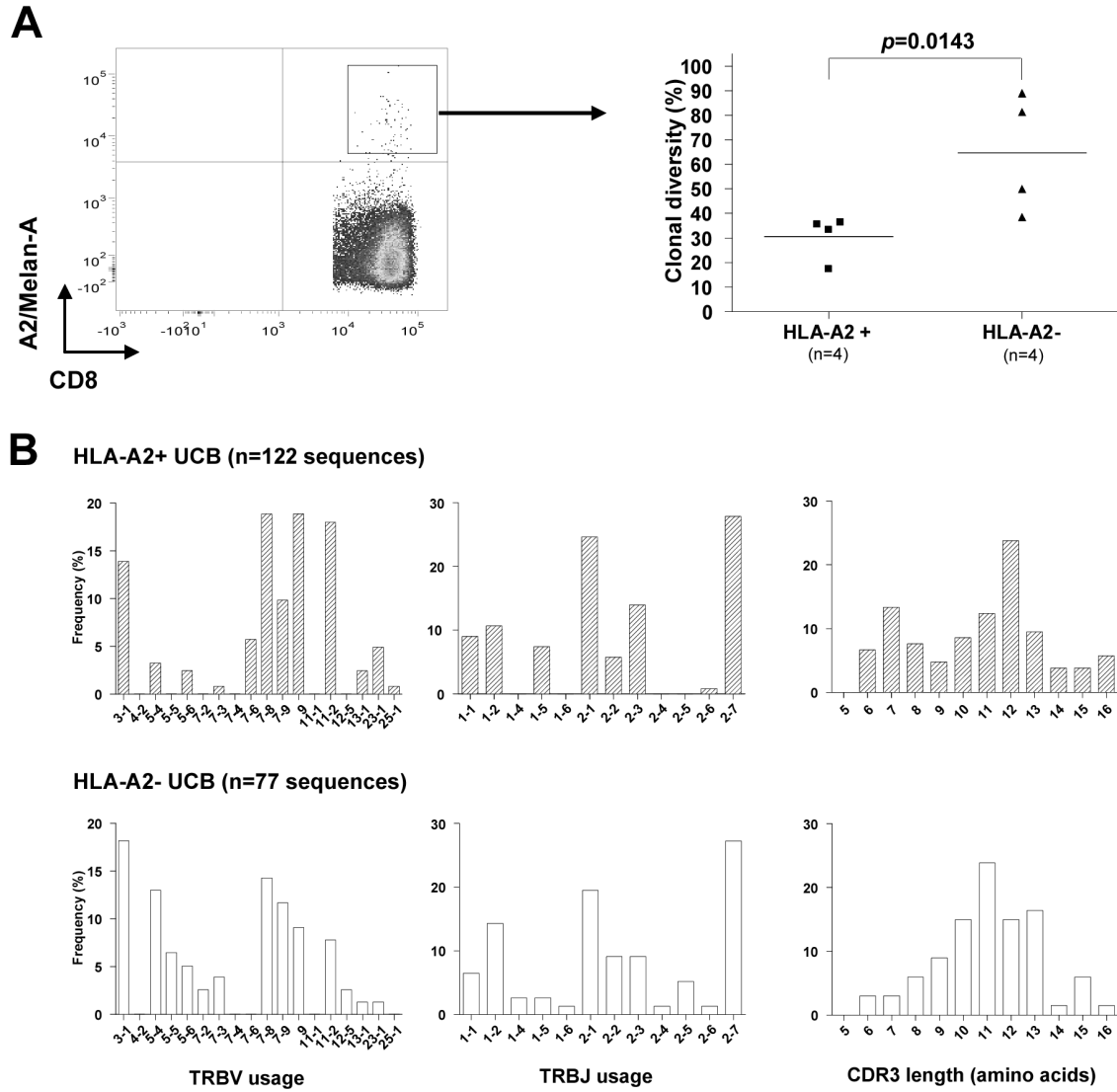


Figure 2.3.

Merindol *et al.*, Figure 3.

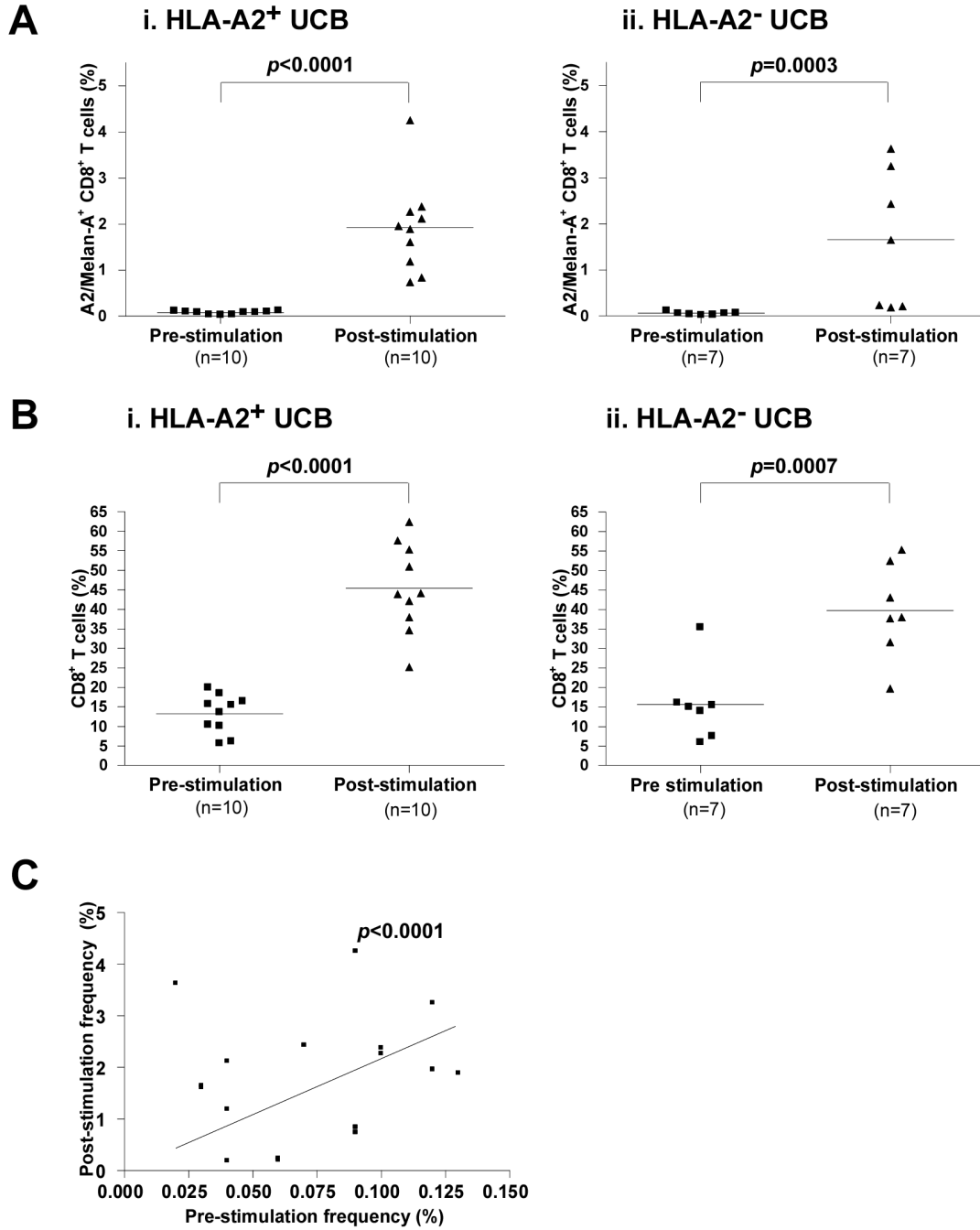


Figure 2.4.

Merindol *et al.*, Figure 4.

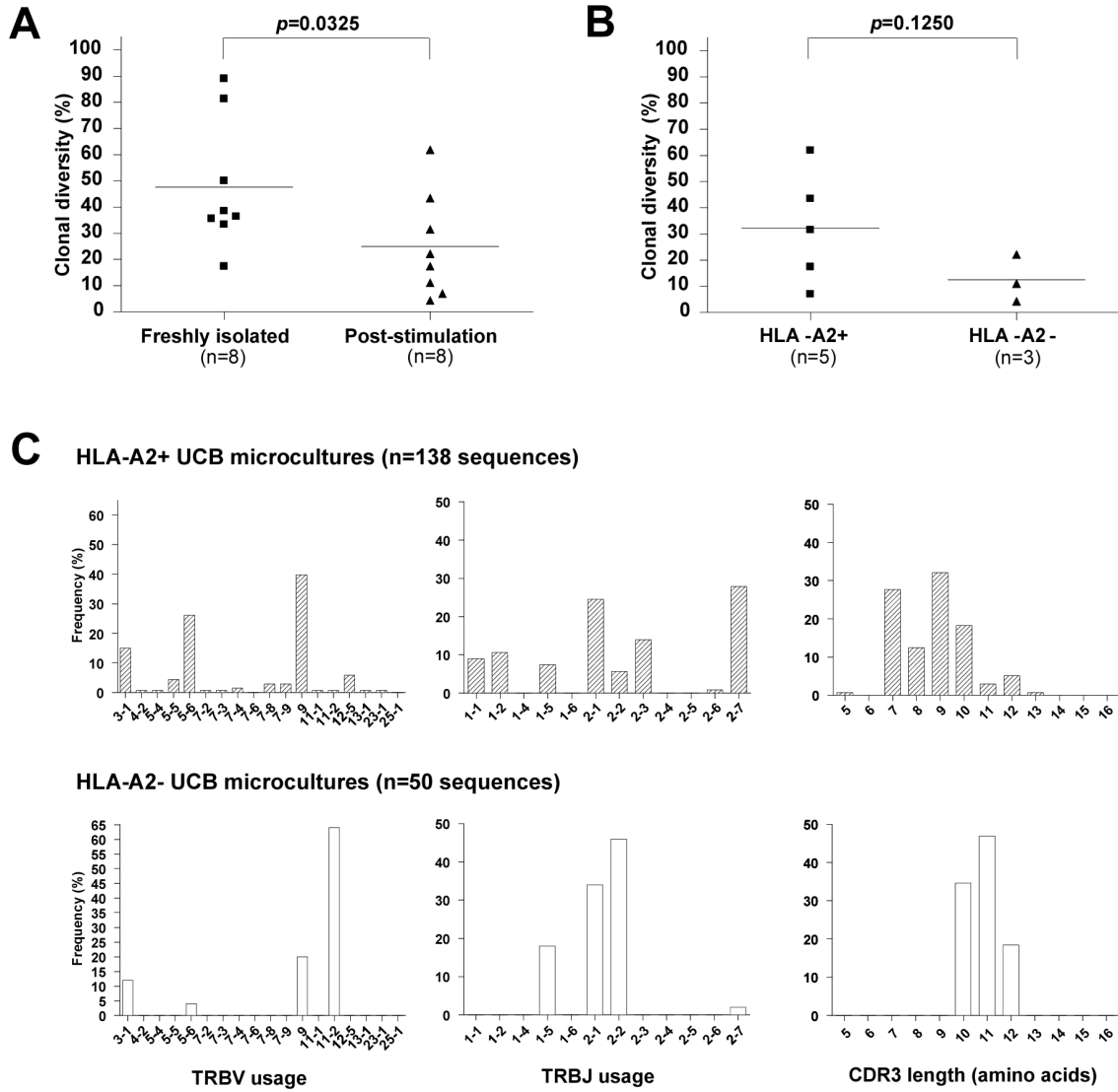


Figure 2.5.

Merindol *et al.*, Figure 5.

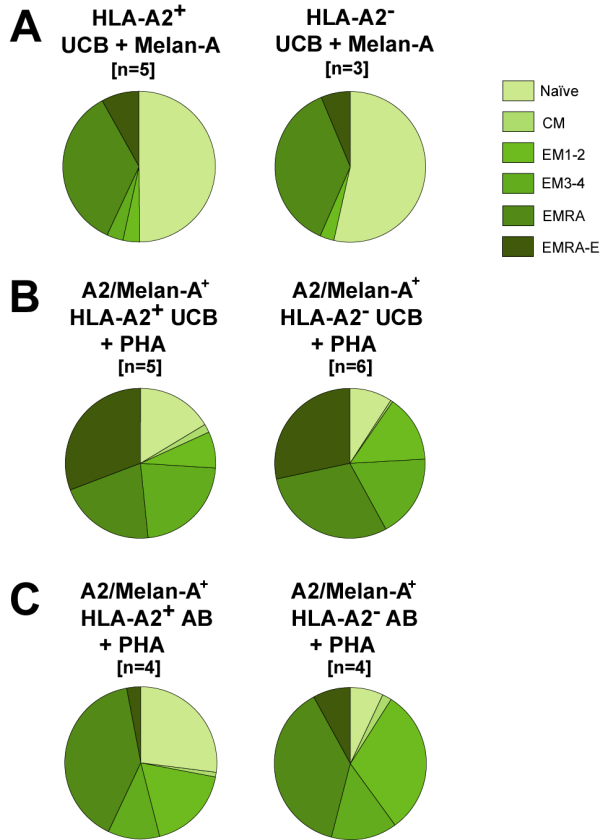


Figure 2.6.

Merindol *et al.*, Figure 6.

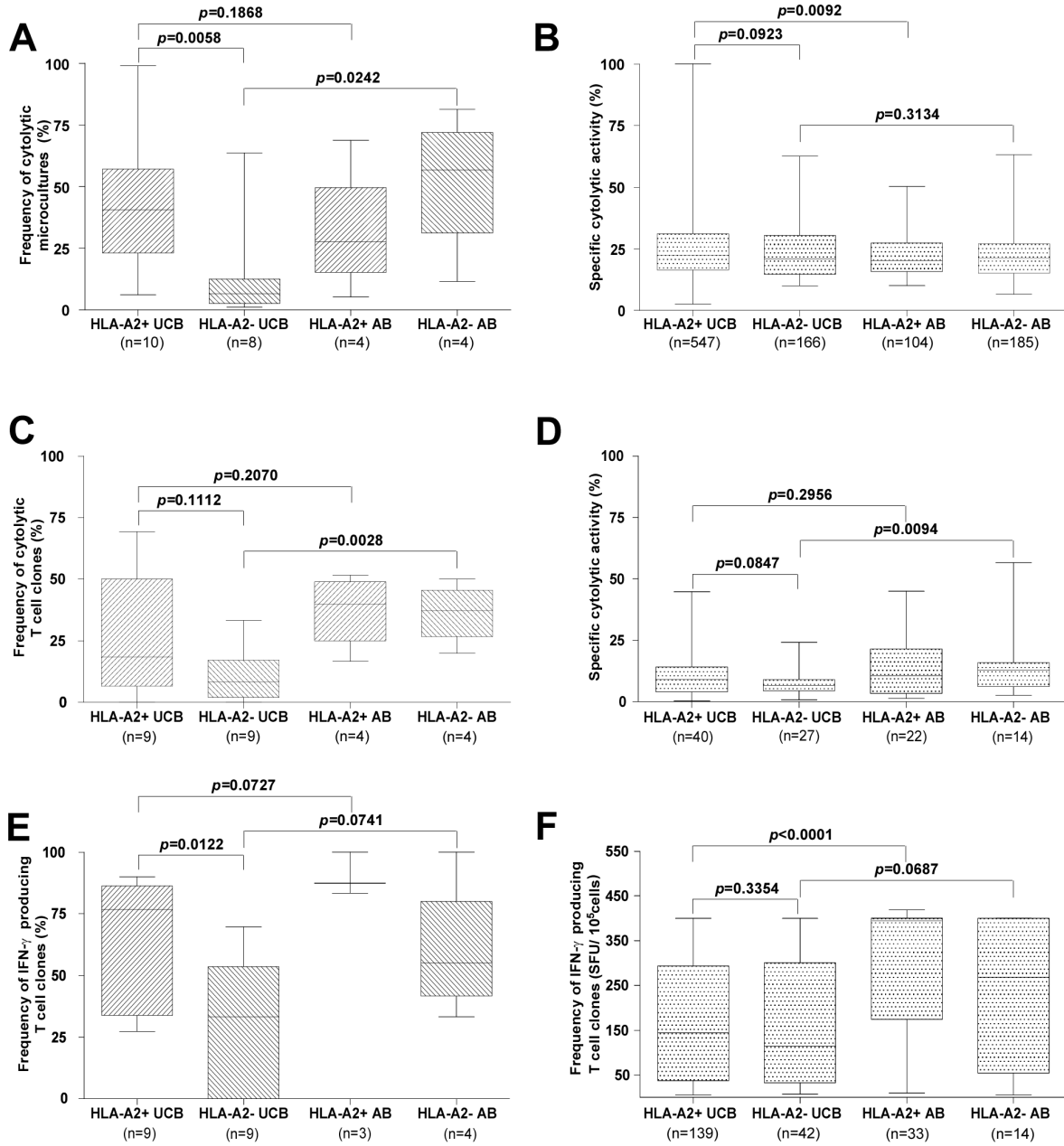
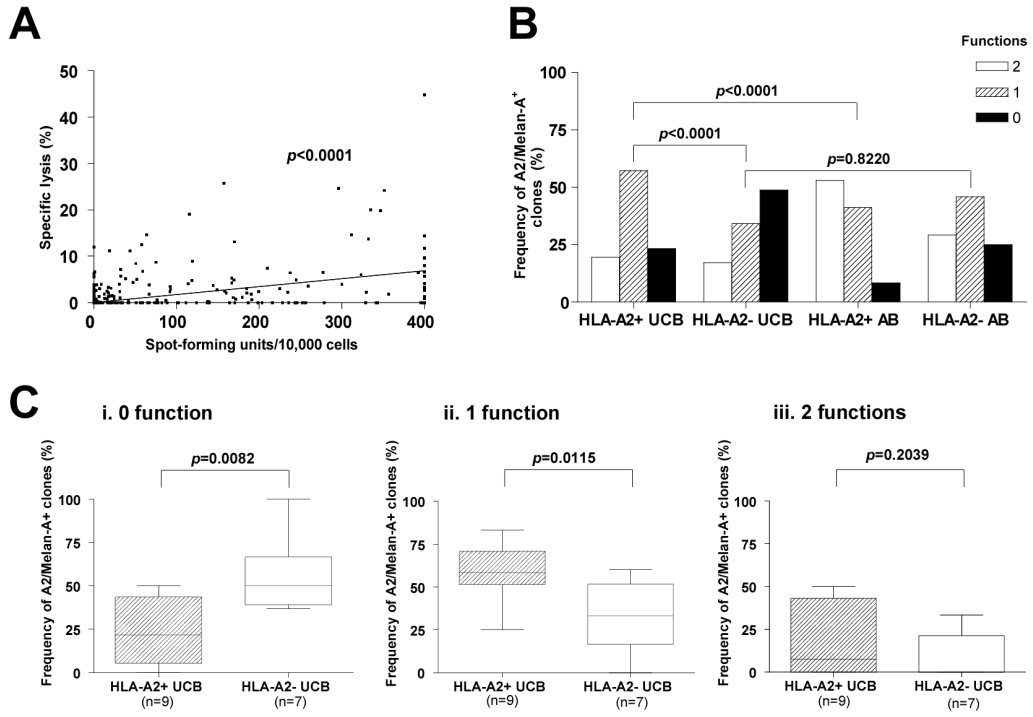




Figure 2.7.

Merindol *et al.*, Figure 7.



Merindol et al., Table 2.I.

<b>Sample</b>	<b>HLA-A type</b>	<b>Melan-A<sub>26-35</sub> A27L-HLA-A2 tetramer binding</b>
UCB1	A01 and A36	+
UCB2	A24 and A32	+
UCB4	A01 and A02	+
UCB6	A02 and A30	+
UCB7	A01 and A03	+
UCB8	A11 and A24	-
UCB9	A02 and A03	-
UCB10	A11 and A30	-
UCB11	A02 and A02	+
UCB12	A29 and A29	+
UCB13	A01 and A68	+
UCB14	A02 and A02	+
UCB15	A32 and A34	+
UCB16	A02 and A30	+
UCB17	A02 and A29	+
UCB18	A23 and A24	+
UCB19	A02 and A23	+
UCB20	A02 and A02	+
UCB21	A01 and A02	+
UCB22	A02 and A33	+
UCB23	A33 and A68	+
UCB24	A01 and A68	+
UCB26	A24 and A32	-
UCB28	A02 and A03	-
UCB29	A31 and A32	-
UCB30	A01 and A68	-
AB1	A01 and A32	+
AB2	A02 and A25	+
AB3	A02 and A02	+
AB4	A02 and A29	+
AB5	A29 and A68	-
AB6	A11 and A24	-
AB7	A02 and A03	-
AB8	A03 and A30	-
AB9	A24 and A30	-
AB10	A09 and A09	+
AB11	A01 and A03	+
AB12	A01 and A32	+
AB13	A11 and A29	-
AB14	A02 and A03	+

## TRANSITION

Au cours de cette étude, nous avons démontré que les lymphocytes T du sang de cordon ombilical détenaient un potentiel fonctionnel important et qu'ils étaient capables de monter des réponses antigéniques fonctionnelles. Nous avons aussi démontré qu'il existait certaines différences qualitatives avec leurs homologues dans le sang périphérique des adultes, notamment un potentiel bifonctionnel (IFN- $\gamma$  et CTL) réduit et une différenciation terminale atteinte plus rapidement.

Dans le contexte d'une transplantation de moelle osseuse, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> issus du greffon et transférés en même temps que les CSH, persistent chez le receveur et combattent les infections opportunistes dans les premiers mois qui suivent la greffe (Reusser et al., 1991). Ils fournissent une protection immunitaire temporaire en attendant la reconstitution thymopoïétique. Ils favorisent également la prise de la greffe et combattent les rechutes de leucémie mais sont responsables d'une complication très importante : la GvHD. Suite à la TSCO, le retard de prise de la greffe, l'incidence élevée de non-prise, l'incidence faible de la GvHD et l'incidence accrue d'IO alimentent la controverse concernant le potentiel des lymphocytes T issus du SCO une fois transférés aux patients. Plus précisément, leur devenir suite à la transplantation en termes de persistance, d'évolution de diversité, de phénotype et de fonction est très mal caractérisé.

Nous étudierons l'évolution du répertoire de lymphocytes T A2/Melan-A<sup>+</sup>, outil unique pour mesurer la diversité et la reconstitution d'une population de lymphocytes T chez la majorité des patients, quelques soient les évènements infectieux.

# Chapitre 3

**CD8<sup>+</sup> T cell reconstitution in recipients of umbilical cord blood transplant and characteristics associated with leukemic relapse.**

Natacha Merindol,<sup>1,3,5</sup> Martin A. Champagne,<sup>2,3,6,8</sup> Michel Duval,<sup>2,3,4,7</sup> and Hugo Soudeyns<sup>1,3,5,7</sup>

<sup>1</sup>Unité d'immunopathologie virale, <sup>2</sup>Service d'hémato-oncologie, <sup>3</sup>Groupe de recherche en transplantation et immunologie du sang de cordon (GRETISC), and <sup>4</sup>Laboratoire d'immunologie du sang de cordon, Centre de cancérologie Charles-Bruneau, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC H3T 1C5, Canada; <sup>5</sup>Departments of Microbiology & Immunology, <sup>6</sup>Medicine, and <sup>7</sup>Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada; <sup>8</sup>Héma-Québec, St-Laurent, QC H4R 2W7, Canada.

[This research was originally published in Blood Online. Prepublished Aug 2, 2011; DOI 10.1182/blood-2011-04-349241]

## **ABSTRACT**

Recipients of umbilical cord blood (UCB) transplantation (UCBT) face a high risk of morbidity and mortality related to opportunistic infections (OI) and leukemic relapse. To understand the molecular basis of these UCBT-related complications, the characteristics of UCB-derived antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells were examined in a group of pediatric UCBT recipients. As compared with the UCB graft inoculum and the late post-UCBT period (12-36 months), declining clonal diversity of UCB-derived CD8<sup>+</sup> T cells specific for the Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide and high frequencies of PD-1-expressing CD8<sup>+</sup> T cells were observed in the first 3 months post-UCBT, a period during which OI are most frequent. The CD8<sup>+</sup> T cell compartment predominantly comprised CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> terminally-differentiated effector-memory T cells until 6 months post-UCBT, at which time the polyfunctionality of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells was re-established. Finally, the frequency of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was significantly higher in subjects who subsequently experienced leukemic relapse. This study informs the biological properties of UCB-derived CD8<sup>+</sup> T cells and provides a rationale for the characteristics of UCBT in terms of immune reconstitution and OI. These results also suggest that elevated frequency of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells could be associated with leukemic relapse in pediatric UCBT recipients.

## INTRODUCTION

Umbilical cord blood (UCB) transplantation (UCBT) is commonly used to treat a variety of hematologic diseases in children.<sup>1,2</sup> Reduced incidence of graft *versus* host disease (GvHD) compared to BM transplantation (BMT) was documented following UCBT.<sup>3</sup> UCBT was associated with slow engraftment, delayed CD8<sup>+</sup> T cells recovery, high incidence of graft failure, and high incidence of opportunistic infections (OI) in the first 3 to 6 months post-transplantation.<sup>4-6</sup> Approximately 20% of pediatric UCBT recipients will also experience leukemic relapse, a frequency similar to that observed in BMT.<sup>7</sup>

In the context of BMT, graft-derived CD8<sup>+</sup> T cells are known to shield the graft recipient against OI and leukemic relapse.<sup>8,9</sup> UCBT involves the transfer of multiple cell subtypes into the recipient, including large amounts of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. While the presence of UCB-derived CD8<sup>+</sup> T cells in the graft inoculum can provide some degree of protection from OI and leukemic relapse to UCBT recipients,<sup>10,11</sup> recent studies suggest that these cells might only mediate minimal levels of antiviral immunity.<sup>12,13</sup> The relative inefficacy of UCB-derived CD8<sup>+</sup> T cells to prevent OI and their failure to prevent leukemic relapse in some patients is not well understood.

Based on cell-surface expression of CD45RA and CCR7, CD8<sup>+</sup> T cells can be classified as naïve, central memory, effector memory, and terminally differentiated.<sup>14</sup> Using peptide-MHC tetramers, antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells isolated from UCB were shown to be mostly naïve and clonally diversified. In addition, they produced significantly less IFN- $\gamma$  but were more likely to achieve terminal differentiation and less likely to exhibit bifunctional properties

(IFN- $\gamma$  production and cytolytic activity) as compared with T lymphocytes derived from adult blood.<sup>15</sup> In theory, these properties are compatible with low incidence of GvHD and high incidence of OI. However, little is known regarding the fate of CD8<sup>+</sup> T cells once they are transplanted into UCBT recipients.

The objective of this study was to characterize the reconstitution of CD8<sup>+</sup> T cells in pediatric UCBT recipients to address a series of questions: a) Do UCB-derived CD8<sup>+</sup> T cell clones persist during immune reconstitution? b) To what extent do they participate in the composition of the reconstituted T cell repertoire? c) How does clonal diversity of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells develop? d) How do they differentiate in terms of naïve-effector-memory phenotype and expression of T cell exhaustion markers? e) How does their polyfunctionality, which reflects their efficacy to control chronic viral infections,<sup>16</sup> evolve in the post-UCBT period? We examined CD8<sup>+</sup> T cells specific for the HLA-A2-restricted Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide (A2/Melan-A)<sup>17</sup> as a model for the reconstitution of an antigen-specific repertoire. A2/Melan-A-specific T cells represent one of the only preimmune T cell repertoires that can be studied in humans.<sup>15,17,18</sup> Here we provide evidence that some UCB-derived CD8<sup>+</sup> T lymphocytes persisted in paediatric recipients in the first 6 months post-UCBT. Their clonal diversity reached a nadir at 3 months post-UCBT. At this point, the CD8<sup>+</sup> compartment was predominantly comprised of terminally-differentiated T cells and both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subsets were enriched in cells expressing programmed death 1 (PD-1). From 6 months post-UCBT, the CD8<sup>+</sup> T cell repertoire was progressively restored with a naïve, diversified, and polyfunctional population. Finally, higher frequencies of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were detected at 2 and 6 months post-UCBT in subjects who subsequently experienced



leukemic relapse, suggesting that PD-1 expression on CD8<sup>+</sup> T cells could be associated with this complication.

## **PATIENTS, MATERIALS, AND METHODS**

**Study subjects.** This study was approved by the Institutional Review Board of Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada, and was conducted according to the standards described in the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. Full informed consent was obtained from all study participants and their parents or legal guardians. Pediatric HLA-A2<sup>+</sup> subjects who underwent UCBT for the treatment of hematologic or neoplastic diseases were enrolled at CHU Sainte-Justine between October 2004 and December 2009 (n = 26). Median age at study entry was 5.42 years (range = 0.33-17.0 years). UCB and venous blood samples (2-10 ml) were obtained from the graft inoculums and from transplanted subjects at 1, 2, 3, 6, 12, 18, 24, and 36 months post-UCBT. UCB units used in transplant procedures were obtained from national and international UCB repositories. All UCB units used in these patients were HLA-A2<sup>+</sup> and had a 4/6 or greater HLA-A, HLA-B, and HLA-DRB1 allele-level match with the recipient. UCB mononuclear cells (UCBMC) and PBMC were isolated on Ficoll-Hypaque gradients (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and cryopreserved in 90% v/v FBS (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% v/v DMSO. All subjects received myeloablative conditioning regimens, including total body irradiation (TBI; 1200 cGy fractionated in 8 doses) or busulfan (0.8 mg per kg, fractionated in 16 doses). GvHD prophylaxis consisted of cyclosporin A and corticosteroids. Subjects were infused with 2 mg per kg anti-thymocyte globulin (ATG) (Thymoglobulin®; Sangstat, Mississauga, Ontario, Canada) on days -2, -1, +1, and +2 relative to the UCBT procedure. Granulocyte-colony

stimulating factor (G-CSF) was also administered starting on day +1. Two subjects were lost to follow-up. Transplant procedure was detailed in Dalle et al.<sup>19</sup> Clinical characteristics of study subjects are summarized in Table 3.1.

**Generation of T cell microcultures.** Frozen UCBMC and PBMC were thawed and cultured for 24 h in RPMI 1640 supplemented with 20% v/v FBS. Cells were seeded at 2000 cells per well in 96-well round-bottom plates and were co-cultured with  $8 \times 10^4$  irradiated (300 Gy) 221.A2 cells (EBV-transformed B lymphoblastoid cell line expressing HLA-A2\*0201<sup>20</sup> pulsed with the HLA-A2-restricted modified Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide (ELAGIGILTV) (New England Peptide, Gardner, MA). Alternatively, to achieve polyclonal expansion for repertoire analysis, cells were pulsed with 1 µg per ml PHA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). T cell microcultures were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% v/v FBS, 50 UI per ml recombinant human (rh)IL-2 (Hoffmann-La Roche, Mississauga, Ontario, Canada), and 10 ng per ml rhIL-7 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Medium was replenished twice a week.

**Isolation and immunophenotyping of Melan-A-specific T cells.** To detect Melan-A-specific CD8<sup>+</sup> T cells in UCBMC, PBMC and T cell microcultures, biotinylated HLA-A2 monomers were refolded around the Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide (CANVAC Core Facility, Montreal, Quebec, Canada) and were tetramerized using PE-conjugated Extravidin (Sigma-Aldrich) or allophycocyanin (APC)-conjugated streptavidin (BD Biosciences, San Jose, CA). Cells were incubated for 15 min at 37°C with 0.3 µg peptide-MHC tetramers per  $1 \times 10^6$  cells. Monoclonal antibodies (mAbs) for cell-surface staining were then added, and cells were incubated for 30 min at room temperature. Tetramer-specific CD8<sup>+</sup> cells were

sorted at low pressure in 100% v/v FBS using a FACSVantage SE equipped with CellQuest software (BD Biosciences). Compensation and logical gates were set with single fluorochromes. Lymphocytes were gated according to forward and side scatter. Melan-A-specific T cells were gated based on expression of CD8. Samples were defined as tetramer positive when: a) A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells represented more than 0.01% of CD8<sup>+</sup> T cells, as this frequency corresponded to maximum background of negative controls; and b) mean fluorescence intensity between tetramer positive and negative populations was  $> 1 \log_{10}$  (Figure 3.S1). Analysis of cell-surface markers was performed using FCS Express Version 3 software (DeNovo Software, Los Angeles, CA). Tetramer-sorted T cells were directly seeded at 10-50 cells per well in 96-well round-bottom plates and were co-cultured with  $8 \times 10^4$  irradiated (300 Gy) 221.A2 cells per well in RPMI 1640 supplemented with 50% v/v FBS, 50 UI per ml rhIL-2, 10 ng per ml rhIL-7 and 1  $\mu$ g per ml Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide. Medium was changed every 2 to 3 days, and  $2 \times 10^4$  irradiated 221.A2 cells per well were added once a week. The functionality of Melan-A sorted T cells was tested after 2 weeks in culture (see below). Immunophenotyping was performed using the following mAbs: PE- or APC-conjugated anti-CD8 (RPA-T8), PE-Cy7-conjugated anti-CCR7 (3D12), and FITC-conjugated anti-CD45RA (HI100) (BD Biosciences). CD8<sup>+</sup> T cells were defined as naïve (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), central memory (CM; CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), effector memory (EM; CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>), and terminally-differentiated effectors (EMRA; CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>).<sup>14</sup> Separately, PBMC were stained with FITC- or PE-conjugated anti-PD-1 (MIH4) and APC-conjugated anti-CD8 (RPA-T8) (BD Biosciences).

**Intracellular staining.** Tetramer-sorted microcultures ( $2 \times 10^5$  cells) were incubated with APC-conjugated anti-CD107a mAb (H4A3) (BD Biosciences) and 221.A2 cells in the

presence of 10 µg per ml Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide at 37°C in RPMI 1640 medium supplemented with 10% v/v FBS. Culture medium alone was used as negative control. Following 1 h stimulation, 10 µg per ml brefeldin A and 6 µg per ml monensin (BD Biosciences) were added. Cells were incubated for 6 h, washed with FACS buffer, stained with PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD8 mAb (RPA-T8) (BD Biosciences), and fixed and permeabilized using Cytofix/Cytoperm reagents (BD Biosciences). Cells were then stained with PE-conjugated anti-IFN-γ (4S.B3) and FITC-conjugated anti-IL-2 (MQ1-17H12) mAbs (BD Biosciences) for 30 min at 4°C and washed twice in Perm/Wash buffer (BD Biosciences). Viable CD8<sup>+</sup> T cells were gated for analysis. Background frequencies measured in absence of cognate peptide were subtracted from each subpopulation.

**Cytotoxicity testing.** Cytolytic activity of tetramer-sorted, Melan-A-stimulated T cell microcultures was measured using a conventional 4 h [<sup>51</sup>Cr] release assay.<sup>21</sup> <sup>51</sup>Cr-labeled targets were 221.A2 cells pulsed with Melan-A<sub>26-35</sub> A27L. Effector to target (E:T) ratio was 10:1 (2 x 10<sup>3</sup> target cells per well). Each microculture was tested in duplicate with Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide and 221.A2 cells alone.

**Amplification and sequencing of TCR β-chain transcripts.** Total mRNA was extracted from pellets of tetramer-sorted cells (500-2000 cells) using the Picopure system (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). TCR β-chain V region (TRBV) mRNA, including its third complementarity-determining region (CDR3), was reverse transcribed and resulting cDNA was amplified by PCR (40 cycles) using universal primers, as described previously.<sup>22</sup> PCR products were subcloned into the TOPO TA cloning vector (Invitrogen) and sequenced

unidirectionally using an ABI 3730xl automated sequencer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA; Plateforme de séquençage et de génotypage des génomes, Centre de recherche du CHUL, Quebec, Quebec, Canada). Identification of TRBV and TCR  $\beta$ -chain J region (TRBJ) segments and determination of CDR3 length and amino acid sequences were performed using IMGT/V-QUEST and confirmed manually.<sup>23</sup> Clonal diversity and dominance were estimated using Simpson's diversity index (Ds).<sup>24</sup>

**Statistical analysis.** Normality of data distribution was tested using the D'Agostino and Pearson omnibus normality test and the Kolmogorov-Smirnov test. Data were expressed as the mean and standard error or median and interquartile range (IQR). Where appropriate, statistical significance in between-groups comparisons was assessed using the Mann-Whitney *U* test, the Wilcoxon signed-rank test, or one way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test. Relationships between variables were tested using Spearman's rank correlation test. *p* values < 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed using GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## RESULTS

***Ex vivo* detection of Melan-A-specific T cells in UCB and UCBT recipients.** Frequencies of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were assessed in UCB grafts and in PBMC samples obtained at 1 to 36 months post-UCBT using peptide-MHC tetramers (Figure 3.1A). A median frequency of 0.3% of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was detected in UCB grafts. No A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were detected at 1, 2 or 3 months post-UCBT, consistent with low numbers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 3.1A). A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were then detected from 6 to 36

months post-UCBT. Relative frequencies of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were correlated with total CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts in recipients over the entire post-UCBT period ( $p = 0.0005$  and  $p = 0.0008$ , respectively). This indicates that the relative abundance of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells depends on the reconstitution of the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell compartments.

**Detection of Melan-A-specific T cells post-UCBT after polyclonal stimulation.** The early post-UCBT period is characterized by very low numbers of circulating CD8<sup>+</sup> T cells.<sup>25</sup> To circumvent this limitation, PHA stimulation was used to expand T cells independent of antigenic specificity.<sup>26</sup> After 7-10 days of expansion, A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were detected at a frequency > 0.01% in 9 of 10 grafts and 8 of 9 study subjects at 1 month post-UCBT (Figure 3.1B). These cells were also detected in 2 of 6 and 1 of 5 patients at 2 months and 3 months post-UCBT, respectively, and in the majority of subjects at 6 to 36 months post-UCBT (Figure 3.1B). The frequency of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells at 3 months post-UCBT was significantly lower than those observed in graft inoculums and in subjects at 1, 6, and 36 months post-UCBT ( $p < 0.05$ ). Moreover, A2/Melan-A<sup>+</sup> T cell frequencies in the graft inoculum and at 1 month post-UCBT were correlated ( $p = 0.0252$ ). These results suggest that some of the A2/Melan-A-specific CD8<sup>+</sup> T cells present in the graft inoculum persisted in the recipient during the early post-UCBT period and then progressively disappeared.

**Evolution of T cell repertoire diversity following UCBT.** TCR  $\beta$  chains expressed by A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were amplified, subcloned and sequenced. As previously reported,<sup>15</sup> A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells in the graft inoculum were polyclonal (median Ds = 0.90)

(Figure 3.2A-2B and 3.S2). Diversity declined significantly at 2 and 3 months post-UCBT ( $p < 0.05$ ) to increase again at 6 months, albeit to a level significantly lower than that observed in the graft ( $p < 0.05$ ). TCR  $\beta$  chain diversity reached graft-comparable levels at 12 months post-UCBT (Figure 3.2B). Changes in diversity were also reflected at the level of CDR3 length: it was normally distributed in 6 of 6 graft inoculum but became highly biased at 1 to 3 months post-UCBT, consistent with repertoire oligoclonality (Figure 3.S2). From then on, the distribution of CDR3 length progressively normalized, with 2 of 11 (18.2%) subjects exhibiting Gaussian profiles at 6 months, 4 of 9 (44.4%) at 12 months, 3 of 7 (42.9%) at 18 months, and 3 of 5 (60.0%) at 24 months post-UCBT (Figure 3.S2). No common TCR  $\beta$  chain clonotypes were identified between graft inoculums and UCBT recipients. In contrast, two waves of persistent clonotypes were observed in the post-UCBT period. The first wave (« early clonotypes ») emerged between 1 to 3 months and was detected until 6 months post-UCBT, whereas the second wave (« late clonotypes ») started to emerge at 6 to 12 months and persisted between 6 and 36 months post-UCBT (Figure 3.2A). It is unlikely that early clonotypes were of recipient origin, as 100% donor chimerism was observed at 3 and 6 months post-UCBT in most study subjects. These results are consistent with rare UCB-derived T cells transiently persisting in the recipient up to 6 months after UCBT, followed by progressive repletion of T cell repertoire diversity *via* thymopoiesis.

### **Phenotypic reconstitution of total and A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells following UCBT.**

Expression of CD45RA and CCR7 was monitored in total CD8<sup>+</sup> T cells and A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells during the post-UCBT period (Figure 3.3). Total and A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were mostly naïve in graft inoculums (Figure 3.3 and 3.S3). Low frequencies of naïve T cells (1.2%, 2.5%, and 3.0%) and high frequencies of EMRA (82.5%, 76.5%, and 70.4%) were

found in total CD8<sup>+</sup> T cells at 1, 2 and 3 months post-UCBT (Figure 3.3). CD8<sup>+</sup> T cells were also comprised of 15.6%, 19.5%, and 22.5% of EM and 0.7%, 1.5%, and 4.1% of CM at 1, 2 and 3 months post-UCBT. At 6 months, naïve T cells emerged at a median frequency of 15.6% of total CD8<sup>+</sup> T cells, whereas 43.4% continued to exhibit an EMRA phenotype. At that time, A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were detected and a median of 54.8% of them were naïve. From 12 to 36 months post-UCBT, the vast majority of CD8<sup>+</sup> T cells were naïve and the second population in terms of relative abundance was EMRA. At all time points, the proportion of naïve cells was significantly higher in A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells than in total CD8<sup>+</sup> T cells ( $p < 0.0313$ ) (Figure 3.3 and data not shown). Interestingly, naïve CD8<sup>+</sup> T cells were observed at a frequency of 22.6% at 1 month post-UCBT in subject P11, a 5 month-old patient who had already achieved a high TCR repertoire diversity at 1 month post-UCBT (Figure 3.2A). These results indicate that the vast majority of CD8<sup>+</sup> T cells display a terminally differentiated phenotype in the first 6 months post-UCBT.

#### **Functional reconstitution of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells following UCBT.**

Polyfunctionality is the hallmark of protective T cell responses against viruses and cancer.<sup>27</sup> PBMC from UCBT recipients were expanded *in vitro* for 7-10 days in the presence of IL-2, IL-7 and Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide, sorted with A2/Melan-A tetramers, and used in functional assays. Following stimulation with cognate peptide, no significant differences in expression of IFN- $\gamma$ , IL-2, CD107a (monofunctional, bifunctional, polyfunctional) or cytolytic activity were observed in A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells between graft inoculums and samples obtained at 6 to 36 months post-UCBT ( $p > 0.05$ ) (Figure 3.4 and 3.S4). A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were not retrieved in sufficient numbers to perform these analyses at 1 to 3 months post-UCBT. These results suggest that CD8<sup>+</sup> T cells isolated from UCB were capable of expressing



combinations of differentiated functions in response to stimulation with cognate peptide, as were those isolated from the peripheral blood of UCBT recipients at 6 to 18 months post-transplant.

**Evolution of PD-1<sup>+</sup> T cell frequency during the post-UCBT period.** PD-1, an inhibitory receptor of the CD28 family, is highly expressed on dysfunctional CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells during chronic viral infections.<sup>28</sup> Since the first 3 months post-UCBT are associated with high risk of OI,<sup>5</sup> with functional immunodeficiency, and with terminally-differentiated CD8<sup>+</sup> T cell phenotypes (Figure 3.3), frequencies of PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were assessed in 18 study subjects, 10 healthy children (aged 3-36 months), and 5 healthy adults (Figure 3.5). PD-1 was expressed at very low levels in UCB grafts (1.3% and 1.0% of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells). Major changes were observed in the mean frequency of PD-1<sup>+</sup> T cells during the post-transplant period ( $p < 0.0001$ ). These disparities were accounted for by a remarkable increase in frequency of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> and PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells at 2 and 3 months post-UCBT compared to graft inoculums and to samples obtained at 6-36 months post-UCBT ( $p < 0.05$ ) (Figure 3.5A-3.5B and 3.5A). The frequencies of PD-1-expressing CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T cells at 3 months post-UCBT were also significantly higher than those observed in healthy adults and healthy children ( $p < 0.0001$ ), consistent with recent reports.<sup>29,30</sup> Frequencies of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were inversely correlated with CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell counts ( $p = 0.0077$ ,  $r = -0.4124$ , and  $p = 0.0052$ ,  $r = -0.4338$ , respectively), highlighting the association between lymphopenia and impaired CD8<sup>+</sup> T cell function in the first months following UCBT (Figure 3.5C-3.5D). Overall, median frequencies of PD-1<sup>+</sup> T cells were higher in the CD4<sup>+</sup> than in the CD8<sup>+</sup> T cell compartment ( $p = 0.0039$ ) and the frequency of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was correlated with the frequency of PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells throughout the follow-

up period ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.7665$ ) (Figure 3.S5B-3.S5C). Finally, the normalized median fluorescence index (MFI) of PD-1 in CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T cells were not higher in the first months post-UCBT than later during follow up ( $p > 0.05$ ) (Figure 3.S5D-3.S5E). These results are consistent with UCB CD8<sup>+</sup> T cells undergoing massive oligoclonal expansion while acquiring a skewed exhausted phenotype following transfer into the recipients.

**PD-1 expression is associated with leukemic relapse.** Eight study subjects experienced leukemic relapse during follow-up (« relapsers »), of whom 6 relapsed > 6 months post-UCBT (Figure 3.S3). There were no significant differences in the naïve-memory phenotype of CD8<sup>+</sup> T cells at 2 or 3 months post-UCBT in relapsers compared to nonrelapsers (Figure 3.S3). However, there was a trend towards higher frequencies of EM T cells ( $p = 0.0823$ ) and significantly lower CD4<sup>+</sup> T cells counts in relapsers at 6 months ( $p = 0.0376$ ) (Fig. 3.6A, 3.S6). There was no significant difference in total CD8<sup>+</sup> T cell counts between relapsers and nonrelapsers (Figure 3.6B). Finally, the frequency of PD1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was significantly higher in relapsers than in nonrelapsers at 2 and 6 months ( $p = 0.0079$  and  $p = 0.0364$ , respectively) (Figure 3.6C-3.6D and 3.S5G). The frequency of PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells was also higher in relapsers at 6 months, but this difference was not statistically significant (Figure 3.S5F and 3.S5H). Taken together, these results suggest that a high frequency of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in UCBT recipients during the early post-transplant period could be associated with subsequent leukemic relapse.

## DISCUSSION

UCB is increasingly being used as an alternative source of hematopoietic stem cells for the treatment of various blood disorders in cases where a suitably-matched donor is not readily available. However, clinical outcomes associated with UCBT differ from those observed following BMT, particularly in terms of GvHD, graft failure, and OI. Leukemic relapse can occur following UCBT, particularly in patients with poor immune reconstitution.<sup>31</sup> To explore the cellular and molecular basis of these outcomes, we examined the reconstitution of antigen-specific T lymphocytes in a group of pediatric UCBT recipients. In recent years, several groups have examined the reconstitution of T cells specific for CMV,<sup>32</sup> or for leukemia-associated antigens such as PR1<sup>33</sup> and WT1.<sup>34</sup> In contrast, the present study was largely focused on the repertoire of T cells that recognize the Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide in the context of HLA-A2 (A2/Melan-A) because these cells represent one of the only preimmune T cell repertoires that can be studied in humans, particularly when the number of cells that can be obtained from study subjects is limited.<sup>15,17,18</sup> Consistent with these previous reports, clonally diversified A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were reproducibly detected in UCB graft inoculums. Using peptide-MHC tetramers, these cells were not detectable *ex vivo* in the peripheral blood of UCBT recipients at 1, 2 or 3 months post-UCBT, an important « window of susceptibility » to OI. When PHA stimulation was used to compensate for low numbers of total CD8<sup>+</sup> T cells in the early post-transplant period, A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were revealed in the majority of subjects at one month post-transplant, and in one third and one fifth of subjects at 2 and 3 months, respectively. These cells exhibited reduced levels of clonal diversity and skewed distribution in CDR3 length as compared with graft inoculums and the late post-transplant period (*i.e.*  $\geq 6$  months post-UCBT), reflecting the oligoclonality of the antigen-specific T cell compartment. These results are consistent with previous reports on reconstitution of TCR repertoire diversity based on analysis of total CD8<sup>+</sup> T

cells.<sup>35</sup> There were no instances of overlap between the clonotypic profiles observed in the graft inoculum and those observed post-UCBT. UCB T cells are highly polyclonal,<sup>15</sup> possibly limiting our ability to track clonal persistence between UCB graft inoculums and UCBT recipients. ATG, which was administered to study subjects as part of the conditioning regimen, could also have contributed to the sudden drop in clonal diversity observed following UCBT. In contrast, the temporary persistence of T cell clonotypes was observed between 1-6 months post-UCBT. Chimerism results confirmed that these cells were of donor origin (data not shown). Taken together, these results suggest that the A2/Melan-A-specific T cell repertoire present in the graft inoculum was not preferentially mobilized following transfer into the UCBT recipient, but that some of these cells transiently persisted in UCBT recipients up to 6 months post-transplant, followed by reconstitution of the T cell repertoire *via* thymopoiesis. Therefore, our results are compatible with the existence of a « hole » or « through » in the T cell repertoire between 2 and 3 months post-UCBT, with little overlap between a first wave derived from homeostatic expansion of T cells contained within the UCB graft inoculum and a second wave generated by rising thymic output.

Most A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells present in graft inoculums expressed a CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> naïve cell surface phenotype. In contrast, the vast majority of CD8<sup>+</sup> T cells displayed a terminally differentiated CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> phenotype in the first 6 months post-UCBT, consistent with previous *in vitro* studies showing that UCB T cells differentiated mostly into EMRA following stimulation, and with observations in adult UCBT recipients and children who underwent BMT.<sup>15,36,37</sup> The EMRA phenotype has been associated with shorter T cell  $t_{1/2}$  and is concordant with the short-term persistence and progressive disappearance of graft-derived CD8<sup>+</sup> T cells during the first 3-6 months post-UCBT, followed

by the emergence of clonally-diversified naïve T cells through thymopoiesis. Interestingly, naïve CD8<sup>+</sup> T cells were observed at a frequency of 22.6% at 1 month post-UCBT in subject P11, who exhibited very high TCR  $\beta$  chain diversity as early as 1 month post-UCBT and clonotypic persistence until 18 months. This suggests that naïve T cells and the persistent T cell clonotype observed in subject P11 resulted from de novo generation of thymus-derived T cells rather than homeostatic expansion of graft-derived T cells, compatible with unusually active thymopoietic processes in this 5 months-old patient. Quantification of the levels of TCR rearrangement circles (TREC) in isolated T cell subsets and other measurements which could be used to strengthen this hypothesis were not performed in the present study as a result of strict limitations in biological sample size.<sup>38,39</sup>

There were no significant differences observed between A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells isolated from the graft inoculums and from UCBT recipients at 6-18 months post-transplant in terms of IFN- $\gamma$ , IL-2, CD107a secretion and cytolytic activity following stimulation with cognate peptide. The T cell polyfunctionality profile is a key indicator of the efficacy of antiviral and antitumoral cell-mediated immune responses.<sup>27</sup> Hence, although this profile was not determined at 1-3 months because of limitations in biological sample size, these results indicate that the functionality of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells was fully reconstituted in UCBT recipients at and beyond 6 months post-UCBT. Had larger amounts of cells ( $>10^7$ ) from graft inoculums and recipients been available, it would have been of high interest to compare these results with the evolution of another biologically relevant pre-immune repertoire in the context of UCBT, such as the CD8<sup>+</sup> T cell population specific for the A2/CMVpp65 tetramer.<sup>18</sup>

PD-1, an inhibitory receptor of the CD28 family, is highly expressed on dysfunctional CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells during chronic viral infections.<sup>28</sup> PD-1 contributes to the dampening of antiviral and anti-tumoral immunity and is associated with clonal exhaustion and diminished effector functions.<sup>40-42</sup> During the early post-transplant period, the frequency of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was positively correlated with that of PD1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells, and inversely correlated with CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell counts, highlighting the association between lymphopenia and impaired CD8<sup>+</sup> T cell function in the first months following UCBT. Gallez-Hawkins *et al.* reported no increase in the frequency of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T cells in the first months following BMT.<sup>43</sup> In the present study, all UCBT recipients experienced viral infections in the first 3 months post-transplantation, making it impossible to assess the impact of OI on PD-1 expression or the impact of PD-1 expression on susceptibility to viruses. Additional studies will be needed to verify if these differences are related to a) the source of the graft inoculum (UCB versus BM); b) the use of ATG; c) the cellular dose; d) the respective ages of the transplant recipients; and/or e) the differential incidence of GvHD and OI, which could not be assessed in the context present study. PD-1 expression is preferentially observed in EM and EMRA T cells.<sup>44,45</sup> Overall, our results are consistent with UCB CD8<sup>+</sup> T cells undergoing massive oligoclonal expansion while acquiring a skewed terminally-differentiated and exhausted phenotype following transfer into the recipients. These results provide a rationale for the increased susceptibility to OI and comparatively reduced incidence of acute GvHD observed in UCBT recipients.<sup>5</sup> These conclusions would be strengthened by a comparison between UCBT and BMT, which should be addressed in future studies. PD-1 expression and/or the interaction between PD-1 and its ligands PD-L1

and PD-L2 could represent attractive targets for interventions aiming to reduce the incidence of OI following UCBT.

Finally, 8 subjects experienced leukemic relapse, including 6 who relapsed later than 6 months post-UCBT, a time at which the polyfunctionality profile of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells had already completely recovered. Although the frequency of PD1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in the first 3 months post-UCBT was high in every subject, it was significantly higher in relapsers than in nonrelapsers at 2 and 6 months. Lower CD4<sup>+</sup> T cell counts and higher frequency of EM CD8<sup>+</sup> T cells frequency were also observed in relapsers, potentially highlighting the importance of cooperation between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells for generation, maintenance and/or efficacy of the graft *versus* leukemia effect. Lower frequencies of CD28<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> and EMRA CD8<sup>+</sup> T cells following allogeneic stem cell transplantation were previously associated with a greater risk of relapse of underlying hematologic malignancies.<sup>37</sup> To our knowledge, the present study is the first to report an association between the frequency of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells and subsequent leukemic relapse. This should be confirmed in larger series and additional studies will be required to determine whether increased frequency of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells is the underlying cause or merely a consequence of the ensuing relapse. However, these results suggest that this parameter could be used as a potential prognostic factor for leukemic relapse in pediatric UCBT recipients.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

N.M. is a Ph.D. candidate at Université de Montréal and this work is submitted in partial requirement for the Ph.D. The authors wish to thank Martine Caty, Serge Sénéchal, and Samira Mezziani for expert technical assistance, and Claude Perreault and Françoise Le Deist for critical reading of the manuscript. Supported by grants from le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and Héma-Québec (M.A.C., M.D., H.S.). N.M. was the recipient of scholarships from the Cole Foundation, la Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine, and FRSQ. The authors declare no financial conflicts of interest.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

N.M. performed research, collected data, analyzed and interpreted data, performed statistical analysis, and wrote the manuscript. M.A.C. and M.D. wrote the manuscript. H.S. designed research, performed statistical analysis, and wrote the manuscript. Correspondence: Hugo Soudeyns, Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Room 6735, Montreal, QC H3T 1C5, Canada.

## **REFERENCES**

1. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med.* 1998;339(22):1565-1577.
2. Barker JN, Wagner JE. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(7):526-532.



3. Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, et al. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1996;88(3):795-802.
4. Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, et al. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood*. 2000;96(8):2703-2711.
5. Barker JN, Hough RE, van Burik JA, et al. Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(5):362-370.
6. Merindol N, Charrier E, Duval M, Soudeyns H. Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in paediatric umbilical cord blood transplantation. *J Leukocyte Biol*. Prepublished on March 2<sup>nd</sup>, 2011 as DOI:10.1189/jlb.0111007.
7. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood*. 2001;97(10):2962-2971.
8. Reusser P, Attenhofer R, Hebart H, Helg C, Chapuis B, Einsele H. Cytomegalovirus-specific T-cell immunity in recipients of autologous peripheral blood stem cell or bone marrow transplants. *Blood*. 1997;89(10), 3873-9
9. Eibl B, Schwaighofer H, Nachbaur D, et al. Evidence for a graft-versus-tumor effect in a patient treated with marrow ablative chemotherapy and allogeneic bone marrow transplantation for breast cancer. *Blood*. 1996;88(4), 1501-8.

10. Cohen G, Carter SL, Weinberg KI, et al. Antigen-specific T-lymphocyte function after cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12(12):1335-1342.
11. Terakura S, Azuma E, Murata M, et al. Hematopoietic engraftment in recipients of unrelated donor umbilical cord blood is affected by the CD34<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell doses. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13(7):822-830.
12. Guérin-El Khourouj V, Dalle JH, Pédrón B, et al. Quantitative and Qualitative CD4 T Cell Immune Responses Related to Adenovirus DNAemia in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(4):476-85.
13. Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- $\gamma$  CD8(+) and CD4(+) T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* Prepublished on January 17, 2011 as DOI: 10.1038/bmt.2010.330.
14. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401(6754):708-712.
15. Merindol N, Grenier AJ, Caty M, et al. Umbilical cord blood T cells respond against the Melan-A/MART-1 tumor antigen and exhibit reduced alloreactivity as compared with adult blood-derived T cells. *J Immunol.* 2010;185(2):856-866.
16. Harari A, Dutoit V, Cellerai C, Bart PA, Du Pasquier RA, Pantaleo G. Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev.* 2006;211:236-254.

17. Romero P, Valmori D, Pittet MJ, et al. Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol Rev.* 2002;188:81-96.
18. Alanio C, Lemaitre F, Law HK, Hasan M, Albert ML. Enumeration of human antigen-specific naive CD8<sup>+</sup> T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood.* 2010;115(18):3718-3725.
19. Dalle JH, Duval M, Moghrabi A, et al. Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33(6):605-601
20. Yee C, Savage PA, Lee PP, Davis MM, Greenberg PD. Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers. *J Immunol.* 1999;162(4):2227-2234.
21. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology.* 1968;14(2):181-196.
22. Soudeyns H, Champagne P, Holloway CL, et al. Transient T cell receptor beta-chain variable region-specific expansions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells during the early phase of pediatric human immunodeficiency virus infection: characterization of expanded cell populations by T cell receptor phenotyping. *J Infect Dis.* 2000;181(1):107-120.
23. Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Web Server issue):W503-W508.

24. Venturi V, Kedzierska K, Turner SJ, Doherty PC, Davenport MP. Methods for comparing the diversity of samples of the T cell receptor repertoire. *J Immunol Methods*. 2007;321(1-2):182-195.
25. Rénard C, Barlogis V, Mialou V, et al. Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children. *Br J Haematol*. 2011;152(3):322-330.
26. Currier JR, Deulofeut H, Barron KS, Kehn PJ, Robinson MA. Mitogens, superantigens, and nominal antigens elicit distinctive patterns of TCRB CDR3 diversity. *Hum Immunol*. 1996;48(1-2):39-51.
27. Betts MR, Nason MC, West SM, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood*. 2006;107(12):4781-4789.
28. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.
29. Ssewanyana I, Baker CA, Ruel T, et al. The distribution and immune profile of T cell subsets in HIV-infected children from Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009;25(1):65-71.
30. Grabmeier-Pfistershammer K, Steinberger P, Rieger A, Leitner J, Kohrgruber N. Identification of PD-1 as a unique marker for failing immune reconstitution in HIV-1-infected patients on treatment. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;56(2):118-124.
31. Parkman R, Cohen G, Carter SL, et al. Successful immune reconstitution decreases leukemic relapse and improves survival in recipients of unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12(9):919-927.

32. Scheinberg P, Melenhorst JJ, Brenchley JM, et al. The transfer of adaptive immunity to CMV during hematopoietic stem cell transplantation is dependent on the specificity and phenotype of CMV-specific T cells in the donor. *Blood*. 2009;114(24):5071-5080.
33. Fujiwara H, El Ouriaghli F, Grube M, et al. Identification and in vitro expansion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells specific for human neutrophil elastase. *Blood*. 2004;103(8):3076-3083.
34. Rezvani K, Grube M, Brenchley JM, et al. Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8<sup>+</sup> T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation. *Blood*. 2003;102(8):2892-2900.
35. Talvensaari K, Clave E, Douay C, et al. A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood*. 2002;99(4):1458-64.
36. Komanduri KV, St John LS, de Lima M, et al. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood*. 2007;110(13):4543-4551.
37. Yakoub-Agha I, Saule P, Magro L, et al. Immune reconstitution following myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the impact of expanding CD28 negative CD8<sup>+</sup> T cells on relapse. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 15(4):496-504.
38. Poulin JF, Viswanathan MN, Harris JM, et al. Direct evidence for thymic function in adult humans. *J Exp Med*. 1999;190(4):479-486.

39. Harris JM, Hazenberg MD, Poulin JF, et al. Multiparameter evaluation of human thymic function: interpretations and caveats. *Clin Immunol*. 2005;115(2):138-46.
40. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006;443(7109):350-354.
41. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;439(7077):682-687.
42. Mumprecht S, Schürch C, Schwaller J, Solenthaler M, Ochsenbein AF. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood*. 2009;114(8):1528-1536.
43. Gallez-Hawkins GM, Thao L, Palmer J, et al. Increased programmed death-1 molecule expression in cytomegalovirus disease and acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(7):872-880.
44. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*. 2008;73(11):975-983.
45. Duraiswamy J, Ibegbu CC, Masopust D, et al. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1hi CD8 T cells in healthy human adults. *J Immunol*. 2011;186(7):4200-4212.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 3.1. Reconstitution of A2/Melan-A<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells following UCBT.** The frequency of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was measured *ex vivo* (A) and following PHA stimulation (B) in UCB graft inoculums and UCBT recipients. Statistical significance was tested using the Mann-Whitney *U* test. Boxes represent median and IQR. Error bars represent the range. n represents the number of subjects.

**Figure 3.2. Evolution of the T cell receptor  $\beta$  chain repertoire in A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells.** A. Longitudinal analysis of the distribution of TCR $\beta$  chain clonotypes amplified from graft inoculums and PBMC samples obtained from corresponding UCBT recipients (n=11). Each bar represents a time point (*i.e.* graft inoculum; time post-UCBT), and each box within a bar represents a particular T cell clonotype identified by a characteristic TCR  $\beta$  chain CDR3 sequence. Open boxes represent unique clonotypes (*i.e.* clonotypes that were not found in another time point). Colored bars represent persisting clonotypes, *i.e.* clonotypes that were observed in more than one time point. Identical colors correspond to identical clonotypes in within-patient but not between-patient analysis. Twenty to 35 independent recombinant clones were analysed per time point. P2, P8 and P20 experienced leukemic relapse. B. Simpson's diversity index ( $D_s$ )<sup>24</sup> was used to represent clonal diversity. Statistical significance was tested using one-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test. \*:  $p < 0.05$ . Boxes represent median and IQR. Error bars represent the range. n represents the number of subjects.

**Figure 3.3. Phenotypic reconstitution of total CD8<sup>+</sup> T cells and A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells following UCBT.** Representative dot plots and pie charts represent median frequencies of naïve, CM, EM, and EMRA CD8<sup>+</sup> T cells measured *ex vivo* in the graft inoculum and UCBT recipients using tetramer staining. No A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells were detected *ex vivo* at 1 to 3 months post-UCBT.

**Figure 3.4. Polyfunctionality profile and cytolytic activity of A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells following UCBT.** A. Staining for IFN- $\gamma$ , IL-2 and CD107a was performed on T cell microcultures derived from graft inoculums and UCBT recipients following stimulation with cognate peptide. Background frequencies measured in absence of cognate peptide were subtracted. Left panel represents the frequencies of cells expressing combinations of IFN- $\gamma$ , IL-2 and CD107a. Right panel depicts the frequencies of cells exhibiting 1, 2 and 3 functions. n represents the number of subjects. B. <sup>51</sup>Cr release assays were performed using 221.A2 targets pulsed with Melan-A<sub>26-35</sub> A27L peptide. Samples were considered positive when <sup>51</sup>Cr release measured in presence of cognate peptide was  $\geq 10\%$  of total release and  $\geq 2$  standard deviations above <sup>51</sup>Cr release measured in absence of peptide. i. Bars represent the mean and standard error of frequencies of cytolytic A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell microcultures derived from the graft inoculum (G) and from samples obtained from study subjects following UCBT. n represents the number of subjects tested at each time point. ii. Box and whiskers represent % specific lysis exhibited by T cell microcultures derived from the graft inoculums or from samples obtained from UCBT recipients. % specific lysis was computed as  $[(^{51}\text{Cr release in presence of cognate peptide} - ^{51}\text{Cr release in absence of peptide}) \times 100 / \text{total } ^{51}\text{Cr release}]$ . n represents the number of T cell microcultures tested at each time point. iii. Squares represent the mean and SEM of lysis in presence (closed squares) or absence



(open squares) of cognate peptide. n represents the number of T cell microcultures tested at each time point. There were no significant differences between time points. Statistical significance was tested using the Mann-Whitney U test and ANOVA analysis of variance. Statistical significance was tested using ANOVA or the Mann-Whitney *U* test.

**Figure 3.5. Frequencies of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> and PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells following UCBT.** A. PD-1 expression was analyzed by FACS on CD8<sup>+</sup> T cells *ex vivo*. Gates were set on CD8<sup>hi</sup> to exclude CD8<sup>+</sup> NK cells. B. PD-1 expression was analyzed by FACS on CD4<sup>+</sup> T cells *ex vivo*. C. Correlation between the frequency of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells and absolute CD8<sup>+</sup> T cell counts throughout the follow-up period. D. Correlation between the frequency of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells and absolute CD4<sup>+</sup> T cell counts throughout the follow-up period. Boxes and whiskers depict the median, IQR and range of frequencies in graft inoculums (G), UCBT recipients, and healthy adults (AB). Statistical significance was tested using Spearman's rank correlation test or one-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ . n represents the number of subjects.

**Figure 3.6. Association between PD-1 expression and leukemic relapse.** Absolute CD4<sup>+</sup> T cells counts (A) and absolute CD8<sup>+</sup> T cell counts (B) were measured by FACS in PBMC samples obtained at 6 months post-UCBT. Frequencies of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were measured in PBMC samples obtained at 2 months (C) and 6 months (D) post-UCBT. Statistical significance was tested using the Mann-Whitney *U* test. Boxes and whiskers depict the median, IQR and range. n represents the number of subjects. NR: non-relapsers, R: relapsers.

## SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

**Fig. 3.S1. Analysis of the TCR  $\beta$  chain repertoire in A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells following UCBT.** The TCR  $\beta$  chain was amplified from cDNA derived from tetramer-sorted A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells isolated from the graft inoculum or UCBT recipients. CDR3 length was determined using IMGT/V-QUEST (Brochet et al., 2008). Gaussian distribution of CDR3 length is consistent with a pre-immune or fully reconstituted T cell repertoire. A mean of 24.9 sequences were analyzed for each subject/time point (1319 sequences total). \* denotes that the distribution of CDR3 length does not deviate from the normal distribution, as determined using the Kolmogorov-Smirnov test.

**Fig. 3.S2. Phenotypic reconstitution of total CD8<sup>+</sup> T cells and A2/Melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells following UCBT.** Pie charts represent median frequencies of naïve, CM, EM, and EMRA CD8<sup>+</sup> T cells and A2/melan-A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells measured *ex vivo* in the graft inoculum and UCBT recipients over 36 mo of follow-up using tetramer staining. No A2/Melan-A<sup>+</sup> T cells were detected *ex vivo* at 1, 2 and 3 months post-UCBT. Relapse: subjects who experienced relapse of underlying leukemic disorder after 6 mo post-UCBT. Failure: subject who experienced failure of engraftment.

**Fig. 3.S4. Representative dot plots and gating strategy for intracellular staining.**

Intracellular staining for IFN- $\gamma$ , IL-2, and CD107a was carried out following stimulation with cognate peptide.

**Fig. 3.S5. PD-1 expression in CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells following UCBT.**

A. Representative dot plots of PD-1, CD8 and CD4 staining in cells from the graft inoculums and PBMC samples obtained from UCBT recipients over the follow-up period. For PD-1<sup>+</sup>, logical gates were set on CD8<sup>hi</sup> to exclude CD8<sup>+</sup> NK cells. B. Relative frequencies of PD1<sup>+</sup> cells in CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells. Statistical significance was tested using the Mann-Whitney *U* test. C. Statistical significance of the association between the frequencies of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells and PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells measured throughout follow-up in UCBT recipients was tested using Spearman's correlation test. Normalized  $\Delta$ MFI for PD-1 [(MFI PD-1<sup>+</sup> - MFI PD-1<sup>-</sup>) / MFI PD-1<sup>-</sup>] was measured by FACS in CD8<sup>+</sup> (D) and CD4<sup>+</sup> (E) T cells obtained from UCBT recipients during the follow-up period and from healthy adults. In D, differences between groups were not statistically significant ( $p > 0.05$ ; one-way ANOVA). In E, overall differences between groups were detected ( $p < 0.05$ ; one-way ANOVA) but these differences could not be significantly ascribed to any particular comparison between time points ( $p > 0.05$ ; Bonferroni's multiple comparison test). F. Frequency of PD-1<sup>+</sup> T cells in CD4<sup>+</sup> T cells did not significantly differ between responders (R) and non-responders (NR) at 6 months post-UCBT. G. The frequency of PD-1-expressing CD8<sup>+</sup> T cells is shown in nonrelapsers only. H. The frequency of PD-1-expressing CD4<sup>+</sup> T cells is shown in nonrelapsers only. n represents the number of subjects.

**Fig. 3.S6. Phenotypic profiles of total CD8<sup>+</sup> T cells in relapsers and non-relapsers following UCBT.** Boxes and whiskers represent the median, IQR, and range of frequencies of naïve, CM, EM, and EMRA CD8<sup>+</sup> T cells measured *ex vivo* in PBMC samples obtained from relapsers (n = 5) and non-relapsers (n = 10) at 6 mo post-UCBT. Statistical significance was assessed using the Mann-Whitney *U* test. NR: non-relapsers, R: relapsers.

**Fig. 3.S7. Gating strategy.** Dot plots show representative samples and gating strategy for determining CD8<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> A2/Melan-A<sup>+</sup> T cell phenotype.

**Table 3.I. Clinical characteristics of transplanted patients**

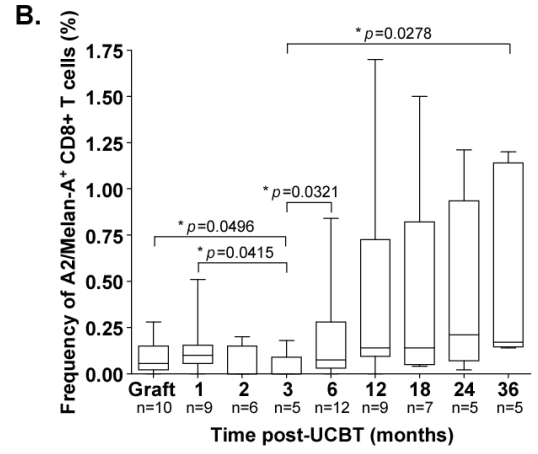
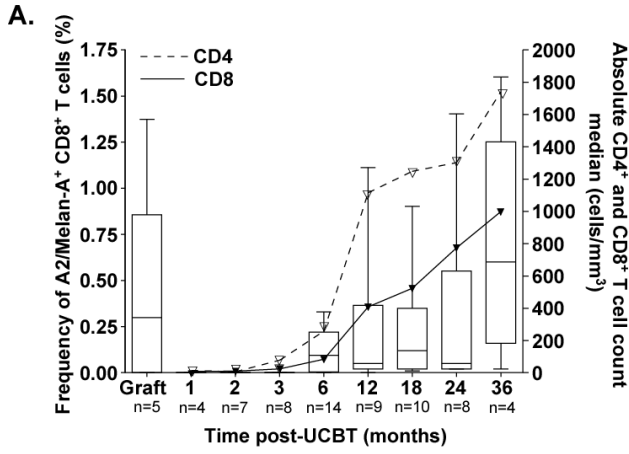
		n	%	Patient reference ID
<b>Gender</b>	XX	11	42.3	1,5,7,8,11,12,20,21,22,23,25
	XY	15	57.7	2,3,4,6,9,10,13,14,15,16,17,18,19,24,26
<b>UCB graft</b>	Single unit	24	92.3	
	Double units	2	7.7	19, 24
<b>Hematologic malignancies</b>	ALL	11	42.3	1,3,8,10,13,14,15,17,18,23,26
	MDS	8	30.8	5,6,7,9,12,21,22,24
	AML	4	15.4	2,4,20,25
<b>Others</b>	FHLH	1	3.8	11
	Farber disease	1	3.8	16
	Hurler syndrome	1	3.8	19
<b>HLA disparity</b>	0	9	34.6	1,4,5,6,12,14,19,23,25
	1	9	34.6	2,3,8,10,11,16,20,21,26
	2	8	30.8	7,9,13,15,17,18,22,24
<b>Outcome</b>	Death	8	30.8	1,2,7,8,12,14,19,23
	Cytomegalovirus infection	3	11.5	7,9,12
	Herpes virus infection (other)	12	46.2	2,9,10,11,13,15,17,21,25
	Leukemic relapse	8	34.8	2,8,12,14,20,22,23,26
	Acute GvHD	4	15.4	17,18,22,24
	Chronic GvHD	1	3.8	21
	Graft failure	3	11.5	1,6,19

Conditioning regimen and GvHD prophylaxis were described under Materials and Methods. Twenty-three of 26 subjects (88.5%) were transplanted to treat persistent malignant disease. The major cause of post-transplant mortality was leukemic relapse (n = 5). Leukemic relapse frequency was computed on hematologic malignancies (8/23= 34.8%). Subjects lost to follow-up (n = 2) were not included in the analysis. ALL: acute lymphoblastic leukemia; MDS: myelodysplastic syndrome; AML: acute myeloid leukemia; FHLH: familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; GvHD: graft-versus-host disease.

# FIGURES

**Figure 3.1.**

Merindol *et al.* Figure 1



**Figure 3.2.**

Merindol *et al.* Figure 2

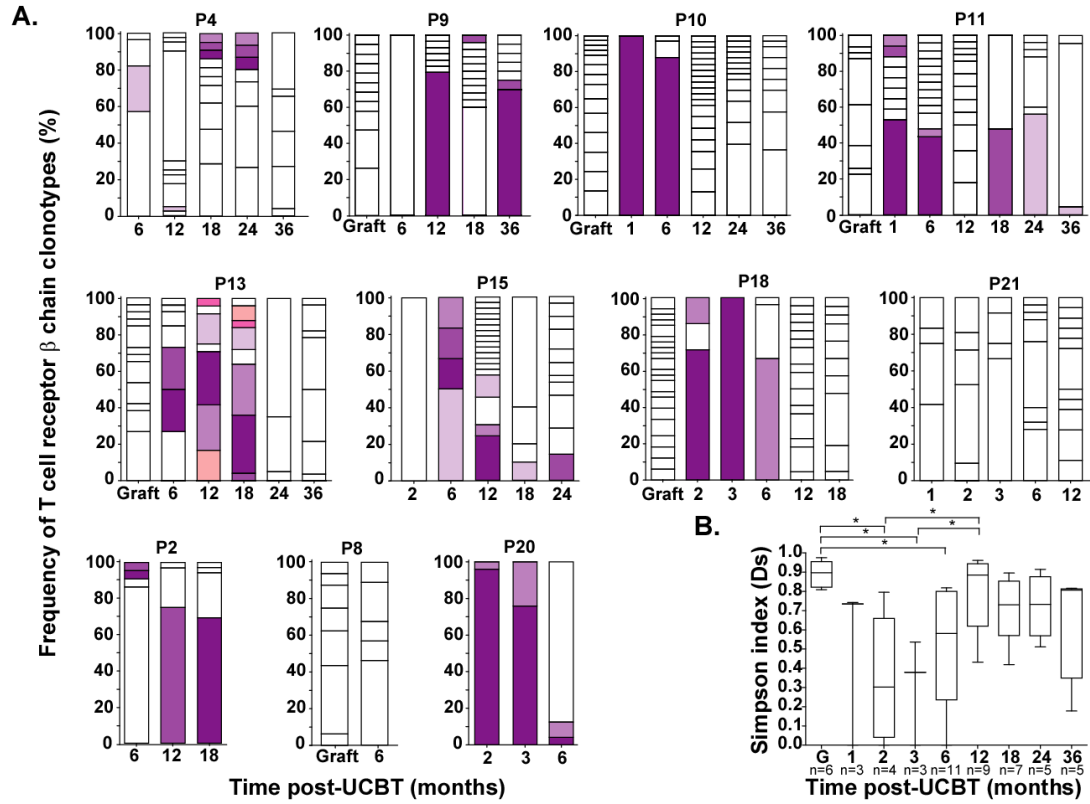
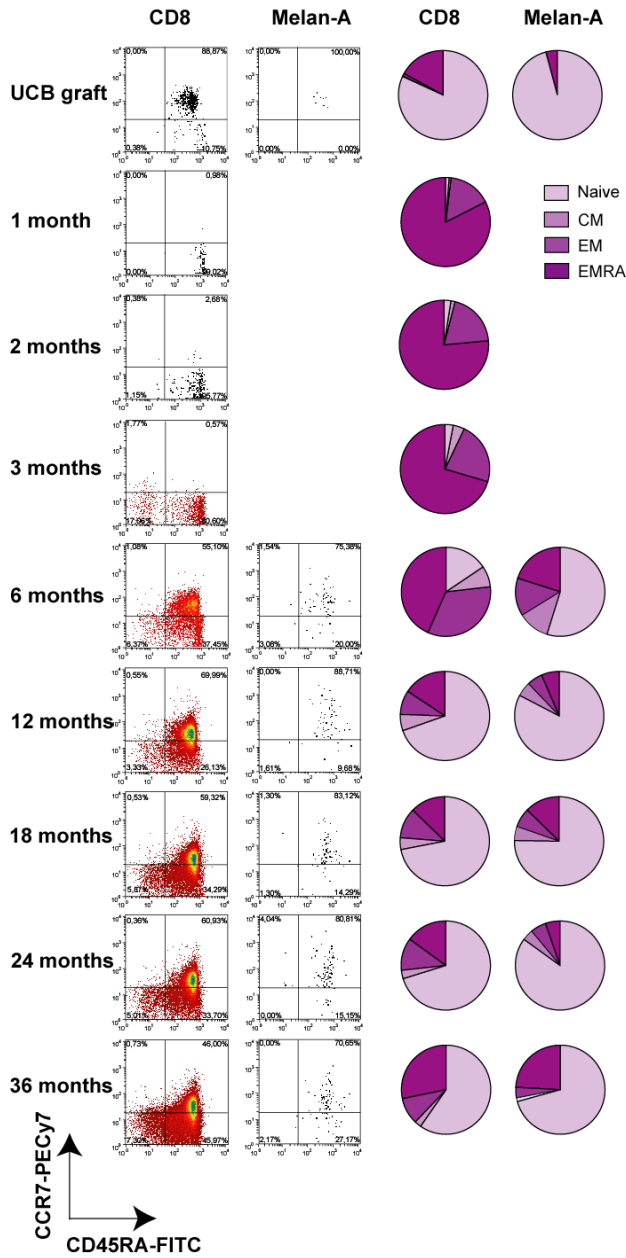


Figure 3.3.

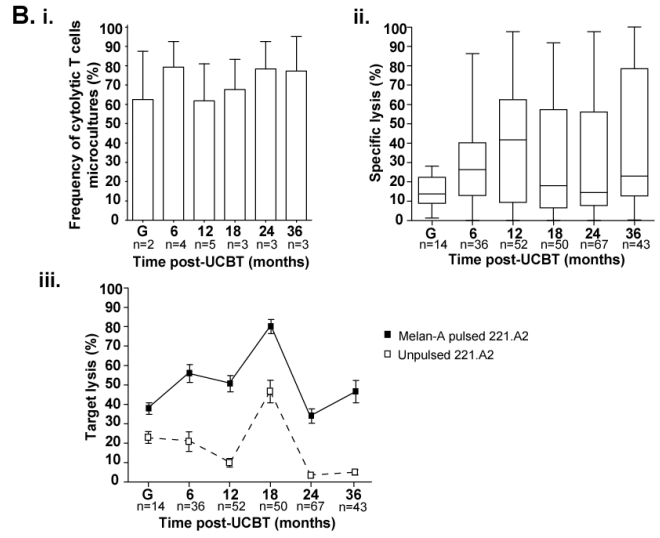
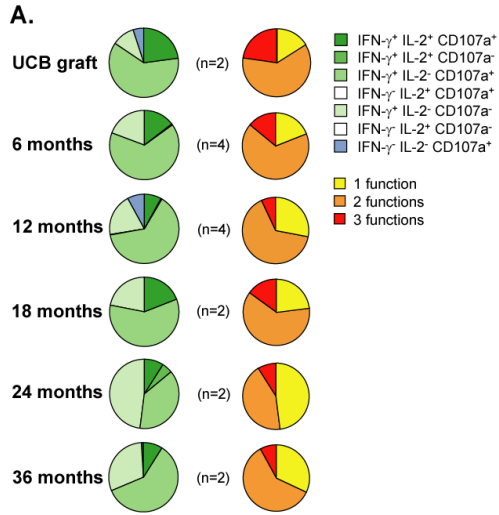
Merindol *et al.* Figure 3.





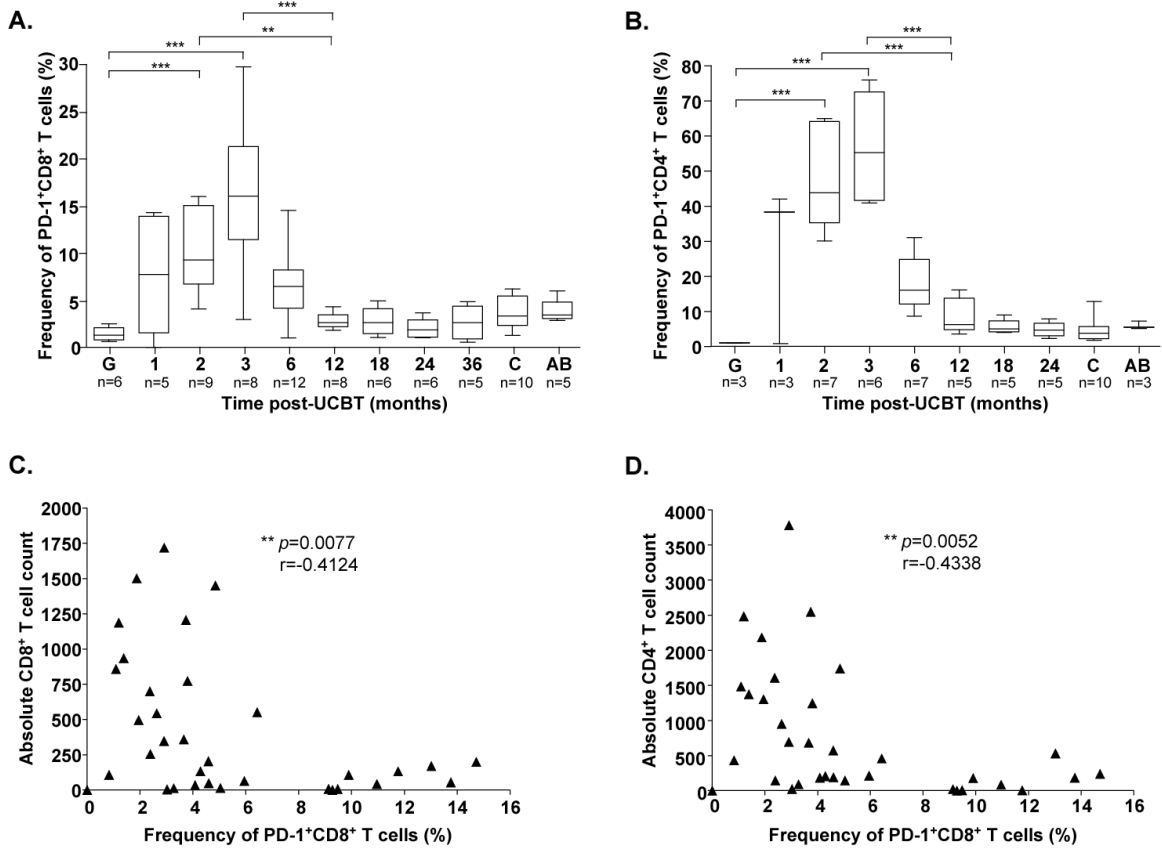
**Figure 3.4.**

Merindol *et al.* Figure 4



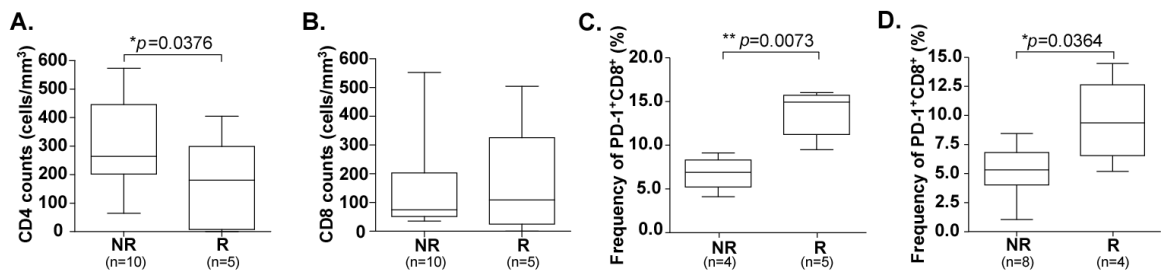
**Figure 3.5.**

Merindol *et al.* Figure 5



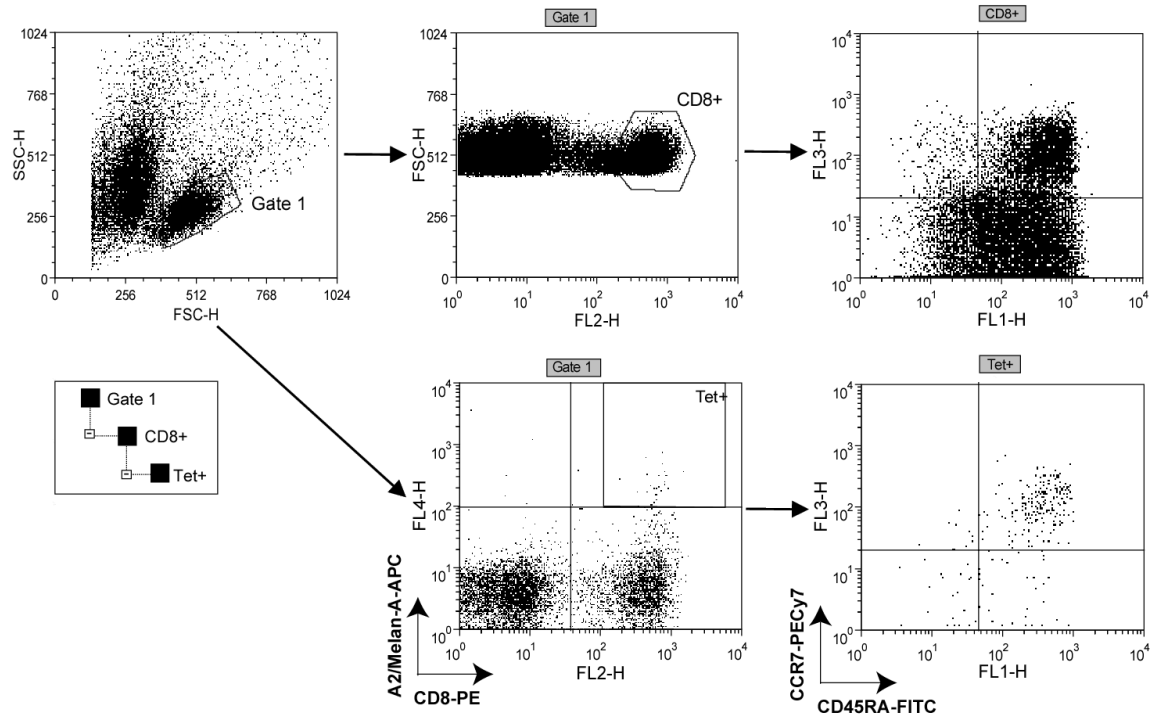
**Figure 3.6.**

Merindol *et al.* Figure 6.



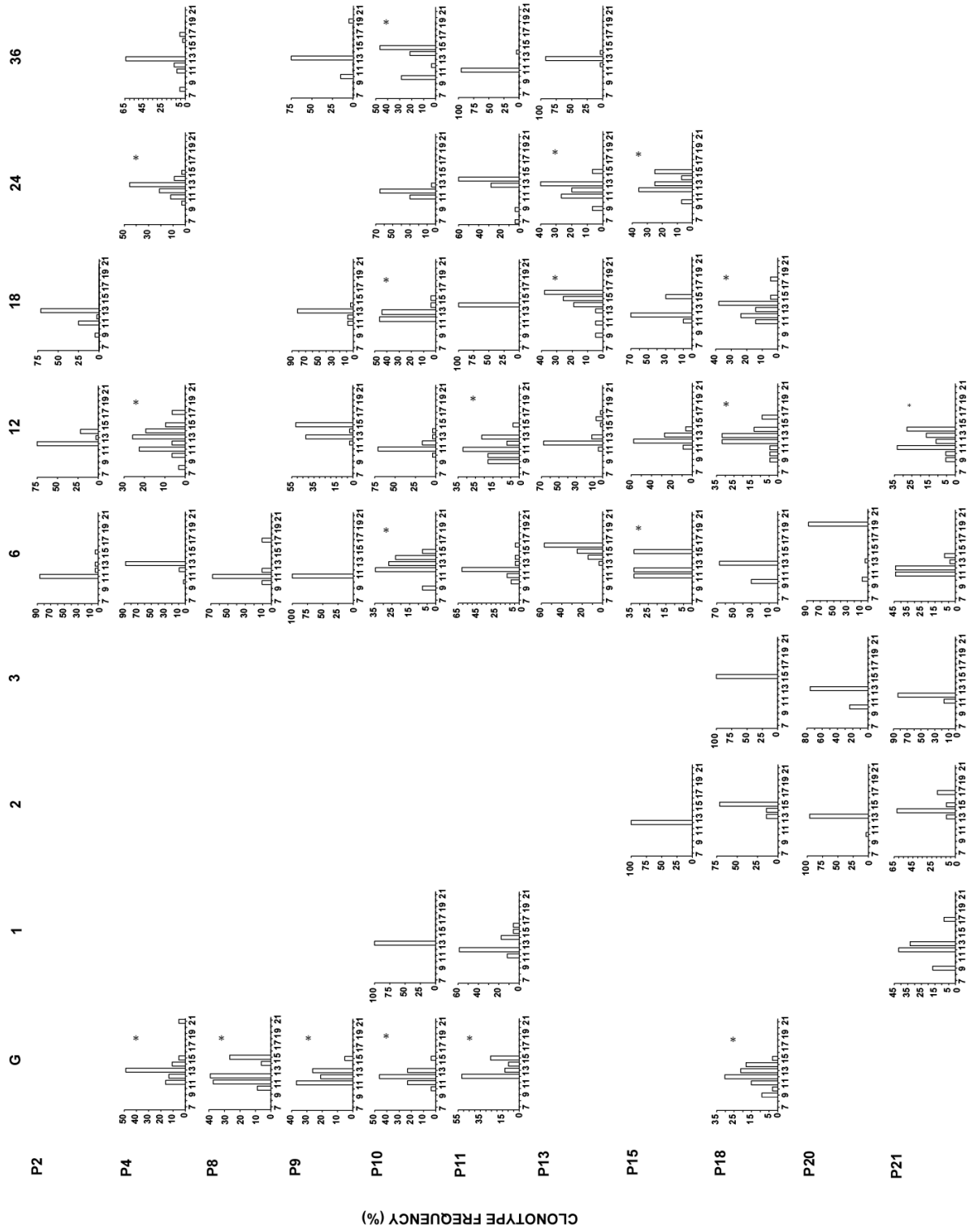
**Figure 3.S1.**

Merindol *et al.* Supplemental Figure 1



Merindol et al. Supplemental Figure 2

Figure 3.S2.



CDR3 LENGTH

**Figure 3.S3.**

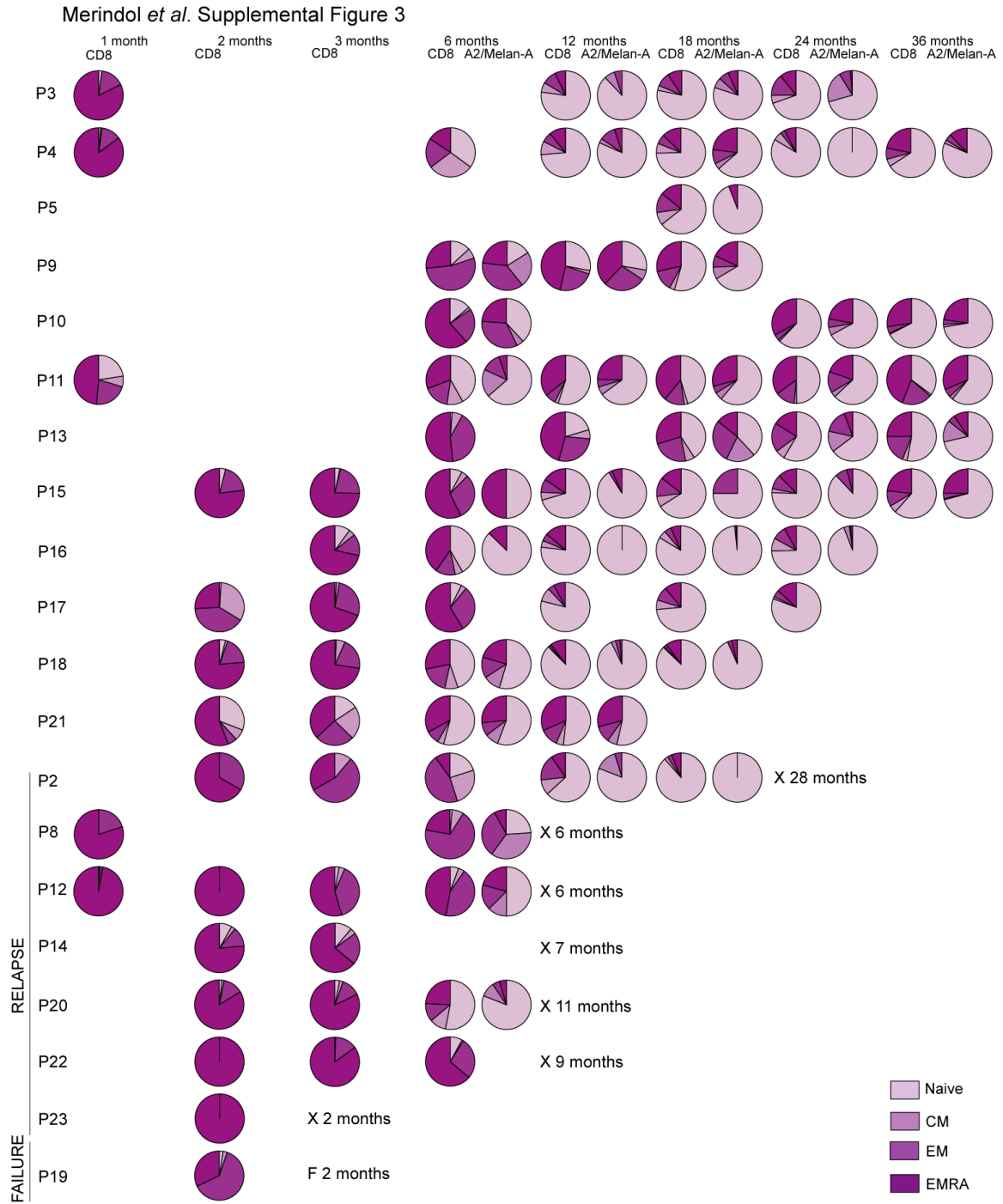
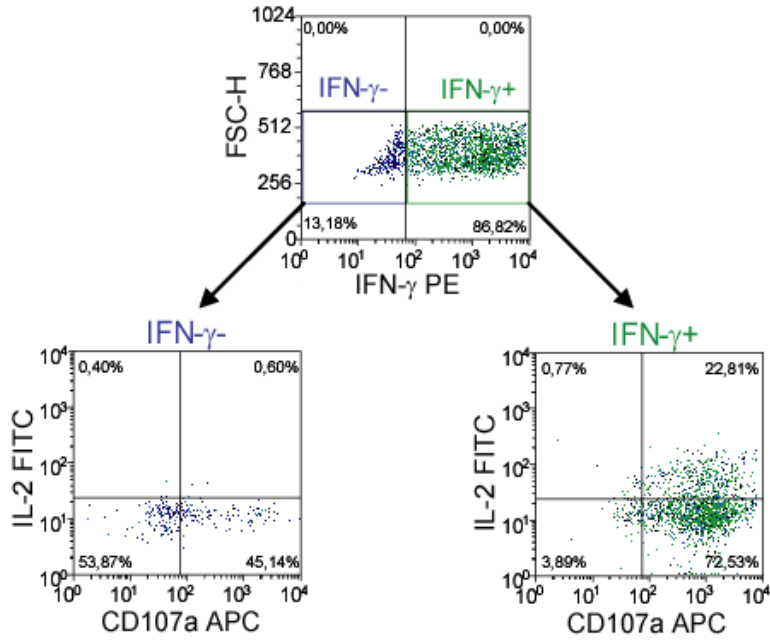


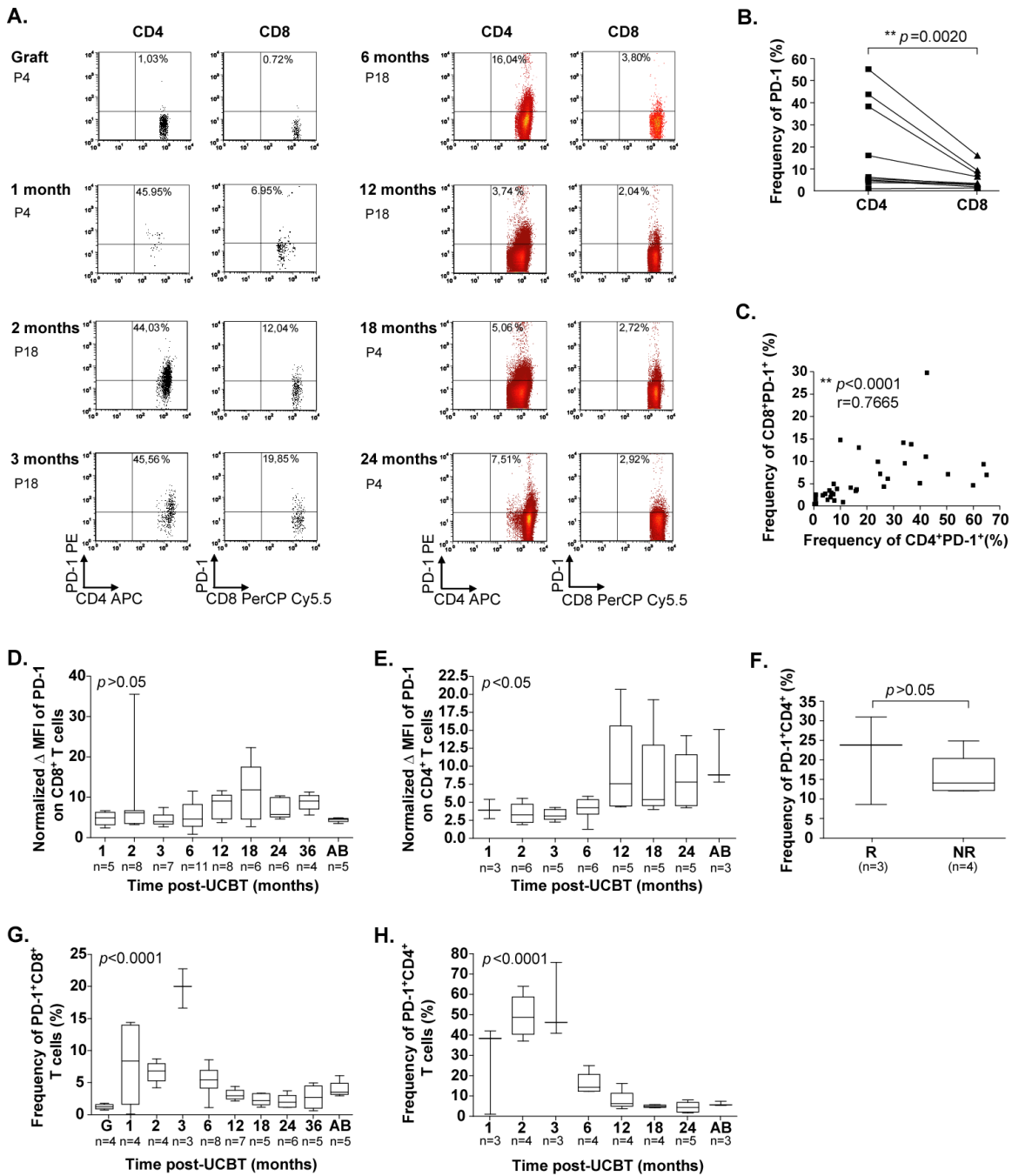
Figure 3.S4.

Merindol *et al.* Supplemental Figure 4



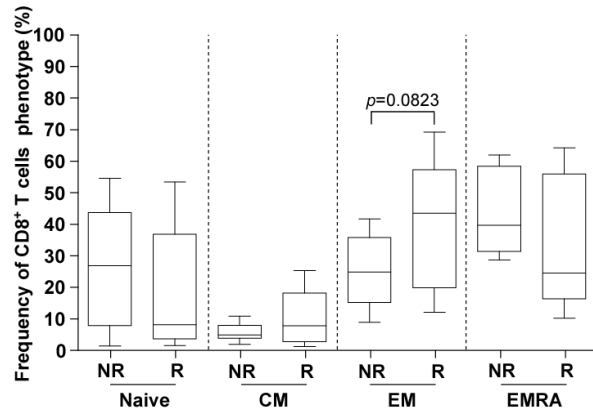
**Figure 3.S5.**

Merindol *et al.* Supplemental Figure 5



**Figure 3.S6.**

Merindol *et al.* Supplemental Figure 6





## TRANSITION

La précédente étude dépeint la reconstitution des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en deux vagues successives et peu chevauchantes, chez les enfants transplantés de SCO. La première vague est caractérisée par un épuisement clonal progressif jusqu'à 3 mois post-greffe, défini par une population en différenciation terminale et exprimant la molécule régulatrice PD-1. La deuxième vague de reconstitution détectée généralement à 6 mois post-TSCO est issue de la thymopoïèse et fait place à des cellules T naïves, polyclonales et fonctionnelles. Tel que suggéré par leur phénotype majoritairement naïf suite à la TSCO, les lymphocytes T A2/Melan-A<sup>+</sup> ne semblent pas répondre à leur antigène en périphérie. Bien qu'informatif quant à la cinétique et quant au potentiel des lymphocytes T en général, ce répertoire ne participe pas, *a priori*, à la protection contre les infections opportunistes et les rechutes de leucémie.

Qu'en est-il de la fonctionnalité des lymphocytes T issus du greffon lorsqu'ils sont stimulés par des virus chez le receveur de TSCO? À quel moment est-il possible de développer des réponses protectrices antivirales après la TSCO? Est-il obligatoire de développer des symptômes cliniques pour développer une immunité anti-virale?

Nous allons tenter de répondre à toutes ces questions dans le chapitre suivant en étudiant les réponses des lymphocytes T spécifiques à CMV et à VZV, deux virus qui sont des causes majeures de morbidité et mortalité chez les receveurs de TSCO.

# Chapitre 4

**RECONSTITUTION OF PROTECTIVE IMMUNE RESPONSES AGAINST CMV AND VZV DOES NOT REQUIRE DISEASE DEVELOPMENT IN PEDIATRIC RECIPIENTS OF UMBILICAL CORD BLOOD TRANSPLANTATION**

Natacha Merindol, Ph.D.,<sup>1,2,3</sup> Insaf Salem Fourati, M.Sc.,<sup>1,2,3</sup> Rose-Marie Brito, B.Sc.,<sup>2,4</sup> Anne-Julie Grenier, M.Sc.,<sup>1,2,3</sup> Emily Charrier, Ph.D.,<sup>2,5,6</sup> Paulo Cordeiro, M.Sc.,<sup>2,5</sup> Martine Caty,<sup>1</sup> Samira Mezziani,<sup>2,7</sup> Brigitte Malette, Ph.D.,<sup>3,4</sup> Michel Duval, M.D.,<sup>2,5,7,8</sup> Carolina Alfieri, Ph.D.,<sup>2,3</sup> Philippe Ovetchkine, M.D.,<sup>2,8,9</sup> Françoise Le Deist, M.D., Ph.D.,<sup>2,3,4</sup> and Hugo Soudeyns, Ph.D.,<sup>1,2,3,8</sup>.

<sup>1</sup>Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine; <sup>†</sup>Groupe de recherche en transplantation et immunologie du sang de cordon (GRETISC), Centre de cancérologie Charles-Bruneau; <sup>3</sup>Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal; <sup>4</sup>Département de microbiologie et immunologie, CHU Sainte-Justine; <sup>5</sup>Laboratoire d'immunologie du sang de cordon, Centre de cancérologie Charles-Bruneau; <sup>6</sup>Biomedical Sciences Program, Faculty of Medicine, Université de Montréal; <sup>7</sup>Service d'hémo-oncologie, CHU Sainte-Justine; <sup>8</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal; <sup>9</sup>Service des maladies infectieuses, CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada.

**Correspondence:** Hugo Soudeyns, Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Room 6735, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada.

**Short title:** Antiviral reconstitution in umbilical cord blood recipients.

**FINANCIAL DISCLOSURE STATEMENT**

The authors have nothing to disclose.

## **ABSTRACT**

Cytomegalovirus (CMV) and varicella-zoster virus (VZV) are significant causes of morbidity and mortality following umbilical cord blood transplantation (UCBT). However, the kinetics of reconstitution and protective potential of antiviral cell-mediated immune responses following UCBT remain poorly characterized. Here, the reconstitution of CMV and VZV-specific T cell responses and standard immunological parameters were assessed between 1 to 36 months post-transplantation using flow cytometry and IFN- $\gamma$  ELISpot in 30 children with haematological malignancies who underwent UCBT (n=28) or bone marrow transplantation (BMT) (n=2). Barely detectable in the first 3 months post-transplantation, antiviral T cell responses directed against CMV and VZV were observed in 30.4% and 40.3% of study subjects after 36 months of follow-up. Four seronegative subjects developed IFN- $\gamma$  responses against CMV, while 4 subjects developed a VZV-specific IFN- $\gamma$  response without showing clinical signs of infection. Four of 30 subjects developed CMV DNAemia, and 5 of 30 experienced manifestations of herpes zoster during the post-transplant period. However, no CMV- or VZV-related events were observed in study subjects following the development of CMV- or VZV-specific responses  $>150$  SFU per  $10^6$  PBMC, consistent with T cell-mediated protection. Finally, famciclovir prophylaxis delayed the onset of herpes zoster but did not strictly prevent the reconstitution of the VZV-specific T cell repertoire, as the frequency of T cells producing IFN- $\gamma$  in response to VZV antigens reached levels consistent with protection in two non-zoster subjects. Routine monitoring of CMV- and VZV-specific cell-mediated immunity during the post-transplant period could inform immunocompetence in UCBT and BMT recipients and guide initiation and cessation of antiherpetic prophylaxis [255 words].

## INTRODUCTION

As an alternative to unrelated bone marrow transplantation (BMT), umbilical cord blood transplantation (UCBT) has been used for over two decades to treat paediatric patients suffering from various haematological disorders. UCBT is associated with a specific pattern of clinical outcomes. Major advantages include a low incidence of graft-versus-host disease (GvHD) [1] and efficient graft-versus-leukemia effect [2]. Its main disadvantages are delayed engraftment, late reconstitution of the CD8<sup>+</sup> T cell subset as compared to BMT, and a higher incidence of opportunistic infections (OI) in the first 3 to 6 months post-transplantation that results in higher rates of morbidity and mortality relative to BMT during this period [3-5]. In particular, cytomegalovirus (CMV) and varicella zoster virus (VZV) are important causes of OI and infections with these pathogens are observed more frequently in UCBT recipients than in BMT recipients [6,7]. CMV is a lymphotropic  $\beta$ -herpesvirus that establishes latency and persists in the host following primary infection. CMV infection is largely asymptomatic in immunocompetent hosts. However, in immunodeficient subjects, it is associated with life-threatening complications, including CMV pneumonia, gastroenteritis, and, less commonly, retinitis, hepatitis, and encephalitis [8]. Between 50% and 100% of patients that are CMV-seropositive prior to transplantation will experience clinical symptoms of CMV infection or detectable viral replication by day 100 post-UCBT [9-11]. Ganciclovir prophylaxis does not fully suppress CMV reactivation and is associated with myelosuppression that limits its usage in paediatric UCBT recipients [4,12-14]. Preemptive monitoring, which consists in performing weekly pp65-specific PCR during the first 6 months following transplantation, reduces the incidence of CMV disease down to 5%-20% at day 100 [11,15,16]. However, late-onset (> 6 months) CMV disease can still occur and is associated with a high rate of mortality [17], particularly in CMV-seropositive recipients [18,19]. Moreover, the high sensitivity of PCR detection may lead to

overtreatment of patients who would not have otherwise progressed to overt CMV disease [20]. Recent tetramer-based studies showed that rapid recovery of CMV-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was associated with a reduced incidence of CMV-related complications in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) recipients [21,22]. Production of IFN- $\gamma$  by CMV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was closely associated with control of CMV antigenemia and DNAemia following allogeneic HSCT in some studies [23,24] but not in others [25,26].

VZV is a  $\alpha$ -herpesvirus that preferentially infects epithelial and neural cells. Primary infection with VZV causes varicella, while its reactivation causes herpes zoster. VZV infection can lead to the development of threatening complications in immunocompromised hosts, including visceral dissemination to the lungs, liver, and/or central nervous system [27-29]. VZV reactivation is common following HSCT, with 13%-55% of patients developing VZV-associated complications during the first year [28]. In 2008, Vandebosch *et al.* reported that VZV reactivation was more frequent (63%), more severe, and occurred later following UCBT compared to BMT [7]. On the basis of this and similar observations, long-term prophylaxis with acyclovir or valaciclovir was recommended to prevent VZV-related complications in HSCT recipients [30]. The penciclovir prodrug famciclovir was used for the same indication in our clinical center. However, there have been concerns whether this prophylactic strategy may also lead to over-treatment and/or development of antiviral drug resistance [30]. In addition, because long-term protection from CMV and VZV infections is critically dependent on the reconstitution of a functional antiviral T cell repertoire [31-35], concerns were raised whether effective antiviral prophylaxis might result in impairment of virus-specific immune reconstitution [36,37]. Indeed, using IFN- $\gamma$  production as a key

marker of T cell function, Distler *et al.* recently reported that VZV-specific T cell-mediated immunity was recovered efficiently in T cell-depleted allogeneic-BMT recipients who experienced herpes zoster but not in non-zoster patients, suggesting that VZV replication was required for priming/restoration of an efficient antiviral T cell repertoire [38]. Immunological monitoring of virus-specific T cell recovery may thus be helpful in determining which treatment strategy to adopt to resolve this conundrum. However, reconstitution and functionality of antiviral T cells are not well characterized in paediatric UCBT recipients.

The objectives of the present study were fourfold: a) to better define and compare the kinetics of reconstitution of CMV-specific and VZV-specific T cell-mediated immune responses following UCBT; b) to determine whether manifestations of CMV- or VZV-associated complications are required for reconstitution of virus-specific cell-mediated immune responses; c) to determine whether these responses protect the graft recipient against CMV- and VZV-associated complications; and d) to examine whether antiherpetic prophylaxis influences their development. To do this, the reconstitution of CMV- and VZV-specific T cell responses and standard immunological parameters were monitored using flow cytometry and IFN- $\gamma$  enzyme-linked immunospot (ELISpot) assays between 1 and 36 months post-transplantation in a group of 30 children who underwent UCBT (n = 28) or BMT (n = 2) for the treatment of haematological malignancies (n = 25) or other haematological or metabolic disorders (n = 5). Results indicate that an important proportion of subjects developed CMV- and VZV-specific IFN- $\gamma$  responses without manifesting symptoms of the diseases, that emergence of detectable CMV- or VZV-specific cell-mediated immune responses was associated with absence of subsequent CMV- and

VZV-associated clinical manifestations, and that famciclovir prophylaxis did not impact the reconstitution of VZV-specific cell-mediated immunity.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study subjects.**

This study was approved by the Institutional Ethics Review Board of CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada. Full informed consent was obtained from all study participants, their parents and/or legal guardians. Thirty subjects with hematologic diseases who underwent either unrelated single UCBT (n = 26), double UCBT (n = 2), or unrelated BMT (n = 2) were enrolled in the study between 10/2004 and 06/2010. Median age at transplantation was 73 months (range: 4-211 months). Venous blood samples (2-10 ml) were obtained from transplant recipients at 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, and 36 months post-transplantation. UCB units, obtained from national and international cord blood banks, were required to show a 4/6 or greater allele-level match (HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1) with the patient and with each other in the case of double UCBT. In the case of BMT, the match had to be 6/8 or greater (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1). Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) were isolated on Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and cryopreserved in 90% v/v FBS (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% v/v DMSO. Basic clinical and socio-demographic characteristics of study subjects are summarized in Table 4.1. The conditioning regimen included total-body irradiation (TBI) or busulfan, except in one subject with severe idiopathic aplastic anemia. Graft inoculums were not T cell depleted. GvHD prophylaxis consisted of cyclosporine A and corticosteroids. Subjects were administered with 2 mg/kg antithymocyte globulin (Thymoglobulin; Sangstat, Mississauga, Ontario, Canada) on day -2, -1, +1, and +2, and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) after UCBT. Intravenous immunoglobulins (500 mg/kg) were



administered weekly to all subjects from transplant to day +100, then every month for 6 months. Subjects with pre-transplant positive serology for herpes simplex virus were given acyclovir prophylaxis (250 mg/m<sup>2</sup>/12 hours) from day -1 to day +21.

### **CMV and VZV monitoring and prophylaxis.**

The graft recipients' pre-transplant CMV serological positivity (CMV<sup>+</sup>) (*i.e.* presence of immunoglobulin G [IgG] antibodies to CMV late antigens) was confirmed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In subjects enrolled before 09/2005, CMV reactivation was monitored by detection of CMV pp67 mRNA in whole blood using a semi-quantitative nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) method [39]. An in house real-time PCR method based on detection of pp65 developed in 2005 was then implemented (Brigitte Malette, CHU Sainte-Justine, Montreal; primer sequences available upon request). Monitoring was performed on a weekly basis until 6 months post-transplant or longer if immunosuppression persisted. Ganciclovir treatment (5 mg/kg/12 hours) was initiated upon detection of more than 3,000 CMV DNA copies/ml plasma and discontinued upon disappearance of viremia. VZV serological status prior to and post-transplantation was determined using ELISA (Enzygnost, Dade Behring Marburg, Marburg, Germany; Euroimmun, Lübeck, Germany). VZV disease was suspected in presence of typical cutaneous vesicular lesions, and confirmed by virus isolation using standard culture or antigen detection by direct immunofluorescence. Anti-VZV immunoglobulins were administered to one subject (P5) at 18 months post-transplant following possible VZV exposure. Since 2007, VZV seropositive subjects (VZV<sup>+</sup>) were treated with famciclovir prophylaxis for the first year following UCBT (no treatment in children under 2 years of age; 125 mg twice a day in children aged 2-5 years; 250 mg twice a day in children aged 6-11; 500 mg twice a day in children aged >12). When zoster was detected after 12 months post-transplantation,

subjects were treated with intravenous acyclovir for 3 days (500 mg/m<sup>2</sup> 3 times per day), followed by 10 days treatment with famciclovir (250 mg 3 times per day in children weighing between 20 and 40 kg; 500 mg 3 times per day in children over 40 kg).

### **Immunophenotyping.**

Absolute CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte counts were determined by flow cytometry. Phenotypic analysis of CD8<sup>+</sup> T cells was performed using cryopreserved PBMC, while CD4<sup>+</sup> T cells were phenotyped from fresh whole blood. Except where mentioned, all antibodies were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA). The following monoclonal antibodies (mAbs) were used: PE- or APC- conjugated anti-CD8 (RPA-T8), PE-Cy7-conjugated anti-CCR7 (3D12), and FITC-conjugated anti-CD45RA (HI100) [40]; or APC-conjugated anti-CD4 (SK3), PE-conjugated anti-CD45RA (ALB11; Beckman Coulter, Indianapolis, IN) and FITC-conjugated anti-CD31 (PECAM-1, clone WM59) [41]. mAbs for cell-surface staining were added, and cells were incubated for 30 min at room temperature for CD8<sup>+</sup> T cells and 20 minutes on ice for CD4<sup>+</sup> T cells. Erythrocytes were then lysed using 10% v/v BD FACS Lysing Solution. Lymphocytes were gated according to forward and side scatter. Compensations were performed using single fluorochromes, and logical gates were set using fluorescence-minus-one (FMO) controls. Analysis was performed on a BD FACSCalibur flow cytometer (CD8<sup>+</sup> T cells) or on a BD FACSCanto II (CD4<sup>+</sup> T cells) using BD FACSDiva and FCS Express Version 3 software packages (DeNovo Software, Los Angeles, CA).

### **Enzyme-linked immunospot assay (ELISpot).**

Frozen PBMC were thawed in the presence of Benzonase Nuclease (Novagen, Madison, WI) and resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 20% v/v FBS and 50 µg/ml

gentamicin (Invitrogen). Cells were incubated overnight into flasks at a concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Assays were performed using 96-well Multiscreen IP plates (Millipore, Bedford, MA) coated overnight at 4°C with purified mouse anti-human IFN- $\gamma$  capture antibody (NIB42; BD Biosciences) diluted 10  $\mu$ g/ml in PBS (Invitrogen). Plates were blocked for 2 h at 37°C with RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS. PBMC were diluted at a final concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml in AIM-V medium (Invitrogen) supplemented with 2% v/v inactivated human serum (IHS; Wisent, St-Jean-Baptiste, QC, Canada). 100  $\mu$ l suspension was added to each well, combined with 100  $\mu$ l of VZV antigen (100,000 Gy irradiated Varivax III; 1,350 plaque forming units/ml; Merck Frosst, Kirkland, Canada) diluted 1/200 in AIM-V medium, or with 1  $\mu$ g of an equimolar mixture of 138 15-mer peptides synthesized based on the amino-acid sequence of CMV pp65 (Pepmix HCMVA pp65; JPT Peptide Technologies, Berlin, Germany) [42-44]. Anti-CD3 mAb (OKT3; Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) was used as positive control (0.5  $\mu$ g/ml), while cells incubated with AIM-V 2% IHS and 0.5% DMSO were used as a negative control. Plates were incubated for 22-24 hours and developed by the addition of 0.5  $\mu$ g/ml of biotinylated anti-IFN- $\gamma$  mAb (4S.B3; BD Biosciences) and alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (Bio-Rad, Hercules, CA). Plates were washed and incubated with BCIP/NBT-plus substrate solution (Bio-Rad). All negative controls and VZV assays were performed in duplicates. Spots were enumerated using CTL ImmunoSpot S4 UV Analyser (Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH). Negative control was subtracted and IFN- $\gamma$  production was expressed as number of spot-forming units (SFU) per  $10^6$  PBMC. Samples were considered positive if the number of spots was >50 SFU per  $10^6$  PBMC above background and 2 standard deviations above the negative control. A value of 400 SFU per well was used when spots were too numerous to be counted.

### **Statistical analysis.**

The Wilcoxon rank-sum test was used to test differences between continuous variables, whereas the Chi-square test was used for categorical measurements. Correlations were assessed using Spearman rank test and linear regression. Reconstitution of CMV- and VZV-specific cell-mediated immune responses was represented using the Kaplan-Meier method, and survival curves were compared using the logrank test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## **RESULTS**

### **Characteristics of study subjects.**

A total of 30 paediatric patients with haematological disorders were enrolled in this study, most of whom were diagnosed with malignant diseases (Table 4.1). Twenty six were transplanted with a single UCB unit, 2 with double UCB units, and 2 with unrelated BM. Eight subjects died during the 36 months follow-up (26.7%). Five subjects (16.7%) had detectable anti-CMV antibody titers (CMV-seropositive) and 19 (63.3%) had measurable anti-VZV antibody titers (VZV-seropositive) prior to transplantation (Supplemental Table 4.1 and 4.2). In all, 14 of 30 subjects (46.7%) developed at least one complication related to infection with herpesviruses during the first 100 days post-transplantation, including herpes simplex virus 1 (HSV-1; n = 4), Epstein-Barr virus (EBV; n = 4), CMV (n = 4), VZV (n = 2), human herpes virus 6 (HHV-6; n = 1), and human herpes virus 7 (HHV-7; n = 1). Two recurrences of zoster and 3 additional VZV reactivations occurred 1-2 years post-transplantation. Four subjects developed acute GvHD and 1 developed chronic GvHD. Nine subjects (30.0%) experienced leukemic relapse during the course of the study, of whom 7

died. Other causes of death included CMV-associated interstitial pneumonia (P7) and graft failure (P19).

### **Reconstitution of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subsets.**

As expected, absolute CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells counts were extremely low in the first 3 months post-transplantation. While CD4<sup>+</sup> T cells counts tripled between 2 and 3 months (median = 24 cells/mm<sup>3</sup> and median = 91 cells/mm<sup>3</sup> at 2 and 3 months post-transplantation, respectively), CD8<sup>+</sup> T cells counts remained stable (median = 20 cells/mm<sup>3</sup>). Median CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts remained below normal values at 6 months post-transplantation, although some subjects had already attained normal T lymphocytes counts by that time (Figure 4.1A) [45,46]. The vast majority of subjects recovered levels of T cells consistent with normal values by 12 months post-transplantation (median = 928 cells/mm<sup>3</sup> and median = 441 cells/mm<sup>3</sup> for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, respectively) (Figure 4.1A) [45,46].

The contribution of thymopoiesis to T cell reconstitution was then evaluated based on the frequency of naïve CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> [40] and CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> T cells [41] (Figure 4.1B and 4.1C). Frequencies of naïve CD8<sup>+</sup> T cells remained close to baseline in the first 3 months post-transplantation, did not increase between 2 and 3 months (median = 1.74%, 4.22%, and 4.44% at 1, 2, and 3 months post-transplantation, respectively), and then rose progressively between 6 and 18 months (median = 27.4%, 66.4%, 76.6%, and 72.8% at 6, 12, 18, and 24 months post-transplantation, respectively) (Figure 4.1B). Naïve CD4<sup>+</sup> T cells were barely detectable at 1 month post-transplantation (median = 0.40%), but their frequency increased slowly between 2 and 6 months (median = 1.30%, 3.20%, and 11.0% at 2, 3, and 6 months post-transplantation, respectively). Between 9 and 24 months post-

transplantation, roughly half of the CD4<sup>+</sup> T cell subset was comprised of naïve CD4<sup>+</sup> T cells (median = 44.0%, 52.0%, and 58.0% at 9, 12, and 24 months post-transplantation, respectively) (Figure 4.1C).

### **Reconstitution of CMV-specific cell-mediated immune responses.**

Five of 30 subjects (16.7%) were CMV-seropositive before transplantation and 4 of them (80%) developed CMV DNAemia (Supplemental Table 1). One subject (P7) died of CMV-associated interstitial pneumonia. Another (P12) developed an ophthalmic infection that was efficiently controlled, but later died of leukemic relapse. There was a strong association between CMV disease and CMV seropositivity ( $p < 0.0001$ , Chi-square test). IFN- $\gamma$  ELISpot using a pp65 peptide mixture as antigen was used to assess reconstitution of anti-CMV cell-mediated immunity in 25 of 30 subjects [10,42-44]. No responses were detected at 1 month post-UCBT, or in BMT recipients. From 2 to 36 months, CMV-specific immune reconstitution was steady and progressive, increasing from a mean of 29 SFU per 10<sup>6</sup> PBMC to 256 SFU per 10<sup>6</sup> PBMC at 2 and 36 months post-transplant (Figure 4.2A). IFN- $\gamma$  responses were heterogeneous, with high SFU values observed at all time points (Figure 4.2A). In Kaplan-Meier analysis, only 3.33% of study subjects had recovered significant anti-CMV immunity at 2 and 3 months post-transplantation. At 6 and 12 months post-transplantation, 10.8% and 15.0% of subjects produced detectable IFN- $\gamma$  in response to CMV. Finally, at 36 months post-transplantation (end of follow-up), 30.4% of subjects tested had developed anti-CMV cell-mediated immunity (Figure 4.2B). Of note, the 2 subjects who were BMT recipients were CMV-seronegative pre-transplant and did not recover CMV-specific IFN- $\gamma$  production during the follow-up period.

CMV DNAemia between 7,000 and 138,107 copies per ml plasma were detected in subjects P7, P9, P12 and P26, who were then treated with ganciclovir. Subject P7, who developed interstitial pneumonia, was withdrawn from the study at 2 months post-UCBT, when CMV DNAemia reached 90,000 copies per ml, and his anti-CMV IFN- $\gamma$  response was not assessed. However, the three other CMV-seropositive subjects (*i.e.* P9 and P12 and P26) exhibited strong IFN- $\gamma$  responses at all time points post-DNAemia (positive pp65 PCR) and did not develop clinical symptoms nor recurrent DNAemia following CMV-specific immune reconstitution (Figure 4.3A). The sole CMV-seropositive subject in whom CMV DNAemia was not detected (P11), was 5 months old at the time of serologic typing and did not reconstitute CMV-specific cell-mediated immunity in terms of IFN- $\gamma$  production (data not shown).

Overall, 4 cases (19.0%) of spontaneous reconstitution of CMV-specific IFN- $\gamma$  production were observed in 21 CMV-seronegative recipients with no concurrent or previously documented incidences of CMV DNAemia (Supplemental Table 4.1). Subject P21 developed a response of 426 SFU per  $10^6$  PBMC as early as 2 months post-transplant, a response that was considerably higher than the mean response observed at that particular time point (Figure 4.3B). CMV-specific T cell responses were confirmed by HLA-A2-pp65 tetramer staining in subjects P4, P5 and P21 (data not shown).

### **Association between thymopoiesis and reconstitution of CMV-specific cell-mediated immune responses.**

The impact of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell reconstitution on the reconstitution of CMV-specific cell-mediated immune responses was examined in UCBT recipients (Table 4.2). During the first

6 months post-transplantation, CMV-specific IFN- $\gamma$  production was associated with total CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell counts ( $p = 0.0483$ ,  $r = 0.2989$ , and  $p = 0.0272$ ,  $r = 0.3489$ , respectively, Spearman's rank correlation test). The frequency of naïve CD8<sup>+</sup> T cells was also positively associated with the magnitude of the CMV-specific response ( $p = 0.0086$ ,  $r = 0.4391$ , Spearman's rank correlation test) (Table 4.2). However, no associations were observed between levels of CMV DNAemia and the degree of immune reconstitution in terms of total and/or naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts (data not shown). These results suggest that both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells participate in the generation of IFN- $\gamma$  in response to stimulation with CMV-derived peptides in UCBT recipients, and that immune reconstitution (*i.e.* the emergence of naïve CD8<sup>+</sup> T cells) leads to stronger responses.

#### **Reconstitution of VZV-specific cell-mediated immune responses.**

Nineteen subjects (63.3%) exhibited a positive VZV serologic status prior to transplantation, including 10 subjects who were treated for 12 months with famciclovir prophylaxis (Supplemental Table 4.2). Five of 19 (26.3%) VZV-seropositive subjects developed zoster-associated clinical symptoms and one later died of leukemic relapse (P2). There was a higher risk of developing VZV disease in VZV-seropositive subjects ( $p = 0.0312$ , Chi-square test). However, no differences were observed in the incidence of VZV disease development whether or not recipients received famciclovir prophylaxis ( $p = 0.5000$ , Chi-square test). IFN- $\gamma$  ELISpot using irradiated Varivax III as antigen was used to assess reconstitution of anti-VZV T cell-mediated immunity in 26 study subjects. No VZV-specific IFN- $\gamma$  responses were detected at 1 and 2 months post-UCBT and post-BMT. Then, the reconstitution of VZV-specific cell-mediated immune responses was progressive, going from a mean of 11 SFU per  $10^6$  PBMC at 3 months post-transplantation to 243 SFU per  $10^6$  PBMC at 36 months. Similar



to CMV-specific immune reconstitution, heterogeneous SFU values were observed (Figure 4.4A). However, the magnitude of VZV-specific responses was comparatively smaller than that of CMV-specific responses ( $p = 0.0273$ ; Wilcoxon rank-sum test) (Figure 4.2A, 4.2C, 4.4A, 4.4C). In Kaplan-Meier analysis, 0.00% and 3.57% of subjects developed VZV-specific IFN- $\gamma$  responses above the detection threshold at 2 and 3 months post-transplantation, respectively. This proportion increased to 14.7% and 19.0% at 6 and 12 months post-transplantation. Finally, at 36 months post-transplantation, 40.3% of subjects tested had developed anti-VZV cell-mediated immunity in terms of IFN- $\gamma$  production (Figure 4.4B). This proportion was higher than that observed with CMV-specific responses (Figure 4.2B), but this difference was not statistically significant ( $p = 0.5477$ , logrank test). The two BMT recipients were VZV-seropositive, and one of them developed an anti-VZV response of 330 SFU per  $10^6$  PBMCs at 24 months post-BMT. In all, 8 of 19 (42.1%) VZV-seropositive subjects, including 5 who were under famciclovir prophylaxis and 4 who came down with zoster, developed a VZV-specific IFN- $\gamma$  response at any time post-transplantation (Figure 4.4A, Supplemental Table 4.2).

Subjects P2, P5 and P13 did not receive famciclovir prophylaxis and developed zoster at 1.5 months, 19 months, and 1 month post-transplantation, respectively. In the case of subject P2, zoster was chronic, with recurrences of symptoms at 6 and 18 months post-UCBT and no significant VZV-specific IFN- $\gamma$  responses (Figure 4.5A). At 20 months post-UCBT, subject P2 died following leukemic relapse. Subject P5, who received anti-VZV IgG and famciclovir at 18 months post-UCBT, developed a response of 400 SFU per  $10^6$  PBMC and no recurrence of clinical symptoms was reported (Figure 4.5A). He was vaccinated against VZV at 3 years post-UCBT. Subject P13 received famciclovir for a year after the first manifestation of

clinical symptoms of zoster. The disease reappeared at 18 months post-transplantation, at which time P13 was treated with famciclovir. However, clinical symptoms reappeared at 28 months post-UCBT. Subject P13 developed a VZV-specific IFN- $\gamma$  response of 208 SFU per  $10^6$  PBMC at 36 months, following which no further recurrences of zoster were reported (follow-up is now 60 months post-transplantation). Subjects P15 and P17 received famciclovir for one year post-UCBT and developed zoster after discontinuation of treatment at 21 and 13 months post-transplantation, respectively. Subject P15 was vaccinated against VZV at 30 months post-transplantation and developed a VZV-specific IFN- $\gamma$  response of 53 SFU per  $10^6$  PBMCs at 36 months post-transplantation. Subject P17 exhibited a VZV-specific IFN- $\gamma$  response of 150 SFU per  $10^6$  PBMC at 21 months post-transplantation, and, at 36 months post-UCBT, no further symptoms of VZV infection were reported. A total of 11 VZV-seropositive subjects did not develop any detectable IFN- $\gamma$  responses against VZV antigens, including 7 subjects who did not receive prophylactic treatment. There were no significant differences between subjects who received prophylaxis and those who did not with respect to the proportion of subjects with above-threshold levels of anti-VZV effectors at 12 months post-transplantation ( $n = 18$ ,  $p = 0.5000$ ; Chi-square test) or with respect to the frequency of cells that produced IFN- $\gamma$  ( $p = 0.5313$ , Wilcoxon rank-sum test).

Spontaneous reconstitution of VZV-specific cell-mediated immune responses (*i.e.* in the absence of clinical symptoms) occurred in 3 of 19 (15.8%) VZV-seropositive subjects (P11, P18 and P29), and in 1 of 7 VZV-seronegative subjects (P21, transplanted at 5 months of age) (Figure 4.5B). VZV-seropositive patients were more likely to reconstitute anti-VZV immunity than VZV-seronegative patients, although this difference did not reach statistical significance ( $p = 0.0509$ , Chi-square test) (Figure 4.5, Supplemental Table 4.2). A few cases

of subclinical VZV reactivations were confirmed by seroconversion to VZV between 12 and 36 months post-transplantation (Table 4.3). Finally, the five subjects who suffered from herpes zoster exhibited VZV-specific IFN- $\gamma$  responses of  $< 150$  SFU per  $10^6$  PBMC at the onset or recurrence of disease, whereas all subjects who reconstituted anti-VZV cell-mediated immunity above the detection threshold in absence of clinical symptoms developed responses  $\geq 150$  SFU per  $10^6$  PBMC ( $p = 0.0013$ ; Chi-square test) (Figure 4.5A and 4.5B).

### **Association between reconstitution of VZV-specific cell-mediated immune responses and thymopoiesis.**

The impact of reconstitution of the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets on VZV-specific cell-mediated immune responses was examined in UCBT and BMT recipients from our study group (Table 4.2). During the first 6 months post-transplantation, VZV-specific IFN- $\gamma$  SFU numbers were significantly associated with absolute CD4<sup>+</sup> T cell counts ( $p = 0.0413$ ,  $r = 0.3337$ , Spearman's rank correlation test). In addition, the magnitude of the VZV-specific response in terms of numbers of IFN- $\gamma$ -producing cells was positively correlated with the frequency of naïve (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> T cells ( $p = 0.0108$ ,  $r = 0.4482$ , Spearman's rank correlation test). These results suggest that both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets are implicated in IFN- $\gamma$  production and that the re-emergence of naïve CD8<sup>+</sup> T cells through thymopoiesis leads to more robust VZV-specific cell-mediated immune responses in terms of IFN- $\gamma$  production.

## DISCUSSION

By better defining and contrasting the kinetics of reconstitution of CMV-specific and VZV-specific T cell-mediated immune responses following UCBT or BMT, the first objective of the present study was to determine whether manifestations of CMV- or VZV-associated complications were required for reconstitution of virus-specific cell-mediated immune responses. To do this, we examined the progressive recovery of CMV- and VZV-specific T lymphocytes over a post-transplantation period of 3 years in 28 UCBT and 2 BMT recipients. In agreement with other studies (reviewed in ref. 5), the first 3-6 months post-transplantation were characterized by low CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts, as well as low frequencies of naïve T cells. This slow recovery also mirrored the reconstitution of the CMV- and VZV-specific T cell repertoires. This is consistent with the high risk of developing opportunistic viral infections in the first 100 days post-transplantation [5], and with the high frequency of exhausted T cells that express programmed-death 1 during this period [47]. The associations that were observed between levels of CMV- and VZV-specific T cells, total CD4<sup>+</sup> T cell counts, and naïve CD8<sup>+</sup> T cell frequencies during the early post-transplantation period strongly suggest that both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells participate in the genesis of IFN- $\gamma$  responses against these viruses, and that thymopoiesis also significantly contributes to the regeneration of the antiviral T cell repertoire. These results are in accordance with a recent study by Brown *et al.*, who suggested that *de novo* production of T cells through thymopoiesis (in opposition to UCB-derived T cells expansion) was required for the development of strong and protective responses [26]. The intermediate to late (6-36 months) post-transplant period was characterized by a progressive increase in levels of T lymphocytes, both naïve and total. At 1 year post-UCBT, CMV- and VZV-specific cell-mediated immune responses in terms of IFN- $\gamma$  production were detectable in only 15.0% and 19.0% of subjects, respectively. This proportion rose to 25.0% and 34.9% of subjects at

2 years post-transplantation, and to 30.4% and 40.3% at 3 years. Kaplan-Meier analysis revealed that the respective kinetics of reconstitution of responses against these two pathogens were not significantly different. This is in spite of the reported differences in timing of CMV-associated (early) *versus* VZV-associated (late) infectious complications relative to the time of transplant [5,7,9-11,28]. In addition, spontaneous reconstitution of CMV- and VZV-specific T cell responses (*i.e.* in absence of clinical symptoms or episodes of DNAemia) was observed in both seropositive and seronegative subjects, though less frequently in the latter. Indeed, four CMV-seronegative subjects developed IFN- $\gamma$  responses against the virus, and three VZV-seropositive and one VZV-seronegative subjects developed a VZV-specific IFN- $\gamma$  response without showing clinical signs of infection. The development of anti-CMV responses in the absence of detectable viral replication was confirmed by staining with MHC-peptide tetramers, while possible subclinical VZV reactivation was suggested by detection of VZV-specific IgG at 12-36 months following UCBT in a single case (P29). Reports have shown that CMV infection (detected with DNAemia or symptomatic episodes) occurred in CMV seronegative patients receiving seronegative grafts, with incidences ranging from 1.2 to 12% in the first 3 months post-transplantation [6,9,19,51]. This is why CMV surveillance is strongly advised for CMV seronegative recipients. However, to our knowledge, antiviral immune reconstitution has never been assessed in this category of patients. Reconstitution of T cell-mediated IFN- $\gamma$  responses directed against VZV in the absence of clinical symptoms of VZV infection is in contradiction with a recent report on recipients of T cell-depleted BM [38], but is in agreement with several other studies. Consistent with our results, Malavige *et al.* showed that VZV-specific T cell responses were detectable in patients with malignancies without clinical signs of VZV reactivation, but appeared weaker or impaired in subjects with detectable VZV viremia [48]. Others have

shown that VZV-specific T lymphocyte proliferation was detectable in BMT recipients irrespective of whether or not they developed symptomatic recurrences of VZV [49], and that subclinical VZV viremia, which may occur without a replication phase in the skin when virions are trapped by mononuclear cells at the neuronal site of reactivation, can be controlled by T cell-mediated immune responses [50]. Taken together, results reported herein indicate that clinical or virological manifestations of CMV and/or VZV infection are not a strict requirement for the reconstitution of cell-mediated immune responses directed against these viruses in paediatric recipients of BMT or UCBT.

The second objective of the present study was to determine whether the T cell-mediated immune responses that were directed against CMV or VZV antigens were capable of protecting graft recipients against infectious complications associated with these two viruses. Four UCBT recipients experienced CMV DNAemia, including 2 cases of symptomatic reactivation. In all instances, CMV DNAemia occurred in the first 6 months post-UCBT. In three subjects, IFN- $\gamma$  ELISpot assays performed after the DNAemia episode showed the presence of anti-CMV T cell responses in terms of IFN- $\gamma$  production. No CMV-related events were observed in study subjects as a whole following the development of CMV-specific responses  $>150$  SFU per  $10^6$  PBMC. This suggests that these responses were associated with protection from CMV-associated complications in UCBT recipients. Five of 30 subjects developed herpes zoster during the course of the study. The time window during which initial VZV reactivation was observed was wider than that of CMV, extending out from 1 month (P13) to 20 months (P15) post-transplantation. One subject (P2) never developed IFN- $\gamma$  responses above the detection threshold and experienced several recurrences of zoster between treatments. Another subject (P13) experienced zoster despite the presence

of VZV-specific responses at levels above the detection threshold. However, attainment of IFN- $\gamma$  responses  $\geq 150$  SFU per  $10^6$  PBMC was associated with absence of further recurrences of herpes zoster, consistent with T cell-mediated antiviral protection. This frequency of VZV-specific T cells was also observed in VZV-seronegative subjects who were not vaccinated against VZV and who did not develop zoster, suggesting that UCBT recipients can recover potentially protective VZV-specific T cell responses in the absence of VZV infection or reactivation. We also observed that some patients did not show detectable levels of anti-VZV and anti-CMV immunity in terms of frequency of IFN- $\gamma$ -producing T cells, but did not develop viremia or clinical signs of viral replication. The study of other functional properties of CMV- and VZV-specific T cells in this context (*i.e.* production of perforin and granzyme B) could provide a more precise picture of the antiviral immune response. Moreover, innate immune responses mediated by natural killer (NK) cells may be sufficient to keep latent CMV and VZV under control in some cases [52,53].

Our third and last objective was to examine whether antiherpetic prophylaxis influenced the development of VZV-specific cell-mediated immune responses. In the present study, 4 of 7 (57.1%) VZV-seropositive subjects who exhibited above-threshold frequencies of IFN- $\gamma$ -producing T cells following *in vitro* stimulation with VZV antigens had been treated with prophylactic famciclovir. In two of these subjects (P15, P17), zoster developed but only after interruption of prophylaxis. Levels  $> 150$  SFU per  $10^6$  PBMC were only attained in one of the 4 subjects (P18; 170 SFU per  $10^6$  PBMC) during the course of prophylaxis. Thus, famciclovir prophylaxis did not succeed in preventing the development of herpes zoster but only delayed the onset of the disease. Whether this delay reduces VZV-associated morbidity and mortality in UCBT and BMT recipients will require further investigation. In addition,

famciclovir prophylaxis did not strictly prevent the reconstitution of the VZV-specific T cell repertoire, as the frequency of T cells producing IFN- $\gamma$  in response to VZV antigens reached levels consistent with protection in one non-zoster subject. Evidently, further studies involving larger numbers of subjects will be needed to confirm that prophylaxis does not affect the reconstitution, frequency and/or functional properties of VZV-specific T cells. In the meantime, in view of the results obtained in the present study, the best strategy may be to administer 12 months of famciclovir prophylaxis to prevent VZV infection/reactivation during the time required for immune reconstitution, and then vaccinate following discontinuation, but only if CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts are within normal range [45] and levels of VZV-specific T cells have reached 150 SFU per 10<sup>6</sup> PBMC or above.

In summary, the present study documented for the first time the reconstitution of CMV- and VZV-specific T cell-mediated immune responses in UCBT recipients over a period of 3 years. The pattern of anti-herpetic immune reconstitution shows that the development of antiviral responses is rapid and efficient in some subjects, reaching a magnitude observed in adult controls as early as 2-3 months post-UCBT. However, antiviral reconstitution is slow in the majority of UCBT recipients. The reason for these differences between subjects is largely unknown. It may be influenced by age, thymic function, genetic predisposition, immunosuppressive drugs and/or exposure to cognate viral antigens [34]. Interestingly, our results revealed that reconstitution of CMV- and VZV-specific T cell responses also took place in subjects who did not develop CMV or VZV disease, and even in some pre-transplant seronegative subjects. Reconstitution appeared to be protective as it was associated with absence of subsequent viral replication and clinical symptoms, both in the case of CMV and VZV.



Immunological monitoring using IFN- $\gamma$  ELISpot is a powerful tool to assess antiviral immune reconstitution in HSCT recipients and could provide guidance for clinical management of transplant recipients. The heterogeneity in CMV-specific and VZV-specific T cell responses suggests that immunological follow-up of transplant patients will be indispensable for the adjustment of immunosuppressive and antiviral therapy as a function of antiviral immune reconstitution. Although larger studies will be needed to rigorously define threshold values, the development of antiviral T cell response  $\geq 150$  SFU/ $10^6$  PBMC was associated with absence of subsequent clinical complications related to CMV or VZV in study subjects. Broadening of the functional properties of T cells that are examined may improve the assessment of actual antiviral protection.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank Dr. Réjean Lapointe and members of his team for use of their automated ELISpot analyzer. Supported by grants from le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), Héma-Québec, and la Fondation Centre de cancérologie Charles-Bruneau (C.A., P.O., F.L.D., M.D., H.S.). N.M. was the recipient of scholarships from the Cole Foundation, la Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine, and FRSQ. I.S.F. was a recipient of a scholarship from la Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine. A.J.G. was the recipient of a master's scholarship from FRSQ. E.C. was a recipient of scholarships from the Cole Foundation and la Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine. The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, et al. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1996;88:795-802.
2. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood*. 2001;97:2962-2971.
3. Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, et al. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood*. 2000;96:2703-2711.
4. Barker JN, Hough RE, van Burik JA, et al. Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:362-370.
5. Merindol N, Charrier E, Duval M, et al. Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation. *J Leukoc Biol*. 2011;90:49-60.
6. Beck JC, Wagner JE, DeFor TE, et al. Impact of cytomegalovirus (CMV) reactivation after umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:215-222.
7. Vandenbosch K, Ovetchkine P, Champagne MA, et al. Varicella-zoster virus disease is more frequent after cord blood than after bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14:867-871.
8. Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am*. 2010;24:319-337.

9. Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, et al. Impact of cytomegalovirus serostatus on outcome of unrelated cord blood transplantation for adults: a single-institute experience in Japan. *Eur J Haematol.* 2008;80:251-257.
10. Takami A, Mochizuki K, Asakura H, et al. High incidence of cytomegalovirus reactivation in adult recipients of an unrelated cord blood transplant. *Haematologica.* 2005;90:1290-1292.
11. Uchida N, Wake A, Takagi S, et al. Umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning for elderly patients with hematologic diseases. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14:583-590.
12. Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, et al. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood.* 1996;88:4063-4071.
13. Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, et al. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med.* 1993;118:173-178.
14. Salzberger B, Bowden RA, Hackman RC, et al. Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: risk factors and outcome. *Blood.* 1997;90:2502-2508.
15. Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, et al. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003;9:543-558.
16. Matsumura T, Narimatsu H, Kami M, et al. Cytomegalovirus infections following umbilical cord blood transplantation using reduced intensity conditioning regimens for adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:577-583.

17. Hebart H, Einsele H. Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum Immunol.* 2004;65:432-436.
18. Boeckh M, Nichols WG. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood.* 2004;103:2003-2008.
19. Walker CM, van Burik JA, De For TE, et al. Cytomegalovirus infection after allogeneic transplantation: comparison of cord blood with peripheral blood and marrow graft sources. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:1106-1115.
20. Zaia JA. Prevention of cytomegalovirus disease in hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2002;35:999-1004.
21. Gratama JW, Boeckh M, Nakamura R, et al. Immune monitoring with iTAg MHC Tetramers for prediction of recurrent or persistent cytomegalovirus infection or disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a prospective multicenter study. *Blood.* 2010;116:1655-1662.
22. Pastore D, Delia M, Mestice A, et al. Recovery of CMV-specific CD8(+) T cells and Tregs after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17:550-557.
23. Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN $\gamma$  CD8 $^{+}$  and CD4 $^{+}$  T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:543-549.
24. Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN $\gamma$  CD8(+) and CD4(+) T-cell responses affording protection from CMV DNAemia

following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2011 [Epub ahead of print].

25. Barron MA, Gao D, Springer KL, et al. Relationship of reconstituted adaptive and innate cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses with CMV viremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2009;49:1777-1783.
26. Brown JA, Stevenson K, Kim HT, et al. Clearance of CMV viremia and survival after double umbilical cord blood transplantation in adults depends on reconstitution of thymopoiesis. *Blood*. 2010;115:4111-4119.
27. Feldman S, Hughes WT, Daniel CB. Varicella in children with cancer: Seventy-seven cases. *Pediatrics*. 1975;56:388-397.
28. Arvin AM. Varicella-Zoster virus: pathogenesis, immunity, and clinical management in hematopoietic cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2000;6:219-230.
29. Wiegering V, Schick J, Beer M, et al. Varicella-zoster virus infections in immunocompromised patients - a single centre 6-years analysis. *BMC Pediatr*. 2011;11:31.
30. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15:1143-1238.
31. Burke BL, Steele RW, Beard OW, et al. Immune responses to varicella-zoster in the aged. *Arch Intern Med*. 1982;142:291-293.
32. Levin MJ, Smith JG, Kaufhold RM, et al. Decline in varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity with increasing age and boosting with a high-dose VZV vaccine. *J Infect Dis*. 2003;188:1336-1344.

33. Jones L, Black AP, Malavige GN, et al. Phenotypic analysis of human CD4<sup>+</sup> T cells specific for immediate-early 63 protein of varicella-zoster virus. *Eur J Immunol.* 2007;37:3393-3403.
34. Quinnan GV, Kirmani N, Rook AH, et al. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med.* 1982;307:7-13.
35. Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, et al. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood.* 1991;78:1373-1380.
36. Ljungman P, Wilczek H, Gahrton G, et al. Long-term acyclovir prophylaxis in bone marrow transplant recipients and lymphocyte proliferation responses to herpes virus antigens in vitro. *Bone Marrow Transplant.* 1986;1:185-192.
37. Selby PJ, Powles RL, Easton D, et al. The prophylactic role of intravenous and long-term oral acyclovir after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Cancer.* 1989;59:434-438.
38. Distler E, Schnurer E, Wagner E, et al. Recovery of varicella-zoster virus-specific T cell immunity after T cell-depleted allogeneic transplantation requires symptomatic virus reactivation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14:1417-1424.
39. Renoult E, Clermont MJ, Phan V, et al. 2008. Prevention of CMV disease in pediatric kidney transplant recipients: evaluation of pp67 NASBA-based pre-emptive ganciclovir therapy combined with CMV hyperimmune globulin prophylaxis in high-risk patients. *Pediatr Transplant.* 2008;12:420-425.

40. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, et al. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*. 2008;73:975-983.
41. Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, et al. 2002. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med*. 2002;195:789-794.
42. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, et al. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther*. 2003;98:269-297.
43. Kondo E, Akatsuka Y, Kuzushima K, et al. 2004. Identification of novel CTL epitopes of CMV-pp65 presented by a variety of HLA alleles. *Blood*. 2004;103:630-638.
44. Kern F, Faulhaber N, Frommel C, et al. 2000. Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol*. 2000;30:1676-1682.
45. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:973-980.
46. Renard C, Barlogis V, Mialou V, et al. Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children. *Br J Haematol*. 2011;152:322-330.
47. Merindol N, Champagne MA, Duval M, et al. CD8<sup>+</sup> T cell reconstitution in recipients of umbilical cord blood transplant and characteristics associated with leukemic relapse. *Blood*. 2011;118:4480-4488.
48. Malavige GN, Rohanachandra LT, Jones L, et al. IE63-specific T-cell responses associate with control of subclinical varicella zoster virus reactivation in individuals with malignancies. *Br J Cancer*. 2010;102:727-730.

49. Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Cell-mediated immunity to varicella-zoster virus after allogeneic marrow transplant. *J Infect Dis.* 1980;141:479-487.
50. Wilson A, Sharp M, Koropchak CM, et al. Subclinical varicella-zoster virus viremia, herpes zoster, and T lymphocyte immunity to varicella-zoster viral antigens after bone marrow transplantation. *J Infect Dis.* 1992;165:119-126.
51. Montesinos, P., J. Sanz, S. Cantero, I. Lorenzo, G. Martin, S. Saavedra, J. Palau, M. Romero, A. Montava, L. Senent, J. Martinez, I. Jarque, M. Salavert, J. Cordoba, L. Gomez, S. Weiss, F. Moscardo, J. de la Rubia, L. Larrea, M. A. Sanz, and G. F. Sanz. 2009. Incidence, risk factors, and outcome of cytomegalovirus infection and disease in patients receiving prophylaxis with oral valganciclovir or intravenous ganciclovir after umbilical cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 15: 730-740.
52. Kuijpers, T. W., P. A. Baars, C. Dantin, M. van den Burg, R. A. van Lier, and E. Roosnek. 2008. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood.* 112:914-915.
53. Iversen A. C., P. S. Norris, C. F. Ware, and C. A. Benedict. 2005. Human NK cells inhibit cytomegalovirus replication through a noncytolytic mechanism involving lymphotoxin-dependent induction of IFN-beta. *J Immunol.* 175:7568-7574.



**Table 4.1. Clinical characteristics of study subjects.**

		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Patient reference ID number</b>
<b>Gender</b>	XX	12	40.0	1,5,7,8,11,12,20,21,22,23,25,29
	XY	18	60.0	2,3,4,6,9,10,13,14,15,16,17,18,19,24,26,
<b>Hematologic malignancy</b>	ALL	13	43.3	1, 3, 8, 10, 13, 14, 15, 17, 18, 23, 27,
	MDS	8	26.7	5, 6, 7, 9, 12, 21, 22, 24
<b>Others</b>	AML	4	13.3	2, 4, 20, 25
	FHLH	1	3.3	11
	Farber disease	1	3.3	16
	Hurler syndrome	1	3.3	19
	SIAA	1	3.3	28
	WAS	1	3.3	26
<b>Source</b>	1 UCB unit	26	86.7	All but 19, 24, 28, 29
	2 UCB units	2	6.7	19, 24
	BM	2	6.7	28, 29
<b>HLA disparity</b>	0	10	33.3	1, 4, 5, 6, 12, 14, 23, 25, 28, 29
	1	11	33.3	2, 3, 8, 10, 11, 16, 19, 20, 21, 27,30
	2	9	30.0	7, 9, 13, 15, 17, 18, 22, 24, 26
<b>Prophylaxis</b>	1 yr famciclovir	10	33.3	14,15,17,18,20,22,23,25,27,29
<b>Outcome</b>	Death	9	30.0	1, 2, 7, 8, 12, 14, 19, 23,30
	CMV DNAemia	4	13.3	7, 9, 12, 26
	Zoster (VZV)	5	16.7	2, 5, 13, 15, 17
	Other herpetic	11	36.7	9, 10, 11, 12, 13, 15, 21, 25, 27, 28, 29
	Relapse	9	30.0	1, 2, 8, 12, 14, 20, 22, 23,30
	Acute GvHD	4	13.3	17, 18, 22, 24
	Chronic GvHD	1	3.3	21
	Graft failure	3	10.0	1, 6, 19

ALL: acute lymphoblastic leukemia; MDS: myelodysplastic syndrome; AML: acute myeloid leukemia; FHLH: familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; SIAA: severe idiopathic aplastic anemia; WAS: Wiskott-Aldrich syndrome; UCB: umbilical cord blood; BM: bone marrow; yr: year; CMV: cytomegalovirus; VZV: varicella-zoster virus; GvHD: graft-versus-host disease.

**Table 4.2. Association between CMV- or VZV-specific IFN- $\gamma$  production, absolute CD3+, CD4+, and CD8+ T cell counts, and frequencies of naïve CD8+ and CD4+ T cells during the first 6 months post-transplantation.**

	<b>Absolute CD3+</b>	<b>Absolute CD4+</b>	<b>Absolute CD8+</b>	<b>Naïve CD4+</b>	<b>Naïve CD8+</b>
<b>CMV</b>	p = 0.0483	p = 0.0272	p = 0.0754	p = 0.3168	p = 0.0086
	r = 0.2989	r = 0.3489			r = 0.4391
<b>VZV</b>	p = 0.0815	p = 0.0413	p = 0.0700	p = 0.2601	p = 0.0108
		r = 0.3337			r = 0.4482

Frequencies of cells producing IFN- $\gamma$  in response to CMV or VZV antigens were determined using IFN- $\gamma$  ELISpot, as described under Materials and Methods. Absolute counts and frequencies were measured by flow cytometry. Statistical significance was tested using Spearman's correlation test. p values < 0.05 were considered statistically significant. CMV: cytomegalovirus; VZV: varicella-zoster virus; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; ELISpot: enzyme-linked immunospot assay.

**Table 4.3. Comparison between VZV-specific IFN- $\gamma$  and antibody production.**

	<b>Positive IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Positive IgG</b>
<b>P13*</b>	12-36 months	12-36 months
<b>P15*</b>	36 months	24-36 months
<b>P16</b>	negative	negative
<b>P17*</b>	6-36 months	12-36 months
<b>P18</b>	3-18 months	negative
<b>P26</b>	Negative	negative
<b>P27</b>	negative	21-36 months
<b>P29</b>	24 months	12-24 months

Frequencies of cells producing IFN- $\gamma$  in response to VZV antigens were determined using IFN- $\gamma$  ELISpot, and antibody responses were measured by ELISA, as described under Materials and Methods. ELISpot positivity was defined as >50 SFU per  $10^6$  PBMC. \*denotes subjects who developed zoster during the post-transplant period. VZV: varicella-zoster virus; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; ELISpot: enzyme-linked immunospot assay; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; IgG: immunoglobulin G; SFU: spot-forming units; PBMC: peripheral blood mononuclear cells

## FIGURE LEGENDS

**Figure 4.1. CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes reconstitution** A. Absolute counts of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells over the post-transplant period were measured by flow cytometry as described under Materials and Methods. Normal values (hatched lines) were set at 500 cells per mm<sup>3</sup> for CD4<sup>+</sup> T cells and 250 cells per mm<sup>3</sup> for CD8<sup>+</sup> T cells [45]. B. The frequency of naïve CD4<sup>+</sup> T cells (CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup>) [41] over the post-transplant period was determined by flow cytometry. C. The frequency of naïve CD8<sup>+</sup> T cells (CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>) [40] over the post-transplant period was determined by flow cytometry.

**Figure 4.2. Reconstitution of CMV-specific T cells over the post-transplant period.** A. Frequencies of cells producing IFN- $\gamma$  in response to CMV antigens were measured using IFN- $\gamma$  ELISpot, as described under Materials and Methods. Data are expressed as SFU per 10<sup>6</sup> PBMC. ELISpot positivity was defined as >50 SFU per 10<sup>6</sup> PBMC. Error bars represent median and interquartile range. B. Kaplan-Meier analysis of the frequencies of study subject exhibiting detectable CMV-specific T cell responses in terms of IFN- $\gamma$  production. ELISpot positivity was defined as >50 SFU per 10<sup>6</sup> PBMC. C. Representative ELISpot wells. CMV: cytomegalovirus; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; ELISpot: enzyme-linked immunospot assay; SFU: spot-forming units; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; DMSO: dimethylsulfoxide.

**Figure 4.3. Reconstitution of CMV-specific T cell responses in recipient of umbilical cord blood transplantation.** A. Reconstitution of total CD3<sup>+</sup> T cells and CMV-specific T cell responses in terms of IFN- $\gamma$  production in 3 subjects with pre-transplantation CMV seropositivity and B. in 5 subjects who were pre-transplant CMV-seronegative. CD3<sup>+</sup> T cell

counts (open triangles) were measured by flow cytometry and frequencies of cells producing IFN- $\gamma$  in response to CMV antigens (open squares) were measured using IFN- $\gamma$  ELISpot and expressed as SFU per  $10^6$  PBMC, as described under Materials and Methods. Dashed horizontal arrows represent periods of time during which subjects were treated with ganciclovir. Solid vertical arrows indicate episodes of positive CMV DNAemia, as tested using real-time PCR. CMV: cytomegalovirus; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; ELISpot: enzyme-linked immunospot assay; SFU: spot-forming units; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; PCR: polymerase chain reaction.

**Figure 4.4. Reconstitution of VZV-specific T cells over the post-transplant period.** A. Frequencies of cells producing IFN- $\gamma$  in response to VZV antigens were measured using IFN- $\gamma$  ELISpot, as described under Materials and Methods. Data are expressed as SFU per  $10^6$  PBMC. ELISpot positivity was defined as  $>50$  SFU per  $10^6$  PBMC. Error bars represent median and interquartile range. B. Kaplan-Meier analysis of the frequencies of study subject exhibiting detectable VZV-specific T cell responses in terms of IFN- $\gamma$  production. ELISpot positivity was defined as  $>50$  SFU per  $10^6$  PBMC. C. Representative ELISpot wells. VZV: varicella-zoster virus; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; ELISpot: enzyme-linked immunospot assay; SFU: spot-forming units; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; DMSO: dimethylsulfoxide.

**Figure 4.5. Reconstitution of VZV-specific T cell responses in recipient of umbilical cord blood transplantation.** A. Reconstitution of total CD3<sup>+</sup> T cells and VZV-specific T cell responses in terms of IFN- $\gamma$  production in 5 subjects who experienced herpes zoster during the post-transplantation period and B. in 5 subjects who did not. CD3<sup>+</sup> T cell counts (open triangles) were measured by flow cytometry and frequencies of cells producing IFN- $\gamma$  in

response to CMV antigens (open squares) were measured using IFN- $\gamma$  ELISpot and expressed as SFU per 10<sup>6</sup> PBMC, as described under Materials and Methods. Solid horizontal arrows represent periods of time during which subjects were treated with famciclovir prophylaxis. Solid vertical arrows indicate episodes of herpes zoster. VZV: varicella-zoster virus; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; ELISpot: enzyme-linked immunospot assay; SFU: spot-forming units; PBMC: peripheral blood mononuclear cells.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

**Supplemental Table 4.1. CMV-specific cell-mediated immune responses, DNAemia and serological status in study subjects.**

CMV serological status	CMV DNAemia		CMV ELISpot positivity (positive/tested)
CMV IgG <sup>+</sup>	+	n = 4	3/3
	-	n = 1	0/1
CMV IgG <sup>-</sup>	+	n=0	nd
	-	n = 25	4/21

CMV serological status, DNAemia and ELISpot positivity were tested as described under Materials and methods. CMV: cytomegalovirus; IgG: immunoglobulin G; ELISpot: enzyme-linked immunospot assay. nd: not determined.

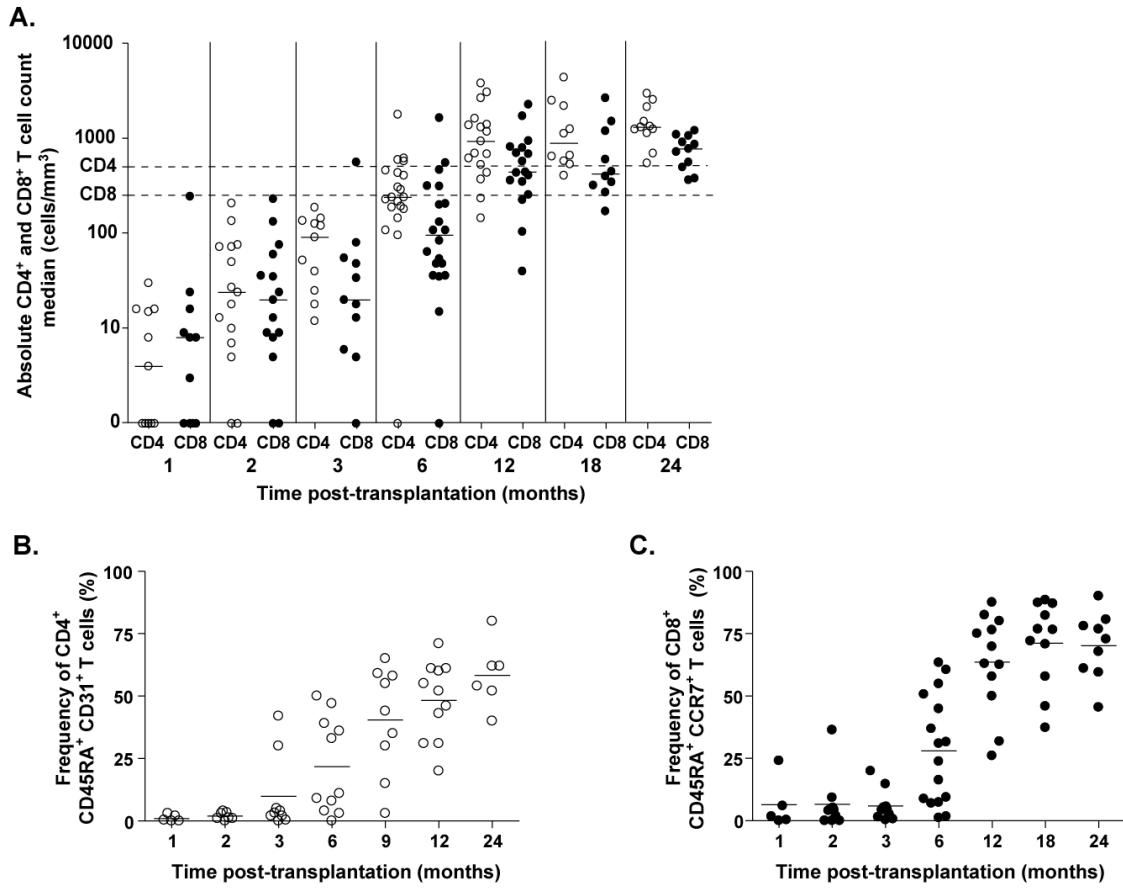
**Supplemental Table 4.2. VZV-specific cell-mediated immune responses, incidence of zoster, prophylaxis, and serological status in study subjects.**

<b>VZV serological status</b>	<b>Incidence of herpes zoster</b>		<b>VZV ELISpot positivity (positive/tested)</b>	<b>Famciclovir prophylaxis (treated/ELISpot+)</b>
VZV IgG <sup>+</sup>	Yes	n = 5	4/5	2/4
	No	n = 14	3/13	2/3
VZV IgG <sup>-</sup>	Yes	n = 0	nd	nd
	No	n = 11	1/7	0/1

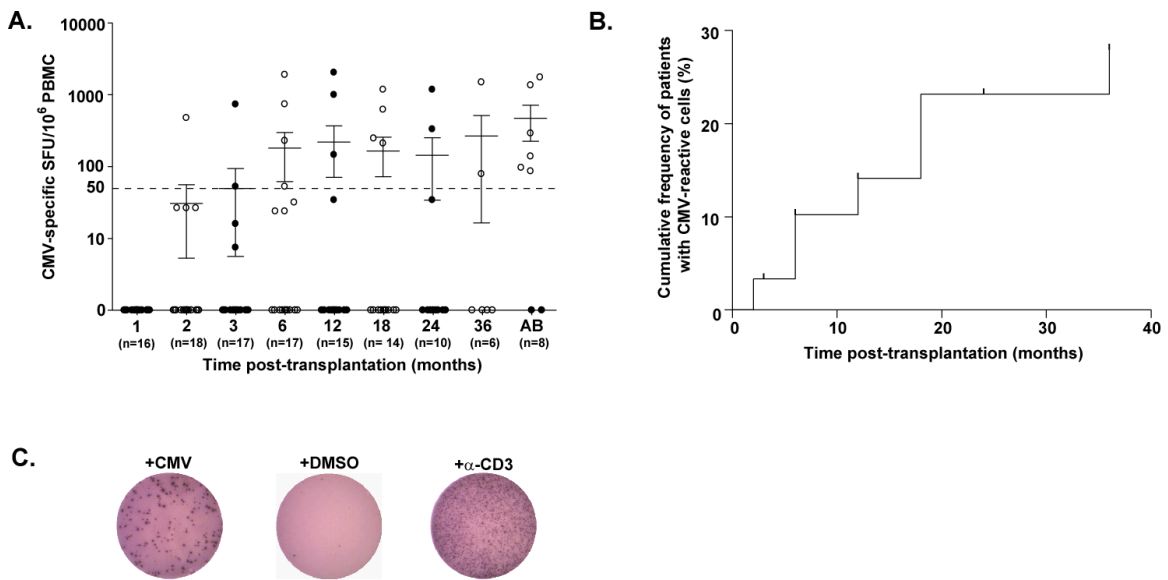
VZV serological status and ELISpot positivity were tested as described under Materials and methods. VZV: varicella-zoster virus; IgG: immunoglobulin G; ELISpot: enzyme-linked immunospot assay. nd: not determined.

**Figure 4.1**

Merindol *et al.* Figure 1



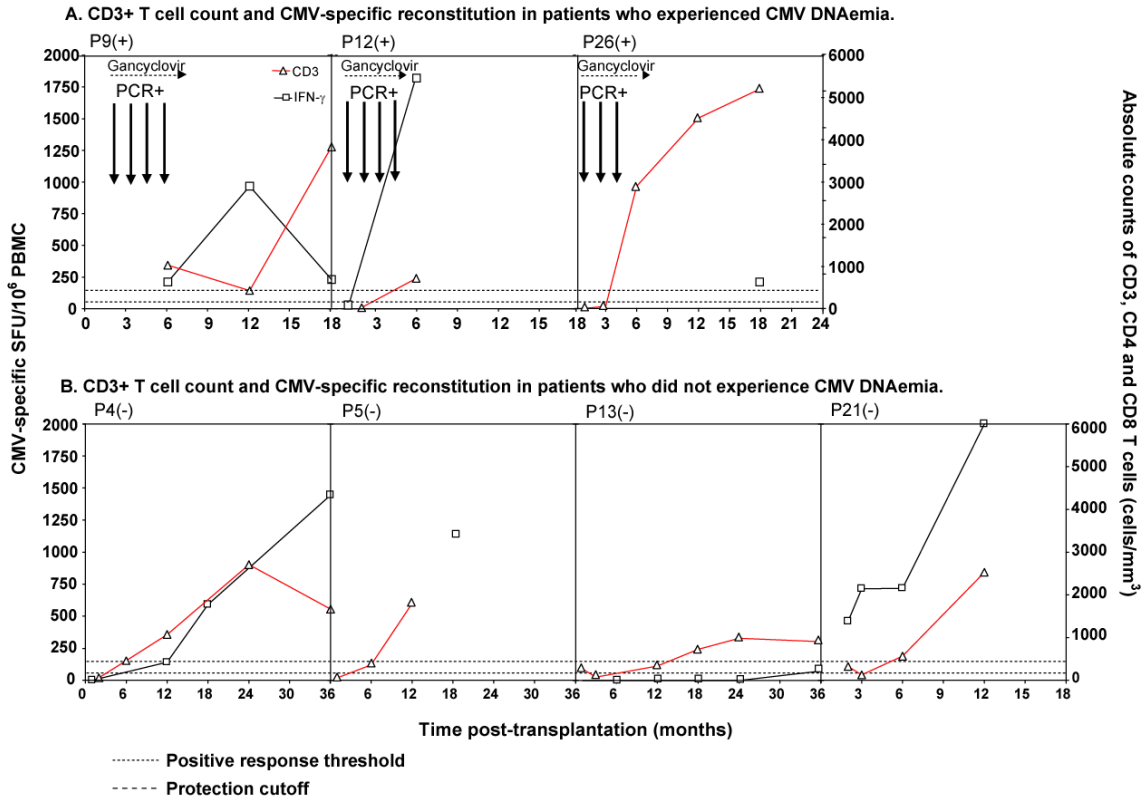
**Figure 4.2**





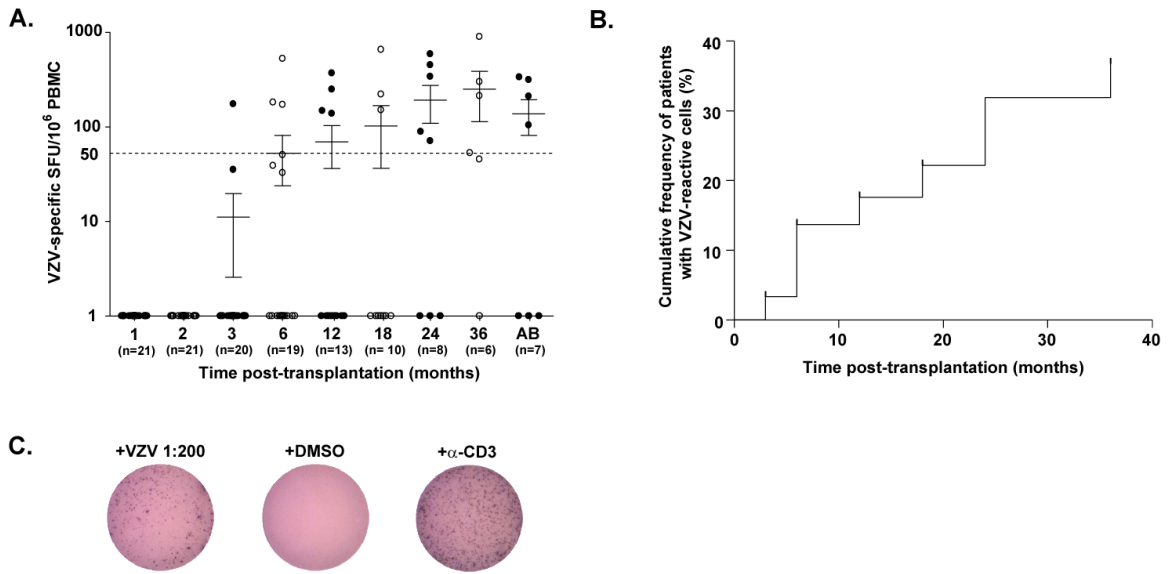
**Figure 4.3**

Merindol *et al.* Figure 3



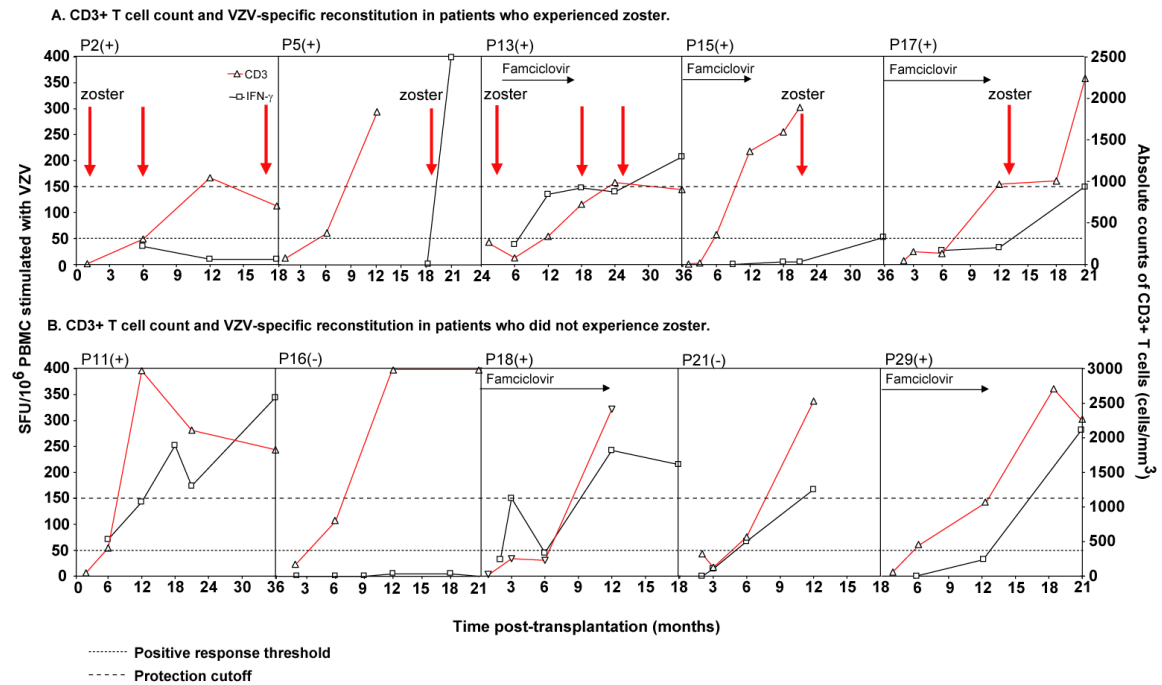
**Figure 4.4**

Merindol *et al.* Figure 4



**Figure 4.5**

Merindol *et al.* Figure 5



## **Chapitre 5 : Discussion**

## I- L'EXPANSION DES LYMPHOCYTES T DU SCO

### I. 1. DES CARACTÉRISTIQUES FONCTIONNELLES PARTICULIÈRES

Souvent protecteurs et parfois nuisibles, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont acteurs de toutes les complications survenant après une TSCO. Il est essentiel de mieux comprendre leur développement et leur fonctionnalité pour améliorer la survie des enfants transplantés. Au cours de ce travail, le potentiel des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> issus du SCO a d'abord été mis en évidence *in vitro*; ensuite, nous avons mesuré leur progression et l'évolution de leur diversité chez les receveurs de TSCO; finalement, nous avons évalué la cinétique de la reconstitution fonctionnelle des réponses antivirales.

En utilisant le répertoire de lymphocytes T spécifiques au tétramère HLA-A2:Melan-A<sub>26-35</sub>A27L, nous avons démontré que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> issus des SCO HLA-A2<sup>+</sup> et HLA-A2<sup>-</sup> prolifèrent, s'oligoclonalisent, se différencient en populations effectrices et déclenchent des réponses cytolytiques après la stimulation antigénique. Des différences importantes avec leurs homologues provenant du sang périphérique d'adultes ont été observées et ces différences étaient exacerbées dans un modèle de reconnaissance en disparité HLA. En comparaison aux lymphocytes T issus du SA, les lymphocytes T A2/Melan-A<sup>+</sup> du SCO se différencient en une plus grande proportion d'effecteurs terminaux, leur production d'IFN- $\gamma$  est plus faible et la fréquence de lymphocytes T bifonctionnels (IFN- $\gamma$  et activité cytolytique) est inférieure suite à stimulation mitogénique (Merindol et al., 2010).

Des caractéristiques semblables sont retrouvées chez les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> totaux et A2/Melan-A<sup>+</sup> issus du SCO et transférés chez des receveurs pédiatriques. Dans le premier mois qui suit la TSCO, les lymphocytes T A2/Melan-A<sup>+</sup> prolifèrent fortement et sont présents à une fréquence proportionnelle et supérieure à celle observée dans le greffon. Par

contre, leur diversité clonale chute de manière dramatique, indiquant que la grande majorité des lymphocytes T A2/Melan-A<sup>+</sup> du SCO a disparu de la périphérie à 1 mois post-greffe. Par la suite, leur fréquence diminue significativement pour n'être détectables, à 3 mois post-greffe, que chez 1 patient sur 5. Leur diversité continue également de chuter, jusqu'à atteindre souvent la monoclonalité à 2-3 mois post-greffe. Ces résultats indiquent que la première réponse au transfert des lymphocytes T A2/Melan-A<sup>+</sup> du SCO en milieu lymphopénique est une forte expansion homéostatique accompagnée d'une oligoclonalisation, voire de la délétion clonale de leur répertoire.

Plutôt que de se différencier en « memory-like », semblable aux CM, comme les lymphocytes T de la MO (Eyrich et al., 2003; Ferrari et al., 2006; Gorla et al., 1993; Mackall et al., 1996), >70% des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> présents dans les 3 premiers mois suite à la transplantation sont en différenciation terminale (EMRA) (Merindol et al., 2011a). Ce phénotype persiste à 6 mois post-greffe, où l'on retrouve encore >40% de lymphocytes T EMRA. Ces résultats chez des receveurs pédiatriques sont comparables à ceux rapportés dans une étude de différenciation des lymphocytes T après TSCO chez l'adulte (Komanduri et al., 2007). Le phénotype EMRA est associé à une faible durée de vie et une longueur plus courte des télomères (Appay et al., 2008; Brenchley et al., 2003; Champagne et al., 2001; Geginat et al., 2001; Hamann et al., 1997). La différenciation terminale des lymphocytes T du SCO concorde avec leur forte prolifération et la chute de leur diversité observée suite à la transplantation.

Par ailleurs, la fonctionnalité du phénotype EMRA est particulière. Il est associé à un défaut d'expression d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ , à l'absence d'expression simultanée d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  et à une fréquence inférieure de lymphocytes T capables de conjointement produire de l'IFN- $\gamma$  et de lyser spécifiquement leur cible (Kim et al., 2009; Merindol et al., 2010). En accord avec ces

résultats, nous avons observé que la quasi-totalité des patients ne développent pas de réponse IFN- $\gamma$  anti-CMV ou anti-VZV dans les 3 premiers mois post-TSCO, et que seulement 10-15% d'entre eux en développent une au cours des 6 mois post-TSCO. Nos résultats montrent que les lymphocytes T du SCO qui parviennent à persister lors des 3 premiers mois post-greffe ne sont pas en nombre suffisant, ou pas suffisamment fonctionnels, pour répondre à CMV ou à VZV et combattre les IO. L'expansion homéostatique des lymphocytes T du SCO chez les enfants transplantés ne mène donc pas à la génération efficace de populations protectrices.

### *I. 1.1. RATIONALISATION*

L'absence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en périphérie au cours des premiers mois post-TSCO, due en partie à la faible dose cellulaire transférée, contribue à la faiblesse de la diversité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et du développement de leurs fonctions protectrices (Hamilton et Jameson, 2008; Hamilton et al., 2006). En outre, la composition de départ du répertoire spécifique à Melan-A et de la population totale de lymphocytes T est différente dans le SCO par rapport au SA. En effet, leur phénotype est davantage naïf. Un avantage incontournable de la TMO sur la TSCO est la présence de cellules CM dans la MO d'un adulte, qui permet de fournir au receveur une population protectrice ayant une longue durée de vie. Au-delà de ces différences évidentes, l'équipe de J. M. McCune propose l'existence de deux populations de lymphocytes T à des stades distincts de développement et provenant de précurseurs différents, entre la vie foetale et la vie adulte (Mold et al., 2010). Au même titre que ce qui a déjà été observé chez les espèces aviaires et murines, ces auteurs proposent l'existence de deux vagues de CSH. La première vague, probablement issue du foie foetal, mène à une lignée de cellules T biaisées vers la tolérance immunitaire alors que la deuxième vague,

issue des CSH présentes dans la MO, prédomine à l'âge adulte et produit des lymphocytes T dotés d'un potentiel pro-inflammatoire. Mold *et al.* suggèrent que des cellules T « fœtales », en coexistence avec des cellules T « adultes », sont présentes dans le SCO. La proportion de cellules T « fœtales » pourrait donc influencer les propriétés fonctionnelles des lymphocytes T issus du SCO.

### I. 1. 2. FONCTIONNALITÉ EN DISPARITÉ HLA

Hamza et al. ont observé que les patients ayant des disparités HLA plus importantes avec leur donneur avaient une moins bonne reconstitution immunitaire et une incidence accrue d'IO (Hamza et al., 2004). De plus, nous avons démontré que les lymphocytes T A2/Melan-A<sup>+</sup> issus des SCO HLA-A2<sup>-</sup> avaient une fonctionnalité significativement réduite suivant la stimulation antigénique (perte de diversité plus importante, fréquence inférieure de lymphocytes T cytolytiques) et mitogénique (fréquences inférieures de lymphocytes T producteurs d'IFN- $\gamma$  et de lymphocytes T portant ces deux fonctions), comparativement à leurs homologues dans les SCO HLA-A2<sup>+</sup> (Merindol et al., 2010).

Les raisons qui sous-tendent de telles différences ne sont pas claires. Il semble que les lymphocytes T des SCO HLA-A2<sup>-</sup> subissent une délétion clonale plus importante que ceux issus des SCO HLA-A2<sup>+</sup>. Ce phénomène pourrait dépendre de différences au niveau de l'affinité peptidique des deux populations. En effet, la distinction principale avec les lymphocytes T A2/Melan-A<sup>+</sup> issus des SCO HLA-A2<sup>+</sup> est l'absence de sélection positive et de sélection négative pour le HLA-A2 des lymphocytes T issus des SCO HLA-A2<sup>-</sup>. En conséquence, il est probable que l'affinité des cellules T sélectionnées pour ce complexe CMH-p soit différente : pour certaines, elle serait plus élevée à cause de l'absence de

sélection négative envers le HLA-A2, et pour d'autres, plus faible à cause de l'absence de sélection positive pour cet allèle. Les cellules T issues des SCO HLA-A2<sup>-</sup> recevraient donc des signaux de forces différentes qui pourraient être responsables de la différence de fonctionnalité en comparaison avec les lymphocytes T issus des SCO HLA-A2<sup>+</sup> (Almeida et al., 2007; Appay et Iglesias, 2011). Il est difficile de tester cette hypothèse *ex vivo* ou *in vitro* étant donné le caractère préimmun du répertoire et la perte de nombreux clones par délétion clonale lors de leur expansion *in vitro*.

Dans des expériences futures, il sera nécessaire de suivre la réponse antigénique des clones non fonctionnels et de ceux qui seront éliminés, avant leur élimination. Il conviendrait d'observer concomitamment l'expression de marqueurs d'apoptose et de différentes molécules caractéristiques de la réponse des lymphocytes T, à des temps plus courts suivant la stimulation peptidique (tous les 2-3 jours) et en utilisant différentes concentrations d'antigène. Il faudrait aussi vérifier si ces cellules développent d'autres fonctions que la cytotoxicité en association avec une stimulation plus forte (par exemple : production d'IL-2, de MIP-1 $\alpha$ , de MIP-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$ ), ou encore des propriétés tolérogènes (production d'IL-10 et expression de FoxP3) (Mold et al., 2010).

## I. 2. UNE POPULATION ÉPUISEE

Dans le but de trouver une explication à la délétion clonale et à l'absence de production d'IFN- $\gamma$  des lymphocytes T du SCO suite à leur transfert chez le receveur, nous avons évalué l'expression du marqueur d'épuisement PD-1. L'expression de PD-1 par les lymphocytes T reflète un dysfonctionnement des fonctions effectrices, mais aussi des défauts de prolifération, de survie et une susceptibilité accrue à l'apoptose (Blackburn et al., 2008; Day



et al., 2006; Petrovas et al., 2006). Effectivement, nous avons observé que la population lymphocytaire des receveurs de TSCO était caractérisée par une grande fréquence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> exprimant PD-1 durant les 3 premiers mois post-greffe. Gallez-Hawkins *et al.* ont mesuré les niveaux d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> chez les receveurs de TMO (Gallez-Hawkins et al., 2009). Ils n'ont retrouvé ni différence d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T (index de fluorescence moyenne), ni variation de fréquence des lymphocytes T PD-1<sup>+</sup> au cours de la première année qui suit la greffe. Cependant, les conclusions de cette étude devront être vérifiées et ont leur limite, d'abord à cause de la courte durée du suivi (360 jours), et aussi parce que les PBMCs de certains patients ont été stimulées avec un mélange de peptides provenant de pp65 de CMV avant de procéder au marquage de PD-1. Ils ne séparent pas ces PBMCs de celles qui n'ont pas été exposées aux antigènes de CMV pour procéder à l'analyse. Hors, la molécule PD-1 est augmentée à la surface des lymphocytes T suivant leur activation (Freeman et al., 2000). Stimuler les PBMCs avec des antigènes viraux biaisera donc l'expression de PD-1. En revanche, ils ont observé une augmentation de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T des patients qui contractaient des infections à CMV et sur les lymphocytes T des patients qui développaient une GvHD. Ces résultats sont intéressants parce qu'ils proposent que l'expression de PD-1 serait influencé par certains évènements infectieux et par la GvHD. Au cours de notre étude, à cause du faible nombre de patients et du grand nombre d'infections virales et bactériennes, il n'a pas été possible d'associer l'expression de PD-1 avec des évènements particuliers. Cependant, nous avons observé, sans toutefois pouvoir le tester statistiquement, que l'expression de PD-1 était particulièrement élevée chez les patients qui faisaient des infections à CMV et EBV, mais aussi chez les patients qui avaient développé un GvHD, particulièrement à 3 mois post-greffe.

Nous avons également démontré que plus les décomptes de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> étaient faibles, plus la fréquence de lymphocytes T PD-1<sup>+</sup> était élevée. Ces résultats suggèrent que l'immunosuppression a pour conséquence vicieuse l'épuisement du peu de lymphocytes T persistants, amenuisant leurs capacités protectrices. Nos données concordent aussi avec d'autres études qui démontrent que l'absence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exacerbe l'épuisement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Wherry, 2011).

Finalement, la délétion clonale, la différenciation terminale et l'absence de production d'IFN- $\gamma$  en réponse à CMV et à VZV au cours des 3 premiers mois post-TSCO reflètent le potentiel fonctionnel réduit des lymphocytes T du greffon transférés chez le patient, et concorde avec la présence importante de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> épuisés. Des observations similaires ont été faites sur les lymphocytes T transférés chez la souris dans un milieu lymphopénique, les cellules T ont exprimé PD-1, n'étaient pas fonctionnelles et se sont oligoclonalisées pour disparaître progressivement en deux mois (Lin et al., 2007). La fonctionnalité lymphocytaire réduite par l'expression de PD-1 pourrait aussi expliquer l'incidence plus faible de la GvHD observé chez les receveurs de TSCO (Blazar et al., 2003).

## *I. 2. 1. INTERPRÉTATION*

Étant donné qu'aucune augmentation d'expression de PD-1 par des lymphocytes T n'a été observée (index de fluorescence moyenne), c'est spécifiquement l'expression prolongée de ce récepteur inhibiteur de 2 à 3 mois post-TSCO qui pourrait être la clé menant à l'épuisement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> (Virgin et al., 2009). La persistance de cet épuisement suggère que les lymphocytes T sont confrontés à un contexte d'inflammation chronique dans les 3 premiers mois post-TSCO. L'interaction de PD-1 avec son ligand PD-L1

a non seulement une influence sur la fonction mais aussi sur la survie et la prolifération des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Brahmamdam et al., 2010; Keir et al., 2008; Petrovas et al., 2006). Les mécanismes reliés à la délétion clonale des lymphocytes T épuisés commencent seulement à être expliqués. Chez la souris, il a été démontré que les lymphocytes T épuisés expriment faiblement la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7 (CD127) et la chaîne  $\beta$  du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15 (CD122). Ils répondent faiblement à l'IL-7 et à l'IL-15 et ne persistent pas lors d'un transfert adoptif chez les souris, en l'absence d'infection virale (Purton et al., 2007; Tan et al., 2002). Chez l'homme, les lymphocytes T expriment de plus faibles niveaux de CD127 lors des infections chroniques. L'IL-7 est essentielle à la prolifération homéostatique mais aussi à la survie des lymphocytes T naïfs et mémoires (Bosco et al., 2005; Schluns et al., 2000; Tan et al., 2001). La diminution de l'expression du CD127 pourrait empêcher les lymphocytes T de compétitionner pour l'IL-7 avec les cellules NK, qui elles, représentent 80% des lymphocytes en périphérie à 1 mois post-TSCO (Merindol et al., 2011b).

Plusieurs autres hypothèses peuvent être émises (et devront être confirmées) pour expliquer les différences entre les lymphocytes T du SCO et ceux issus de la MO. Il est possible que la perforine, les différentes granzymes et les molécules impliquées dans la voie de signalisation du TCR ne soient pas exprimées au même niveau (Mold et al., 2010). Il a été démontré que l'expression des granzymes et des cytokines étaient modulée en fonction du stade de différenciation des lymphocytes T, et en fonction du type de virus (Appay et al., 2008; Makedonas et al., 2010); menant à des potentiels cytolytiques distincts.

Les mécanismes moléculaires responsables des différences fonctionnelles entre les lymphocytes T du SCO et ceux de la MO demeurent très peu étudiés. Ces différences pourraient être expliquées au niveau épigénétique : c'est-à-dire par des accessibilités relatives des facteurs de transcription aux promoteurs des gènes supportant les fonctions

effectrices. Par exemple, il pourrait s'agir de niveau différent de méthylation ou d'acétylation des histones (Kato et al., 2007; Zou et al., 2001). De plus, certaines molécules inhibitrices telles que des microARN ciblant la prolifération, la survie ou la cytotoxicité pourraient être exprimées en quantité différente dans les lymphocytes T du SCO (Lederhuber et al., 2011; Merkerova et al., 2010). Il est déjà reconnu que la production réduite d'IFN- $\gamma$  peut être attribuée à une diminution de l'expression du facteur de transcription NFATc2/NFAT-1 (Kadereit et al., 2003; Kaminski et al., 2003) et à la surexpression de l'ordre de 58 fois du microARN 184 dans les lymphocytes T du SCO (Weitzel et al., 2009). Il est également reconnu qu'un problème de translocation de NFAT-1 au noyau engendre l'épuisement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Agnellini et al., 2007). Ces résultats concordent avec la différenciation des lymphocytes T du SCO en populations épuisées. De nombreux autres microARN qui modulent la différenciation des lymphocytes T pourraient également être exprimés différemment dans le SCO (Almanza et al., 2010; Rossi et al. 2011).

Les facteurs de transcription tels que Blimp-1 ou T-bet, ou les microARN associés à leur régulation, pourraient aussi jouer un rôle important. Tous deux ont une implication clé dans l'épuisement. T-bet induit la différenciation terminale des lymphocytes T lors d'infections aiguës et réprime directement la transcription du gène codant pour PD-1 lors d'infections virales chroniques (Joshi et Kaech, 2008; Kao et al., 2011). L'expression de Blimp-1 joue un rôle central dans la différenciation terminale mais aussi dans l'épuisement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, car il est associé à une augmentation de l'expression de PD-1, de LAG-3, de CD160 et de 2B4, et une diminution de l'expression de CD127 (Kallies et al., 2009; Martins et Calame, 2008; Shin et al., 2009). Il est probable que l'expression de Blimp-1 soit différente chez les lymphocytes T du SCO.

L'étude de l'expression de CD127 et de la chaîne  $\beta$  du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15 à la surface des lymphocytes T transplantés de SCO pourrait fournir des informations importantes pour comprendre les mécanismes amenant à la délétion clonale chez les receveurs de TSCO. Il est fort possible que certaines déficiences fonctionnelles des lymphocytes T du SCO puissent être résolues suivant l'ajout de certaines de ces cytokines ou après blocage de l'interaction entre PD-1 et son ligand (Barbey et al., 2007).

Le TGF- $\beta$ , auquel les lymphocytes T du SCO sont exposés pendant la grossesse, pourrait contribuer à l'épuisement (Alatrakchi et al., 2007; Garba et al., 2002). Il serait intéressant d'aller mesurer son impact sur la différenciation des lymphocytes T et vérifier l'empreinte de la signalisation de cette molécule sur les lymphocytes T du SCO. Également, il serait important d'aller mesurer la contribution des autres molécules impliquées dans l'épuisement, telles que LAG-3, 2B4, CD160, TIM-3 et CTLA-4.

Finalement, les différences de fonctionnalité entre les lymphocytes T issus du SCO et ceux de l'adulte devraient être caractérisées en profondeur *ex vivo*, suivant une stimulation antigénique et mitogénique *in vitro*, et en compatibilité ou en disparité HLA, en utilisant des micropuces pour mesurer l'expression des microARN et des ARN messagers. Les résultats de ces expériences pourraient être confirmés par marquage intracellulaire en cytométrie multiparamétrique.

### I. 3. ANERGIE, APOPTOSE OU SÉNESCENCE?

Alors que plus de 70% des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont de phénotype EMRA, seulement 16% sont épuisés à 3 mois post-greffe. Il existe probablement des mécanismes alternatifs pour expliquer la délétion clonale et la susceptibilité accrue aux IO.

Un défaut de fonctionnalité peut aussi être attribué à une anergie des lymphocytes T. Cependant, il est peu probable que les cellules T du SCO soient anergiques. Bien qu'il y ait un certain chevauchement des caractéristiques entre les cellules anergiques et les cellules épuisées, ces deux phénotypes sont différents. L'épuisement implique une activation préalable des cellules T, accompagnée de signaux de costimulation, d'une prolifération clonale et d'une perte de fonction progressive (Keir et al., 2008). L'anergie est causée par une stimulation antigénique en l'absence de costimulation et est caractérisée par une absence de réponse plutôt que par sa diminution (Wherry et al., 2007). Ainsi, l'anergie est peu compatible avec ce qui est observé *in vitro*, et peu compatible avec la différenciation en effecteurs terminaux et l'oligoclonalisation observées suivant la TSCO.

Par ailleurs, il a été rapporté que le nombre de cycles de prolifération et la susceptibilité à l'apoptose des lymphocytes T issus du SCO étaient plus importants suite à la stimulation polyclonale, par rapport à leurs homologues issus du SA (Chalmers et al., 1998; Kadereit et al., 2003; Kaminski et al., 2003; Risdon et al., 1994b). *A priori*, un plus grand nombre de cycles de prolifération concorde avec la différenciation terminale observé suivant la TSCO. De même, la susceptibilité accrue à l'apoptose pourrait expliquer la délétion clonale massive notée *in vitro* suite à la stimulation antigénique et *ex vivo* après la transplantation chez l'enfant.

Les lymphocytes T activés du SCO pourraient aussi représenter une population sénescence (Brenchley et al., 2003; Champagne et al., 2001; Geginat et al., 2001; Hamann et al., 1997). Ce phénotype est caractérisé, entre autre, par une différenciation terminale et un épuisement clonal des lymphocytes T. Le marqueur CD57 identifie les cellules T sénescences ayant une faible capacité proliférative (Brenchley et al., 2003; Joshi et Kaech, 2008). Les cellules CD57<sup>+</sup> conservent habituellement leurs fonctions effectrices mais la perte de

répertoire qui suit la TSCO pourrait être telle que les lymphocytes T antiviraux sont tout simplement absents, parce que déjà éliminés au moment du challenge infectieux (Akbar et Henson, 2011). À noter que la corrélation entre l'expression de CD57 et de PD-1 est faible dans le contexte du VIH (Wherry et al., 2007) mais qu'il existe bien une association entre la longueur des télomères (indicateur de sénescence) et l'expression de PD-1 (Lichterfeld et al., 2008). Ainsi, la sénescence progressive des cellules T du greffon après la TSCO pourrait aussi être un mécanisme complémentaire à l'épuisement clonal.

Il serait important de vérifier ces hypothèses de surprolifération et de sénescence, en utilisant une stimulation antigénique plutôt que mitogénique, et en comparant les répertoires de lymphocytes T spécifiques à Melan-A issus du SCO et ceux du SA. La longueur des télomères pourrait être mesurée en utilisant la méthode du « flow FISH » (FISH : « fluorescent in situ hybridization »), combiné avec l'étude des marqueurs d'activation, d'inhibition et de sénescence en cytométrie multiparamétrique (Baerlocher et al., 2006). Il faudrait aussi évaluer la susceptibilité à l'apoptose post-transplantation en étudiant par exemple, l'expression de Bcl-2 et Bcl-X(L).

#### I. 4. LES FACTEURS DE RISQUE DE RECHUTE

La principale cause de mortalité au sein de notre groupe de patients est la rechute de leucémie (22%) (Merindol et al., 2011a). Les rechutes sont causées par la persistance de cellules leucémiques, résistantes au traitement. En transplantant un nouveau système hématopoïétique, on permet l'allorecognition des cellules cancéreuses du receveur par les cellules immunitaires du donneur, à travers les antigènes mineurs, les HLA

incompatibles ou les antigènes tumoraux. Nous nous sommes intéressés à savoir si la qualité des lymphocytes T qui émergeaient au cours de la première vague de reconstitution, lors des 3-6 premiers mois qui suivent la greffe, avait une influence sur le risque de développer des rechutes.

Les lymphocytes T sont des effecteurs essentiels de la destruction des cellules tumorales. Nous avons observé qu'une fréquence plus élevée de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> EM et de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>, ainsi qu'un compte plus faible de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> étaient présents dans les 6 premiers mois post-TSCO chez les patients qui allaient éventuellement faire une rechute. Notre étude démontre ainsi que l'effet GvL qui suit la TSCO n'est pas uniquement dépendant des cellules NK (Merindol et al., 2011b), mais que la reconstitution fonctionnelle précoce des lymphocytes T influence aussi le risque de rechute. Si les lymphocytes T ne fonctionnent pas de manière optimale, ils ne parviendront pas à contenir la croissance des cellules malignes, qui mènera *in fine* à la rechute malgré la présence des cellules NK.

La fréquence élevée de lymphocytes T de phénotype EM chez les patients transplantés de SCO qui rechuteront suggère que cette population ne combat pas efficacement les cellules tumorales. Nous avons aussi observé qu'un ratio EM/EMRA plus élevé était retrouvé chez les patients qui allaient rechuter (données non montrées). Suite à une TMO, il a été démontré de manière similaire qu'une reconstitution de cellules T avec des nombres inférieurs de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> à 2 mois post-greffe correspondait à un risque plus important de rechutes subséquentes (Yakoub-Agha et al., 2009). Or, le CD28 est fortement exprimé sur les lymphocytes T naïfs, CM et EM mais très peu sur les EMRA (Appay et al., 2008). Le phénotype EM est associé à une expression élevée de granzyme K et faible de granzyme B, de perforine et d'IFN- $\gamma$ , à l'inverse du phénotype EMRA (Appay et al., 2008;



Romero et al., 2007; Takata et Takiguchi, 2006). L'activité cytolytique pourrait donc être la fonction la plus importante (comparativement à la capacité proliférative) pour combattre les rechutes dans les premiers mois post-TSCO.

Récemment le phénotype EM a été associé avec l'expression préférentielle du marqueur d'épuisement PD-1 (Duraiswamy et al., 2011). Or, nous avons également observé une fréquence élevée de lymphocytes T exprimant PD-1 à 2 et 6 mois post-TSCO chez les patients qui rechutent subséquemment. Tel que décrit plus tôt, PD-1 est un marqueur d'épuisement mais aussi de dysfonction des lymphocytes T. En fait, dans de nombreuses études, son expression est associée à une dysfonction de l'activité anti-tumorale (Mumprecht et al., 2009; Wang et al., 2011a; Zhou et al., 2011). Il n'est donc pas étonnant qu'une fréquence élevée de lymphocytes T PD-1<sup>+</sup> soit associée à un contrôle moins efficace des rechutes. Très récemment, les lymphocytes T anti-tumoraux PD-1<sup>+</sup> ont aussi été détectés à une fréquence particulièrement élevée chez deux receveurs de TCSH allogéniques qui faisaient une rechute (Norde et al., 2011). Ces données concordent avec nos résultats. Par ailleurs, un compte faible de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez les patients qui rechutent, corrobore la corrélation inverse observée avec la fréquence de lymphocytes T PD-1<sup>+</sup> (Holm et al., 2008; Merindol et al., 2011b; Sullivan et al., 2010).

Ces résultats démontrent l'importance d'une reconstitution fonctionnelle des lymphocytes T pour prévenir la rechute. Ils suggèrent que le combat contre la leucémie commence plusieurs mois avant la détection de la rechute. Nous proposons que l'augmentation des niveaux de lymphocytes T PD-1<sup>+</sup>, en l'absence de GvHD ou d'infection virale persistante, puisse servir de facteur prédictif de rechute de leucémie. Nos résultats devront être confirmés sur des groupes plus importants de patients et évalués pour d'autres sources de CSH (MO, sang périphérique mobilisé).

#### *I. 4. 1. MÉCANISMES POSSIBLES*

La raison de la reconstitution immunitaire affaiblie chez certains patients n'est pas très claire. Le phénotype et la fonctionnalité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont directement dépendants de l'aide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ainsi, une mauvaise reconstitution CD4<sup>+</sup> pourrait représenter le début de la cascade de dysfonction de la population lymphocytaire. Le décompte de lymphocyte T CD4<sup>+</sup> à 6 mois post-greffe dépend surtout de l'activité thymopoïétique du patient. Cette dernière peut être influencée par l'âge du patient, la GvHD, la disparité HLA ou encore la dose cellulaire injectée au patient (Merindol et al., 2011b; Niehues et al., 2001).

L'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T, comme la différenciation en populations effectrices et sénescentes est aussi influencée par la présence d'infections. La grande majorité de nos patients subissent des IO virales ou bactériennes. Le niveau basal d'expression de PD-1 est augmenté chez tous les patients dans les 3 premiers mois post-greffe, même ceux qui ne feront pas de rechute de leucémie. Cela pourrait signifier que la présence ou la persistance d'infections particulières pourrait épuiser les lymphocytes T et conditionner le patient à une mauvaise réponse anti-tumorale. Des études avec un nombre plus important de patients permettront de clarifier cette possibilité.

## II- DEUXIÈME VAGUE DE RECONSTITUTION

Alors que la première vague de lymphocytes T se termine, avec les derniers clonotypes « précoces » EMRA qui persistent péniblement jusqu'à 6 mois post-TSCO, une nouvelle population émerge. Elle est caractérisée par 16% de lymphocytes T naïfs, la réapparition des lymphocytes T spécifiques à Melan-A, et un regain progressif de la diversité du répertoire (Figure 1). Elle se traduit aussi par l'expansion des lymphocytes T qui expriment peu PD-1, un potentiel polyfonctionnel rétabli et l'émergence progressive de réponses antivirales protectrices contre CMV et VZV. Le développement de réponses antivirales semble quantitativement dépendant de la fonction thymique, mesurée par la fréquence des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs (Merindol et al., 2011c). Par ailleurs, le potentiel fonctionnel des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> A2/Melan-A<sup>+</sup> à 6 mois post-greffe, probablement reconstitués par thymopoïèse, est complètement rétabli (production d'IL-2, d'IFN- $\gamma$ , de CD107a et capacité cytolytique). Les patients les plus jeunes (greffés à 4 et 5 mois) démontrent une reconstitution très rapide, avec une diversité du répertoire de lymphocytes T A2/Melan-A<sup>+</sup> et une fréquence de lymphocytes T naïfs significatives dès 1-2 mois post-greffe. Ces patients sont aussi parmi les plus rapides à développer des réponses antivirales. Cette reconstitution précoce relativement aux patients plus âgés s'explique par l'activité thymopoïétique accrue des patients en bas âge. Ces résultats démontrent l'importance de la thymopoïèse pour restaurer la capacité protectrice des lymphocytes T (Brown et al., 2010).

À 12 mois post-greffe, le phénotype, la diversité des lymphocytes T et l'expression de PD-1 semblent totalement restaurés chez tous les patients. La population de lymphocytes T A2/Melan-A<sup>+</sup> et les réponses antivirales protectrices (sans développement de maladie) sont

détectées de manière persistantes jusqu'à la limite du suivi, 3 ans après la greffe. La reconstitution amorcée par la thymopoïèse est donc durable et fonctionnelle.

Des observations étonnantes ont été faites après 12 mois de suivi. Dans notre étude, la reconstitution paraît se détériorer après un an. Bien que la différence soit non significative, la diversité du répertoire spécifique à Melan-A semble diminuer entre 18 et 36 mois post-greffe. La distribution des longueurs de CDR3 n'est plus normale à 24 et 36 mois, signe possible d'une oligoclonalisation. De même, la fréquence des lymphocytes T spécifiques à Melan-A et celle des lymphocytes T EMRA ré-augmentent à 3 ans post-greffe. Cinq patients sur cinq ont contracté ou récidivé d'un zona après un an post-greffe. De manière intrigante, il y a donc un risque important d'infections à VZV malgré des décomptes élevés de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Il semble que les patients qui ne parviennent pas à développer des réponses  $\geq 150$  SFU d'IFN- $\gamma$ /million de PBMCs malgré un compte lymphocytaire élevé et une activité thymopoïétique normale ne sont pas protégés contre VZV. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le rôle possible des lymphocytes T dans la pathogenèse du zona, qui peuvent être infectés par le VZV (Arvin, 2000; Schaap et al., 2005; Soong et al., 2000; Zerboni et al., 2005) et déclencher le transfert du virus au racine des ganglions dorsaux (Ku et al., 2004; Zerboni et al., 2005), plutôt qu'à cause d'un problème de reconstitution fonctionnelle du compartiment des lymphocytes T (Benjamin et al., 2002; Tomonari et al., 2003). Néanmoins, notre étude démontre que le développement d'une forte réponse des lymphocytes T permet un contrôle efficace de la réplication du VZV et doit donc continuer à être une priorité.

Ces données soulignent l'importance d'évaluer la reconstitution immunitaire à plus long terme. Au cours du vieillissement normal d'un individu, la production thymique s'affaiblit, la population naïve et la diversité clonale diminuent, et les risques infectieux augmentent.

Cependant, cette évolution est progressive et se joue sur plusieurs décennies chez les individus sains. Une étude récente chez les receveurs de MO haploidentique apparentée et appauvrie en lymphocytes T a démontré qu'il y avait des différences importantes entre les receveurs et leur donneur plus de 10 ans après la greffe (Le et al., 2011). Les auteurs ont observé qu'il y avait moins de cellules T naïves, des niveaux inférieurs de TREC, moins de cellules T CD4<sup>+</sup> CM, et plus de cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices et de cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices chez les receveurs que chez leur donneur. Bien qu'aucune baisse significative de diversité n'ait pu être observée avec la méthode du « spectratype », les auteurs observent certains changements au niveau de l'utilisation des régions variables de la chaîne  $\beta$  du TCR, 10 ans après la transplantation. Il pourrait donc y avoir un vieillissement prématuré du système immunitaire chez ces patients.

De manière générale, les données sur les répertoires spécifiques à Melan-A, CMV et VZV s'accordent pour montrer que la reconstitution thymique est essentielle pour mener à la restauration d'une population T fonctionnelle. Cependant, il n'est pas certain qu'elle mène à la restauration d'une population ayant les mêmes capacités que celle des individus sains.

L'évolution de la thymopoïèse, de la sénescence, de l'épuisement, de la diversité et de la fonctionnalité du répertoire lymphocytaires devrait être caractérisée en profondeur durant des décennies après la greffe de SCO pour vérifier que cette source de CSH est comparable aux autres sources de CSH à long terme. De même, l'influence du conditionnement, des médicaments anti-GvHD (ATG) et des traitements antiviraux (Famciclovir) sur la reconstitution lymphocytaires à long terme devront aussi être évalués.

### III- COMMENT PROTÉGER DES INFECTIONS OPPORTUNISTES ET DES RECHUTES?

La conclusion la plus importante de cette étude est que la qualité de la première vague de lymphocytes T émergeant dans les 3-6 premiers mois suivant la TSCO joue un rôle déterminant dans la susceptibilité aux IO et aux rechutes de leucémie. Il est primordial d'optimiser la reconstitution précoce pour améliorer le pronostic des enfants transplantés de SCO.

La première façon d'accomplir cela est d'augmenter la dose cellulaire. Une TSCO contient environ  $1 \log_{10}$  de CSH de moins qu'une TMO. La transplantation de deux unités de SCO compatibles chez les adultes émerge en tant qu'alternative encourageante pour améliorer la prise de la greffe, et diminuer le risque de rechute de leucémie (Barker et al., 2005b; Sideri et al., 2011). Malheureusement, cette mesure est aussi associée avec un risque plus élevé de GvHD (MacMillan et al., 2009). Si la disponibilité des unités de SCO et le coût de la TSCO le permet, il serait intéressant de doubler la dose de CSH en utilisant deux unités de SCO chez les enfants et d'en évaluer l'impact sur les IO et la rechute de leucémie.

L'administration d'ATG est un autre facteur limitant la quantité de lymphocytes T présents en périphérie chez les patients au cours des premiers mois post-greffe. Cette molécule est utilisée pour éliminer les lymphocytes T du receveur et prévenir le rejet mais aussi pour éliminer une partie de ceux du donneur et prévenir la GvHD. Très peu d'études ont été publiées portant sur des procédures de TSCO chez l'enfant en absence d'ATG. Récemment, Sauter *et al.* ont démontré que d'omettre l'ATG dans le conditionnement permettait de diminuer le risque d'IO et d'obtenir une reconstitution plus rapide des lymphocytes T chez les adultes recevant deux unités de SCO (Sauter et al., 2011). Malheureusement, les patients

étaient aussi plus susceptibles de développer un GvHD. Le dilemme est toujours le même : comment améliorer la fonction des lymphocytes T pour combattre les IO et les rechutes sans aggraver le risque de GvHD? Il est important de trouver une alternative à l'ATG, ou à son schéma d'utilisation afin d'améliorer la reconstitution immunitaire sans engendrer le GvHD. De plus, le mécanisme précis d'action de cette molécule sur les lymphocytes T n'est pas encore complètement caractérisé et doit être élucidé (Broady et al., 2009; Genestier et al., 1998).

D'autres conclusions plus directes peuvent être tirées de cette étude : l'expression de PD-1 est augmentée pendant la fenêtre de 100 jours correspondant à la période de haut risque d'IO. De plus, cette expression semble influencer le risque de rechute de leucémie. Ainsi, il paraît prometteur de bloquer l'interaction entre PD-1 et son ligand PDL-1 pour restaurer, en partie, la fonctionnalité de la première vague de lymphocytes T. Dans les modèles animaux, le blocage de cette interaction permet d'améliorer aussi bien la réponse anti-pathogène que la réponse anti-tumorale (Bhadra et al., 2011; Curran et al., 2010; Dotti, 2009; Pilon-Thomas et al., 2010; Sakuishi et al., 2010). Chez la souris, certains ont même démontré que le blocage de PD-1/PD-L1 permettait de restaurer l'effet anti-leucémique de lymphocytes T alloréactifs transférés de manière adoptive sans induire la GvHD (Koestner et al., 2011). Les résultats d'études cliniques récentes suggèrent que l'obstruction de la voie PD-1 pourrait être une stratégie immunothérapeutique majeure pour parvenir au contrôle immunologique des tumeurs chez l'homme (Brahmer et al., 2010; Velu et al., 2009). Cette stratégie pourrait être particulièrement utile en présence d'une population lymphocytaire exprimant PD-1 de manière intermédiaire, comme les lymphocytes T périphériques des receveurs de TSCO (Blackburn et al., 2008). Sans oublier que les souris *Pdcd1*<sup>-/-</sup> sont très susceptibles de développer des réactions auto-immunes et que l'interaction entre PD-1 et

son ligand est un mécanisme de tolérance et de régulation immunitaire essentiel, ces études laissent entrevoir que le blocage partiel ou temporaire de la voie PD-1/PD-L1 pourrait être une option intéressante pour améliorer la fonctionnalité de la première vague de reconstitution. De prochaines études sur les autres récepteurs inhibiteurs permettront de déterminer s'il faudrait également bloquer leur interaction avec leur ligand. L'apport extérieur de fortes doses d'IL-7 ou d'autres interleukines (IL-2, IL-15 et IL-21) est aussi une voie intéressante pour tenter de restaurer la survie et la fonction des lymphocytes T.

Ultimement, l'optimisation de la thymopoïèse demeure l'intervention possédant le plus fort potentiel pour améliorer du pronostic des patients suivant la TSCO. En effet, la restauration de la diversité et d'un compte normal de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dépend directement de la génération *de novo* de lymphocytes T à partir du thymus. De plus, nos données démontrent que la reconstitution des réponses antivirales dépend de la production des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> naïfs. L'IL-7 joue un rôle primordial pour la thymopoïèse chez la souris. Cependant, chez l'homme, son rôle semble plutôt au niveau de l'expansion périphérique. En revanche, deux molécules semblent prometteuses : le « Keratinocyte Growth factor » (KGF) et l'hormone de croissance somatotropine (« growth hormone », GH). Napolitano *et al.* ont étudié l'impact de l'administration du GH sur la fonction thymique des adultes infectés par le VIH-1 (Napolitano et al., 2008). Ils ont observé que la GH induisait la production de cellules T en mesurant la fréquence des TREC et le nombre de cellules T naïves. Ils ont ainsi démontré que l'involution thymique pouvait être renversée pharmacologiquement chez les individus immunodéficients. Wang *et al.* ont étudié le KGF et démontré, que chez la souris receveuse de TSCO allogénique, l'administration de cette molécule augmentait la production thymique et l'effet GvL (Wang et al., 2011b).



Le transfert adoptif de lymphocytes T activés est également une méthode de choix pour combattre les IO et les rechutes. En effet, certaines équipes sont déjà parvenues à générer des lymphocytes T antiviraux et antitumoraux. (Hanley et al., 2009). Notre étude permet de tirer certaines conclusions quant à l'utilisation des lymphocytes T du SCO en transfert adoptif. Bien que nous ayons mesuré un certain potentiel fonctionnel des lymphocytes T du SCO, il semble y avoir des différences importantes avec les lymphocytes T d'adultes. Ces différences résident notamment dans la délétion clonale suite à la stimulation et à la transplantation en milieu lymphopénique, ainsi que dans une différenciation en EMRA et en populations épuisées. À ce jour, il n'est donc pas certain que le SCO soit une source adéquate de lymphocytes T. Ces résultats impliquent la nécessité d'évaluer le phénotype et la fonctionnalité des lymphocytes T générés *in vitro* à partir du SCO, de même que leur persistance et leur fonctionnalité chez le receveur. Il faudra s'assurer que les stratégies de stimulation *in vitro* génèrent une population effectrice non épuisée avec une durée de vie suffisante pour combattre les infections virales.

Finalement, la meilleure protection antivirale est générée par la vaccination chez les individus sains. Trois vaccins contre la varicelle sont actuellement sur le marché, soient le Varivax<sup>®</sup> III (Merck Frosst : 1 350 pfu/ml), le Varilrix<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline : 1 995 pfu/ml) et le Priorix-Tetra<sup>™</sup> (GlaxoSmithKline : 1 996 pfu/ml) (Protocole d'immunisation du Québec). Tous ces vaccins sont constitués de virus vivants et atténués de la souche OKA, développée au Japon au milieu des années 70 (Takahashi et al., 1974). Pour le VZV, qui risque de se réactiver après l'arrêt du Fanciclovir, la vaccination, à un an post-greffe, des patients ayant des comptes de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> normaux et aucune complication infectieuse ou de GvHD semble une stratégie intéressante à évaluer. Elle est présentement à l'étude au CHU Sainte-Justine.

Le vaccin contre CMV contient la glycoprotéine B du virus et l'adjuvant MF59. Il est en cours d'essai clinique. Jusqu'à présent, il permet d'immuniser au moins la moitié des femmes non infectées testées. De plus, il génère de fortes réponses humorales et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez la femme chroniquement infectée (Pass et al., 2009; Sabbaj et al., 2011). Le défi avec les pathologies reliées à CMV est qu'elle se déroule majoritairement dans les 6 premiers mois post-TSCO, alors que le patient n'a pas encore atteint un décompte de lymphocytes T normal. Cependant, ce vaccin n'étant pas composé de virus vivants, et certains patients étant capables de monter des réponses anti-CMV dans les 3 premiers mois post-greffe, il serait intéressant de déterminer le seuil minimal de reconstitution nécessaire pour pouvoir vacciner les patients durant les 6 premiers mois qui suivent la TSCO.

#### IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

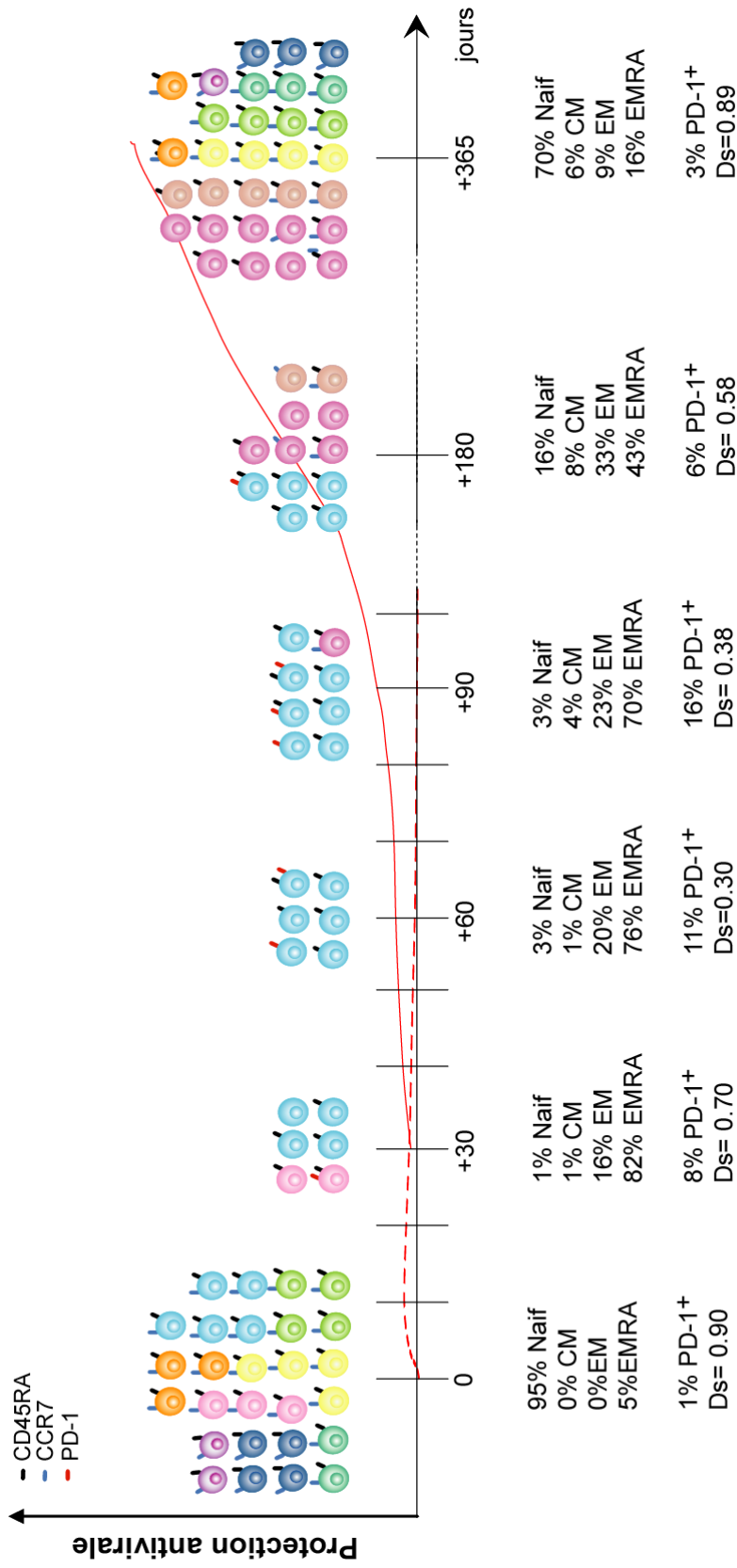
La TSCO est une procédure acceptée et utilisée dans le monde entier mais de nombreux défis demeurent afin d'optimiser la prise de la greffe et de minimiser les complications qui y sont associées. Les IO, la GvHD et les rechutes de leucémies doivent être combattues pour augmenter les chances de survie des enfants transplantés. Les lymphocytes T ont un rôle important à jouer dans toutes ces complications. Au cours de cette étude, nous avons pu démontrer que les lymphocytes T du SCO n'étaient pas immatures mais qu'ils avaient bien un potentiel fonctionnel important suite à une stimulation mitogénique ou antigénique. Nous avons également observé qu'il y avait certaines différences entre les lymphocytes T issus du SCO et ceux issus du sang adulte, en particulier dans un contexte de disparité HLA.

Ces différences devront être considérées lors de protocoles visant à générer des lymphocytes T antitumoraux ou antiviraux pour le transfert adoptif.

Nous avons établi le profil de différenciation des lymphocytes T suite à la TSCO, et décrit en détail les deux vagues de reconstitution des lymphocytes T. Nous avons démontré que la première vague de lymphocytes T, qui persiste jusqu'à 6 mois post-TSCO, est caractérisée par une population en différenciation terminale subissant une forte délétion clonale et contenant un nombre important de lymphocytes T épuisés. La qualité de cette première vague, déterminée par le profil de différenciation, le décompte CD4 et la fréquence de lymphocytes T qui expriment PD-1, a un impact important sur la susceptibilité aux IO et sur le risque latent de développer une rechute de leucémie. La deuxième vague de lymphocytes T commence à 6 mois post-greffe et laisse place à une population fonctionnelle et diversifiée avec un potentiel maximal atteint à un an. Cette deuxième vague de lymphocytes T générés par thymopoïèse mène à l'émergence de réponses antivirales protectrices. Cependant, la protection contre le VZV peut prendre plusieurs années pour se mettre en place chez certains patients. La diversité du répertoire de lymphocytes T spécifiques à Melan-A semble diminuer après 2 et 3 ans post-TSCO. Également, la fréquence de lymphocytes T en différenciation terminale semble augmenter de nouveau à 3 ans post-greffe. Cette deuxième vague de diversité devra donc être étudiée plus en détail et à plus long terme, pour vérifier que le répertoire fonctionnel est restauré suivant la TSCO.

Finalement, tous nos résultats démontrent que la stratégie à adopter pour améliorer le pronostic des enfants qui reçoivent une TSCO est d'optimiser le potentiel des lymphocytes T issus du SCO ou reconstitués *de novo*. Pour valider les résultats de cette étude, il sera important d'enrôler un nombre plus important de patients transplantés de SCO ainsi que des enfants transplantés de MO. Il faudra alors confirmer le rôle de PD-1 et déterminer celui

joué par d'autres marqueurs d'épuisement dans la fonctionnalité des lymphocytes T du SCO et la rechute de leucémie. Il faudra mesurer l'influence du type d'infection et de la GvHD sur l'épuisement des lymphocytes T. Il sera également intéressant de vérifier l'impact de la disparité HLA, du type de leucémie et du conditionnement sur la reconstitution fonctionnelle des lymphocytes T. Concernant les infections à VZV, il faudra évaluer si le traitement prophylactique diminue réellement les risques d'infections, si la vaccination à l'arrêt du traitement est une approche adéquate, et si le seuil de 150 SFU/millions PBMCs détermine réellement des réponses protectrices. Il sera important d'intégrer la surveillance préemptive par ELISpot des virus comme CMV, VZV, EBV, et adénovirus pour contrôler l'état immunitaire antiviral des patients et ainsi alléger la durée de leurs traitements.



**Figure 4.1.** Modèle proposé de reconstitution des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> suivant la transplantation de sang de cordon ombilical. Le greffon de sang de cordon ombilical est composé de répertoires de lymphocytes T naïfs arborant une diversité et un potentiel fonctionnel importants. Une fois transférés chez le patient ou stimulés *in vitro*, ces répertoires subissent une déletion clonale dramatique et la majorité d'entre eux se différencient en lymphocytes T effecteurs terminaux (EMRA). Une grande partie exprime le marqueur d'épuisement PD-1 et ils ne sont pas capables de monter des réponses antivirales protectrices pendant les trois premiers mois post-greffe. Cette population issue du greffon semble disparaître totalement peu après 6 mois post-greffe alors qu'une deuxième vague de lymphocytes T issue de la thymopoïèse et caractérisée par une augmentation de la diversité et l'apparition de réponses protectrices anti-virales émerge. La qualité de la reconstitution de la première vague de lymphocytes T semble avoir aussi des conséquences sur le risque de développer des rechutes de leucémie. Il faut donc absolument la cibler pour améliorer la survie des enfants transplantés. Les lymphocytes T portant des TCR différents sont représentés de couleurs différentes. La courbe en rouge représente le niveau de protection antivirale. La courbe pointillée représente le niveau conféré par le greffon. CM : central mémoire, EM : effecteur mémoire. Ds : indice de Simpson de diversité des TCR.

# Références

- Agnellini, P., P. Wolint, M. Rehr, J. Cahenzli, U. Karrer, and A. Oxenius. 2007. Impaired NFAT nuclear translocation results in split exhaustion of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell functions during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4565-4570.
- Akbar, A.N., and S.M. Henson. 2011. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat Rev Immunol* 11:289-295.
- Alanio, C., F. Lemaitre, H.K. Law, M. Hasan, and M.L. Albert. 2010. Enumeration of human antigen-specific naive CD8<sup>+</sup> T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood* 115:3718-3725.
- Alatrakchi, N., C.S. Graham, H.J. van der Vliet, K.E. Sherman, M.A. Exley, and M.J. Koziel. 2007. Hepatitis C virus (HCV)-specific CD8<sup>+</sup> cells produce transforming growth factor beta that can suppress HCV-specific T-cell responses. *J Virol* 81:5882-5892.
- Alfonso, C., and L. Karlsson. 2000. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 18:113-142.
- Almanza, G., A. Fernandez, S. Volinia, X. Cortez-Gonzalez, C.M. Croce, and M. Zanetti. 2010. Selected microRNAs define cell fate determination of murine central memory CD8 T cells. *PLoS One* 5:e11243.
- Almeida, J.R., D.A. Price, L. Papagno, Z.A. Arkoub, D. Sauce, E. Bornstein, T.E. Asher, A. Samri, A. Schnuriger, I. Theodorou, D. Costagliola, C. Rouzioux, H. Agut, A.G. Marcelin, D. Douek, B. Autran, and V. Appay. 2007. Superior control of HIV-1 replication by CD8<sup>+</sup> T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med* 204:2473-2485.
- Altman, J.D., P.A. Moss, P.J. Goulder, D.H. Barouch, M.G. McHeyzer-Williams, J.I. Bell, A.J. McMichael, and M.M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94-96.
- Amigorena, S., and A. Savina. 2010. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 22:109-117.
- Anderson, M.S., E.S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S.P. Berzins, S.J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis. 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298:1395-1401.
- Appay, V., and M.C. Iglesias. 2011. Antigen sensitivity and T-cell receptor avidity as critical determinants of HIV control. *Curr Opin HIV AIDS* 6:157-162.
- Appay, V., R.A. van Lier, F. Sallusto, and M. Roederer. 2008. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 73:975-983.
- Arstila, T.P., A. Casrouge, V. Baron, J. Even, J. Kanellopoulos, and P. Kourilsky. 1999. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 286:958-961.
- Arvin, A.M. 1992. Cell-mediated immunity to varicella-zoster virus. *J Infect Dis* 166 Suppl 1:S35-41.
- Arvin, A.M. 2000. Varicella-Zoster virus: pathogenesis, immunity, and clinical management in hematopoietic cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 6:219-230.
- Arvin, A.M., M. Sharp, S. Smith, C.M. Koropchak, P.S. Diaz, P. Kinchington, W. Ruyechan, and J. Hay. 1991. Equivalent recognition of a varicella-zoster virus immediate early protein (IE62) and glycoprotein I by cytotoxic T lymphocytes of either CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> phenotype. *J Immunol* 146:257-264.

- Asanuma, H., M. Sharp, H.T. Maecker, V.C. Maino, and A.M. Arvin. 2000. Frequencies of memory T cells specific for varicella-zoster virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus by intracellular detection of cytokine expression. *J Infect Dis* 181:859-866.
- Baerlocher, G.M., I. Vulto, G. de Jong, and P.M. Lansdorp. 2006. Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat Protoc* 1:2365-2376.
- Baldwin, K.K., B.P. Trenchak, J.D. Altman, and M.M. Davis. 1999. Negative selection of T cells occurs throughout thymic development. *J Immunol* 163:689-698.
- Ballen, K.K., T.R. Spitzer, B.Y. Yeap, S. McAfee, B.R. Dey, E. Attar, R. Haspel, G. Kao, D. Liney, E. Alyea, S. Lee, C. Cutler, V. Ho, R. Soiffer, and J.H. Antin. 2007. Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol Blood Marrow Transplant* 13:82-89.
- Barbey, C., P. Baumgaertner, E. Devevre, V. Rubio-Godoy, L. Derre, G. Bricard, P. Guillaume, I.F. Luescher, D. Lienard, J.C. Cerottini, P. Romero, N. Rufer, and D.E. Speiser. 2007. IL-12 controls cytotoxicity of a novel subset of self-antigen-specific human CD28+ cytolytic T cells. *J Immunol* 178:3566-3574.
- Barker, J.N., R.E. Hough, J.A. van Burik, T.E. DeFor, M.L. MacMillan, M.R. O'Brien, and J.E. Wagner. 2005a. Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source. *Biol Blood Marrow Transplant* 11:362-370.
- Barker, J.N., and J.E. Wagner. 2003. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 3:526-532.
- Barker, J.N., D.J. Weisdorf, T.E. DeFor, B.R. Blazar, P.B. McGlave, J.S. Miller, C.M. Verfaillie, and J.E. Wagner. 2005b. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 105:1343-1347.
- Barlogis, V., L. Glasman, C. Brunet, A.D. Loundou, C. Lemarie, C. Galambrun, I. Thuret, C. Curtillet, M. Le Meignen, F. Bernard, H. Chambost, B. Calmels, C. Picard, C. Chabannon, F. Dignat-George, and G. Michel. 2011. Impact of viable CD45 cells infused on lymphocyte subset recovery after unrelated cord blood transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant* 17:109-116.
- Beck, J.C., J.E. Wagner, T.E. DeFor, C.G. Brunstein, M.R. Schleiss, J.A. Young, D.H. Weisdorf, S. Cooley, J.S. Miller, and M.R. Verneris. 2010. Impact of cytomegalovirus (CMV) reactivation after umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16:215-222.
- Benjamin, D.K., Jr., W.C. Miller, S. Bayliff, L. Martel, K.A. Alexander, and P.L. Martin. 2002. Infections diagnosed in the first year after pediatric stem cell transplantation. *Pediatr Infect Dis J* 21:227-234.
- Bensinger, W.I., C.H. Weaver, F.R. Appelbaum, S. Rowley, T. Demirer, J. Sanders, R. Storb, and C.D. Buckner. 1995. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 85:1655-1658.
- Bergmann, L., C. Miething, U. Maurer, J. Brieger, T. Karakas, E. Weidmann, and D. Hoelzer. 1997. High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* 90:1217-1225.
- Berthou, C., S. Legros-Maida, A. Soulie, A. Wargnier, J. Guillet, C. Rabian, E. Gluckman, and M. Sasportes. 1995. Cord blood T lymphocytes lack constitutive perforin expression in contrast to adult peripheral blood T lymphocytes. *Blood* 85:1540-1546.
- Bhadra, R., J.P. Gigley, L.M. Weiss, and I.A. Khan. 2011. Control of Toxoplasma reactivation by rescue of dysfunctional CD8+ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9196-9201.

- Bianchetti, M.G., C. Roduit, and O.H. Oetliker. 1991. Acyclovir-induced renal failure: course and risk factors. *Pediatr Nephrol* 5:238-239.
- Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1987a. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329:512-518.
- Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1987b. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-512.
- Blackburn, S.D., H. Shin, G.J. Freeman, and E.J. Wherry. 2008. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15016-15021.
- Blazar, B.R., B.M. Carreno, A. Panoskaltsis-Mortari, L. Carter, Y. Iwai, H. Yagita, H. Nishimura, and P.A. Taylor. 2003. Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol* 171:1272-1277.
- Bluestone, J. A., A. K. Abbas. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 253–257.
- Boeckh, M., T.A. Gooley, D. Myerson, T. Cunningham, G. Schoch, and R.A. Bowden. 1996. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood* 88:4063-4071.
- Boeckh, M., H.W. Kim, M.E. Flowers, J.D. Meyers, and R.A. Bowden. 2006. Long-term acyclovir for prevention of varicella zoster virus disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation--a randomized double-blind placebo-controlled study. *Blood* 107:1800-1805.
- Bosco, N., F. Agenes, and R. Ceredig. 2005. Effects of increasing IL-7 availability on lymphocytes during and after lymphopenia-induced proliferation. *J Immunol* 175:162-170.
- Bosi, A., and B. Bartolozzi. 2010. Safety of bone marrow stem cell donation: a review. *Transplant Proc* 42:2192-2194.
- Bouneaud, C., P. Kourilsky, and P. Bousso. 2000. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13:829-840.
- Bourgeois, C., and B. Stockinger. 2006. T cell homeostasis in steady state and lymphopenic conditions. *Immunol Lett* 107:89-92.
- Brahmamdam, P., S. Inoue, J. Unsinger, K.C. Chang, J.E. McDunn, and R.S. Hotchkiss. 2010. Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *J Leukoc Biol* 88:233-240.
- Brahmer, J.R., C.G. Drake, I. Wollner, J.D. Powderly, J. Picus, W.H. Sharfman, E. Stankevich, A. Pons, T.M. Salay, T.L. McMiller, M.M. Gilson, C. Wang, M. Selby, J.M. Taube, R. Anders, L. Chen, A.J. Korman, D.M. Pardoll, I. Lowy, and S.L. Topalian. 2010. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28:3167-3175.
- Brenchley, J.M., N.J. Karandikar, M.R. Betts, D.R. Ambrozak, B.J. Hill, L.E. Crotty, J.P. Casazza, J. Kuruppu, S.A. Migueles, M. Connors, M. Roederer, D.C. Douek, and R.A. Koup. 2003. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* 101:2711-2720.
- Brigden, D., A.E. Rosling, and N.C. Woods. 1982. Renal function after acyclovir intravenous injection. *Am J Med* 73:182-185.



- Broady, R., J. Yu, and M.K. Levings. 2009. ATG-induced expression of FOXP3 in human CD4(+) T cells in vitro is associated with T-cell activation and not the induction of FOXP3(+) T regulatory cells. *Blood* 114:5003-5006.
- Brown, J.A., K. Stevenson, H.T. Kim, C. Cutler, K. Ballen, S. McDonough, C. Reynolds, M. Herrera, D. Liney, V. Ho, G. Kao, P. Armand, J. Koreth, E. Alyea, S. McAfee, E. Attar, B. Dey, T. Spitzer, R. Soiffer, J. Ritz, J.H. Antin, and V.A. Boussiotis. 2010. Clearance of CMV viremia and survival after double umbilical cord blood transplantation in adults depends on reconstitution of thymopoiesis. *Blood* 115:4111-4119.
- Broxmeyer, H.E., G.W. Douglas, G. Hangoc, S. Cooper, J. Bard, D. English, M. Arny, L. Thomas, and E.A. Boyse. 1989. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3828-3832.
- Brunell, P.A. 1992. Varicella in pregnancy, the fetus, and the newborn: problems in management. *J Infect Dis* 166 Suppl 1:S42-47.
- Brunstein, C.G., K.S. Baker, and J.E. Wagner. 2007a. Umbilical cord blood transplantation for myeloid malignancies. *Curr Opin Hematol* 14:162-169.
- Brunstein, C.G., J.N. Barker, D.J. Weisdorf, T.E. DeFor, J.S. Miller, B.R. Blazar, P.B. McGlave, and J.E. Wagner. 2007b. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood* 110:3064-3070.
- Buckner, C.D., R.A. Clift, J.E. Sanders, P. Stewart, W.I. Bensinger, K.C. Doney, K.M. Sullivan, R.P. Witherspoon, H.J. Deeg, F.R. Appelbaum, and et al. 1984. Marrow harvesting from normal donors. *Blood* 64:630-634.
- Burchett, S.K., L. Corey, K.M. Mohan, J. Westall, R. Ashley, and C.B. Wilson. 1992. Diminished interferon-gamma and lymphocyte proliferation in neonatal and postpartum primary herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* 165:813-818.
- Burke, M.J., R.I. Vogel, S.K. Janardan, C. Brunstein, A.R. Smith, J.S. Miller, D. Weisdorf, J.E. Wagner, and M.R. Verneris. 2010. Early Lymphocyte Recovery and Outcomes after Umbilical Cord Blood Transplantation (UCBT) for Hematologic Malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*
- Canque, B., S. Camus, A. Dalloul, E. Kahn, M. Yagello, C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, C. Schmitt, and J.C. Gluckman. 2000. Characterization of dendritic cell differentiation pathways from cord blood CD34(+)CD7(+)CD45RA(+) hematopoietic progenitor cells. *Blood* 96:3748-3756.
- Carrington, M., and S.J. O'Brien. 2003. The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu Rev Med* 54:535-551.
- Chalmers, I.M., G. Janossy, M. Contreras, and C. Navarrete. 1998. Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes. *Blood* 92:11-18.
- Champagne, P., G.S. Ogg, A.S. King, C. Knabenhans, K. Ellefsen, M. Nobile, V. Appay, G.P. Rizzardi, S. Fleury, M. Lipp, R. Forster, S. Rowland-Jones, R.P. Sekaly, A.J. McMichael, and G. Pantaleo. 2001. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410:106-111.
- Charak, B.S., E.G. Brown, and A. Mazumder. 1995. Augmentation of murine hematopoiesis by interleukin 2-activated irradiated T cells. *Transplantation* 60:589-594.
- Chothia, C., D.R. Boswell, and A.M. Lesk. 1988. The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *EMBO J* 7:3745-3755.
- Clark, E.M., D.S. Joshi, A.B. Grimm, A.D. Joshi, P. Wang, and S.S. Joshi. 2010. Ultrastructural basis of enhanced antitumor cytotoxicity of cord blood-derived CTLs: a comparative analysis with peripheral blood and bone marrow. *Int J Oncol* 37:645-653.

- Claverie, J.M., A. Prochnicka-Chalufour, and L. Bougueleret. 1989. Implications of a Fab-like structure for the T-cell receptor. *Immunol Today* 10:10-14.
- Cohen, G., S.L. Carter, K.I. Weinberg, B. Masinsin, E. Guinan, J. Kurtzberg, J.E. Wagner, N.A. Kernan, and R. Parkman. 2006. Antigen-specific T-lymphocyte function after cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:1335-1342.
- Collins, E.J., D.N. Garboczi, and D.C. Wiley. 1994. Three-dimensional structure of a peptide extending from one end of a class I MHC binding site. *Nature* 371:626-629.
- Coulie, P.G., V. Brichard, A. Van Pel, T. Wolfel, J. Schneider, C. Traversari, S. Mattei, E. De Plaen, C. Lurquin, J.P. Szikora, J.C. Renauld, and T. Boon. 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 180:35-42.
- Crisa, L., V. Cirulli, K.A. Smith, M.H. Ellisman, B.E. Torbett, and D.R. Salomon. 1999. Human cord blood progenitors sustain thymic T-cell development and a novel form of angiogenesis. *Blood* 94:3928-3940.
- Crotty S. 2011. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 29:621-663.
- Cupedo, T., M. Nagasawa, K. Weijer, B. Blom, and H. Spits. 2005. Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. *Eur J Immunol* 35:383-390.
- Curran, M.A., W. Montalvo, H. Yagita, and J.P. Allison. 2010. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4275-4280.
- Dalle, J.H., M. Duval, A. Moghrabi, E. Wagner, M.F. Vachon, S. Barrette, M. Bernstein, J. Champagne, M. David, J. Demers, P. Rousseau, R. Winikoff, and M.A. Champagne. 2004. Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 33:605-611.
- Darrah, P.A., D.T. Patel, P.M. De Luca, R.W. Lindsay, D.F. Davey, B.J. Flynn, S.T. Hoff, P. Andersen, S.G. Reed, S.L. Morris, M. Roederer, and R.A. Seder. 2007. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med* 13:843-850.
- Davis, C.C., L.C. Marti, G.D. Sempowski, D.A. Jeyaraj, and P. Szabo. 2010. Interleukin-7 permits Th1/Tc1 maturation and promotes ex vivo expansion of cord blood T cells: a critical step toward adoptive immunotherapy after cord blood transplantation. *Cancer Res* 70:5249-5258.
- Davis, M.M., and P.J. Bjorkman. 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334:395-402.
- Davison, A.J., and J.E. Scott. 1986. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J Gen Virol* 67 ( Pt 9):1759-1816.
- Day, C.L., D.E. Kaufmann, P. Kiepiela, J.A. Brown, E.S. Moodley, S. Reddy, E.W. Mackey, J.D. Miller, A.J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E.J. Wherry, H.M. Coovadia, P.J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G.J. Freeman, and B.D. Walker. 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443:350-354.
- Del Blanco, B., J.L. Roberts, N. Zamarreno, N. Balmelle-Devaux, and C. Hernandez-Munain. 2009. Flexible stereospecific interactions and composition within nucleoprotein complexes assembled on the TCR alpha gene enhancer. *J Immunol* 183:1871-1883.
- Distler, E., E. Schnurer, E. Wagner, C. von Auer, B. Plachter, D. Wehler, C. Huber, K. Kolbe, R.G. Meyer, and W. Herr. 2008. Recovery of varicella-zoster virus-specific T cell immunity after T cell-depleted allogeneic transplantation requires symptomatic virus reactivation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:1417-1424.
- Dotti, G. 2009. Blocking PD-1 in cancer immunotherapy. *Blood* 114:1457-1458.

- Douek, D.C., R.D. McFarland, P.H. Keiser, E.A. Gage, J.M. Massey, B.F. Haynes, M.A. Polis, A.T. Haase, M.B. Feinberg, J.L. Sullivan, B.D. Jamieson, J.A. Zack, L.J. Picker, and R.A. Koup. 1998. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396:690-695.
- Douek, D.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. 2000. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 355:1875-1881.
- Duraiswamy, J., C.C. Ibegbu, D. Masopust, J.D. Miller, K. Araki, G.H. Doho, P. Tata, S. Gupta, M.J. Zilliox, H.I. Nakaya, B. Pulendran, W.N. Haining, G.J. Freeman, and R. Ahmed. 2011. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J Immunol* 186:4200-4212.
- Dutoit, V., P. Guillaume, P. Romero, J.C. Cerottini, and D. Valmori. 2002a. Functional analysis of HLA-A\*0201/Melan-A peptide multimer+ CD8+ T cells isolated from an HLA-A\*0201- donor: exploring tumor antigen allorestricted recognition. *Cancer Immunol* 2:7.
- Dutoit, V., V. Rubio-Godoy, M.J. Pittet, A. Zippelius, P.Y. Dietrich, F.A. Legal, P. Guillaume, P. Romero, J.C. Cerottini, R.A. Houghten, C. Pinilla, and D. Valmori. 2002b. Degeneracy of antigen recognition as the molecular basis for the high frequency of naive A2/Melan-a peptide multimer(+) CD8(+) T cells in humans. *J Exp Med* 196:207-216.
- Dutton, R.W., L.M. Bradley, and S.L. Swain. 1998. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 16:201-223.
- Duval, M., B. Pedron, P. Rohrlich, F. Legrand, A. Faye, B. Lescoeur, P. Bensaid, R. Larchee, G. Sterkers, and E. Vilmer. 2002. Immune reconstitution after haematopoietic transplantation with two different doses of pre-graft antithymocyte globulin. *Bone Marrow Transplant* 30:421-426.
- Eapen, M., P. Rubinstein, M.J. Zhang, C. Stevens, J. Kurtzberg, A. Scaradavou, F.R. Loberiza, R.E. Champlin, J.P. Klein, M.M. Horowitz, and J.E. Wagner. 2007. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* 369:1947-1954.
- Einsele, H., G. Ehninger, M. Steidle, I. Fischer, S. Bihler, F. Gerneth, A. Vallbracht, H. Schmidt, H.D. Waller, and C.A. Muller. 1993. Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *Blood* 82:1672-1678.
- Einsele, H., and H. Hebart. 1999. Cytomegalovirus infection following stem cell transplantation. *Haematologica* 84 Suppl EHA-4:46-49.
- Eisen, H.N. 2001. Specificity and degeneracy in antigen recognition: yin and yang in the immune system. *Annu Rev Immunol* 19:1-21.
- Eyrich, M., C. Leiler, P. Lang, K. Schilbach, M. Schumm, P. Bader, J. Greil, T. Klingebiel, R. Handgretinger, D. Niethammer, and P.G. Schlegel. 2003. A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34+ peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. *Bone Marrow Transplant* 32:379-390.
- Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H.G. Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290-296.
- Falkenburg, J.H., W.A. Marijt, M.H. Heemskerk, and R. Willemze. 2002. Minor histocompatibility antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions. *Curr Opin Hematol* 9:497-502.
- Falkenburg, J.H., S.A. van Luxemburg-Heijs, F.T. Lim, H.H. Kanhai, and R. Willemze. 1996. Umbilical cord blood contains normal frequencies of cytotoxic T-lymphocyte precursors

- (ctlp) and helper T-lymphocyte precursors against noninherited maternal antigens and noninherited paternal antigens. *Ann Hematol* 72:260-264.
- Ferrara, J.L., K.R. Cooke, L. Pan, and W. Krenger. 1996. The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells* 14:473-489.
- Ferrari, V., C.R. Cacere, C.M. Machado, C.S. Pannuti, F.L. Dulley, J.C. Barros, A.J. Duarte, and G. Benard. 2006. Distinct patterns of regeneration of central memory, effector memory and effector TCD8+ cell subsets after different hematopoietic cell transplant types: possible influence in the recovery of anti-cytomegalovirus immune response and risk for its reactivation. *Clin Immunol* 119:261-271.
- Finocchi, A., M.L. Romiti, S. Di Cesare, P. Puliafito, S. Pensieroso, I. Rana, R. Pinto, C. Cancrini, G. De Rossi, M. Caniglia, and P. Rossi. 2006. Rapid T-cell receptor CD4+ repertoire reconstitution and immune recovery in unrelated umbilical cord blood transplanted pediatric leukemia patients. *J Pediatr Hematol Oncol* 28:403-411.
- Freeman, G.J., A.J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L.J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M.C. Byrne, H.F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M.R. Bowman, B.M. Carreno, M. Collins, C.R. Wood, and T. Honjo. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192:1027-1034.
- Frey, C.R., M.A. Sharp, A.S. Min, D.S. Schmid, V. Loparev, and A.M. Arvin. 2003. Identification of CD8+ T cell epitopes in the immediate early 62 protein (IE62) of varicella-zoster virus, and evaluation of frequency of CD8+ T cell response to IE62, by use of IE62 peptides after varicella vaccination. *J Infect Dis* 188:40-52.
- Gallez-Hawkins, G.M., L. Thao, J. Palmer, A. Daxis, X. Li, A.E. Franck, B. Tegtmeier, S.F. Lacey, D.J. Diamond, S.J. Forman, and J.A. Zaia. 2009. Increased programmed death-1 molecule expression in cytomegalovirus disease and acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 15:872-880.
- Garba, M.L., C.D. Pilcher, A.L. Bingham, J. Eron, and J.A. Frelinger. 2002. HIV antigens can induce TGF-beta(1)-producing immunoregulatory CD8+ T cells. *J Immunol* 168:2247-2254.
- Garderet, L., N. Dulphy, C. Douay, N. Chalumeau, V. Schaeffer, M.T. Zilber, A. Lim, J. Even, N. Mooney, C. Gelin, E. Gluckman, D. Charron, and A. Toubert. 1998. The umbilical cord blood alphabeta T-cell repertoire: characteristics of a polyclonal and naive but completely formed repertoire. *Blood* 91:340-346.
- Ge, Q., V.P. Rao, B.K. Cho, H.N. Eisen, and J. Chen. 2001. Dependence of lymphopenia-induced T cell proliferation on the abundance of peptide/ MHC epitopes and strength of their interaction with T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1728-1733.
- Geginat, J., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2001. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med* 194:1711-1719.
- Genestier, L., S. Fournel, M. Flacher, O. Assossou, J.P. Revillard, and N. Bonnefoy-Berard. 1998. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 91:2360-2368.
- Gerlach, C., J.W. van Heijst, E. Swart, D. Sie, N. Armstrong, R.M. Kerkhoven, D. Zehn, M.J. Bevan, K. Schepers, and T.N. Schumacher. 2010. One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. *J Exp Med* 207:1235-1246.
- Gilden, D.H., B.K. Kleinschmidt-DeMasters, J.J. LaGuardia, R. Mahalingam, and R.J. Cohrs. 2000. Neurologic complications of the reactivation of varicella-zoster virus. *N Engl J Med* 342:635-645.
- Giustina, A., G. Romanelli, A. Cimino, and G. Brunori. 1988. Low-dose acyclovir and acute renal failure. *Ann Intern Med* 108:312.

- Gluckman, E., H.A. Broxmeyer, A.D. Auerbach, H.S. Friedman, G.W. Douglas, A. Devergie, H. Esperou, D. Thierry, G. Socie, P. Lehn, and et al. 1989. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 321:1174-1178.
- Gluckman, E., V. Rocha, A. Boyer-Chammard, F. Locatelli, W. Arcese, R. Pasquini, J. Ortega, G. Souillet, E. Ferreira, J.P. Laporte, M. Fernandez, and C. Chastang. 1997. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 337:373-381.
- Gluckman E. 2011. Milestones in umbilical cord blood transplantation. *Blood Rev.* [Epub ahead of print].
- Gnann, J.W., Jr. 2002. Varicella-zoster virus: atypical presentations and unusual complications. *J Infect Dis* 186 Suppl 1:S91-98.
- Godfrey, W.R., D.J. Spoden, Y.G. Ge, S.R. Baker, B. Liu, B.L. Levine, C.H. June, B.R. Blazar, and S.B. Porter. 2005. Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 105:750-758.
- Goodrich, J.M., R.A. Bowden, L. Fisher, C. Keller, G. Schoch, and J.D. Meyers. 1993. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med* 118:173-178.
- Gorla, R., P. Airo, P. Ferremi-Leali, G. Rossi, E. Prati, D. Brugnani, and R. Cattaneo. 1993. Predominance of 'memory' phenotype within CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 11:346-347.
- Goronzy, J.J., and C.M. Weyand. 2005. T cell development and receptor diversity during aging. *Curr Opin Immunol* 17:468-475.
- Goulmy, E. 1997. Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol Rev* 157:125-140.
- Gratama, J.W., A.M. Wursch, C. Nissen, A. Gratwohl, J. D'Amaro, G.C. de Gast, J.J. van Rood, and B. Speck. 1986. Influence of graft-versus-host disease prophylaxis on early T-lymphocyte regeneration following allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 62:355-365.
- Grupp, S.A., J.W. Stern, N. Bunin, C. Nancarrow, A.A. Ross, M. Mogul, R. Adams, H.E. Grier, J.B. Gorlin, R. Shamberger, K. Marcus, D. Neuberg, H.J. Weinstein, and L. Diller. 2000. Tandem high-dose therapy in rapid sequence for children with high-risk neuroblastoma. *J Clin Oncol* 18:2567-2575.
- Gutman, J.A., C.J. Turtle, T.J. Manley, S. Heimfeld, I.D. Bernstein, S.R. Riddell, and C. Delaney. 2010. Single-unit dominance after double-unit umbilical cord blood transplantation coincides with a specific CD8+ T-cell response against the nonengrafted unit. *Blood* 115:757-765.
- Haczku, A., A. Alexander, P. Brown, B. Assoufi, B. Li, A.B. Kay, and C. Corrigan. 1994. The effect of dexamethasone, cyclosporine, and rapamycin on T-lymphocyte proliferation in vitro: comparison of cells from patients with glucocorticoid-sensitive and glucocorticoid-resistant chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 93:510-519.
- Hakim, F.T., R. Cepeda, S. Kaimei, C.L. Mackall, N. McAtee, J. Zujewski, K. Cowan, and R.E. Gress. 1997. Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. *Blood* 90:3789-3798.
- Hamann, D., P.A. Baars, M.H. Rep, B. Hooibrink, S.R. Kerkhof-Garde, M.R. Klein, and R.A. van Lier. 1997. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 186:1407-1418.

- Hamilton, S.E., and S.C. Jameson. 2008. The nature of the lymphopenic environment dictates protective function of homeostatic-memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18484-18489.
- Hamilton, S.E., M.C. Wolkers, S.P. Schoenberger, and S.C. Jameson. 2006. The generation of protective memory-like CD8<sup>+</sup> T cells during homeostatic proliferation requires CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* 7:475-481.
- Hamza, N.S., M. Lisgaris, G. Yadavalli, L. Nadeau, R. Fox, P. Fu, H.M. Lazarus, O.N. Koc, R.A. Salata, and M.J. Laughlin. 2004. Kinetics of myeloid and lymphocyte recovery and infectious complications after unrelated umbilical cord blood versus HLA-matched unrelated donor allogeneic transplantation in adults. *Br J Haematol* 124:488-498.
- Hanley, P.J., C.R. Cruz, B. Savoldo, A.M. Leen, M. Stanojevic, M. Khalil, W. Decker, J.J. Mollrem, H. Liu, A.P. Gee, C.M. Rooney, H.E. Heslop, G. Dotti, M.K. Brenner, E.J. Shpall, and C.M. Bollard. 2009. 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* 114:1958-1967.
- Harari, A., V. Dutoit, C. Cellera, P.A. Bart, R.A. Du Pasquier, and G. Pantaleo. 2006. Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev* 211:236-254.
- Harari, A., S.C. Zimmerli, and G. Pantaleo. 2004. Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Hum Immunol* 65:500-506.
- Harris, D.T., J. LoCascio, and F.J. Besencon. 1994. Analysis of the alloreactive capacity of human umbilical cord blood: implications for graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 14:545-553.
- Harris, D.T., M.J. Schumacher, J. Locascio, F.J. Besencon, G.B. Olson, D. DeLuca, L. Shenker, J. Bard, and E.A. Boyse. 1992. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10006-10010.
- Hayward, A.R., O. Pontesilli, M. Herberger, M. Laszlo, and M. Levin. 1986. Specific lysis of varicella zoster virus-infected B lymphoblasts by human T cells. *J Virol* 58:179-184.
- Hexner, E.O., G.A. Danet-Desnoyers, Y. Zhang, D.M. Frank, J.L. Riley, B.L. Levine, D.L. Porter, C.H. June, and S.G. Emerson. 2007. Umbilical cord blood xenografts in immunodeficient mice reveal that T cells enhance hematopoietic engraftment beyond overcoming immune barriers by stimulating stem cell differentiation. *Biol Blood Marrow Transplant* 13:1135-1144.
- Ho, V.T., and R.J. Soiffer. 2001. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 98:3192-3204.
- Hogquist, K.A., T.A. Baldwin, and S.C. Jameson. 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 5:772-782.
- Holm, M., F.O. Pettersen, and D. Kvale. 2008. PD-1 predicts CD4 loss rate in chronic HIV-1 infection better than HIV RNA and CD38 but not in cryopreserved samples. *Curr HIV Res* 6:49-58.
- Houde, M., S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante, M.F. Princiotta, P. Thibault, D. Sacks, and M. Desjardins. 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425:402-406.
- Housset, D., and B. Malissen. 2003. What do TCR-pMHC crystal structures teach us about MHC restriction and alloreactivity? *Trends Immunol* 24:429-437.
- Htwe, T.H., S. Bergman, and J. Koirala. 2008. Famciclovir substitution for patients with acyclovir-associated renal toxicity. *J Infect* 57:266-268.

- Huisman, C., R.A. de Weger, L. de Vries, M.G. Tilanus, and L.F. Verdonck. 2007. Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 39:285-291.
- Huseby, E.S., J. White, F. Crawford, T. Vass, D. Becker, C. Pinilla, P. Marrack, and J.W. Kappler. 2005. How the T cell repertoire becomes peptide and MHC specific. *Cell* 122:247-260.
- Ignatowicz, L., J. Kappler, and P. Marrack. 1996. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* 84:521-529.
- Inoue, K., H. Ogawa, Y. Sonoda, T. Kimura, H. Sakabe, Y. Oka, S. Miyake, H. Tamaki, Y. Oji, T. Yamagami, T. Tatekawa, T. Soma, T. Kishimoto, and H. Sugiyama. 1997. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 89:1405-1412.
- Inoue, K., H. Sugiyama, H. Ogawa, M. Nakagawa, T. Yamagami, H. Miwa, K. Kita, A. Hiraoka, T. Masaoka, K. Nasu, and et al. 1994. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 84:3071-3079.
- Ishaqi, M.K., S. Afzal, A. Dupuis, J. Doyle, and A. Gassas. 2008. Early lymphocyte recovery post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with significant graft-versus-leukemia effect without increase in graft-versus-host disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 41:245-252.
- Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 11:3887-3895.
- Janas, M.L., G. Varano, K. Gudmundsson, M. Noda, T. Nagasawa, and M. Turner. 2010. Thymic development beyond beta-selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4. *J Exp Med* 207:247-261.
- Jenkins, M.K., H.H. Chu, J.B. McLachlan, and J.J. Moon. 2010. On the composition of the preimmune repertoire of T cells specific for Peptide-major histocompatibility complex ligands. *Annu Rev Immunol* 28:275-294.
- Jiang, Z., G.B. Adams, A.M. Hanash, D.T. Scadden, and R.B. Levy. 2002. The contribution of cytotoxic and noncytotoxic function by donor T-cells that support engraftment after allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 8:588-596.
- Jimenez, M., C. Martinez, G. Ercilla, E. Carreras, A. Urbano-Ispizua, M. Aymerich, N. Villamor, N. Amezcaga, M. Rovira, F. Fernandez-Aviles, and E. Montserrat. 2006. Clinical factors influencing T-cell receptor excision circle (TRECs) counts following allogeneic stem cell transplantation in adults. *Transpl Immunol* 16:52-59.
- Jones, L., A.P. Black, G.N. Malavige, and G.S. Ogg. 2006. Persistent high frequencies of varicella-zoster virus ORF4 protein-specific CD4+ T cells after primary infection. *J Virol* 80:9772-9778.
- Jones, L., A.P. Black, G.N. Malavige, and G.S. Ogg. 2007. Phenotypic analysis of human CD4+ T cells specific for immediate-early 63 protein of varicella-zoster virus. *Eur J Immunol* 37:3393-3403.
- Joshi, N.S., and S.M. Kaeche. 2008. Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation. *J Immunol* 180:1309-1315.
- Joshi, S.S., N.N. Babushkina-Patz, D.J. Verbik, T.G. Gross, S.R. Tarantolo, C.A. Kuszynski, S.J. Pirruccello, M.R. Bishop, and A. Kessinger. 1998. Antitumor activity of human umbilical cord blood cells: A comparative analysis with peripheral blood and bone marrow cells. *Int J Oncol* 13:791-799.
- Joshi, S.S., S.R. Tarantolo, C.A. Kuszynski, and A. Kessinger. 2000. Antitumor therapeutic potential of activated human umbilical cord blood cells against leukemia and breast cancer. *Clin Cancer Res* 6:4351-4358.

- Junge, S., B. Kloeckener-Gruissem, R. Zufferey, A. Keisker, B. Salgo, J.C. Fauchere, F. Scherer, T. Shalaby, M. Grotzer, U. Siler, R. Seger, and T. Gungor. 2007. Correlation between recent thymic emigrants and CD31+ (PECAM-1) CD4+ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur J Immunol* 37:3270-3280.
- Kadereit, S., G.R. Junge, T. Kleen, M.M. Kozik, B.A. Kaminski, K. Daum-Woods, P. Fu, M. Tary-Lehmann, and M.J. Laughlin. 2003. Deficient IFN-gamma expression in umbilical cord blood (UCB) T cells can be rescued by IFN-gamma-mediated increase in NFATc2 expression. *J Clin Immunol* 23:485-497.
- Kallies, A., A. Xin, G.T. Belz, and S.L. Nutt. 2009. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity* 31:283-295.
- Kaminski, B.A., S. Kadereit, R.E. Miller, P. Leahy, K.R. Stein, D.A. Topa, T. Radivoyevitch, M.L. Veigl, and M.J. Laughlin. 2003. Reduced expression of NFAT-associated genes in UCB versus adult CD4+ T lymphocytes during primary stimulation. *Blood* 102:4608-4617.
- Kansu, E. 2004. The pathophysiology of chronic graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 79:209-215.
- Kao, C., K.J. Oestreich, M.A. Paley, A. Crawford, J.M. Angelosanto, M.A. Ali, A.M. Intlekofer, J.M. Boss, S.L. Reiner, A.S. Weinmann, and E.J. Wherry. 2011. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8(+) T cell responses during chronic infection. *Nat Immunol*
- Kato, N., J. Tanaka, J. Sugita, T. Toubai, Y. Miura, M. Ibata, Y. Syono, S. Ota, T. Kondo, M. Asaka, and M. Imamura. 2007. Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia* 21:2103-2108.
- Kawakami, Y., S. Eliyahu, C.H. Delgado, P.F. Robbins, L. Rivoltini, S.L. Topalian, T. Miki, and S.A. Rosenberg. 1994a. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3515-3519.
- Kawakami, Y., S. Eliyahu, K. Sakaguchi, P.F. Robbins, L. Rivoltini, J.R. Yannelli, E. Appella, and S.A. Rosenberg. 1994b. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 180:347-352.
- Keil, F., E. Prinz, K. Moser, C. Mannhalter, P. Kalhs, N. Worel, W. Rabitsch, A. Schulenburg, M. Mitterbauer, and H. Greinix. 2003. Rapid establishment of long-term culture-initiating cells of donor origin after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, and significant prognostic impact of donor T-cell chimerism on stable engraftment and progression-free survival. *Transplantation* 76:230-236.
- Keir, M.E., M.J. Butte, G.J. Freeman, and A.H. Sharpe. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26:677-704.
- Kern, F., N. Faulhaber, C. Frommel, E. Khatamzas, S. Prosch, C. Schonemann, I. Kretzschmar, R. Volkmer-Engert, H.D. Volk, and P. Reinke. 2000. Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol* 30:1676-1682.
- Kim, D.H., J.G. Kim, S.K. Sohn, W.J. Sung, J.S. Suh, K.S. Lee, and K.B. Lee. 2004. Clinical impact of early absolute lymphocyte count after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 125:217-224.
- Kim, T.K., L.S. St John, E.D. Wieder, J. Khalili, Q. Ma, and K.V. Komanduri. 2009. Human late memory CD8+ T cells have a distinct cytokine signature characterized by CC chemokine production without IL-2 production. *J Immunol* 183:6167-6174.



- Kimmig, S., G.K. Przybylski, C.A. Schmidt, K. Laurisch, B. Mowes, A. Radbruch and A. Thiel. 2002. Two subsets of naive T helper cells with distinct T-cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med* 195:789–794.
- Klein, A.K., D.D. Patel, M.E. Gooding, G.D. Sempowski, B.J. Chen, C. Liu, J. Kurtzberg, B.F. Haynes, and N.J. Chao. 2001. T-Cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 7:454-466.
- Kloosterboer, F.M., S.A. van Luxemburg-Heijs, R. Willemze, and J.H. Falkenburg. 2006. Similar potential to become activated and proliferate but differential kinetics and profiles of cytokine production of umbilical cord blood T cells and adult blood naive and memory T cells. *Hum Immunol* 67:874-883.
- Knudtzon, S. 1974. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 43:357-361.
- Koc, Y., K.B. Miller, D.P. Schenkein, J. Griffith, M. Akhtar, J. DesJardin, and D.R. Snyderman. 2000. Varicella zoster virus infections following allogeneic bone marrow transplantation: frequency, risk factors, and clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 6:44-49.
- Koestner, W., M. Hapke, J. Herbst, C. Klein, K. Welte, J. Fruehauf, A. Flatley, D.A. Vignali, M. Hardtke-Wolenski, E. Jaeckel, B.R. Blazar, and M.G. Sauer. 2011. PD-L1 blockade effectively restores strong graft-versus-leukemia effects without graft-versus-host disease after delayed adoptive transfer of T-cell receptor gene-engineered allogeneic CD8+ T cells. *Blood* 117:1030-1041.
- Komanduri, K.V., L.S. St John, M. de Lima, J. McMannis, S. Rosinski, I. McNiece, S.G. Bryan, I. Kaur, S. Martin, E.D. Wieder, L. Worth, L.J. Cooper, D. Petropoulos, J.J. Molldrem, R.E. Champlin, and E.J. Shpall. 2007. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood* 110:4543-4551.
- Kondo, E., Y. Akatsuka, K. Kuzushima, K. Tsujimura, S. Asakura, K. Tajima, Y. Kagami, Y. Kodera, M. Tanimoto, Y. Morishima, and T. Takahashi. 2004. Identification of novel CTL epitopes of CMV-pp65 presented by a variety of HLA alleles. *Blood* 103:630-638.
- Kondo, K., H. Kaneshima, and E.S. Mocarski. 1994. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11879-11883.
- Kost, R.G., and S.E. Straus. 1996. Postherpetic neuralgia--pathogenesis, treatment, and prevention. *N Engl J Med* 335:32-42.
- Krenger, W., B.R. Blazar, and G.A. Hollander. 2011. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood*
- Krenger, W., and J.L. Ferrara. 1996. Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol Res* 15:50-73.
- Krogstad, P., P.M. Mendelman, V.L. Miller, C. Clausen, S. Abbott, S. Weagant, C.L. Wilson, and D.B. Lewis. 1992. Clinical and microbiologic characteristics of cutaneous infection with *Yersinia enterocolitica*. *J Infect Dis* 165:740-743.
- Ku, C.C., L. Zerboni, H. Ito, B.S. Graham, M. Wallace, and A.M. Arvin. 2004. Varicella-zoster virus transfer to skin by T Cells and modulation of viral replication by epidermal cell interferon-alpha. *J Exp Med* 200:917-925.
- Kumanovics, A., T. Takada, and K.F. Lindahl. 2003. Genomic organization of the mammalian MHC. *Annu Rev Immunol* 21:629-657.
- Kumar, S., M.G. Chen, D.A. Gastineau, M.A. Gertz, D.J. Inwards, M.Q. Lacy, A. Tefferi, and M.R. Litzow. 2003. Lymphocyte recovery after allogeneic bone marrow transplantation predicts risk of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 17:1865-1870.
- Kurtzberg, J., V.K. Prasad, S.L. Carter, J.E. Wagner, L.A. Baxter-Lowe, D. Wall, N. Kapoor, E.C. Guinan, S.A. Feig, E.L. Wagner, and N.A. Kernan. 2008. Results of the Cord Blood Transplantation Study (COBLT): clinical outcomes of unrelated donor umbilical cord

- blood transplantation in pediatric patients with hematologic malignancies. *Blood* 112:4318-4327.
- Landolfo, S., M. Gariglio, G. Gribaudo, and D. Lembo. 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 98:269-297.
- Lankat-Buttgereit, B., and R. Tampe. 2002. The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiol Rev* 82:187-204.
- Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2005. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 17:326-332.
- Laport, G.G., B.M. Sandmaier, B.E. Storer, B.L. Scott, M.J. Stuart, T. Lange, M.B. Maris, E.D. Agura, T.R. Chauncey, R.M. Wong, S.J. Forman, F.B. Petersen, J.C. Wade, E. Epner, B. Bruno, W.A. Bethge, P.T. Curtin, D.G. Maloney, K.G. Blume, and R.F. Storb. 2008. Reduced-intensity conditioning followed by allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult patients with myelodysplastic syndrome and myeloproliferative disorders. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:246-255.
- Le Blanc, K., A.J. Barrett, M. Schaffer, H. Hagglund, P. Ljungman, O. Ringden, and M. Remberger. 2009. Lymphocyte recovery is a major determinant of outcome after matched unrelated myeloablative transplantation for myelogenous malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 15:1108-1115.
- Le, R.Q., J.J. Melenhorst, M. Battiwalla, B. Hill, S. Memon, B.N. Savani, A. Shenoy, N.F. Hensel, E.K. Koklanaris, K. Keyvanfar, F.T. Hakim, D.C. Douek, and A.J. Barrett. 2011. Evolution of the donor T-cell repertoire in recipients in the second decade after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 117:5250-5256.
- Lederhuber, H., K. Baer, I. Altiok, K. Sadeghi, K.R. Herkner, and D.C. Kasper. 2011. MicroRNA-146: tiny player in neonatal innate immunity? *Neonatology* 99:51-56.
- Leung, W., M. Ramirez, G. Mukherjee, E.J. Perlman, and C.I. Civin. 1999. Comparisons of alloreactive potential of clinical hematopoietic grafts. *Transplantation* 68:628-635.
- Lichterfeld, M., D. Mou, T.D. Cung, K.L. Williams, M.T. Waring, J. Huang, F. Pereyra, A. Trocha, G.J. Freeman, E.S. Rosenberg, B.D. Walker, and X.G. Yu. 2008. Telomerase activity of HIV-1-specific CD8+ T cells: constitutive up-regulation in controllers and selective increase by blockade of PD ligand 1 in progressors. *Blood* 112:3679-3687.
- Lin, S.J., C.D. Peacock, K. Bahl, and R.M. Welsh. 2007. Programmed death-1 (PD-1) defines a transient and dysfunctional oligoclonal T cell population in acute homeostatic proliferation. *J Exp Med* 204:2321-2333.
- Lipton, J.M. 2003. Peripheral blood as a stem cell source for hematopoietic cell transplantation in children: is the effort in vein? *Pediatr Transplant* 7 Suppl 3:65-70.
- Litman, G.W., M.K. Anderson, and J.P. Rast. 1999. Evolution of antigen binding receptors. *Annu Rev Immunol* 17:109-147.
- Locatelli, F., R. Maccario, P. Comoli, F. Bertolini, G. Giorgiani, D. Montagna, F. Bonetti, P. De Stefano, G. Rondini, G. Sirchia, and F. Severi. 1996. Hematopoietic and immune recovery after transplantation of cord blood progenitor cells in children. *Bone Marrow Transplant* 18:1095-1101.
- Locksley, R.M., N. Flournoy, K.M. Sullivan, and J.D. Meyers. 1985. Infection with varicella-zoster virus after marrow transplantation. *J Infect Dis* 152:1172-1181.
- Mackall, C.L., C.V. Bare, L.A. Granger, S.O. Sharrow, J.A. Titus, and R.E. Gress. 1996. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol* 156:4609-4616.
- MacMillan, M.L., D.J. Weisdorf, C.G. Brunstein, Q. Cao, T.E. DeFor, M.R. Verneris, B.R. Blazar, and J.E. Wagner. 2009. Acute graft-versus-host disease after unrelated donor umbilical cord blood transplantation: analysis of risk factors. *Blood* 113:2410-2415.

- Madden, D.R., D.N. Garboczi, and D.C. Wiley. 1993. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* 75:693-708.
- Madden, D.R., J.C. Gorga, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1991. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 353:321-325.
- Maillard, I., L. Tu, A. Sambandam, Y. Yashiro-Ohtani, J. Millholland, K. Keeshan, O. Shestova, L. Xu, A. Bhandoola, and W.S. Pear. 2006. The requirement for Notch signaling at the beta-selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor. *J Exp Med* 203:2239-2245.
- Makedonas, G., N. Hutnick, D. Haney, A.C. Amick, J. Gardner, G. Cosma, A.R. Hersperger, D. Dolfi, E.J. Wherry, G. Ferrari, and M.R. Betts. 2010. Perforin and IL-2 upregulation define qualitative differences among highly functional virus-specific human CD8 T cells. *PLoS Pathog* 6:e1000798.
- Malette, B., Rousseau, C., Laferrière, C. 2011, in preparation. Quantification of cytomegalovirus in various biological samples using a new quality-controlled duplex QPCR: Performance vs. other commercial assays and four year prospective study in an immunosuppressed pediatric patient population.
- Malhotra, I., A.N. Wamachi, P.L. Mungai, E. Mzungu, D. Koech, E. Muchiri, A.M. Moormann, and C.L. King. 2008. Fine specificity of neonatal lymphocytes to an abundant malaria blood-stage antigen: epitope mapping of Plasmodium falciparum MSP1(33). *J Immunol* 180:3383-3390.
- Marchant, A., and M. Goldman. 2005. T cell-mediated immune responses in human newborns: ready to learn? *Clin Exp Immunol* 141:10-18.
- Marijt, W.A., N.A. Kernan, T. Diaz-Barrientos, W.F. Veenhof, R.J. O'Reilly, R. Willemze, and J.H. Falkenburg. 1995. Multiple minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones can be generated during graft rejection after HLA-identical bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 16:125-132.
- Marrack, P., J.P. Scott-Browne, S. Dai, L. Gapin, and J.W. Kappler. 2008. Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annu Rev Immunol* 26:171-203.
- Martin, P.J. 1990. The role of donor lymphoid cells in allogeneic marrow engraftment. *Bone Marrow Transplant* 6:283-289.
- Martins, G., and K. Calame. 2008. Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 26:133-169.
- Martins, V.C., T. Boehm, and C.C. Bleul. 2008. Ltbetar signaling does not regulate Aire-dependent transcripts in medullary thymic epithelial cells. *J Immunol* 181:400-407.
- Mason, D. 1998. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T cell receptor. *Immunol Today* 19:395-404.
- Matthay, K.K., J.G. Villablanca, R.C. Seeger, D.O. Stram, R.E. Harris, N.K. Ramsay, P. Swift, H. Shimada, C.T. Black, G.M. Brodeur, R.B. Gerbing, and C.P. Reynolds. 1999. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* 341:1165-1173.
- Mattsson, J., O. Ringden, and R. Storb. 2008. Graft Failure after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:165-170.
- Mazur, M.A., C.C. Davis, and P. Szabolcs. 2008. Ex vivo expansion and Th1/Tc1 maturation of umbilical cord blood T cells by CD3/CD28 costimulation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:1190-1196.
- McCaughy, T.M., M.S. Wilken, and K.A. Hogquist. 2007. Thymic emigration revisited. *J Exp Med* 204:2513-2520.

- Melenhorst, J.J., P. Scheinberg, A. Williams, D.R. Ambrozak, K. Keyvanfar, M. Smith, J.P. McCoy, Jr., N.F. Hensel, D.C. Douek, and A.J. Barrett. 2011. Alloreactivity Across HLA Barriers Is Mediated by Both Naive and Antigen-Experienced T Cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 17:800-809.
- Menssen, H.D., H.J. Renkl, U. Rodeck, J. Maurer, M. Notter, S. Schwartz, R. Reinhardt, and E. Thiel. 1995. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 9:1060-1067.
- Merindol, N., M.A. Champagne, M. Duval, and H. Soudeyns. 2011a. CD8+ T cell reconstitution in recipients of umbilical cord blood transplant and characteristics associated with leukemic relapse. *Blood* 118:4480-4488.
- Merindol, N., E. Charrier, M. Duval, and H. Soudeyns. 2011b. Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation. *J Leukoc Biol* 90:49-60.
- Merindol, N., A.J. Grenier, M. Caty, E. Charrier, A. Duval, M. Duval, M.A. Champagne, and H. Soudeyns. 2010. Umbilical cord blood T cells respond against the Melan-A/MART-1 tumor antigen and exhibit reduced alloreactivity as compared with adult blood-derived T cells. *J Immunol* 185:856-866.
- Merindol, N., I. Salem Fourati, R.M. Brito, A.J. Grenier, E. Charrier, P. Cordeiro, M. Caty, S. Mezziani, B. Mallette, M. Duval, C. Alfieri, P. Ovetckine, F. Le Deist, and H. Soudeyns. 2011c. Protective reconstitution against CMV and VZV does not require disease development in umbilical cord blood pediatric recipients. *In preparation*
- Merkerova, M., A. Vasikova, M. Belickova, and H. Bruchova. 2010. MicroRNA expression profiles in umbilical cord blood cell lineages. *Stem Cells Dev* 19:17-26.
- Meyers, J.D., N. Flournoy, and E.D. Thomas. 1980. Cell-mediated immunity to varicella-zoster virus after allogeneic marrow transplant. *J Infect Dis* 141:479-487.
- Michel, G., V. Rocha, S. Chevret, W. Arcese, K.W. Chan, A. Filipovich, T.A. Takahashi, M. Vowels, J. Ortega, P. Bordigoni, P.J. Shaw, I. Yaniv, A. Machado, P. Pimentel, F. Fagioli, A. Verdeguer, J.P. Jouet, B. Diez, E. Ferreira, R. Pasquini, J. Rosenthal, E. Sievers, C. Messina, A.P. Iori, F. Garnier, I. Ionescu, F. Locatelli, and E. Gluckman. 2003. Unrelated cord blood transplantation for childhood acute myeloid leukemia: a Eurocord Group analysis. *Blood* 102:4290-4297.
- Micklethwaite, K.P., B. Savoldo, P.J. Hanley, A.M. Leen, G.J. Demmler-Harrison, L.J. Cooper, H. Liu, A.P. Gee, E.J. Shpall, C.M. Rooney, H.E. Heslop, M.K. Brenner, C.M. Bollard, and G. Dotti. 2010. Derivation of human T lymphocytes from cord blood and peripheral blood with antiviral and antileukemic specificity from a single culture as protection against infection and relapse after stem cell transplantation. *Blood* 115:2695-2703.
- Mikulska, M., A.M. Raiola, P. Bruzzi, R. Varaldo, S. Annunziata, T. Lamparelli, F. Frassoni, E. Tedone, B. Galano, A. Bacigalupo, and C. Viscoli. 2011. CMV Infection After Transplant from Cord Blood Compared to Other Alternative Donors: The Importance of Donor-Negative CMV Serostatus. *Biol Blood Marrow Transplant*
- Mold, J.E., J. Michaelsson, T.D. Burt, M.O. Muench, K.P. Beckerman, M.P. Busch, T.H. Lee, D.F. Nixon, and J.M. McCune. 2008. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* 322:1562-1565.
- Mold, J.E., S. Venkatasubrahmanyam, T.D. Burt, J. Michaelsson, J.M. Rivera, S.A. Galkina, K. Weinberg, C.A. Stoddart, and J.M. McCune. 2010. Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. *Science* 330:1695-1699.
- Mommaas, B., J.A. Stegehuis-Kamp, A.G. van Halteren, M. Kester, J. Enczmann, P. Wernet, G. Kogler, T. Mutis, A. Brand, and E. Goulmy. 2005. Cord blood comprises antigen-

- experienced T cells specific for maternal minor histocompatibility antigen HA-1. *Blood* 105:1823-1827.
- Moretta, A., R. Maccario, F. Fagioli, E. Giraldi, A. Busca, D. Montagna, R. Miniero, P. Comoli, G. Giorgiani, M. Zecca, S. Pagani, and F. Locatelli. 2001. Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp Hematol* 29:371-379.
- Morita, C.T., C.M. Parker, M.B. Brenner, and H. Band. 1994. TCR usage and functional capabilities of human gamma delta T cells at birth. *J Immunol* 153:3979-3988.
- Muller, A.M., J.A. Linderman, M. Florek, D. Miklos, and J.A. Shizuru. 2010. Allogeneic T cells impair engraftment and hematopoiesis after stem cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:14721-14726.
- Mumprecht, S., C. Schurch, J. Schwaller, M. Solenthaler, and A.F. Ochsenbein. 2009. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* 114:1528-1536.
- Murohara, T., H. Ikeda, J. Duan, S. Shintani, K. Sasaki, H. Eguchi, I. Onitsuka, K. Matsui, and T. Imaizumi. 2000. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105:1527-1536.
- Nagamine, K., P. Peterson, H.S. Scott, J. Kudoh, S. Minoshima, M. Heino, K.J. Krohn, M.D. Lalioti, P.E. Mullis, S.E. Antonarakis, K. Kawasaki, S. Asakawa, F. Ito, and N. Shimizu. 1997. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 17:393-398.
- Napolitano, L.A., D. Schmidt, M.B. Gotway, N. Ameli, E.L. Filbert, M.M. Ng, J.L. Clor, L. Epling, E. Sinclair, P.D. Baum, K. Li, M.L. Killian, P. Bacchetti, and J.M. McCune. 2008. Growth hormone enhances thymic function in HIV-1-infected adults. *J Clin Invest* 118:1085-1098.
- Niehues, T., V. Rocha, A.H. Filipovich, K.W. Chan, R. Porcher, G. Michel, J.J. Ortega, P. Wernet, U. Gobel, E. Gluckman, and F. Locatelli. 2001. Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children -- a Eurocord analysis. *Br J Haematol* 114:42-48.
- Nikolich-Zugich, J., M.K. Slifka, and I. Messaoudi. 2004. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol* 4:123-132.
- Nishimura, H., M. Nose, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11:141-151.
- Nishimura, H., T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Nakatani, M. Hara, A. Matsumori, S. Sasayama, A. Mizoguchi, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291:319-322.
- Nonoyama, S., L.A. Penix, C.P. Edwards, D.B. Lewis, S. Ito, A. Aruffo, C.B. Wilson, and H.D. Ochs. 1995. Diminished expression of CD40 ligand by activated neonatal T cells. *J Clin Invest* 95:66-75.
- Norde, W.J., F. Maas, W. Hobo, A. Korman, M. Quigley, M.G. Kester, K. Hebeda, J.H. Falkenburg, N. Schaap, T.M. de Witte, R. van der Voort, and H. Dolstra. 2011. PD-1/PD-L1 interactions contribute to functional T cell impairment in patients that relapse with cancer after allogeneic stem cell transplantation. *Cancer Res*
- Nurieva, R., S. Thomas, T. Nguyen, N. Martin-Orozco, Y. Wang, M.K. Kaja, X.Z. Yu, and C. Dong. 2006. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J* 25:2623-2633.
- Ochs, L.A., W.J. Miller, A.H. Filipovich, R.J. Haake, P.B. McGlave, B.R. Blazar, N.K. Ramsay, J.H. Kersey, and D.J. Weisdorf. 1994. Predictive factors for chronic graft-versus-host disease after histocompatible sibling donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 13:455-460.

- Ohashi, P.S., H. Pircher, K. Burki, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1990. Distinct sequence of negative or positive selection implied by thymocyte T-cell receptor densities. *Nature* 346:861-863.
- Padovan, E., G. Casorati, P. Dellabona, S. Meyer, M. Brockhaus, and A. Lanzavecchia. 1993. Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science* 262:422-424.
- Palmer, E. 2003. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 3:383-391.
- Paludan, C., D. Schmid, M. Landthaler, M. Vockerodt, D. Kube, T. Tuschl, and C. Munz. 2005. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307:593-596.
- Pamer, E., and P. Cresswell. 1998. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16:323-358.
- Pantaleo, G., and R.A. Koup. 2004. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat Med* 10:806-810.
- Pantelouris, E.M. 1968. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 217:370-371.
- Parkman, R., G. Cohen, S.L. Carter, K.I. Weinberg, B. Masinsin, E. Guinan, J. Kurtzberg, J.E. Wagner, and N.A. Kernan. 2006. Successful immune reconstitution decreases leukemic relapse and improves survival in recipients of unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:919-927.
- Pass, R.F., C. Zhang, A. Evans, T. Simpson, W. Andrews, M.L. Huang, L. Corey, J. Hill, E. Davis, C. Flanigan, and G. Cloud. 2009. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 360:1191-1199.
- Pavletic, Z.S., S.S. Joshi, S.J. Pirruccello, S.R. Tarantolo, J. Kollath, E.C. Reed, P.J. Bierman, J.M. Vose, P.I. Warkentin, T.G. Gross, K. Nasrati, J.O. Armitage, A. Kessinger, and M.R. Bishop. 1998. Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant* 21:33-41.
- Petrie, H.T., F. Livak, D.G. Schatz, A. Strasser, I.N. Crispe, and K. Shortman. 1993. Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J Exp Med* 178:615-622.
- Petrovas, C., J.P. Casazza, J.M. Brenchley, D.A. Price, E. Gostick, W.C. Adams, M.L. Precopio, T. Schacker, M. Roederer, D.C. Douek, and R.A. Koup. 2006. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 203:2281-2292.
- Pilon-Thomas, S., A. Mackay, N. Vohra, and J.J. Mule. 2010. Blockade of programmed death ligand 1 enhances the therapeutic efficacy of combination immunotherapy against melanoma. *J Immunol* 184:3442-3449.
- Pittet, M.J., A. Gati, F.A. Le Gal, G. Bioley, P. Guillaume, M. de Smedt, J. Plum, D.E. Speiser, J.C. Cerottini, P.Y. Dietrich, P. Romero, and A. Zippelius. 2006. Ex vivo characterization of allo-MHC-restricted T cells specific for a single MHC-peptide complex. *J Immunol* 176:2330-2336.
- Pittet, M.J., D. Valmori, P.R. Dunbar, D.E. Speiser, D. Lienard, F. Lejeune, K. Fleischhauer, V. Cerundolo, J.C. Cerottini, and P. Romero. 1999. High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J Exp Med* 190:705-715.
- Pittet, M.J., A. Zippelius, D. Valmori, D.E. Speiser, J.C. Cerottini, and P. Romero. 2002. Melan-A/MART-1-specific CD8 T cells: from thymus to tumor. *Trends Immunol* 23:325-328.
- Preblud, S.R. 1986. Varicella: complications and costs. *Pediatrics* 78:728-735.
- Przepiorka, D., K.W. Chan, R.E. Champlin, S.J. Culbert, D. Petropoulos, C. Ippoliti, I. Khouri, Y.O. Huh, H. Vreisdorff, A.B. Deisseroth, and et al. 1995. Prevention of graft-versus-host disease with anti-CD5 ricin A chain immunotoxin after CD3-depleted HLA-

- nonidentical marrow transplantation in pediatric leukemia patients. *Bone Marrow Transplant* 16:737-741.
- Purton, J.F., J.T. Tan, M.P. Rubinstein, D.M. Kim, J. Sprent, and C.D. Surh. 2007. Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent. *J Exp Med* 204:951-961.
- Regner M. 2001. Cross-reactivity in T-cell antigen recognition. *Immunol Cell Biol* 79:91-100.
- Renard, C., V. Barlogis, V. Mialou, C. Galambrun, D. Bernoux, M.P. Goutagny, L. Glasman, A.D. Loundou, F. Poitevin-Later, F. Dignat-George, V. Dubois, C. Picard, C. Chabannon, Y. Bertrand, and G. Michel. 2011. Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children. *Br J Haematol* 152:322-330.
- Reusser, P., S.R. Riddell, J.D. Meyers, and P.D. Greenberg. 1991. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78:1373-1380.
- Ribeiro-do-Couto, L.M., L.C. Boeijs, J.S. Kroon, B. Hooibrink, B.S. Breur-Vriesendorp, L.A. Aarden, and C.J. Boog. 2001. High IL-13 production by human neonatal T cells: neonate immune system regulator? *Eur J Immunol* 31:3394-3402.
- Rimoldi, D., K. Muehlethaler, S. Salvi, D. Valmori, P. Romero, J.C. Cerottini, and F. Levy. 2001. Subcellular localization of the melanoma-associated protein Melan-AMART-1 influences the processing of its HLA-A2-restricted epitope. *J Biol Chem* 276:43189-43196.
- Risdon, G., J. Gaddy, and H.E. Broxmeyer. 1994a. Allogeneic responses of human umbilical cord blood. *Blood Cells* 20:566-570; discussion 571-562.
- Risdon, G., J. Gaddy, F.B. Stehman, and H.E. Broxmeyer. 1994b. Proliferative and cytotoxic responses of human cord blood T lymphocytes following allogeneic stimulation. *Cell Immunol* 154:14-24.
- Robin, C., A. Bennaceur-Griscelli, F. Louache, W. Vainchenker, and L. Coulombel. 1999. Identification of human T-lymphoid progenitor cells in CD34+ CD38low and CD34+ CD38+ subsets of human cord blood and bone marrow cells using NOD-SCID fetal thymus organ cultures. *Br J Haematol* 104:809-819.
- Rocha, V., J. Cornish, E.L. Sievers, A. Filipovich, F. Locatelli, C. Peters, M. Remberger, G. Michel, W. Arcese, S. Dallorso, K. Tiedemann, A. Busca, K.W. Chan, S. Kato, J. Ortega, M. Vowels, A. Zander, G. Souillet, A. Oakill, A. Woolfrey, A.L. Pay, A. Green, F. Garnier, I. Ionescu, P. Wernet, G. Sirchia, P. Rubinstein, S. Chevret, and E. Gluckman. 2001. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 97:2962-2971.
- Rocha, V., and E. Gluckman. 2006. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:34-41.
- Rocha, V., J.E. Wagner, Jr., K.A. Sobocinski, J.P. Klein, M.J. Zhang, M.M. Horowitz, and E. Gluckman. 2000. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med* 342:1846-1854.
- Romero, P., P.R. Dunbar, D. Valmori, M. Pittet, G.S. Ogg, D. Rimoldi, J.L. Chen, D. Lienard, J.C. Cerottini, and V. Cerundolo. 1998. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 188:1641-1650.
- Romero, P., N. Gervois, J. Schneider, P. Escobar, D. Valmori, C. Pannetier, A. Steinle, T. Wolfel, D. Lienard, V. Brichard, A. van Pel, F. Jotereau, and J.C. Cerottini. 1997. Cytolytic T lymphocyte recognition of the immunodominant HLA-A\*0201-restricted Melan-A/MART-1 antigenic peptide in melanoma. *J Immunol* 159:2366-2374.

- Romero, P., A. Zippelius, I. Kurth, M.J. Pittet, C. Touvrey, E.M. Iancu, P. Corthesy, E. Devedre, D.E. Speiser, and N. Rufer. 2007. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Immunol* 178:4112-4119.
- Rossi, L. R., G. Rossetti, L. Wenandy, S. Curti, A. Ripamonti, R. J. P. Bonnal, R. Sciarretta Birolo, M. Moro, M. C. Crosti, P. Gruarin, S. Maglie, F. Marabita, D. Mascheroni, V. Parente, M. Comelli, E. Trabucchi, R. De Francesco, J. Geginat, S. Abrignani, and M. Pagani. 2011. Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4<sup>+</sup> T cells by the microRNA miR-125b. *Nature Immunology* 12, 796–803.
- Roux, E., F. Dumont-Girard, M. Starobinski, C.A. Siegrist, C. Helg, B. Chapuis, and E. Roosnek. 2000. Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood* 96:2299-2303.
- Rubinstein, P., C. Carrier, A. Scaradavou, J. Kurtzberg, J. Adamson, A.R. Migliaccio, R.L. Berkowitz, M. Cabbad, N.L. Dobrila, P.E. Taylor, R.E. Rosenfield, and C.E. Stevens. 1998. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 339:1565-1577.
- Rubinstein, P., R.E. Rosenfield, J.W. Adamson, and C.E. Stevens. 1993. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* 81:1679-1690.
- Rudolph, M.G., J.A. Speir, A. Brunmark, N. Mattsson, M.R. Jackson, P.A. Peterson, L. Teyton, and I.A. Wilson. 2001. The crystal structures of K(bm1) and K(bm8) reveal that subtle changes in the peptide environment impact thermostability and alloreactivity. *Immunity* 14:231-242.
- Ruggeri, L., M. Capanni, E. Urbani, K. Perruccio, W.D. Shlomchik, A. Tosti, S. Posati, D. Rogaia, F. Frassoni, F. Aversa, M.F. Martelli, and A. Velardi. 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295:2097-2100.
- Sabbaj, S., R.F. Pass, P.A. Goepfert, and S. Pichon. 2011. Glycoprotein B vaccine is capable of boosting both antibody and CD4 T-cell responses to cytomegalovirus in chronically infected women. *J Infect Dis* 203:1534-1541.
- Sadegh-Nasseri, S., S. Natarajan, C.L. Chou, I.Z. Hartman, K. Narayan, and A. Kim. 2010. Conformational heterogeneity of MHC class II induced upon binding to different peptides is a key regulator in antigen presentation and epitope selection. *Immunol Res* 47:56-64.
- Sakuishi, K., L. Apetoh, J.M. Sullivan, B.R. Blazar, V.K. Kuchroo, and A.C. Anderson. 2010. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* 207:2187-2194.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
- Salzberger, B., R.A. Bowden, R.C. Hackman, C. Davis, and M. Boeckh. 1997. Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: risk factors and outcome. *Blood* 90:2502-2508.
- Sauter, C., M. Abboud, X. Jia, G. Heller, A.M. Gonzales, M. Lubin, R. Hawke, M.A. Perales, M.R. van den Brink, S. Giralt, G. Papanicolaou, A. Scaradavou, T.N. Small, and J.N. Barker. 2011. Serious Infection Risk and Immune Recovery after Double-Unit Cord Blood Transplantation Without Antithymocyte Globulin. *Biol Blood Marrow Transplant*
- Schaap, A., J.F. Fortin, M. Sommer, L. Zerboni, S. Stamatidis, C.C. Ku, G.P. Nolan, and A.M. Arvin. 2005. T-cell tropism and the role of ORF66 protein in pathogenesis of varicella-zoster virus infection. *J Virol* 79:12921-12933.
- Schlenner, S.M., V. Madan, K. Busch, A. Tietz, C. Lauffle, C. Costa, C. Blum, H.J. Fehling, and H.R. Rodewald. 2010. Fate mapping reveals separate origins of T cells and myeloid lineages in the thymus. *Immunity* 32:426-436.



- Schlenner, S.M., and H.R. Rodewald. 2010. Early T cell development and the pitfalls of potential. *Trends Immunol* 31:303-310.
- Schluns, K.S., W.C. Kieper, S.C. Jameson, and L. Lefrancois. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1:426-432.
- Schmid, D.A., M.B. Irving, V. Posevitz, M. Hebeisen, A. Posevitz-Fejfar, J.C. Sarria, R. Gomez-Eerland, M. Thome, T.N. Schumacher, P. Romero, D.E. Speiser, V. Zoete, O. Michielin, and N. Rufer. 2010. Evidence for a TCR affinity threshold delimiting maximal CD8 T cell function. *J Immunol* 184:4936-4946.
- Scholz, M., H.W. Doerr, and J. Cinatl. 2003. Human cytomegalovirus retinitis: pathogenicity, immune evasion and persistence. *Trends Microbiol* 11:171-178.
- Scollay, R.G., E.C. Butcher, and I.L. Weissman. 1980. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur J Immunol* 10:210-218.
- Sensi, M., C. Traversari, M. Radrizzani, S. Salvi, C. Maccalli, R. Mortarini, L. Rivoltini, C. Farina, G. Nicolini, T. Wolfel, and et al. 1995. Cytotoxic T-lymphocyte clones from different patients display limited T-cell-receptor variable-region gene usage in HLA-A2-restricted recognition of the melanoma antigen Melan-A/MART-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5674-5678.
- Sharp, M., K. Terada, A. Wilson, S. Nader, P.E. Kinchington, W.T. Ruyechan, J. Hay, and A.M. Arvin. 1992. Kinetics and viral protein specificity of the cytotoxic T lymphocyte response in healthy adults immunized with live attenuated varicella vaccine. *J Infect Dis* 165:852-858.
- Sherman, L.A., and S. Chattopadhyay. 1993. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 11:385-402.
- Shin, H., S.D. Blackburn, A.M. Intlekofer, C. Kao, J.M. Angelosanto, S.L. Reiner, and E.J. Wherry. 2009. A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 31:309-320.
- Shinjoh, M., and T. Takahashi. 2009. Varicella zoster exposure on paediatric wards between 2000 and 2007: safe and effective post-exposure prophylaxis with oral aciclovir. *J Hosp Infect* 72:163-168.
- Shlomchik, W.D., M.S. Couzens, C.B. Tang, J. McNiff, M.E. Robert, J. Liu, M.J. Shlomchik, and S.G. Emerson. 1999. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285:412-415.
- Sideri, A., N. Neokleous, P. Brunet de la Grange, B. Guerton, M.C. Le Bousse Kerdiles, G. Uzan, C. Peste-Tsilimidos, and E. Gluckman. 2011. An overview of the progress on double umbilical cord blood transplantation. *Haematologica*
- Singer, A., S. Adoro, and J.H. Park. 2008. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol* 8:788-801.
- Sliz, P., O. Michielin, J.C. Cerottini, I. Luescher, P. Romero, M. Karplus, and D.C. Wiley. 2001. Crystal structures of two closely related but antigenically distinct HLA-A2/melanocyte-melanoma tumor-antigen peptide complexes. *J Immunol* 167:3276-3284.
- Soong, W., J.C. Schultz, A.C. Patera, M.H. Sommer, and J.I. Cohen. 2000. Infection of human T lymphocytes with varicella-zoster virus: an analysis with viral mutants and clinical isolates. *J Virol* 74:1864-1870.
- Sorrer, M.L., M.B. Maris, B.M. Sandmaier, B.E. Storer, M.J. Stuart, U. Hegenbart, E. Agura, T.R. Chauncey, J. Leis, M. Pulsipher, P. McSweeney, J.P. Radich, C. Bredeson, B. Bruno, A. Langston, M.R. Loken, H. Al-Ali, K.G. Blume, R. Storb, and D.G. Maloney. 2005. Hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for advanced chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 23:3819-3829.

- Spain, L.M., and L.J. Berg. 1992. Developmental regulation of thymocyte susceptibility to deletion by "self"-peptide. *J Exp Med* 176:213-223.
- Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21:139-176.
- Sullivan, L.C., H.L. Hoare, J. McCluskey, J. Rossjohn, and A.G. Brooks. 2006. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. *Trends Immunol* 27:413-420. Review
- Sullivan, B.A., N.A. Nagarajan, G. Wingender, J. Wang, I. Scott, M. Tsuji, R.W. Franck, S.A. Porcelli, D.M. Zajonc, and M. Kronenberg. 2010. Mechanisms for glycolipid antigen-driven cytokine polarization by Valpha14i NKT cells. *J Immunol* 184:141-153.
- Surh, C.D., and J. Sprent. 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372:100-103.
- Svegliati, S., A. Olivieri, N. Campelli, M. Luchetti, A. Poloni, S. Trappolini, G. Moroncini, A. Bacigalupo, P. Leoni, E.V. Avvedimento, and A. Gabrielli. 2007. Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood* 110:237-241.
- Szabolcs, P., K.D. Park, M. Reese, L. Marti, G. Broadwater, and J. Kurtzberg. 2003. Coexistent naive phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood. *Exp Hematol* 31:708-714.
- Taghon, T., and E.V. Rothenberg. 2008. Molecular mechanisms that control mouse and human TCR-alpha and TCR-gamma delta T cell development. *Semin Immunopathol* 30:383-398.
- Takahashi, M., T. Otsuka, Y. Okuno, Y. Asano, and T. Yazaki. 1974. Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. *Lancet* 2:1288-1290.
- Takami, A., K. Mochizuki, H. Asakura, H. Yamazaki, H. Okumura, and S. Nakao. 2005. High incidence of cytomegalovirus reactivation in adult recipients of an unrelated cord blood transplant. *Haematologica* 90:1290-1292.
- Takata, H., and M. Takiguchi. 2006. Three memory subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules. *J Immunol* 177:4330-4340.
- Takahata, Y., A. Nomura, H. Takada, S. Ohga, K. Furuno, S. Hikino, H. Nakayama, S. Sakaguchi, and T. Hara. 2004. CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol* 32:622-629.
- Talvensaari, K., E. Clave, C. Douay, C. Rabian, L. Garderet, M. Busson, F. Garnier, D. Douek, E. Gluckman, D. Charron, and A. Toubert. 2002. A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood* 99:1458-1464.
- Tan, J.T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K.I. Weinberg, and C.D. Surh. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8732-8737.
- Tan, J.T., B. Ernst, W.C. Kieper, E. LeRoy, J. Sprent, and C.D. Surh. 2002. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J Exp Med* 195:1523-1532.
- Terakura, S., E. Azuma, M. Murata, T. Kumamoto, M. Hirayama, Y. Atsuta, Y. Kodaera, M. Yazaki, T. Naoe, and K. Kato. 2007. Hematopoietic engraftment in recipients of unrelated donor umbilical cord blood is affected by the CD34+ and CD8+ cell doses. *Biol Blood Marrow Transplant* 13:822-830.
- Theilgaard-Monch, K., K. Raaschou-Jensen, H. Palm, K. Schjodt, C. Heilmann, L. Vindelov, N. Jacobsen, and E. Dickmeiss. 2001. Flow cytometric assessment of lymphocyte subsets,

- lymphoid progenitors, and hematopoietic stem cells in allogeneic stem cell grafts. *Bone Marrow Transplant* 28:1073-1082.
- Thomson, B.G., K.A. Robertson, D. Gowan, D. Heilman, H.E. Broxmeyer, D. Emanuel, P. Kotylo, Z. Brahmi, and F.O. Smith. 2000. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* 96:2703-2711.
- Tomblyn, M., T. Chiller, H. Einsele, R. Gress, K. Sepkowitz, J. Storek, J.R. Wingard, J.A. Young, and M.J. Boeckh. 2009. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant* 15:1143-1238.
- Tomonari, A., T. Iseki, S. Takahashi, J. Ooi, K. Takasugi, Y. Shimohakamada, N. Ohno, F. Nagamura, K. Uchimarui, K. Tani, A. Tojo, and S. Asano. 2003. Varicella-zoster virus infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. *Br J Haematol* 122:802-805.
- Tomonari, A., S. Takahashi, J. Ooi, N. Tsukada, T. Konuma, S. Kato, S. Kasahara, T. Iseki, T. Yamaguchi, A. Tojo, and S. Asano. 2008. Impact of cytomegalovirus serostatus on outcome of unrelated cord blood transplantation for adults: a single-institute experience in Japan. *Eur J Haematol* 80:251-257.
- Tourne, S., N. Nakano, S. Viville, C. Benoist, and D. Mathis. 1995. The influence of invariant chain on the positive selection of single T cell receptor specificities. *Eur J Immunol* 25:1851-1856.
- Tu, W., S. Chen, M. Sharp, C. Dekker, A.M. Manganello, E.C. Tongson, H.T. Maecker, T.H. Holmes, Z. Wang, G. Kemble, S. Adler, A. Arvin, and D.B. Lewis. 2004. Persistent and selective deficiency of CD4+ T cell immunity to cytomegalovirus in immunocompetent young children. *J Immunol* 172:3260-3267.
- Turner, S.J., K. Kedzierska, H. Komodromou, N.L. La Gruta, M.A. Dunstone, A.I. Webb, R. Webby, H. Walden, W. Xie, J. McCluskey, A.W. Purcell, J. Rossjohn, and P.C. Doherty. 2005. Lack of prominent peptide-major histocompatibility complex features limits repertoire diversity in virus-specific CD8+ T cell populations. *Nat Immunol* 6:382-389.
- Uchida, N., A. Wake, S. Takagi, H. Yamamoto, D. Kato, Y. Matsushashi, T. Matsumura, S. Seo, N. Matsuno, K. Masuoka, E. Kusumi, K. Yuji, S. Miyakoshi, M. Matsuzaki, A. Yoneyama, and S. Taniguchi. 2008. Umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning for elderly patients with hematologic diseases. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:583-590.
- Valmori, D., J.F. Fonteneau, C.M. Lizana, N. Gervois, D. Lienard, D. Rimoldi, V. Jongeneel, F. Jotereau, J.C. Cerottini, and P. Romero. 1998. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* 160:1750-1758.
- van Heeckeren, W.J., L.R. Fanning, H.J. Meyerson, P. Fu, H.M. Lazarus, B.W. Cooper, W.W. Tse, T.L. Kindwall-Keller, J. Jaroscak, M.R. Finney, R.M. Fox, L. Solchaga, M. Forster, R.J. Creger, and M.J. Laughlin. 2007. Influence of human leucocyte antigen disparity and graft lymphocytes on allogeneic engraftment and survival after umbilical cord blood transplant in adults. *Br J Haematol* 139:464-474.
- van Rood, J.J., C.E. Stevens, J. Smits, C. Carrier, C. Carpenter, and A. Scaradavou. 2009. Reexposure of cord blood to noninherited maternal HLA antigens improves transplant outcome in hematological malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19952-19957.
- Vandenbosch, K., P. Ovetchkine, M.A. Champagne, E. Haddad, L. Alexandrov, and M. Duval. 2008. Varicella-zoster virus disease is more frequent after cord blood than after bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:867-871.

- Velu, V., K. Titanji, B. Zhu, S. Husain, A. Pladevega, L. Lai, T.H. Vanderford, L. Chennareddi, G. Silvestri, G.J. Freeman, R. Ahmed, and R.R. Amara. 2009. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* 458:206-210.
- Venanzi, E.S., R. Melamed, D. Mathis, and C. Benoist. 2008. The variable immunological self: genetic variation and nongenetic noise in Aire-regulated transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:15860-15865.
- Venturi, V., D.A. Price, D.C. Douek, and M.P. Davenport. 2008. The molecular basis for public T-cell responses? *Nat Rev Immunol* 8:231-238.
- Virgin, H.W., E.J. Wherry, and R. Ahmed. 2009. Redefining chronic viral infection. *Cell* 138:30-50.
- Voelter, V., N. Rufer, S. Reynard, G. Greub, R. Brookes, P. Guillaume, F. Grosjean, T. Fagerberg, O. Michelin, S. Rowland-Jones, C. Pinilla, S. Leyvraz, P. Romero, and V. Appay. 2008. Characterization of Melan-A reactive memory CD8+ T cells in a healthy donor. *Int Immunol* 20:1087-1096.
- Voogt, P.J., W.E. Fibbe, W.A. Marijt, E. Goulmy, W.F. Veenhof, M. Hamilton, A. Brand, F.E. Zwann, R. Willemze, J.J. van Rood, and et al. 1990. Rejection of bone-marrow graft by recipient-derived cytotoxic T lymphocytes against minor histocompatibility antigens. *Lancet* 335:131-134.
- Wada, H., K. Masuda, R. Satoh, K. Kakugawa, T. Ikawa, Y. Katsura, and H. Kawamoto. 2008. Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature* 452:768-772.
- Wagner, E., M. Duval, J.H. Dalle, H. Morin, S. Bizier, J. Champagne, and M.A. Champagne. 2006. Assessment of cord blood unit characteristics on the day of transplant: comparison with data issued by cord blood banks. *Transfusion* 46:1190-1198.
- Wagner, J.E., J. Rosenthal, R. Sweetman, X.O. Shu, S.M. Davies, N.K. Ramsay, P.B. McGlave, L. Sender, and M.S. Cairo. 1996. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* 88:795-802.
- Waller, E.K., A.A. Langston, S. Lonial, J. Cherry, J. Somani, A.J. Allen, H. Rosenthal, and I. Redei. 2003. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-thymocyte globulin in recipients of partially HLA-matched blood hematopoietic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 9:460-471.
- Wang, S.F., S. Fouquet, M. Chapon, H. Salmon, F. Regnier, K. Labroquere, C. Badoual, D. Damotte, P. Validire, E. Maubec, N.B. Delongchamps, A. Cazes, L. Gibault, M. Garcette, M.C. Dieu-Nosjean, M. Zerbib, M.F. Avril, A. Prevost-Blondel, C. Randriamampita, A. Trautmann, and N. Bercovici. 2011a. Early T cell signalling is reversibly altered in PD-1+ T lymphocytes infiltrating human tumors. *PLoS One* 6:e17621.
- Wang, Y., G. Chen, S. Qiao, X. Ma, X. Tang, A. Sun, and D. Wu. 2011b. Keratinocyte growth factor enhanced immune reconstitution in murine allogeneic umbilical cord blood cell transplant. *Leuk Lymphoma*
- 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. 2001. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 97:1458-1466.
- Weinreich, M.A., and K.A. Hogquist. 2008. Thymic emigration: when and how T cells leave home. *J Immunol* 181:2265-2270.
- Weitzel, R.P., M.L. Lesniewski, P. Haviernik, S. Kadereit, P. Leahy, N.J. Greco, and M.J. Laughlin. 2009. microRNA 184 regulates expression of NFAT1 in umbilical cord blood CD4+ T cells. *Blood* 113:6648-6657.
- Wherry, E.J. 2011. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 13:492-499.

- Wherry, E.J., S.J. Ha, S.M. Kaech, W.N. Haining, S. Sarkar, V. Kalia, S. Subramaniam, J.N. Blattman, D.L. Barber, and R. Ahmed. 2007. Molecular signature of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27:670-684.
- Wilkinson, R.W., G. Anderson, J.J. Owen, and E.J. Jenkinson. 1995. Positive selection of thymocytes involves sustained interactions with the thymic microenvironment. *J Immunol* 155:5234-5240.
- Williams, K.M., F.T. Hakim, and R.E. Gress. 2007. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin Immunol* 19:318-330.
- Wilson, R., R. Read, and P. Cole. 1992. Interaction of Haemophilus influenzae with mucus, cilia, and respiratory epithelium. *J Infect Dis* 165 Suppl 1:S100-102.
- Xu, X.N., M.A. Purbhoo, N. Chen, J. Mongkolsapaya, J.H. Cox, U.C. Meier, S. Tafuro, P.R. Dunbar, A.K. Sewell, C.S. Hourigan, V. Appay, V. Cerundolo, S.R. Burrows, A.J. McMichael, and G.R. Screaton. 2001. A novel approach to antigen-specific deletion of CTL with minimal cellular activation using alpha3 domain mutants of MHC class I/peptide complex. *Immunity* 14:591-602.
- Yakoub-Agha, I., P. Saule, L. Magro, P. Cracco, A. Duhamel, V. Coiteux, B. Bruno, F. Dufosse, J.P. Jouet, J.P. Dessaint, and M. Labalette. 2009. Immune reconstitution following myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the impact of expanding CD28negative CD8<sup>+</sup> T cells on relapse. *Biol Blood Marrow Transplant* 15:496-504.
- Yaneva, R., C. Schneeweiss, M. Zacharias, and S. Springer. 2010. Peptide binding to MHC class I and II proteins: new avenues from new methods. *Mol Immunol* 47:649-657.
- Yewdell, J.W., and J.R. Bennink. 2001. Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 13:13-18.
- York, I.A., and K.L. Rock. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14:369-396.
- Zerboni, L., C.C. Ku, C.D. Jones, J.L. Zehnder, and A.M. Arvin. 2005. Varicella-zoster virus infection of human dorsal root ganglia in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6490-6495.
- Zerrahn, J., W. Held, and D.H. Raulet. 1997. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell* 88:627-636.
- Zhou, D., P. Li, Y. Lin, J.M. Lott, A.D. Hislop, D.H. Canaday, R.R. Brutkiewicz, and J.S. Blum. 2005. Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 22:571-581.
- Zhou, Q., M.E. Munger, R.G. Veenstra, B.J. Weigel, M. Hirashima, D.H. Munn, W.J. Murphy, M. Azuma, A.C. Anderson, V.K. Kuchroo, and B.R. Blazar. 2011. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8<sup>+</sup> T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* 117:4501-4510.
- Zhuravskaya, T., J.P. Maciejewski, D.M. Netski, E. Bruening, F.R. Mackintosh, and S. St Jeor. 1997. Spread of human cytomegalovirus (HCMV) after infection of human hematopoietic progenitor cells: model of HCMV latency. *Blood* 90:2482-2491.
- Zinkernagel, R.M. 2002. On cross-priming of MHC class I-specific CTL: rule or exception? *Eur J Immunol* 32:2385-2392.
- Zippelius, A., M.J. Pittet, P. Batard, N. Rufer, M. de Smedt, P. Guillaume, K. Ellefsen, D. Valmori, D. Lienard, J. Plum, H.R. MacDonald, D.E. Speiser, J.C. Cerottini, and P. Romero. 2002. Thymic selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans. *J Exp Med* 195:485-494.
- Zorn, E., H.T. Kim, S.J. Lee, B.H. Floyd, D. Litsa, S. Arumugarajah, R. Bellucci, E.P. Alyea, J.H. Antin, R.J. Soiffer, and J. Ritz. 2005. Reduced frequency of FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 106:2903-2911.

Zou, Y.R., M.J. Sunshine, I. Taniuchi, F. Hatam, N. Killeen, and D.R. Littman. 2001. Epigenetic silencing of CD4 in T cells committed to the cytotoxic lineage. *Nat Genet* 29:332-336.

# **Annexe**

## COMPLEMENTARY AND CONTRASTING ROLES OF NK CELLS AND T CELLS IN PAEDIATRIC UMBILICAL CORD BLOOD TRANSPLANTATION

Natacha Merindol<sup>\*,¶,1</sup>, Emily Charrier<sup>†,§,||,1</sup>, Michel Duval<sup>†,§,¶</sup>, Hugo Soudeyns<sup>\*,¶,¶,¶</sup>.

\*Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine; †Laboratoire d'immunologie du sang de cordon and ‡Groupe de recherche en transplantation et immunologie du sang de cordon (GRETISC), Centre de cancérologie Charles Bruneau, CHU Sainte-Justine; §Département d'hémo-oncologie, CHU Sainte-Justine; ¶Department of Microbiology and Immunology, ||Biomedical Sciences, and #Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. <sup>1</sup>These authors contributed equally to this manuscript.

**Summary sentence:** T lymphocytes and NK cells contained within umbilical cord blood are transferred to the recipient during transplant and exert an important influence on the outcome of the procedure.

**Running title:** NK cells and T cells in umbilical cord blood transplant.

**Address correspondence to:** Hugo Soudeyns, Unité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Room 6735, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada.

**Key words:** Umbilical cord blood; umbilical cord blood transplantation; NK cells; T lymphocytes; leukemia.

[**Status of this review:** published in Journal of Leukocyte Biology on 2011 Jul; 90(1):49-60].



**Total character count (not including spaces): 25,826. Total figures: 4. Total color figures: 4. Total number of references: 148. Total number of words in abstract: 119. Total number of words in summary sentence: 28.**

## **ABBREVIATIONS PAGE**

ALL: acute lymphoblastic leukemia; AML: acute myeloid leukemia; APC: antigen presenting cell; ATG: anti-thymocyte globulin; BM: bone marrow; BMT: bone marrow transplantation; CML: chronic myeloid leukemia; CMV: Cytomegalovirus; CTL: cytotoxic T lymphocyte; DC: dendritic cell; EBV: Epstein-Barr virus; GvHD: graft *versus* host disease; GvL: graft *versus* leukemia; HE: homeostatic expansion; HLA: human leukocyte antigen; HSC: hematopoietic stem cells; HSV: Herpes simplex virus; ICAM-1: inter-cellular adhesion molecule 1; IFN: interferon; KIR: killer immunoglobulin-like receptor; LFA-1: lymphocyte function associated antigen 1; LSA: leukemia-specific antigen; mHAg: minor histocompatibility antigen; MHC: major histocompatibility complex; MIC: MHC class I chain related protein; NIMA: non-inherited maternal antigen; NMDP: national marrow donor program; NK: natural killer; OI: opportunistic infection; PD-1: programmed death-1; TCR: T cell receptor; TGF: tumour growth factor; UCB: umbilical cord blood; UCBT: umbilical cord blood transplantation; VZV: varicella-zoster virus.

## **ABSTRACT**

Umbilical cord blood (UCB) transplantation (UCBT) has been used for almost 25 years to treat a variety of malignant and non-malignant childhood diseases. The biological properties of NK cells and T cells and their implication in engraftment, immune reconstitution, opportunistic infections, leukemic relapse and graft versus host disease (GvHD) have been explored in the context of UCBT. These studies have established that lymphocytes have a major impact on outcome of UCBT and that NK cells and T cells play complementary and contrasting roles in immune reconstitution and the graft *versus* leukemia (GvL) effect. Therefore, novel strategies to improve outcome of UCBT recipients, including immunotherapeutic regimens, should be based on key immunologic features of UCB T lymphocytes and NK cells.

## INTRODUCTION

Umbilical cord blood (UCB) is increasingly being used in children as a source of haematopoietic stem cells (HSC) to treat malignant diseases, immunodeficiency, inborn errors of metabolism, and congenital or acquired anaemia [1-3]. In 2009, 1056 UCB transplantations (UCBT) were overseen by the National Marrow Donor Program (NMDP), representing 22% of the total number of NMDP transplants that year and an increase of 18% over 2008 [4]. UCBT has several advantages over unrelated bone marrow transplantation (BMT) (Table 1). One of its major benefits is the lower incidence of acute graft-*versus*-host disease (GvHD) as compared with BMT, particularly in the case where UCB is fully matched to the recipient or only one human leukocyte antigen (HLA) locus is mismatched [5-7]. As a consequence, UCB grafts are readily available for 70 % of subjects who have no access to a compatible sibling's bone marrow. Other advantages include a lower risk of transmitting viral infections from donor to recipient [2, 8], improvement of ethnic balance by banking UCB rather than relying on volunteer donors, and shorter time from decision to transplant [9,10]. In addition, risks for the donor are nonexistent. However, UCBT also has significant drawbacks (Table 1). First, the number of hematopoietic progenitors is limited, as UCB units contain 1 to 2 log<sub>10</sub> fewer nucleated cells than BM units [3]. For this reason, UCBT was initially restricted to paediatric patients. Second, myeloid reconstitution is slower following UCBT and engraftment is delayed [2, 5, 11, 12]. Third, opportunistic infections (OI) are a major cause of morbidity and mortality, particularly in the initial 100 days following UCBT [2, 13, 14]. Finally, the incidence of leukemic relapse (approximately 20 % at 2 years) and GvHD (approximately 20 % of acute and chronic GvHD) impacts overall survival, even though these complications are less frequent than following BMT [6, 15, 16]. Hence, key challenges remain to overcome these limitations that

include the development of novel immunotherapeutic strategies to improve engraftment and decrease the incidence of leukemic relapse without increasing the frequency or the severity of the GvHD. This review examines the properties of T cells and NK cells, with particular emphasis on their influence in engraftment, control of OIs, acute GvHD, and the graft versus leukemia (GvL) effect in paediatric UCB transplanted patients.

### **Reconstitution of T lymphocytes and NK cells following UCBT**

Previous studies on bone marrow and peripheral blood transplant recipients have established that rapid lymphocyte recovery is associated with better outcome [17-21]. In children, lymphoid reconstitution following UCBT resembles that which follows BMT [22-24] and is positively influenced by the CD45<sup>+</sup> cell dose contained in the UCB units [25]. The phenotype of NK cells from UCB is different from that of their adult counterparts (Table 2): they express low levels of ICAM-1, CD161, CD57, CD8, and killer immunoglobulin-like receptors (KIR), and higher levels of NKG2A, IFN- $\gamma$ , granzyme B and perforin. HLA-E is the ligand of NKG2A, HLA-C1 is a functionally-important ligand of KIR2DL2 and KIR2DL3, HLA-C2 is recognized by KIR2DL1, and HLA-Bw4 is recognized by KIR3DL1 [26, 27]. UCB-derived NK cells are highly responsive to stimulation by IL-2, IL-7, IL12, IL-15, and IL-18. They possess high proliferative capacity but low cytotoxicity in absence of these cytokines [28, 29]. UCB NK cells undergo extensive homeostatic expansion (HE) and their counts reach normal levels as early as 1 month post-transplantation [10, 20, 22, 30, 31]. They may represent up to 80% of peripheral blood lymphocytes during the first 100 days post-transplant (Figure 1). Early NK cell recovery is characterized by a transient predominance of CD56<sup>bright</sup> lymphocytes (precursors of CD56<sup>dim</sup> NK cells). These cells preferentially

express inhibitory receptor NKG2A, are poorly cytolytic, but possess a high potential for production of cytokines, including interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [30, 32-34]. Functional CD56<sup>dim</sup> KIR<sup>+</sup> NK cells then emerge that can express both perforin/granzyme and Fas/FasL-mediated cytotoxic activity [24, 35]. Overall, NK cell recovery following UCBT is generally rapid and complete in quantitative and qualitative terms.

UCB T cells are predominantly of a naïve phenotype and their repertoire is fully diversified (Table 2) [36, 37]. In lymphodepleted hosts, the overwhelming majority of T cells that emerge during the first 100 days post-UCBT are peripherally-expanding graft-derived T lymphocytes (Figure 1). By itself, HE in lymphopenic recipients generates a narrow T cell repertoire with skewed distribution of T cell receptor (TCR)  $\beta$  chain CDR3 length. Normal levels of clonal diversity are never attained before the initiation of thymopoiesis [38, 39]. Furthermore, HE leads to the differentiation of naïve T cells into terminally-differentiated effectors (EMRA; CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) that display significant cytotoxic activity but an enhanced susceptibility to apoptosis [37, 40]. This contrasts with the largely « memory-like » phenotype (CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) of T cells observed early on following BMT [38, 41, 42]. Moving forward from the 100-days window, naïve CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T cells become progressively more prevalent, as a second wave of T cells repopulate the periphery as a result of *de novo* thymopoiesis (Figure 1). Thymus-dependent T cell reconstitution is gradual and the numbers of thymus-derived T cells usually do not reach normal range until 9 months following UCBT, although normal proliferative responses to mitogens are typically reached at 6 months [11]. In the absence of significant GvHD, this pathway leads to the restoration of a functional T cell compartment, with full repertoire diversity generally achieved within 1 year in paediatric recipients [23, 24, 39, 43, 44, 45, 46]. Interestingly,

Talvensaari *et al.* observed that greater TCR repertoire diversity was attained in UCBT recipients as compared with BMT recipients 2 years after transplant [43]. This could be related to the fact that lymphoid, myeloid and endothelial progenitors present in UCB differentiate more efficiently than their BM counterparts, leading to efficient thymopoiesis and qualitative improvements in the peripheral T cell repertoire [44, 47-50]. Thus, while early T cell reconstitution following UCBT is qualitatively different in terms of subset composition, as compared to what is observed after BMT, both HSC sources generally lead to the generation of a diversified T cell compartment in the long term.

#### **Involvement of T and NK cells in engraftment and graft failure.**

Efficient immune reconstitution requires engraftment of donor-derived HSC and their maintenance in the graft recipient. Graft failure may result from lack of initial engraftment and/or from the loss of donor cells subsequent to engraftment (graft rejection). Engraftment failure is usually a direct consequence of low cellular dose, including lymphocytes [2, 8]. As the majority of UCBT involve HLA mismatch and low HSC dose, engraftment (measured by neutrophil and granulocyte reconstitution) is delayed and graft failure is a comparatively frequent complication (10-15% following UCBT *versus* 1-2% following BMT) [6, 15]. Moreover, the effect of HLA mismatch is most detrimental when graft cell dose is low [6, 15]. Increasing the cellular dose by transplanting double, partially matched UCB units leads to significant improvements in hematologic recovery in older children and adults even if immune reconstitution remains problematic [51-55].

In contrast, graft rejection is an active process that leads to the elimination of donor cells following their recognition as non-self (recognition of HLA and/or minor histocompatibility antigens [mHAgs]). T lymphocytes and NK cells from the *recipient* can actively impair the engraftment of donor HSC and part of the conditioning regimen aims to deplete recipient lymphocytes to avoid graft rejection [56, 57, 58]. Anti-thymocyte globulin (ATG) is often administered as part of the conditioning regimen to deplete recipient T cells [50]. Meanwhile, T lymphocytes and NK cells from the *donor* have a positive impact on engraftment, as both total nucleated cell dose and CD45<sup>+</sup> cell counts are predictive of the kinetics of myeloid engraftment following UCBT [2]. In mice, infusion of activated NK cells early after BMT is associated with faster engraftment and decreased rates of graft failure [59-61]. This effect has been attributed to the cytotoxic activity of NK cells directed against recipient hematopoietic cells. NK cell cytotoxicity is triggered when inhibitory KIR no longer recognize the presence of self HLA class I at the surface of potential target cells [62]. Work on mouse models and clinical studies alike demonstrated that when KIR and KIR ligands are mismatched, alloreactive donor NK cells facilitate engraftment by killing recipient antigen presenting cells (APCs) and T cells that survived the conditioning regimen [63]. Hence, donor NKs can improve the rate of successful engraftment and accelerate its kinetics following HSCT. Whether such an effect can be observed in humans in the context of UCBT is presently unclear [64, 65]. Indeed, Willemze *et al.* reported no beneficial effect of KIR-ligand mismatch on engraftment or chimerism following UCBT [64]. Nevertheless, UCB NK cells are competent to trigger alloreactive cytotoxicity, as baseline expression levels of granzyme B and perforin *ex vivo* are higher in UCB NK cells as compared to adult NK cells and levels of IFN- $\gamma$  production are similar. While cytolytic activity displayed by fresh non-stimulated UCB NK cells is significantly inferior to that of adult NK cells (Table 2) [65], this activity can be readily restored by stimulation with IL-2, IL-12 and IL-15 and is enhanced by direct cell-

surface binding of ATG [66-70]. Moreover, *ex vivo* expansion with IL-2 enables UCB NK cells to form lytic immunological synapses [71]. Thus, KIR-KIR ligand mismatch protocols and/or pre-treatment of the UCB graft or isolated lymphocyte subsets with cytokines could represent potential immunotherapeutic means to improve both the rate and the kinetics of engraftment following UCBT.

CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell doses in the graft were positively correlated with engraftment in UCBT recipients [72, 73]. Similar to NK cells, T lymphocytes of donor origin contribute to the prevention of graft rejection by depleting residual immunological effectors in the graft recipient, leading to efficient establishment of complete donor chimerism that eases achievement of full immune recovery [74]. T cells also facilitate engraftment at and beyond the level of HSCs, an effect that could involve T cell-derived cytokines, cell-to-cell contact, and/or stimulation of HSC differentiation [74-77]. HLA-A and HLA-B play a central role in antigen recognition by CD8<sup>+</sup> T cells [78]. Engraftment can be accelerated by matching recipients for the donor's non-inherited maternal HLA antigens (NIMA), suggesting that NIMA-specific T cells present in UCB are activated upon re-exposure to cognate antigen in the recipient, though the mechanism(s) involved must be further investigated [79]. On the other hand, T cell function depends on antigen specificity and can be deleterious. Muller *et al.* recently reported that mature T cells specific for a minor antigen present in the graft inoculum delayed HSC engraftment [80]. However, this would be unlikely to occur in UCBT, where the large majority of T lymphocytes display a naïve phenotype. Because the capacity of T cells and NK cells to facilitate engraftment largely depends on the numbers of cells transferred into the recipient [6], new strategies to improve UCB engraftment should



involve treatments that selectively eliminate host immune effectors while sparing donor-derived T and NK cells.

### **T cells, NK cells and the control of opportunistic infections.**

UCBT is associated with increased risks of OI, accounting for > 50% of the mortality following UCBT in children, with the majority of events occurring within the 100-days window [2, 14]. Beyond this point, OI-related mortality in UCBT recipients equates that observed in HLA-matched or one-mismatch BMT recipients [2, 14]. Hence, procedures aimed at reducing OI-associated morbidity and mortality should principally target the 100-days window [81]. Bacteria are frequent causes of OI after UCBT and risks are higher in patients with graft failure, highlighting the importance of proper immune reconstitution [14, 82] (Figure 1). Viral infections with cytomegalovirus (CMV) and Epstein-Barr virus (EBV) are particularly prevalent in the immediate post-transplant period. Up to 20% of UCBT recipients experience CMV infections associated with unfavorable outcomes in the first 6 months post-transplant, a higher proportion than that observed following BMT [83]. UCBT recipients are also at higher risk of developing adenoviral infections [84]. In addition, *de novo* infection or reactivation of varicella zoster virus (VZV) occurs in as much as 63% of UCBT recipients, and takes place more frequently--and later--than following BMT [85, 86]. UCBT recipient with rapid recovery of absolute lymphocyte counts have a lower risk of OIs, highlighting the role of lymphocytes in fighting infection [82, 87]. However, comparative studies suggest that there is no significant difference in the incidence of severe fungal infections among children following UCBT or BMT [14, 82], suggesting that immunological

impairment of the T cell compartment observed following UCBT is restricted to specific components of the T cell repertoire.

Higher NK cell doses in BM or peripheral blood grafts were associated with decreased incidence of viral OIs [88, 89]. Given the rapid functional NK reconstitution following UCBT, an efficient NK-mediated control of viral infections would be expected in UCBT recipients. However, while KIR-ligand mismatch generally has a positive effect on outcome of allogeneic HSCT, two recent studies on comparatively large series showed increased frequency of OI-related mortality in KIR-ligand mismatched UCBT recipients, a difference which in one case reached statistical significance [64, 65]. Thus, efficient NK cell recovery in a KIR-mismatched context may in fact aggravate OI-associated outcomes, perhaps *via* destruction of host APCs and/or interference with T cell recovery (competition for growth factors).

100 days roughly corresponds to the time required for T cells generated *de novo via* thymopoiesis to become detectable in transplanted subjects. Similar to what is observed in BMT, UCB-derived T cells could theoretically provide protection against OIs during the time required for emerging post-thymic T cells to begin replenish the peripheral pool. In a longitudinal analysis of T cell responses to *Herpes simplex virus* (HSV), VZV and CMV in children with malignancies over the first 4 years post-UCBT, Cohen *et al.* reported that 43 % of UCBT recipients developed T cell responses against 1 or more of these pathogens during the 100-days window, and that the presence of these responses decreased the likelihood of OI-related mortality in UCBT recipients [90]. These results indicate that naive T

lymphocytes transferred in the UCB graft can give rise to antigen-specific T cell-mediated immunity *before* thymic recovery. However, the protection afforded by these inoculum-derived T cells is not entirely effective. One possible explanation is that HE of UCB-derived T lymphocytes during immune reconstitution leads to the formation of a skewed T cell repertoire with limited responsiveness against newly-encountered antigens. Increased expression of programmed death 1 (PD-1) could also be responsible for functional impairment of T lymphocytes. This was observed in CMV disease following allogeneic HSCT, consistent with apoptosis and/or clonal exhaustion of graft-derived CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell effectors [91, 92]. Finally, the higher incidence of VZV disease following UCBT *versus* BMT and its delayed presentation (*i.e.* past the 100-days window) are puzzling. It is possible that the late manifestations of VZV-associated OIs reflect the role of T lymphocytes in the pathogenesis of *Herpes zoster* as opposed to a problem related to functional reconstitution of the T cell compartment *per se* [84, 85]. Indeed, T cells can be productively infected with VZV and are thought to mediate transfer of the virus from the dorsal root ganglia to other peripheral sites during cutaneous and visceral VZV dissemination [93-98].

In summary, the incidence of OIs is high during the first 100 days post-UCBT despite early and functional NK recovery. This highlights the limited participation of NK cells in antiviral defences, even in the context of KIR mismatch. The relative antiviral efficacy of UCB-derived T lymphocytes observed in some patients provides experimental support for the development of strategies to improve protection against OIs by exploiting the antimicrobial potential of UCB T cells. In particular, protocols based on adoptive transfer of T cell lines or clones to protect HSCT recipients against common OI-associated pathogens during the early

post-transplant period have achieved a measurable degree of success [99-104]. Approaches aimed at accelerating T cell reconstitution should likewise be investigated.

### **Involvement of T and NK cells in GvHD.**

Acute GvHD develops in 3 phases: a) host tissues are damaged by inflammation resulting from conditioning regimens; b) recipient and donor-derived APCs and inflammatory cytokines trigger activation of donor-derived T cells, which expand into differentiated effectors; and c) activated donor T cells mediate cytotoxicity against host target cells (Figure 2) [105, 106]. Acute GvHD is thought to represent a Th1/Tc1 type of immunopathology based on the predominance of cytotoxic T lymphocyte (CTL)-mediated tissue injury and of increased production of Th1 cytokines, including IL-2, IL-12, and IFN- $\gamma$  [107]. All UCBT recipients receive GvHD prophylaxis (typically cyclosporine A and/or methotrexate and methylprednisolone). However, while efficient at preventing GvHD, these pharmaceutical agents impair the functional reconstitution of T cells and may have an impact on engraftment and on the incidence of opportunistic infections and leukemic relapse [108, 109]. In the first 100 days post-transplant, incidence and severity of acute GvHD are lower in paediatric UCBT recipients as compared to recipients of HSCT from unrelated donors, in spite of higher levels of HLA mismatch in UCBT [5, 110, 111]. This observation may simply be related to the  $\sim 1 \log_{10}$  lower nucleated cell dose used in UCBT. The overwhelming majority of T lymphocytes present in UCB are naïve, show little baseline cytotoxicity, and exhibit atypical functional properties. Indeed, they secrete lower levels of IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$  *in vitro*, and express lower levels of granzyme and perforin, molecules that are hallmarks of T<sub>H</sub>1 responses [112, 113]. Based on their production of high levels of IL-13,

UCB T cells also exhibit an anti-inflammatory  $T_H2/T_C2$  bias [114]. Following mitogen stimulation, a larger proportion of UCB-derived T cells express a terminally-differentiated phenotype (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) and a lower proportion exhibits bifunctional properties (*i.e.* cytolytic activity and IFN- $\gamma$  production) than T cells derived from adult blood [37]. In addition, when placed in an HLA-mismatched context, UCB CD8<sup>+</sup> T cells display reduced functionality following antigenic stimulation (*i.e.* clonal exhaustion, reduced cytolytic activity and IFN- $\gamma$  production) [37]. Finally, regulatory T cells present in the UCB could also contribute to the suppression of alloreactivity [115-117]. Thus, variant phenotype and biological functions of UCB-derived T lymphocytes are compatible with the reduced incidence of acute GvHD observed following UCBT.

NK cells are thought to play a beneficial role in the prevention of GvHD. In mice, adoptive transfer of IL-2-activated NK cells early after transplant inhibits GvHD, and this protective effect is dependent on TGF- $\beta$  [118]. Consistent with this, Ruggeri *et al.* showed that infusion of donor NK cells eliminates recipient APCs, effectively limiting T cell activation that would ultimately lead to GvHD [63]. Recently, Olson *et al.* demonstrated in a mouse model that NK cells prevented GvHD by directly inhibiting and/or killing autologous activated alloreactive T cells [119]. Clinical studies have tried to take advantage of this property of NK cells by mismatching KIR and KIR ligand between donors and recipients, leading to a clear reduction in the incidence of GvHD following BMT in adults [63]. However, two recent clinical trials failed to find such a beneficial impact of KIR-ligand mismatch in UCBT [64, 65]. In fact, Brunstein *et al.* even established that it led to a significantly higher incidence of grade III-IV acute GvHD following reduced intensity conditioning [65]. These adverse events were accounted for by the large variety of underlying diseases, by the use of double UCBT in this

particular study group, and/or by the fact that only one-third of the subjects received ATG as part of their conditioning regimen, suggesting that KIR-ligand mismatch-mediated inhibition of GvHD was at least partly dependent on T cell depletion [120]. Other possible explanations include: a) preferential expansion of NK cells in presence of T cell depletion leading to NK-mediated alloreactivity and reduced incidence of GvHD; and b) expression of KIR ligands by certain T cell subsets leading to increased GvHD in absence of T cell depletion. Additional studies will be required to sort out these alternatives.

### **Roles of T and NK cells in GvL.**

Given that subjects transplanted with UCB receive 1 log<sub>10</sub> fewer lymphocytes than BMT recipients, that the vast majority of UCB T cells are naïve, and that the incidence of GvHD is lower after UCBT, concerns were raised regarding the ability of UCB-derived lymphocytes to mediate GvL reactions. In fact, the risk of leukemic relapse is equal or even lower in UCBT *versus* BMT recipients [6, 15, 121]. Factors associated with relapse after UCBT include recipient CMV seropositivity [6], 6/6 donor-recipient HLA match [2] and delayed recovery of antiviral immune responses [122], all of which suggest active participation of T and/or NK cells in GvL.

Both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells can mediate Ag-specific cytotoxicity directed against leukemic cells. They recognize three classes of Ag: a) broadly-expressed mHAg [123, 124]; b) mHAg that are uniquely expressed by cells of the hematopoietic lineage; and c) leukemia-specific Ags (LSA), such as Wilms' tumor-1 (WT-1), preferentially expressed Ag of melanoma (PRAME), or fusion proteins (*e.g.* BCR-ABL) [125-128]. UCB is comprised of a diversified T

cell population that may include mHAg-specific T cells (Figure 3) [129]. Evidence that T cells are implicated in GvL initially stemmed from the fact that full donor T cell chimerism is crucial for preventing relapse [130, 131]. Moreover, Cohen *et al.* reported that patients exhibiting herpes virus-specific proliferative T cell responses at any time in the first 3 years following unrelated UCBT had a lower incidence of leukemic relapse and a higher overall rate of survival [90]. In addition, matching for NIMA was associated with reduced incidence of UCBT-related mortality and post-transplant relapse, suggesting that UCB T cells recognized and killed recipient leukemic cells [79]. While UCB T cells may protect against leukemic relapse in the early post-transplant period, their contribution to GvL is expected to increase over time as a result of thymic reconstitution. Together, these data indicate that improvement of T cell reconstitution should lead to improvements in outcome. The development of methods to selectively expand, activate, and use antitumoral T cells derived from UCB as components of adoptive immunotherapeutic regimens continues to be actively pursued [101, 132-136]. As immunotherapy shows optimal efficacy when residual malignancy is minimal, adoptive transfer of UCB-derived T cells should be performed early during the post-transplant period.

One limitation of T cell-mediated antitumoral immunity resides in the capacity of cancer cells to down-regulate cell surface MHC class I expression, leading to reduced target cell recognition by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Fortunately, this process sensitizes tumour cells to NK-mediated killing (Figure 3A). Alloreactive NK cells can kill various types of leukemic cells, including acute myeloid leukemia (AML), chronic myeloid leukemia (CML), and several types of myeloma [137]. However, *in vitro* studies showed that tumour cells from acute lymphoblastic leukemia (ALL), the most common tumour of hematopoietic origin in

children, resist NK cell cytotoxicity [138]. Resistance is associated with lack of leukocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) expression at the surface of leukemic cells and with reduced expression of MICA/MICB, two ligands of activating receptor NKG2D (Figure 3B) [139]. Strategies to enhance expression of MICA and MICB on leukemic cells (chromatin remodelling) or stimulatory receptors on NK cells (genetic modification of primary NK cells) were tested to counteract this resistance [140, 141]. KIR-KIR-ligand mismatch was also attempted to enhance the GvL potential of NK cells in HSCT recipients (Figure 3A). In the Eurocord-Netcord study, based on 218 children with acute leukemia, NK cell-mediated alloreactivity in unrelated UCBT was associated with significantly reduced incidence of relapse and heightened leukemia-free survival [64]. In contrast, Brunstein *et al.* showed that KIR-ligand mismatch had no significant effect on the relapse rate and overall survival following UCBT that involved myeloablative or reduced-intensity conditioning regimens [65]. Once again, T cell depletion (mediated by ATG) was a *sine qua non* condition to set NK-mediated GvL in motion (Figure 3B and Figure 4). Interestingly, Dalle *et al* demonstrated that ATG binds directly to NK cells and increases their production of IFN- $\gamma$  [67]. A higher nucleated cell dose in the graft and the absence of memory T cells were also associated with improved effectiveness of KIR-ligand mismatch to prevent leukemic relapse [142-145]. These data suggest that lack of competition by T cells for growth factors (IL-2, IL-7, and IL-15) leads to enhanced NK-mediated GvL following UCBT (Figure 4). NK alloreactivity was also documented in HLA-identical donor-recipient pairs without KIR-ligand mismatch, indicative of the possible involvement of other pathways of NK cell activation [145-147]. On the whole, NK cells appear to exert their major anti-leukemic effect during the first 3 to 6 months post-transplant, when competition by T cells for cytokines is minimal. UCB-derived NK cells can be expanded up to 20-fold *ex vivo* and differentiate into mature cytolytic cells



that could be potentially useful as an immunotherapeutic modality aimed at preventing leukemic relapse *via* enhancement of GvL [148, 149, 150].

## **CONCLUDING REMARKS**

UCB has gained widespread acceptance as a source of progenitor cells for HSCT, but many challenges remain. Engraftment must be improved, the incidence of graft failure has to be reduced, and myeloid and neutrophil reconstitution must be accelerated (Figure 4). One obvious means by which this could be achieved would be to increase cell dose. Since 2005, transplantation of double UCB units has been used to treat older children and adult patients in absence of fully matched BM donors [54]. Interestingly, only one of the two UCB units usually engrafts. Factors affecting the engraftment of one unit are not clearly established although the process appears to be influenced by the comparative degree of preservation and viability of CD34<sup>+</sup> HSCs and by CD8<sup>+</sup> T cells derived from the engrafting unit responding against the non-engrafting unit [151]. This recent observation emphasizes the importance of donor lymphocytes for achieving successful engraftment. Double UCBT is a promising approach to increase cellular dose. Further studies are needed to verify a possible increase risk of GvHD [54] and decreased risk of leukemic relapse [56].

Another serious challenge relates to the comparatively high incidence of OIs following UCBT. In theory, the absence of memory T cells in the UCB graft should represent a real handicap when rapid and optimal adaptive immune responses need to be mobilized. In

practice, a number of studies have now established that UCB-derived T lymphocytes are not intrinsically « immature » but are instead capable of mounting effective cytotoxic T cell responses in a variety of settings [37, 129, 152-154]. Novel strategies to expand and/or promote the maturation and differentiation of UCB-derived T lymphocytes have shown promise for the control of « early » virally-associated OIs (EBV, CMV, adenovirus) during the 100-days high-risk window [101, 102]. Analogous procedures could be developed for dealing with « late » OIs such as VZV. Moreover, alternatives to ATG conditioning that would spare UCB-derived virus-specific T cells should be further explored.

Incidence of acute GvHD is comparatively low following UCBT, but it remains a clinically significant complication of the procedure. Leukemic relapse is also a major concern. Donor-recipient KIR and/or NIMA mismatch should continue to be examined as a possible means to benefit from the properties of NK cells and T cells that are associated with the prevention of GvHD and with effective GvL. Another area of research that should be intensely explored concerns the relative impact of matching specific HLA class I and class II loci on UCBT-related complications and outcome, together with its influence on NK cell and T cell function. The generation of UCB-derived anti-leukemic T cells and their storage for future use also represents a promising approach to improve UCBT outcomes in the high-risk window.

In the context of paediatric UCBT, T cells and NK cells fight on different frontlines. Whereas the control of « early » and « late » OIs is primarily mediated by UCB-derived and *de novo* generated T cells, NK cells contribute chiefly to the prevention of both leukemic relapse and

acute GvHD. The complementarity between these two cell subsets should be taken advantage of in the context of novel, integrated immunotherapeutic strategies aimed at improving engraftment, accelerating immune reconstitution, and mitigating complications in UCB transplanted patients.

## LEGENDS TO TABLES AND FIGURES

### **Table 1: Advantages and disadvantages of umbilical cord blood transplantation compared to other sources of hematopoietic stem cells.**

HLA: human leukocyte antigen; GvHD: graft *versus* host disease; DLI: donor lymphocyte infusion.

### **Table 2: Properties of T cells and NK cells from umbilical cord blood as compared to cells from adult peripheral blood.**

NK: natural killer cells; Gr: granzymes; GrB: granzyme B; ICAM-1: inter-cellular adhesion molecule 1; IFN- $\gamma$ : interferon gamma; Th2/Tc2 T helper and T cytotoxic type 2; NFATc2: nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 2.

### **Figure 1: Kinetics of immune reconstitution and transplant-related complications in children following umbilical cord blood transplantation.**

The post-transplantation period can be divided in 3 phases. The pre-engraftment period (phase I, days 0-30) is characterized by general immunosuppression (*i.e.* depletion of lymphocytes in the recipient by anti-thymocyte globulin [ATG]), neutropenia, low platelets counts, and high susceptibility to fungal infections. Host residual antigen-presenting cells progressively disappear during phase I. Massive proliferation leads NK cells to reach normal levels within one month post-transplantation. They may represent 80% of the recipient's peripheral blood lymphocytes during the post-engraftment period (phase II; days 30-100).

During phase II, patients experience high susceptibility to bacterial infections, viral infections (*i.e.* cytomegalovirus [CMV]), and acute graft-*versus*-host disease (GvHD). Some umbilical cord blood T cells are believed to persist in the recipient and proliferate through homeostatic expansion. This period culminates with the *de novo* generation of T cells through thymopoiesis and the end of the 100-days high-risk window. The late phase (phase III) is characterized by a higher incidence of varicella-zoster virus (VZV) infection/reactivation and a progressive reconstitution of B cell and T cell subsets that can reach normal levels at 6-9 months post-transplant.

**Figure 2: Contrasting role of T cells and NK cells in the physiopathology of acute graft-*versus*-host disease following umbilical cord blood transplantation.**

The physiopathology of acute GvHD is relatively well understood. Acute GvHD occurs rapidly after HSCT (*i.e.* during the first 100 days). This period is characterized by a state of immune reactivity promoted by conditioning-induced lymphopenia, which damages host tissues and initiates a « cytokine storm » (Step 1). This in turn activates the recipient's dendritic cells (Step 2) that migrate into draining lymph nodes where they present antigens and activate donor CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. These are the major effectors of acute GvHD as they directly lyse host cells (Step 3). In contrast, NK cells prevent acute GvHD by eliminating recipient dendritic cells. The lower incidence and severity of acute GvHD following UCBT is generally attributed to the lower alloreactivity of UCB T cells. Rapid emergence of functional NK cells following UCBT concomitantly with T cells lymphopenia may also contribute to the lower incidence of acute GvHD.

**Figure 3: Involvement of T cells and NK cells in the graft-versus-leukemia effect.**

Both T and NK cells are critical for the prevention of leukemic relapse. In A, residual ATG and GvHD prophylaxis impair T cells reconstitution during the first 100 days post-transplantation. T cells do not compete with NK cells, which find the necessary cytokines to support their proliferation and activation. Donor-derived NK cells kill residual recipient DCs, interfering with T cell-mediated GvL. NK cells anti-tumoral cytotoxicity is further enhanced in the context of a donor-recipient KIR-KIR ligand mismatch and/or when leukemic cells lack MHC-I but express MICA/MICB at their surface. In B, following 100 days post-transplantation, reconstituted T cells compete with NK cells for key cytokines (*i.e.* IL-2, IL-7, IL-12, IL-15). NK cells no longer kill autologous donor-derived DCs presenting tumour Ags, which can efficiently prime T cells. MHC-I-expressing leukemic cells are recognized and killed by primed T cells. KIR: killer immunoglobulin-like receptor; ICAM-1: inter-cellular adhesion molecule 1; DC: dendritic cells; MHC: major histocompatibility complex; LFA-1: leukocyte function-associated antigen 1; UCB: umbilical cord blood; ATG: anti-thymocyte globulin. GvL: graft-versus-leukemia effect.

**Figure 4: NK cells, T cells and outcome of umbilical cord blood transplantation.** This figure highlights the complementary and contrasting roles of NK cells and T lymphocytes in graft failure, immune reconstitution, opportunistic infections, GvL, and GvHD. When T cells are present, they compete for IL-7 and IL-15, limiting their availability for NK cells. Alternative conditioning (less severe depletion of T lymphocytes), efficient thymopoiesis and expression of MHC-I on leukemic cells favour the development of T cell-mediated immunity. T cells may prevent graft failure, promote immune reconstitution, protect against

opportunistic infections and leukemic relapse. However, they may induce GvHD. Following UCBT, equilibrium shifts towards NK cells. Indeed, the T cell lymphodepletion triggered by the use of anti-thymocyte globulin (ATG) and the absence of memory T cells in the graft enable NK cells to find required cytokines in sufficient amounts. Moreover, lack of MHC-I expression on leukemic cells and KIR-KIR ligand mismatch are favourable conditions for NK-mediated alloreactivity while being detrimental to T cell function. The presence of efficient alloreactive NK cells may prevent graft failure, improve immune reconstitution, fight leukemic relapse and prevent GvHD. On the other hand, NK cells are incapable of preventing opportunistic infections and KIR-KIR ligand mismatch may even aggravate OI-related mortality. Immunotherapy based on the presence of these cells in the recipient or on their *in vitro* expansion should favour GvL without inducing GvHD. However, the relative inefficacy of NK cells at fighting off OIs argues for the use of immunotherapeutic modalities based on T lymphocytes, at least as long as GvHD can be kept under control.

## **AUTHORSHIPS**

N.M., E.C., M.D., and H.S. wrote the manuscript.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank Dr Sabine Herblot, Dr Armelle Le Campion, Doris G. Ransy and Paulo Cordeiro for critical reading of the manuscript. Supported by grants from le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and Héma-Québec (Quebec, Canada). N.M. was the recipient of doctoral scholarships from the Cole Foundation, Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine, and FRSQ. E.C. was supported by the Cole Foundation and Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine.

## REFERENCES

1. Gluckman, E., Broxmeyer, H. A., Auerbach, A. D., Friedman, H. S., Douglas, G. W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., Cooper, S., English, D., Kurtzberg, J., Bard, J., and Boyse, E.A. (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.***321**, 1174-1178.
2. Rubinstein, P., Carrier, C., Scaradavou, A., Kurtzberg, J., Adamson, J., Migliaccio, A. R., Berkowitz, R. L., Cabbad, M., Dobrila, N. L., Taylor, P. E., Rosenfield, R. E., and Stevens, C. E. (1998) Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N. Engl. J. Med.***339**, 1565-1577.
3. Barker, J. N., and Wagner, J. E. (2003) Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Cancer.***3**, 526-532.
4. National Marrow Donor Program: [www.wordmarrow.org](http://www.wordmarrow.org), (2010).
5. Wagner, J. E., Rosenthal, J., Sweetman, R., Shu, X. O., Davies, S. M., Ramsay, N. K., McGlave, P. B., Sender, L., and Cairo, M. S. (1996) Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood.***88**, 795-802.
6. Rocha, V., Cornish, J., Sievers, E. L., Filipovich, A., Locatelli, F., Peters, C., Remberger, M., Michel, G., Arcese, W., Dallorso, S., Tiedemann, K., Busca, A., Chan, K. W., Kato, S., Ortega, J., Vowels, M., Zander, A., Souillet, G., Oakill, A., Woolfrey, A., Pay, A. L., Green, A., Garnier, F., Ionescu, I., Wernet, P., Sirchia, G., Rubinstein, P., Chevret, S., and Gluckman, E. (2001) Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood.***97**, 2962-2971.
7. Hwang, W. Y., Samuel, M., Tan, D., Koh, L. P., Lim, W., and Linn, Y. C. (2007) A meta-analysis of unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in adult and pediatric patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.***13**, 444-453.
8. Gluckman, E., Rocha, V., Boyer-Chammard, A., Locatelli, F., Arcese, W., Pasquini, R., Ortega, J., Souillet, G., Ferreira, E., Laporte, J. P., Fernandez, M., and Chastang, C. (1997) Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N. Engl. J. Med.***337**, 373-381.
9. Rubinstein, P., Rosenfield, R. E., Adamson, J. W., and Stevens, C. E. (1993) Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood.***81**, 1679-1690.



10. Wagner, E., Duval, M., Dalle, J. H., Morin, H., Bizier, S., Champagne, J., and Champagne, M.A. (2006) Assessment of cord blood unit characteristics on the day of transplant: comparison with data issued by cord blood banks. *Transfusion*.**46**, 1190-1198.
11. Thomson, B. G., Robertson, K. A., Gowan, D., Heilman, D., Broxmeyer, H. E., Emanuel, D., Kotylo, P., Brahmi, Z., and Smith, F. O. (2000) Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood*.**96**, 2703-2711.
12. Dalle, J. H., Duval, M., Moghrabi, A., Wagner, E., Vachon, M. F., Barrette, S., Bernstein, M., Champagne, J., David, M., Demers, J., Rousseau, P., Winikoff, R., and Champagne, M. A. (2004) Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplant*.**33**, 605-611.
13. Rocha, V., and Gluckman, E. (2006) Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biol. Blood Marrow Transplant*.**12**, 34-41.
14. Barker, J. N., Hough, R. E., van Burik, J. A., DeFor, T. E., MacMillan, M. L., O'Brien, M. R., and Wagner, J. E. (2005) Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source. *Biol. Blood Marrow Transplant*.**11**, 362-370.
15. Eapen, M., Rubinstein, P., Zhang, M. J., Stevens, C., Kurtzberg, J., Scaradavou, A., Loberiza, F. R., Champlin, R. E., Klein, J. P., Horowitz, M. M., and Wagner, J. E. (2007) Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet*. **369**, 1947-1954.
16. Kurtzberg, J., Prasad, V.K., Carter, S.L., Wagner, J.E., Baxter-Lowe, L.A., Wall, D., Kapoor, N., Guinan, E.C., Feig, S.A., Wagner, E.L., and Kernan, N.A. (2008) Results of the Cord Blood Transplantation Study (COBLT): clinical outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with hematologic malignancies. *Blood*.**112**, 4318-4327.
17. Pavletic, Z. S., Joshi, S. S., Pirruccello, S. J., Tarantolo, S. R., Kollath, J., Reed, E. C., Bierman, P. J., Vose, J. M., Warkentin, P. I., Gross, T. G., Nasrati, K., Armitage, J. O., Kessinger, A., and Bishop, M. R. (1998) Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant*.**21**, 33-41.
18. Le, B. K., Barrett, A. J., Schaffer, M., Hagglund, H., Ljungman, P., Ringden, O., and Remberger, M. (2009) Lymphocyte recovery is a major determinant of outcome after matched unrelated myeloablative transplantation for myelogenous malignancies. *Biol. Blood Marrow Transplant*.**15**, 1108-1115.

19. Kumar, S., Chen, M. G., Gastineau, D. A., Gertz, M. A., Inwards, D. J., Lacy, M. Q., Tefferi, A., and Litzow, M. R. (2003) Lymphocyte recovery after allogeneic bone marrow transplantation predicts risk of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*.**17**, 1865-1870.
20. Ishaqi, M. K., Afzal, S., Dupuis, A., Doyle, J., and Gassas, A. (2008) Early lymphocyte recovery post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with significant graft-versus-leukemia effect without increase in graft-versus-host disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*.**41**, 245-252.
21. Kim, D. H., Kim, J. G., Sohn, S. K., Sung, W. J., Suh, J. S., Lee, K. S., and Lee, K. B. (2004) Clinical impact of early absolute lymphocyte count after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol*.**125**, 217-224.
22. Locatelli, F., Maccario, R., Comoli, P., Bertolini, F., Giorgiani, G., Montagna, D., Bonetti, F., De, S. P., Rondini, G., Sirchia, G., and Severi, F. (1996) Hematopoietic and immune recovery after transplantation of cord blood progenitor cells in children. *Bone Marrow Transplant*.**18**, 1095-1101.
23. Niehues, T., Rocha, V., Filipovich, A. H., Chan, K. W., Porcher, R., Michel, G., Ortega, J. J., Wernet, P., Gobel, U., Gluckman, E., and Locatelli, F. (2001) Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children -- a Eurocord analysis. *Br. J. Haematol*.**114**, 42-48.
24. Moretta, A., Maccario, R., Fagioli, F., Giraldi, E., Busca, A., Montagna, D., Miniero, R., Comoli, P., Giorgiani, G., Zecca, M., Pagani, S., and Locatelli, F. (2001) Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp. Hematol*.**29**, 371-379.
25. Barlogis, V., Glasman, L., Brunet, C., Loundou, A. D., Lemarie, C., Galambrun, C., Thuret, I., Curtillet, C., Le, M. M., Bernard, F., Chambost, H., Calmels, B., Picard, C., Chabannon, C., Dignat-George, F., and Michel, G. (2011) Impact of viable CD45 cells infused on lymphocyte subset recovery after unrelated cord blood transplantation in children. *Biol. Blood Marrow Transplant*.**17**, 109-116.
26. Velardi, A., Ruggeri, L., Mancusi, A., Aversa, F., and Christiansen, F. T. (2009) Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Curr Opin Immunol*.**21**, 525-30.
27. Parham, P., and McQueen, K. L. (2003) Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev Immunol*.**3**, 108-22.
28. Lopez-Vergès, S., Milush, J. M., Pandey, S., York, V. A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., Norris, P. J., Nixon, D. F., and Lanier, L. L. (2010) CD57 defines a functionally distinct

- population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*.**116**, 3865-3874.
29. Le Garff-Tavernier, M., Béziat, V., Decocq, J., Siguret, V., Gandjbakhch, F., Pautas, E., Debré, P., Merle-Beral, H., and Vieillard, V. (2010) Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell*.**9**, 527-535.
  30. Beziat, V., Nguyen, S., Lapusan, S., Hervier, B., Dhedin, N., Bories, D., Uzunov, M., Boudifa, A., Trebeden-Negre, H., Norol, F., Marjanovic, Z., Marie, J. P., Vernant, J. P., Debre, P., Rio, B., and Vieillard, V. (2009) Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia*.**23**, 721-728.
  31. Björkström, N. K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M. A., Björklund, A. T., Flodström-Tullberg, M., Michaëlsson, J., Rottenberg, M. E., Guzmán, C. A., Ljunggren, H. G., and Malmberg, K. J. (2010) Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*.**116**, 3853-3864.
  32. Vago, L., Forno, B., Sormani, M. P., Crocchiolo, R., Zino, E., Di, T. S., Lupo Stanghellini, M. T., Mazzi, B., Perna, S. K., Bondanza, A., Middleton, D., Palini, A., Bernardi, M., Bacchetta, R., Peccatori, J., Rossini, S., Roncarolo, M. G., Bordignon, C., Bonini, C., Ciceri, F., and Fleischhauer, K. (2008) Temporal, quantitative, and functional characteristics of single-KIR-positive alloreactive natural killer cell recovery account for impaired graft-versus-leukemia activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*.**112**, 3488-3499.
  33. Nguyen, S., Dhedin, N., Vernant, J. P., Kuentz, M., Al, J. A., Rouas-Freiss, N., Carosella, E. D., Boudifa, A., Debre, P., and Vieillard, V. (2005) NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood*.**105**, 4135-4142.
  34. Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D'Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., Conte, R., Strowig, T., Moretta, A., Münz, C., Thiel, A., Moretta, L., and Ferlazzo, G. (2007) CD56brightCD16-killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J. Immunol*.**178**, 4947-4955.
  35. Brahmi, Z., Hommel-Berrey, G., Smith, F., and Thomson, B. (2001) NK cells recover early and mediate cytotoxicity via perforin/granzyme and Fas/FasL pathways in umbilical cord blood recipients. *Hum. Immunol*.**62**, 782-790.
  36. Garderet, L., Dulphy, N., Douay, C., Chalumeau, N., Schaeffer, V., Zilber, M. T., Lim, A., Even, J., Mooney, N., Gelin, C., Gluckman, E., Charron, D., and Toubert, A. (1998) The umbilical cord blood alphabeta T-cell repertoire: characteristics of a polyclonal and naive but completely formed repertoire. *Blood*.**91**, 340-346.

37. Merindol, N., Grenier, A. J., Caty, M., Charrier, E., Duval, A., Duval, M., Champagne, M. A., and Soudeyins, H. (2010) Umbilical cord blood T cells respond against the Melan-A/MART-1 tumor antigen and exhibit reduced alloreactivity as compared with adult blood-derived T cells. *J. Immunol.***185**, 856-866.
38. Mackall, C. L., Bare, C. V., Granger, L. A., Sharrow, S. O., Titus, J. A., and Gress, R. E. (1996) Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J. Immunol.***156**, 4609-4616.
39. Klein, A. K., Patel, D. D., Gooding, M. E., Sempowski, G. D., Chen, B. J., Liu, C., Kurtzberg, J., Haynes, B. F., and Chao, N. J. (2001) T-Cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.***7**, 454-466.
40. Komanduri, K. V., St John, L. S., de Lima, M., McMannis, J., Rosinski, S., McNiece, I., Bryan, S. G., Kaur, I., Martin, S., Wieder, E. D., Worth, L., Cooper, L. J., Petropoulos, D., Mollrem, J. J., Champlin, R. E., and Shpall, E. J. (2007) Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood.***110**, 4543-4551.
41. Gorla, R., Airo, P., Ferremi-Leali, P., Rossi, G., Prati, E., Brugnoli, D., and Cattaneo, R. (1993) Predominance of 'memory' phenotype within CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant.***11**, 346-347.
42. Eyrich, M., Leiler, C., Lang, P., Schilbach, K., Schumm, M., Bader, P., Greil, J., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Niethammer, D., and Schlegel, P. G. (2003) A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34+ peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. *Bone Marrow Transplant.***32**, 379-390.
43. Talvensaaari, K., Clave, E., Douay, C., Rabian, C., Garderet, L., Busson, M., Garnier, F., Douek, D., Gluckman, E., Charron, D., and Toubert, A. (2002) A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood.***99**, 1458-1464.
44. Robin, C., Bennaceur-Griscelli, A., Louache, F., Vainchenker, W., and Coulombel, L. (1999) Identification of human T-lymphoid progenitor cells in CD34+ CD38<sup>low</sup> and CD34+ CD38+ subsets of human cord blood and bone marrow cells using NOD-SCID fetal thymus organ cultures. *Br J Haematol.***104**, 809-819.
45. Goronzy, J. J., and Weyand, C. M. (2005) T cell development and receptor diversity during aging. *Curr. Opin. Immunol.***7**, 468-475.

46. Finocchi, A., Romiti, M. L., Di Cesare, S., Puliafito, P., Pensieroso, S., Rana, I., Pinto, R., Cancrini, C., De Rossi, G., Caniglia, M., and Rossi, P. (2006) Rapid T-cell receptor CD4+ repertoire reconstitution and immune recovery in unrelated umbilical cord blood transplanted pediatric leukemia patients. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.***28**, 403-411.
47. Canque, B., Camus, S., Dalloul, A., Kahn, E., Yagello, M., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Schmitt, C., and Gluckman, J. C. (2000) Characterization of dendritic cell differentiation pathways from cord blood CD34+CD7+CD45RA+ hematopoietic progenitor cells. *Blood.***96**, 3748-3756.
48. Murohara, T., Ikeda, H., Duan, J., Shintani, S., Sasaki, K., Eguchi, H., Onitsuka, I., Matsui, K., and Imaizumi, T. (2000) Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J. Clin. Invest.***105**, 1527-1536.
49. Crisa, L., Cirulli, V., Smith, K. A., Ellisman, M. H., Torbett, B. E., and Salomon, D. R. (1999) Human cord blood progenitors sustain thymic T-cell development and a novel form of angiogenesis. *Blood.***94**, 3928-3940.
50. Duval, M., Pedron, B., Rohrlich, P., Legrand, F., Faye, A., Lescoeur, B., Bensaid, P., Larchee, R., Sterkers, G., and Vilmer, E. (2002) Immune reconstitution after haematopoietic transplantation with two different doses of pre-graft antithymocyte globulin. *Bone Marrow Transplant.***30**, 421-426.
51. Ballen, K. K., Spitzer, T. R., Yeap, B. Y., McAfee, S., Dey, B. R., Attar, E., Haspel, R., Kao, G., Liney, D., Alyea, E., Lee, S., Cutler, C., Ho, V., Soiffer, V., and Antin, J. H. (2007). Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol. Blood Marrow Transplant.***13**, 82-89.
52. Brunstein, C. G., Barker, J. N., Weisdorf, D. J., DeFor, T. E., Miller, J. S., Blazar, B. R., McGlave, P. B., and Wagner, J. E. (2007) Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood.***110**, 3064-3070.
53. Barker, J. N., Weisdorf, D. J., DeFor, T. E., Blazar, B. R., McGlave, P. B., Miller, J. S., Verfaillie, C. M., and Wagner, J. E. (2005) Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood.***105**, 1343-1347.
54. Kang, H. J., Yoo, K. H., Lee, J. W., Kim, H., Lee, S. H., Sung, K. W., Park, K. D., Koo, H. H., Shin, H. Y., and Ahn, H. S. (2010) Double umbilical cord blood transplantation for children and adolescents. *Ann. Hematol.***89**, 1035-1044.
55. Verneris, M. R., Brunstein, C. G., Barker, J., MacMillan, M. L., DeFor, T., McKenna, D. H., Burke, M. J., Blazar, B. R., Miller, J. S., McGlave, P. B., Weisdorf, D. J., and Wagner, J. E.

- (2009) Relapse risk after umbilical cord blood transplantation: enhanced graft-versus-leukemia effect in recipients of 2 units. *Blood*.**114**, 4293-4299.
56. Voogt, P. J., Fibbe, W. E., Marijt, W. A., Goulmy, E., Veenhof, W. F., Hamilton, M., Brand, A., Zwann, F. E., Willemze, R., and van Rood, J. J (1990) Rejection of bone-marrow graft by recipient-derived cytotoxic T lymphocytes against minor histocompatibility antigens. *Lancet*.**335**, 131-134.
  57. Marijt, W. A., Kernan, N. A., Diaz-Barrientos, T., Veenhof, W. F., O'Reilly, R. J., Willemze, R., and Falkenburg, J. H. (1995) Multiple minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones can be generated during graft rejection after HLA-identical bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*.**16**, 125-132.
  58. Mattsson, J., Ringden, O., and Storb, R. (2008). Graft failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant*.**14**, 165-170.
  59. Murphy, W. J., Keller, J. R., Harrison, C. L., Young, H. A., and Longo, D. L. (1992) Interleukin-2-activated natural killer cells can support hematopoiesis in vitro and promote marrow engraftment in vivo. *Blood*.**80**, 670-677.
  60. Hirayama, M., Genyey, C., Brownell, A., and Kaplan, J. (1998) IL-2-activated murine newborn liver NK cells enhance engraftment of hematopoietic stem cells in MHC-mismatched recipients. *Bone Marrow Transplant*.**21**, 1245-1252.
  61. Siefer, A. K., Longo, D. L., Harrison, C. L., Reynolds, C. W., and Murphy, W. J. (1993) Activated natural killer cells and interleukin-2 promote granulocytic and megakaryocytic reconstitution after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Blood*.**82**, 2577-2584.
  62. Lanier, L. L. (1998) NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol*.**16**, 359-393.
  63. Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*.**295**, 2097-2100.
  64. Willemze, R., Rodrigues, C. A., Labopin, M., Sanz, G., Michel, G., Socie, G., Rio, B., Sirvent, A., Renaud, M., Madero, L., Mohty, M., Ferra, C., Garnier, F., Loiseau, P., Garcia, J., Lecchi, L., Kogler, G., Beguin, Y., Navarrete, C., Devos, T., Ionescu, I., Boudjedir, K., Herr, A. L., Gluckman, E., and Rocha, V. (2009) KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. *Leukemia*.**23**, 492-500.
  65. Brunstein, C. G., Wagner, J. E., Weisdorf, D. J., Cooley, S., Noreen, H., Barker, J. N., DeFor, T., Verneris, M. R., Blazar, B. R., and Miller, J. S. (2009) Negative effect of KIR

- alloreactivity in recipients of umbilical cord blood transplant depends on transplantation conditioning intensity. *Blood*.**113**, 5628-5634.
66. Dalle, J. H., Menezes, J., Wagner, E., Blagdon, M., Champagne, J., Champagne, M. A., and Duval, M. (2005) Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr. Res.***57**, 649-655.
  67. Dalle, J. H., Dardari, R., Menezes, J., Cordeiro, P., Champagne, M. A., and Duval, M. (2009) Binding of thymoglobulin to natural killer cells leads to cell activation and interferon-gamma production. *Transplantation*.**87**, 473-481.
  68. Lau, A. S., Sigaroudinia, M., Yeung, M. C., and Kohl, S. (1996) Interleukin-12 induces interferon-gamma expression and natural killer cytotoxicity in cord blood mononuclear cells. *Pediatr. Res.***39**, 150-155.
  69. Umemoto, M., Azuma, E., Hirayama, M., Nagai, M., Hiratake, S., Qi, J., Kumamoto, T., Komada, Y., and Sakurai, M. (1997) Two cytotoxic pathways of natural killer cells in human cord blood: implications in cord blood transplantation. *Br. J. Haematol.***98**, 1037-1040.
  70. Tanaka, H., Kai, S., Yamaguchi, M., Misawa, M., Fujimori, Y., Yamamoto, M., and Hara, H. (2003) Analysis of natural killer (NK) cell activity and adhesion molecules on NK cells from umbilical cord blood. *Eur. J. Haematol.***71**, 29-38.
  71. Xing, D., Ramsay, A. G., Gribben, J. G., Decker, W. K., Burks, J. K., Munsell, M. Li, S., Robinson, S. N., Yang, H., Steiner, D., Shah, N., McMannis, J. D., Champlin, R. E., Hosing, C., Zweidler-McKay, P. A., Shpall, E. J., and Bollard, C. M. (2010) Cord Blood Natural Killer Cells Exhibit Impaired Lytic Immunological Synapse Formation That Is Reversed With IL-2 Ex vivo Expansion. *J. Immunother.***33**, 684-696.
  72. van Heeckeren, W. J., Fanning, L. R., Meyerson, H. J., Fu, P., Lazarus, H. M., Cooper, B. W., Tse, W. W., Kindwall-Keller, T. L., Jaroscak, J., Finney, M. R., Fox, R. M., Solchaga, L., Forster, M., Creger, R. J., and Laughlin, M. J. (2007) Influence of human leucocyte antigen disparity and graft lymphocytes on allogeneic engraftment and survival after umbilical cord blood transplant in adults. *Br. J. Haematol.***139**, 464-474.
  73. Terakura, S., Azuma, E., Murata, M., Kumamoto, T., Hirayama, M., Atsuta, Y., Kodera, Y., Yazaki, M., Naoe, T., and Kato, K. (2007) Hematopoietic engraftment in recipients of unrelated donor umbilical cord blood is affected by the CD34+ and CD8+ cell doses. *Biol. Blood Marrow Transplant.***13**, 822-830.
  74. Jiang, Z., Adams, G. B., Hanash, A. M., Scadden, D. T., and Levy, R. B. (2002) The contribution of cytotoxic and noncytotoxic function by donor T-cells that support engraftment after allogeneic bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.***8**, 588-596.

75. Hexner, E. O., Danet-Desnoyers, G. A., Zhang, Y., Frank, D. M., Riley, J. L., Levine, B. L., Porter, D. L., June, C. H., and Emerson, S. G. (2007) Umbilical cord blood xenografts in immunodeficient mice reveal that T cells enhance hematopoietic engraftment beyond overcoming immune barriers by stimulating stem cell differentiation. *Biol. Blood Marrow Transplant.***13**, 1135-1144.
76. Martin, P. J. (1990) The role of donor lymphoid cells in allogeneic marrow engraftment. *Bone Marrow Transplant.***6**, 283-289.
77. Charak, B. S., Brown, E. G., and Mazumder, A. (1995) Augmentation of murine hematopoiesis by interleukin 2-activated irradiated T cells. *Transplantation.***60**, 589-594.
78. Carrington, M., and O'Brien, S. J. (2003) The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu Rev Med.***54**, 535-551.
79. van Rood, J. J., Stevens, C. E., Smits, J., Carrier, C., Carpenter, C., and Scaradavou, A. (2009). Reexposure of cord blood to noninherited maternal HLA antigens improves transplant outcome in hematological malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***106**, 19952-19957.
80. Muller, A. M., Linderman, J. A., Florek, M., Miklos, D., and Shizuru, J. A. (2010) Allogeneic T cells impair engraftment and hematopoiesis after stem cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***107**, 14721-14726.
81. Tomblyn, M., Chiller, T., Einsele, H., Gress, R., Sepkowitz, K., Storek, J., Wingard, J. R., Young, J. A., and Boeckh, M. J. (2009) Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol. Blood Marrow Transplant.***15**, 1143-1238.
82. Hamza, N. S., Lisgaris, M., Yadavalli, G., Nadeau, L., Fox, R., Fu, P., Lazarus, H. M., Koc, O. N., Salata, R. A., and Laughlin, M. J. (2004) Kinetics of myeloid and lymphocyte recovery and infectious complications after unrelated umbilical cord blood versus HLA-matched unrelated donor allogeneic transplantation in adults. *Br. J. Haematol.***124**, 488-498.
83. Beck, J. C., Wagner, J. E., DeFor, T. E., Brunstein, C. G., Schleiss, M. R., Young, J. A., Weisdorf, D. H., Cooley, S., Miller, J. S., and Verneris, M. R. (2010) Impact of cytomegalovirus (CMV) reactivation after umbilical cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.***16**, 215-222.
84. Benjamin, D. K. Jr., Miller, W. C., Bayliff, S., Martel, L., Alexander, K. A., and Martin, P. L. (2002) Infections diagnosed in the first year after pediatric stem cell transplantation. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **21**, 227-234.



85. Tomonari, A., Iseki, T., Takahashi, S., Ooi, J., Takasugi, K., Shimohakamada, Y., Ohno, N., Nagamura, F., Uchimarui, K., Tani, K., Tojo, A., and Asano, S. (2003) Varicella-zoster virus infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. *Br. J. Haematol.***122**, 802-805.
86. Vandebosch, K., Ovetchkine, P., Champagne, M. A., Haddad, E., Alexandrov, L., and Duval, M. (2008) Varicella-zoster virus disease is more frequent after cord blood than after bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.***14**, 867-871.
87. Burke, M. J., Vogel, R. I., Janardan, S. K., Brunstein, C., Smith, A. R., Miller, J. S., Weisdorf, D., Wagner, J. E., and Verneris, M. R. (2010) Early Lymphocyte Recovery and Outcomes after Umbilical Cord Blood Transplantation (UCBT) for Hematologic Malignancies. *Biol. Blood Marrow Transplant.* [Epub ahead of print]
88. Larghero, J., Rocha, V., Porcher, R., Filion, A., Ternaux, B., Lacassagne, M. N., Robin, M., Peffault de Latour, R., Devergie, A., Biscay, N., Ribaud, P., Benbunan, M., Gluckman, E., Marolleau, J. P., and Socie, G. (2007) Association of bone marrow natural killer cell dose with neutrophil recovery and chronic graft-versus-host disease after HLA identical sibling bone marrow transplants. *Br. J. Haematol.***138**, 101-109.
89. Kim, D. H., Sohn, S. K., Lee, N. Y., Baek, J. H., Kim, J. G., Won, D. I., Suh, J. S., Lee, K. B., and Shin, I. H. (2005) Transplantation with higher dose of natural killer cells associated with better outcomes in terms of non-relapse mortality and infectious events after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from HLA-matched sibling donors. *Eur. J. Haematol.***75**, 299-308.
90. Cohen, G., Carter, S. L., Weinberg, K. I., Masinsin, B., Guinan, E., Kurtzberg, J., Wagner, J. E., Kernan, N. A., and Parkman, R. (2006) Antigen-specific T-lymphocyte function after cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.***12**, 1335-1342.
91. Lin, S. J., Peacock, C. D., Bahl, K., and Welsh, R. M. (2007) Programmed death-1 (PD-1) defines a transient and dysfunctional oligoclonal T cell population in acute homeostatic proliferation. *J. Exp. Med.***204**, 2321-2333.
92. Gallez-Hawkins, G. M., Thao, L., Palmer, J., Dagens, A., Li, X., Franck, A. E., Tegtmeier, B., Lacey, S. F., Diamond, D. J., Forman, S. J., and Zaia, J. A. (2009) Increased programmed death-1 molecule expression in cytomegalovirus disease and acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.***15**, 872-880.
93. Soong, W., Schultz, J. C., Patera, A. C., Sommer, M. H., and Cohen, J. I. (2000) Infection of human T lymphocytes with varicella-zoster virus: an analysis with viral mutants and clinical isolates. *J. Virol.***74**, 1864-1870.

94. Arvin, A. M. (2000) Varicella-Zoster virus: pathogenesis, immunity, and clinical management in hematopoietic cell transplant recipients. *Biol. Blood Marrow Transplant.***6**, 219-230.
95. Schaap, A., Fortin, J. F., Sommer, M., Zerboni, L., Stamatis, S., Ku, C. C., Nolan, G. P., and Arvin, A. M. (2005). T-cell tropism and the role of ORF66 protein in pathogenesis of varicella-zoster virus infection. *J. Virol.***79**, 12921-12933.
96. Zerboni, L., Ku, C. C., Jones, C. D., Zehnder, J. L., and Arvin, A. M. (2005) Varicella-zoster virus infection of human dorsal root ganglia in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***102**, 6490-6495.
97. Ku, C. C., Zerboni, L., Ito, H., Graham, B. S., Wallace, M., and Arvin, A. M. (2004) Varicella-zoster virus transfer to skin by T Cells and modulation of viral replication by epidermal cell interferon-alpha. *J. Exp. Med.***200**, 917-925.
98. Abendroth, A., Morrow, G., Cunningham, A. L., and Slobedman, B. (2001) Varicella-zoster virus infection of human dendritic cells and transmission to T cells: implications for virus dissemination in the host. *J. Virol.***75**, 6183-6192.
99. Perruccio, K., Tosti, A., Burchielli, E., Topini, F., Ruggeri, L., Carotti, A., Capanni, M., Urbani, E., Mancusi, A., Aversa, F., Martelli, M. F., Romani, L., and Velardi, A. (2005) Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood.***106**, 4397-4406.
100. Feuchtinger, T., Matthes-Martin, S., Richard, C., Lion, T., Fuhrer, M., Hamprecht, K., Handgretinger, R., Peters, C., Schuster, F. R., Beck, R., Schumm, M., Lotfi, R., Jahn, G., and Lang, P. (2006) 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**, 64-76.
101. Micklethwaite, K. P., Savoldo, B., Hanley, P. J., Leen, A. M., Demmler-Harrison, G. J., Cooper, L. J., Liu, H., Gee, A. P., Shpall, E. J., Rooney, C. M., Heslop, H. E., Brenner, M. K., Bollard, C. M., and Dotti, G. (2010) Derivation of human T lymphocytes from cord blood and peripheral blood with antiviral and antileukemic specificity from a single culture as protection against infection and relapse after stem cell transplantation. *Blood.***115**, 2695-2703.
102. Hanley, P. J., Cruz, C. R., Savoldo, B., Leen, A. M., Stanojevic, M., Khalil, M., Decker, W., Mollidrem, J. J., Liu, H., Gee, A. P., Rooney, C. M., Heslop, H. E., Dotti, G., Brenner, M. K., Shpall, E. J., and Bollard, C. M. (2009) 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.***114**, 1958-1967.

103. Leen, A. M., Christin, A., Myers, G. D., Liu, H., Cruz, C. R., Hanley, Kennedy-Nasser, A. A., Leung, K. S., Gee, A. P., Krance, R. A., Brenner, M. K., Heslop, H. E., Rooney, C. M., and Bollard, C. M. (2009) 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**, 4283-4292.
104. Okas, M., Gertow, J., Uzunel, M., Karlsson, H., Westgren, M., Karre, K., Ringden, O., Mattsson, J., and Uhlin, M. (2010) Clinical expansion of cord blood-derived T cells for use as donor lymphocyte infusion after cord blood transplantation. *J. Immunother*.**33**, 96-105.
105. Shlomchik, W. D., Couzens, M. S., Tang, C. B., McNiff, J., Robert, M. E., Liu, J., Shlomchik, M. J., and Emerson, S. G. (1999) Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*.**285**, 412-415.
106. Ferrara, J. L., Cooke, K. R., Pan, L., and Krenger, W. (1996) The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells*.**14**, 473-489.
107. Krenger, W., and Ferrara, J. L. (1996) Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Res*.**15**, 50-73.
108. Haczku, A., Alexander, A., Brown, P., Assoufi, B., Li, B., Kay, A.B., and Corrigan, C. (1994) The effect of dexamethasone, cyclosporine, and rapamycin on T-lymphocyte proliferation in vitro: comparison of cells from patients with glucocorticoid-sensitive and glucocorticoid-resistant chronic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*.**93**, 510-519.
109. Gratama, J.W., Würsch, A.M., Nissen, C., Gratwohl, A., D'Amaro, J., de Gast, G.C., van Rood, J.J., and Speck, B. (1986) Influence of graft-versus-host disease prophylaxis on early T-lymphocyte regeneration following allogeneic bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol*. **62**, 355-365.
110. Rocha, V., Wagner, J. E. Jr., Sobocinski, K. A., Klein, J. P., Zhang, M. J., Horowitz, M. M., and Gluckman, E. (2000) Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N. Engl. J. Med*.**342**, 1846-1854.
111. MacMillan, M. L., Weisdorf, D. J., Brunstein, C. G., Cao, Q., DeFor, T. E., Verneris, M. R., Blazar, B. R., and Wagner, J. E. (2009) Acute graft-versus-host disease after unrelated donor umbilical cord blood transplantation: analysis of risk factors. *Blood*.**113**, 2410-2415.

112. Berthou, C., Legros-Maida, S., Soulie, A., Wargnier, A., Guillet, J., Rabian, C., Gluckman, E., and Sasportes, M. (1995) Cord blood T lymphocytes lack constitutive perforin expression in contrast to adult peripheral blood T lymphocytes. *Blood*.**85**, 1540-1546.
113. Cantó, E., Rodriguez-Sanchez, J. L., and Vidal, S. (2003) Distinctive response of naïve lymphocytes from cord blood to primary activation via TCR. *J. Leukoc. Biol.***74**, 998-1007.
114. Ribeiro-do-Couto, L. M., Boeijs, L. C., Kroon, J. S., Hooibrink, B., Breur-Vriesendorp, B. S., Aarden, L. A., and Boog, C. J. (2001). High IL-13 production by human neonatal T cells: neonate immune system regulator? *Eur. J. Immunol.***31**, 3394-3402.
115. Godfrey, W. R., Spoden, D. J., Ge, Y. G., Baker, S. R., Liu, B., Levine, B. L., June, C. H., Blazar, B. R., and Porter, S. B. (2005) Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood*.**105**, 750-758.
116. Cupedo, T., Nagasawa, M., Weijer, K., Blom, B., and Spits, H. (2005) Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. *Eur. J. Immunol.***35**, 383-390.
117. Mold, J. E., Michaelsson, J., Burt, T. D., Muench, M. O., Beckerman, K. P., Busch, M. P., Lee, T. H., Nixon, D. F., and McCune, J. M. (2008) Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science*.**322**, 1562-1565.
118. Asai, O., Longo, D. L., Tian, Z. G., Hornung, R. L., Taub, D. D., Ruscetti, F. W., and Murphy, W. J. (1998) Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.***101**, 1835-1842.
119. Olson, J. A., Leveson-Gower, D. B., Gill, S., Baker, J., Beilhack, A., and Negrin, R. S. (2010) NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood*.**115**, 4293-4301.
120. Yabe, T., Matsuo, K., Hirayasu, K., Kashiwase, K., Kawamura-Ishii, S., Tanaka, H., Ogawa, A., Takanashi, M., Satake, M., Nakajima, K., Tokunaga, K., Inoko, H., Saji, H., Ogawa, S., Juji, T., Sasazuki, T., Kodera, Y., and Morishima, Y. (2008) Donor killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype-patient cognate KIR ligand combination and antithymocyte globulin preadministration are critical factors in outcome of HLA-C-KIR ligand-mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.***14**, 75-87.
121. Michel, G., Rocha, V., Chevret, S., Arcese, W., Chan, K. W., Filipovich, A., Takahashi, T. A., Vowels, M., Ortega, J., Bordigoni, P., Shaw, P. J., Yaniv, I., Machado, A., Pimentel, P., Fagioli, F., Verdeguer, A., Jouet, J. P., Diez, B., Ferreira, E., Pasquini, R., Rosenthal, J.,

- Sievers, E., Messina, C., Iori, A. P., Garnier, F., Ionescu, I., Locatelli, F., and Gluckman, E. (2003) Unrelated cord blood transplantation for childhood acute myeloid leukemia: a Eurocord Group analysis. *Blood*.**102**, 4290-4297.
122. Parkman, R., Cohen, G., Carter, S. L., Weinberg, K. I., Masinsin, B., Guinan, E., Kurtzberg, J., Wagner, J. E., and Kernan, N. A. (2006) Successful immune reconstitution decreases leukemic relapse and improves survival in recipients of unrelated cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant*.**12**, 919-927.
  123. Goulmy, E. 1997. Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol. Rev*.**157**, 125-140.
  124. Falkenburg, J. H., Marijt, W. A., Heemskerk, M. H., and Willemze, R. (2002) Minor histocompatibility antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions. *Curr. Opin. Hematol*.**9**, 497-502.
  125. Bergmann, L., Miething, C., Maurer, U., Brieger, J., Karakas, T., Weidmann, E., and Hoelzer, D. (1997) High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood*.**90**, 1217-1225.
  126. Menssen, H. D., Renkl, H. J., Rodeck, U., Maurer, J., Notter, M. , Schwartz, S., Reinhardt, R., and Thiel, E. (1995) Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia*.**9**, 1060-1067.
  127. Inoue, K., Sugiyama, H., Ogawa, H., Nakagawa, M., Yamagami, T., Miwa, H., Kita, K., Hiraoka, A., Masaoka, T., and Nasu, K. (1994) WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*.**84**, 3071-3079.
  128. Inoue, K., Ogawa, H., Sonoda, Y., Kimura, T., Sakabe, H., Oka, Y., Miyake, S., Tamaki, H., Oji, Y., Yamagami, T., Tatekawa, T., Soma, T., Kishimoto, T., and Sugiyama, H. (1997) Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood*.**89**, 1405-1412.
  129. Mommaas, B., Stegehuis-Kamp, J. A., van Halteren, A. G., Kester, M., Enczmann, J., Wernet, P., Kogler, G., Mutis, T., Brand, A., and Goulmy, E. (2005) Cord blood comprises antigen-experienced T cells specific for maternal minor histocompatibility antigen HA-1. *Blood*.**105**, 1823-1827.
  130. Keil, F., Prinz, E., Moser, K., Mannhalter, C., Kalhs, P., Worel, N., Rabitsch, W., Schulenburg, A., Mitterbauer, M., and Greinix, H. (2003) Rapid establishment of long-term culture-initiating cells of donor origin after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, and significant prognostic impact of donor

- T-cell chimerism on stable engraftment and progression-free survival. *Transplantation*.**76**, 230-236.
131. Huisman, C., de Weger, R. A., de Vries, L., Tilanus, M. G., and Verdonck, L. F. (2007) Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*.**39**, 285-291.
  132. Joshi, S. S., Babushkina-Patz, N. N., Verbik, D. J., Gross, T. G., Tarantolo, S. R., Kuszynski, C. A., Pirruccello, S. J., Bishop, M. R., and Kessinger, A. (1998) Antitumor activity of human umbilical cord blood cells: A comparative analysis with peripheral blood and bone marrow cells. *Int. J. Oncol*.**13**, 791-799.
  133. Joshi, S. S., Tarantolo, S. R., Kuszynski, C. A., and Kessinger, A. (2000) Antitumor therapeutic potential of activated human umbilical cord blood cells against leukemia and breast cancer. *Clin. Cancer. Res*.**6**, 4351-4358.
  134. Clark, E. M., Joshi, D. S., Grimm, A. B., Joshi, A. D., Wang, P., and Joshi, S. S. (2010) Ultrastructural basis of enhanced antitumor cytotoxicity of cord blood-derived CTLs: a comparative analysis with peripheral blood and bone marrow. *Int. J Oncol*.**37**, 645-653.
  135. Mazur, M. A., Davis, C. C., and Szabolcs, P. (2008) Ex vivo expansion and Th1/Tc1 maturation of umbilical cord blood T cells by CD3/CD28 costimulation. *Biol. Blood Marrow Transplant*.**14**, 1190-1196.
  136. Davis, C. C., Marti, L. C., Sempowski, G. D., Jeyaraj, D. A., and Szabolcs, P. (2010) Interleukin-7 permits Th1/Tc1 maturation and promotes ex vivo expansion of cord blood T cells: a critical step toward adoptive immunotherapy after cord blood transplantation. *Cancer Res*.**70**, 5249-5258.
  137. Ruggeri, L., Mancusi, A., Burchielli, E., Capanni, M., Carotti, A., Aloisi, T., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A. (2008) NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol. Dis*.**40**, 84-90.
  138. Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R. S., Martelli, M. F., and Velardi, A. (1999) Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*.**94**, 333-339.
  139. Romanski, A., Bug, G., Becker, S., Kampfmann, M., Seifried, E., Hoelzer, D., Ottmann, O. G., and Tonn, T. (2005) Mechanisms of resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute lymphoblastic leukemia. *Exp. Hematol*.**33**, 344-352.
  140. Kato, N., Tanaka, J., Sugita, J., Toubai, T., Miura, Y., Ibata, M., Syono, Y., Ota, S., Kondo, T., Asaka, M., and Imamura, M. (2007) Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the

- susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia*.**21**, 2103-2108.
141. Imai, C., Iwamoto, S., and Campana, D. (2005) Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood*.**106**, 376-383.
  142. Giebel, S., Locatelli, F., Lamparelli, T., Velardi, A., Davies, S., Frumento, G., Maccario, R., Bonetti, F., Wojnar, J., Martinetti, M., Frassoni, F., Giorgiani, G., Bacigalupo, A., and Holowiecki, J. (2003) Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*.**102**, 814-819.
  143. Beelen, D. W., Ottinger, H. D., Ferencik, S., Elmaagacli, A. H., Peceny, R., Trenschele, R., and Grosse-Wilde, H. (2005) Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood*.**105**, 2594-2600.
  144. Pende, D., Marcenaro, S., Falco, M., Martini, S., Bernardo, M. E., Montagna, D., Romeo, E., Cognet, C., Martinetti, M., Maccario, R., Mingari, M. C., Vivier, E., Moretta, L., Locatelli, F., and Moretta, A. (2009) Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*.**113**, 3119-3129.
  145. Cook, M. A., Milligan, D. W., Fegan, C. D., Darbyshire, P. J., Mahendra, P., Craddock, C. F., Moss, P. A., and Briggs, D. C. (2004) The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood*.**103**, 1521-1526.
  146. Hsu, K. C., Keever-Taylor, C. A., Wilton, A., Pinto, C., Heller, G., Arkun, K., O'Reilly, R. J., Horowitz, M. M., and Dupont, B. (2005) Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood*.**105**, 4878-4784.
  147. Verheyden, S., Schots, R., Duquet, W., and Demanet, C. (2005) A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*.**19**, 1446-1452.
  148. Ayello, J., van de Ven, C., Cairo, E., Hochberg, J., Baxi, L., Satwani, P., and Cairo, M. S. (2009) Characterization of natural killer and natural killer-like T cells derived from ex vivo expanded and activated cord blood mononuclear cells: implications for adoptive cellular immunotherapy. *Exp. Hematol*.**37**, 1216-1229.

149. Velardi, A., Ruggeri, L., Mancusi, A., Aversa, F., and Christiansen, F. T. (2009) Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Curr. Opin. Immunol.***21**, 525-530.
150. Miller, J. S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., McNearney, S. A., Yun, G. H., Fautsch, S. K., McKenna, D., Le, C., Defor, T. E., Burns, L. J., Orchard, P. J., Blazar, B. R., Wagner, J. E., Slungaard, A., Weisdorf, D. J., Okazaki, I. J., and McGlave, P. B. (2005) Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood.***105**, 3051-3057.
151. Gutman, J. A., Turtle, C. J., Manley, T. J., Heimfeld, S., Bernstein, I. D., Riddell, S. R., and Delaney, C. (2010) Single-unit dominance after double-unit umbilical cord blood transplantation coincides with a specific CD8+ T-cell response against the nonengrafted unit. *Blood.***115**, 757-765.
152. Marchant, A., and Goldman, M. (2005) T cell-mediated immune responses in human newborns: ready to learn? *Clin. Exp. Immunol.***141**, 10-18.
153. Malhotra, I., Wamachi, A. N., Mungai, P. L., Mzungu, E., Koech, D., Muchiri, E., Moormann, A. M., and King, C. L. (2008) Fine specificity of neonatal lymphocytes to an abundant malaria blood-stage antigen: epitope mapping of Plasmodium falciparum MSP1(33). *J Immunol.***180**, 3383-3390.
154. Hermann, E., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Even, J., Rodriguez, P., Berthe, A., Gonzalez-Merino, E., Torrico, F., and Carlier, Y. (2002) Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood.***100**, 2153-2158.



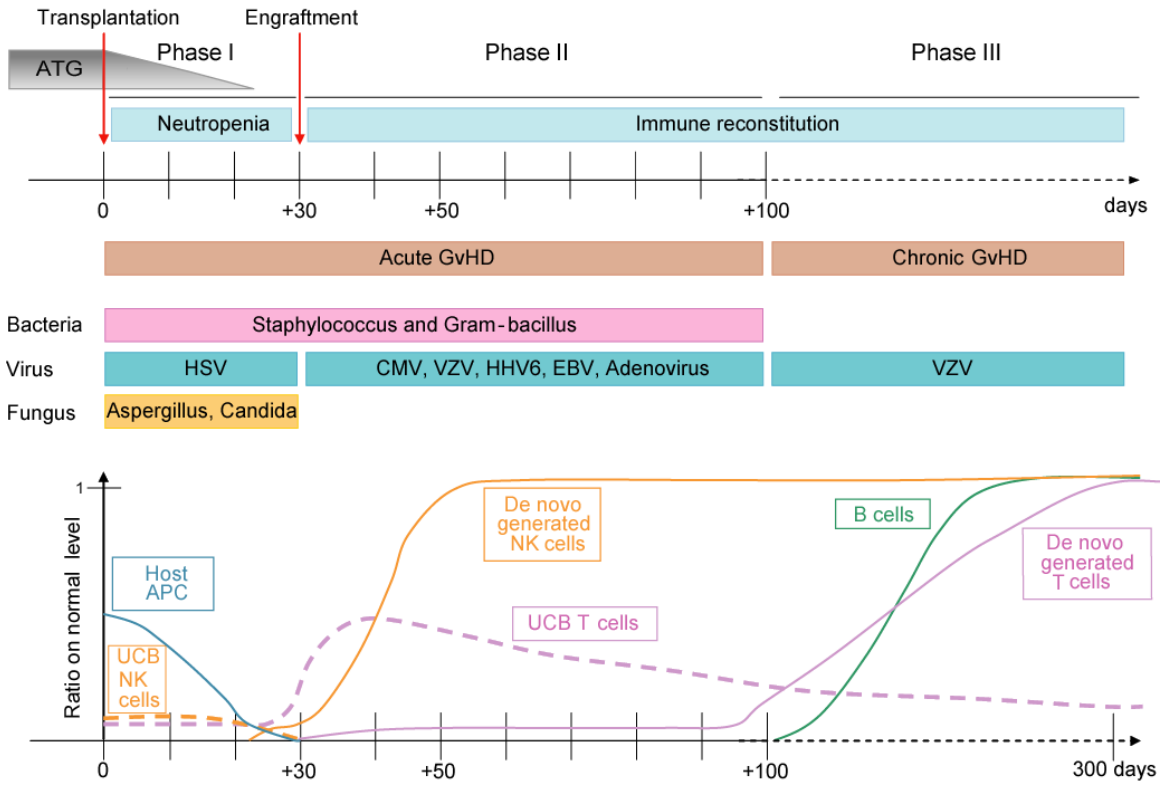
**Table 1.** Advantages and disadvantages of umbilical cord blood compared to other sources of hematopoietic stem cells.

<b>Advantages</b>	<b>Disadvantages</b>
Easier practical organization of transplant	Limited numbers of hematopoietic progenitor cells
Absence of risk for the donor	Higher incidence of graft failure
Improved ethnic balance	Delayed engraftment
Allows greater donor-recipient HLA disparity	Slower myeloid reconstitution
Lower incidence and severity of GvHD	DLI from the same donor is not possible
Lessened incidence of graft contamination with viruses	Increased infectious morbidity in the first 100 days post-transplant

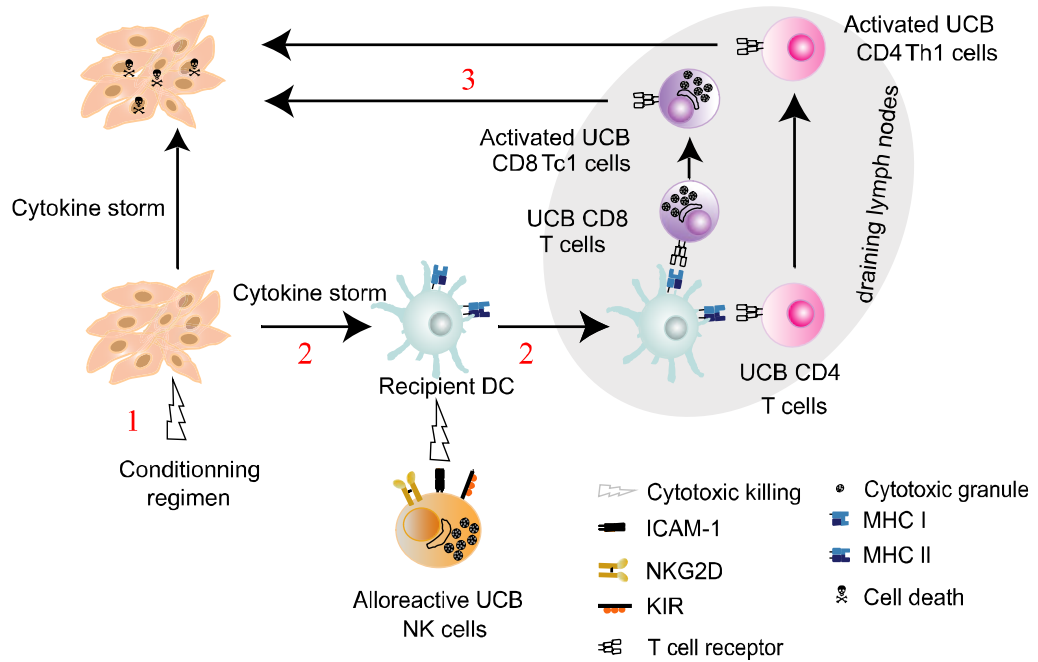
**Table 2.** Properties of T cells and NK cells from umbilical cord blood as compared to cells from adult peripheral blood.

	NK cells	T cells
Number and frequency	Frequency is higher (25% versus 8%)	Similar frequency, higher CD3 expression
Phenotype	Lower ICAM-1 and CD161 expression Fewer L-selectin <sup>+</sup> cells Lower CD8 and CD57 expression	Naïve CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup>
Proliferation and/or apoptosis	Lower to similar levels of proliferation <i>ex vivo</i>	Enter apoptosis more readily Higher telomerase expression
Cytokine production	Lower to similar levels of IFN- $\gamma$ production	T <sub>H</sub> 2/T <sub>C</sub> 2 bias Lower production of IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$ Higher production of IL-13
Cytotoxic potential	Higher expression of GrB and perforin Lower levels of <i>ex vivo</i> cytotoxicity	Lack of Gr and perforin secretion Lower NFATc2 expression

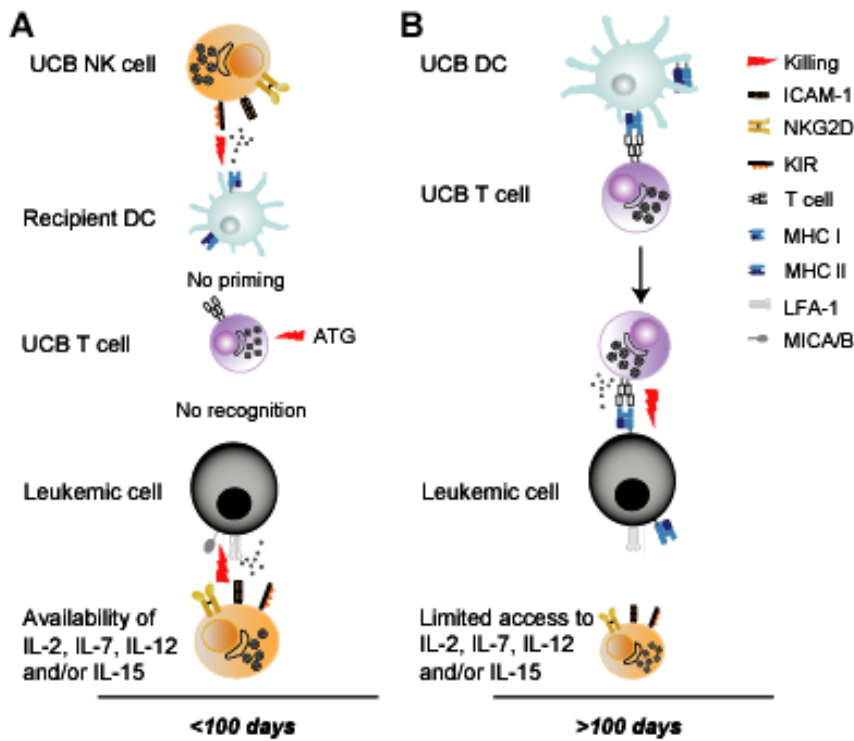
Merindol *et al.*, Figure 1



Merindol *et al.*, Figure 2.



Merindol *et al.*, Figure 3.



Merindol *et al.*, Figure 4.

